

2004-01235B

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

環境ホルモン受容体センシング法による
内分泌かく乱性の順位予測

平成14～16年度
総合研究報告書

平成17(2005)年4月

主任研究者
九州大学大学院理学研究院化学部門

下東 康幸

目 次

I. 総合研究報告 (総括研究報告) 環境ホルモン受容体センシング法による内分泌かく乱性の順位予測 下東康幸-----	1
(分担研究報告)	
1. エストロゲン受容体センシングのモノクローナル抗体の作製 坂口和靖・桑田 治-----	19
2. ポリクローナル抗体の設計作製、エピトープ解析および試験 野瀬 健-----	29
3. グルココルチコイド受容体等の cDNA クローニングと発現 白須直人-----	41
4. ファージディスプレイ法によるエストロゲン受容体センシング 抗体の作製 白須直人-----	45
(事業報告)	
1. (派遣事業報告) グルココルチコイド受容体の基礎生化学的解析 坂口和靖-----	51
2. (派遣事業報告) G タンパク質共役受容体作動性の化学物質による HEK293 細胞からの分泌ホルモン hCG α の同定 野瀬 健-----	55
3. (招へい事業報告) ショウジョウバエ脳神経系を用いた化学物質の 神経系リスク評価試験系の確立 下東康幸-----	59
4. (委託事業報告) ショウジョウバエの脳神経および卵産生における 継代的な化学物質応答解析 下東康幸-----	65
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	73
III. 研究成果の刊行物・別刷り-----	75

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（総合）研究報告

環境ホルモン受容体センシング法による内分泌かく乱性の順位予測

主任研究者 下東康幸 九州大学大学院理学研究院教授

研究要旨

本研究課題では、化学物質の女性ホルモン・エストロゲン受容体（ER）などの核内受容体を介した内分泌かく乱作用性を高精度に予測する方法を確立し、多数の化学物質の内分泌かく乱性の順位付けを行うことを目的とする。このため、抗体を核内受容体コンホメーション変化のセンシングトレーサーとして用いて、ホルモン受容体結合性とホルモン活性を同時に評価するアッセイ系の確立に取り組んだ。その結果、ER およびアンドロゲン受容体（AR）について、結合性を抗体応答有効濃度、ホルモン活性を最大抗体応答性として評価するアッセイ系の確立に成就し、この受容体センシング抗体法を核内受容体の全てに適用可能な方法論として確立した。そして、ER に関して目標の 503 種類の化学物質を試験・解析を完了し、内分泌かく乱性の順位付けを行った。さらに、受容体センシングのモノクローナル抗体を作製し、予測法の進化改良を実施した。ヒトに存在する 48 種の核内受容体の全てに化学物質のかく乱作用が懸念されるようになった現在、一般の核内受容体へもセンシング抗体法を適用すべく、グルココルチコイド受容体（GR）を始めとする核内受容体について、センシング抗体の作製、受容体のクローニング、タンパク質の発現などの研究実験に着手し、GR および甲状腺ホルモン受容体（TR）、プロゲステロン受容体（PR）、エストロゲン関連受容体（ERR α 、 β 、 γ ）の受容体感受性抗体の調製に成就した。この核内受容体センシング抗体法は、厚生労働行政の「化学物質総合対策研究分野」の内分泌かく乱性の順位付けに関する研究課題に直接的に資するものであり、今後、AR、TR、等の核内受容体について逐次に順位付けが期待される。

分担研究者

坂口和靖（九州大学大学院理学研究院
化学部門・助教授、現：北海道大学大
学院理学研究科化学専攻）

野瀬 健（九州大学大学院理学研究院
化学部門・助教授（助手より昇任））

（研究協力者）

桑田 治（社）日本食品衛生協会・九州大
学大学院理学府レサーチレジデント）

白須直人（社）日本食品衛生協会・九州大
学大学院理学府レサーチレジデント）

ン性か？ 抗ホルモン性か？）、強さについて精度の高い予測法が求められている。化学物質の内分泌かく乱作用の評価においては、① ホルモン受容体に結合するのか、結合しないのか？ 結合するとき、どの位強く結合するのか？ ② 受容体結合したのち、ホルモン作用を示すのか？ ③ ホルモン作用を持たずに阻害・遮断作用（抗ホルモン作用）なのか？ を判別しなければならない。現在検討されているスクリーニング法は、こうしたホルモン受容体への結合性、ホルモン活性、抗ホルモン活性の3つの活性についてそれぞれ別途に試験されねばならず、きわめて煩雑であり、非効率的である。したがって、これら3つの異なる活性を統合的に評価し、化学物質の内分泌かく乱作用性を高精度に予測する方法論の開発が急務である。

こうしたなか最近、我々は「化学物質のホルモン受容体への結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知・センシングする」

A. 研究目的

内分泌かく乱作用が懸念される非常に多数の既存の化学物質を、迅速にスクリーニングする方法が必要とされている。さらに、それらの内分泌かく乱作用の性質（ホルモ

という、全く新しい着想に基づく「ホルモン受容体結合能および活性化能の同時評価測定法」の開発に成功した。この方法は、ホルモン受容体にホルモンや化学物質が結合すると受容体がホルモン活性型（アゴニスト型）、あるいは不活性型（アンタゴニスト型）に構造（コンホメーション）変化する（図1）のを特異的な抗体で感知（センシング）しようとするものである。この方法は、化学物質のホルモン受容体結合活性のスクリーニングのみならず、ホルモン活性について同時に測定・評価することを可能にする方法である。本申請課題では、この方法を「化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法」として確立しようとするものである。この方法は原理的には、細胞核内の転写因子をホルモン受容体とする一連の核内受容体のすべてに適用できる方法である。これが確立すると、いわゆる「環境ホルモンの内分泌かく乱作用」問題について、化学物質の適正な評価基準策定の基盤データを与えると思われる。さらに、この方法は、厚生労働行政の「化学物質総合対策研究分野」の内分泌かく乱性の順位付けに関する研究課題を直接的に実現するものである。

本研究では、転写因子であり有機化合物をリガンドとする核内受容体について、化学物質の内分泌かく乱作用性の評価法を開発することを目的に、以下の項目について実施する。

- ① 女性ホルモン・エストロゲン受容体コンホメーションセンシング抗体を用いた、化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法の確立
- ② 核内受容体全般についての一般的な内分泌かく乱作用性の順位予測法の確立
- ③ 受容体コンホメーション変化センシングモノクローナル抗体の作製による予測法の進化改良

① に関しては、化学物質 503 種類についてポリクローナル・センシング抗体を用いて試験・解析から順位予測を実施すること、その結果を既報の試験結果と比較対照してその妥当性を証明することを完了要件とした。② に関しては、ER 以外の他の核内受容体でもセンシング抗体法が成立することを要件とし、アンドロゲン受容体 (AR) での試験を実施することとした。③ に関して

は、アゴニストとアンタゴニストを識別する抗体の選別と受容体応答性の高感度を指標にすることとした。

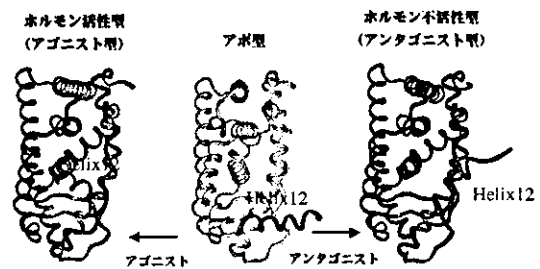


図1. 女性ホルモン・エストロゲン受容体の化学物質結合に伴うコンホメーション変化

B. 研究方法

【ポリクローナルセンシング抗体の調製】

(1) 抗原ペプチドの合成

エストロゲン受容体の第 12 ヘルックスに相当する断片ペプチドを抗原として設定し、このペプチドを Fmoc 固相法により合成した。タンパク質担体との結合のために、ペプチドの N 末端にシステインを加えたペプチドとした。合成粗生成物をゲルろ過 (Sephadex G-25, $\phi = 1.8 \text{ cm}$, $l = 75 \text{ cm}$) および逆相 HPLC (Lichrospher RP-18 (e), $\phi = 25 \text{ cm} \times 250 \text{ mm}$) により精製し、純粋な目的ペプチドを得た。目的物の確認は質量分析 (MALDI-TOF) により行った。

(2) 架橋試薬のキャリアタンパク質への結合

担体タンパク質として、キーホールリンペットヘモシアニン (KLH)、架橋試薬として 2 価性の *m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた。KLH の 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.2) 溶液 (16 mg/ μl) に、MBS の DMF 溶液 (3.6 mg/12 μl) を 9.3 μl 添加し、室温で 30 分攪拌した。反応液を遠心分離後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

(3) エピトープペプチドの KLH への結合

上記(1)で得られたペプチド 1 mg を添加した水溶液 500 μl に、トリス- (2-シアノエチル) ホスフィン水溶液 (5 mg/ml) を 200 μl 加えてシステインの SH 基を完全に遊離させた。これに、(2)で調製した KLH-MBS 複合体溶液 (230 μl) および 0.2 M Na_2HPO_4 (115 μl)

を加え、室温で3時間攪拌した。遠心後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

(4) ウサギへの免疫

(3)で調製した抗原溶液をフロイントのアジュバントとペプチド 0.1 mg/匹となるように混合してエマルジョンとし、ウサギ(ニュージーランドホワイト)(2匹)に免疫した。約3ヶ月後、耳静脈から採血し、十分な抗体価が得られていることを ELISA により確認した。

(5) 抗体の精製

ウサギより採血した血液 30 ml を 37°C で 1 時間、その後、4°C で終夜インキュベートした。遠心分離により血清と血餅を分画し、血清画分を抗血清とした。得られた抗血清を次に示す 2 段階で精製した。すなわち、まず、キャリアタンパク質 KLH に対する抗体を免疫沈降により除去し、次いで合成ペプチドを用いてアフィニティ精製した。

① 免疫沈降：最終濃度 0.5 mg/ml となるように 5 mg/ml の KLH 水溶液を粗血清に加えて、4°C で終夜インキュベートした。沈殿してくる抗 KLH 抗体複合体を遠心分離で除去した。この操作は、KLH 水溶液を加えても沈殿が析出してこなくなるまで繰り返した。

② アフィニティ精製

アガロース担体にヨードアセチルが架橋したゲル (SulfoLink Coupling Gel : Pierce 社) に Cys(SH)-ペプチドを反応させ、抗原ペプチドを架橋したゲル担体を調製した。これをアフィニティ担体としたアフィニティクロマトグラフィーにより抗体を精製した。

③ プロテイン A アフィニティ精製

Protein A を共有結合させたアガロースビーズ担体のカラム (Protein A AffinityPak™ Columns : Pierce 社) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより、抗体の IgG 成分を精製した。

(6) 調製した抗体のエストロゲン受容体に対する応答の解析

調製した抗体の女性ホルモン・エストロ

ゲン受容体に対する応答を ELISA により調べた。エストロゲン受容体 (10^{-7} ~ 10^{-12} M, 90 μ l) を 17 β -エストラジオール (10^{-6} ~ 10^{-10} M もしくは 0 M ; 10 μ l) と反応させた。

この溶液をあらかじめ調製しておいた抗原ペプチドを吸着させた 96 穴イムノプレートに全量移し、作製した抗体溶液 (10 μ l) を加えて 4°C で終夜インキュベートした。ELISA プレートの調製は、ウシサイログロブリンに結合した抗原ペプチドをプレートに吸着 (2.5 μ g/ μ l, 50 μ l/well) させ、室温 1.5 時間インキュベート後、洗浄し、ELISA キット (ELISAmate, KPL 社) 付属の BSA Diluent/Blocking Solution Concentrate を 10 倍に希釈したものによるブロッキングという操作手順により行った。そして、プレートを洗浄後、HRP 標識の 2 次抗体を反応させた。そして、洗浄後に基質 (過酸化水素 /2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)) を反応させて発色させ、405 nm の吸光度を測定した。基質は、ABTS Peroxidase Substrate と Peroxidase Solution B を使用直前に当量体積ずつ混合して調製し、添加量は 100 μ l/well とした。

分析の結果、リガンド未処理時 (リガンド非存在下) ではエストロゲン受容体の濃度依存的に吸光度が小さくなった。一方、 10^{-6} M の 17 β -エストラジオール処理時 (17 β -エストラジオールを受容体に結合させた状態) では、受容体の有無に関わらず吸光度はほぼ一定であった。受容体を加えていない系の吸光度と比較して、吸光度が小さいほど抗体は受容体に結合したことを意味する。したがって、抗体はリガンド非存在下でエストロゲン受容体を強く認識・結合し、一方、天然のエストロゲン・17 β -エストラジオールを受容体に結合させた状態では、抗体は受容体に結合できなくなることが判明した。

(7) センシングアッセイ

女性ホルモン受容体 (40 nM, 90 μ l) に対して化学物質 (10^{-11} ~ 10^{-5} M, 10 μ l) を室温で 1 時間反応させ、リガンド-受容体複合体を調製した。この溶液をあらかじめ調製した抗原ペプチドをコートした 96 穴イムノプレートに移した。プレートの調製はウシサイログロブリンに結合した抗原ペプチドをプレートに吸着 (2.5 μ g/ μ l, 50 μ l/well) させ、室温 1.5 時間インキュベ

ト後、洗浄し、ELISA キット (ELISAmate, KPL 社) 付属の BSA Diluent/Blocking Solution Concentrate を 10 倍に希釈したものによるブロッキングにより行った。リガンド受容体複合体溶液を移した 96 穴イムノプレートにセンシング抗体溶液 (10 μ l/well) を加えて 4 $^{\circ}$ C で終夜反応させた。溶液を一括除去により捨て、プレートを洗浄後、1/500 希釈の Horseradish Peroxydase (HRP) 標識 2 次抗体溶液 (50 μ l) を加えて室温で 1 時間反応させた。溶液を捨て、プレートを洗浄後、過酸化水素/ABTS を基質とした酵素反応により溶液を発色させた。基質は、ELISA キット付属の ABTS Peroxidase 基質と Peroxidase Solution B を使用直前に当量体積ずつ混合して調製し、添加量は 100 μ l/well とした。405 nm の吸光度を測定してプレート上のペプチドに結合した抗体量を定量した。

(8) センシングアッセイの解析法

受容体のコンホメーション変化量 (抗体応答) は、基準の女性ホルモン・17 β -エストラジオールに対する相対値として、プレートに残存する 2 次抗体の酵素活性値の測定値から、次式により算出できる。

$$D(\%) = (A - B) \times 100 / (C - B)$$

D: コンホメーション変化量 (抗体応答)

A: 受容体および試験化学物質を添加したときの測定値

B: 受容体のみ添加したときの測定値

C: 受容体および過剰量の女性ホルモンを添加したときの測定値

EC₅₀ 値の算出は以下のように行った (図 2)。まず、各化学物質の濃度に対して抗体応答をプロットし、抗体応答がプラトーに達したときの値を最大抗体応答性 R_{max}(%) として、これをグラフより算出した。さらに、得られたシグモイド様曲線を解析プログラム ALLFIT で数理解析し、R_{max}(%) 値の 50% に対応する化学物質濃度を抗体応答有効濃度 (EC₅₀) として、この値を算出した。また、上記のようにして求めた最大抗体応答性 R_{max}(%) は、試験化学物質が受容体を活性型コンホメーションに転化できる割合の最大値を示し、試験化学物質のホルモン活性を表すパラメータとなる。すなわち、

評価としては、抗体応答 (縦軸) はホルモン活性の強さの指標となり、EC₅₀ 値は化学物質と受容体との結合の強さの指標となる。

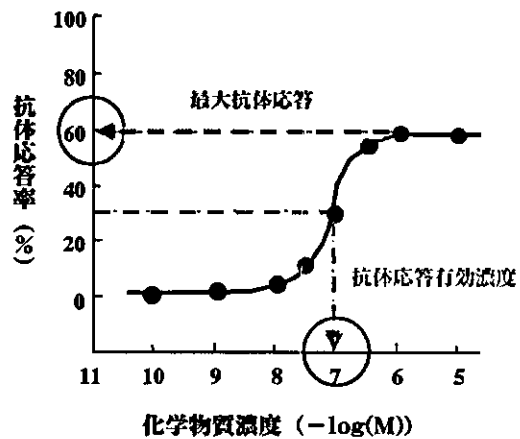


図 2. 受容体コンホメーション変化センシングアッセイの解析

(9) アンドロゲン受容体に対するコンホメーション変化センシングアッセイ

男性ホルモン・アンドロゲン受容体 (AR) に対するセンシング抗体アッセイは、基本的にエストロゲン受容体 (ER) のアッセイ系構築に準じて実施した。ポリクローナル抗体作製にあたっては、アンドロゲン受容体の第 12 ヘリックスに相当する断片ペプチドを抗原として設定し、このペプチドを Fmoc 固相法により合成した。以下は、上記の方法(1)~(8)に記されている ER の場合と同様に行った。

(10) その他の核内受容体に対する抗体の調製

ホルモン受容体 ER および AR 以外に、プロゲステロン受容体 (PR)、グルココルチコイド受容体 (GR)、エストロゲン関連受容体 (ERR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR) に対する抗体作製にあたっては、各受容体の第 12 ヘリックスに相当する断片ペプチドを抗原として設定し、ER の場合と同様に行った。

【モノクローナルセンシング抗体の調製】

(1) 抗原の調製とマウスへの免疫

エストロゲン受容体 (ER) のうちリガンドの結合により構造変化を起こすことが見出されている α ヘリックス 12 (H12) 部位付近の配列をもつペプチドを合成し、ポリクローナル抗体を作製した時と同様にキャ

リアタンパク質 KLH と結合させて免疫源とした。これを Balb/c マウスの足蹠に局所免疫し、9 日目以後肢大腿部より肥大したリンパ節を摘出した。リンパ細胞とマウス由来ミエローマ細胞とをポリエチレングリコールにより融合させて 96 ウェル培養プレート播き込んで培養した。ウェル中のハイブリドーマ細胞を順次 DMEM 培地に移して継代培養し、その培養上清を回収してスクリーニングに用いた。

(2) 抗体産生細胞のスクリーニング

培養上清に含まれる抗体を以下の 2 段階のスクリーニングで検定した。まず、ペプチドまたは ER を抗原とする間接 ELISA 法を一次スクリーニングとして実施し、これらの抗原に実際に結合する抗体の産生細胞を選別した。続いてペプチド抗原を固定化し ER を競合剤として用いた競合 ELISA 法による二次スクリーニングを実施した。ここで、ER のみを競合剤として用いた場合と ER にあらかじめリガンドであるエストラジオールを添加して用いた場合との間で ER への結合に差異のあるような抗体を探索した。

(3) センシングアッセイ法の確立

二次スクリーニングにおいてリガンドの有無に応じて異なる免疫反応性を示した抗体について、リガンド濃度を変化させて競合の程度が変化するかどうかを調べた。さらに競合 ELISA における抗体濃度、抗原量、受容体濃度などについての至適実験条件を詳細に検討した。その結果、女性ホルモンである 17β -エストラジオール (E_2) を基準アゴニスト物質として用いるコンホメーション変化センシングアッセイ法を確立した。さらにアンタゴニストの一つとして 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) を同様に用いて試験した。

(4) クローン化と腹水調製

センシング能を有するモノクローナル抗体の産生が確かめられたハイブリドーマは、

それぞれ限界希釈法でクローン化を進めた。さらにそのうちの一つについては、ハイブリドーマをマウスの腹腔内へ注射して飼育後に腹水を回収することにより、高濃度の抗体溶液を得た。

(5) 抗原認識部位の解析

センシング抗体の ER に対する認識部位を調べるため、免疫源および固相化抗原として用いたペプチドに加えて、配列が一部重複して N 端寄りの配列を持つペプチドを併用した間接 ELISA を行って、抗体の反応性を比較した。

(倫理面への配慮)

本研究課題では、抗体を作製するに当たって、ウサギやマウスなどの実験動物を使用する。こうした実験動物は、きちんと管理された環境下で飼育され、また、飼料、飲料水、さらには清浄空気を供するなど、十分な動物愛護の配慮のもとで実験に用いられる。また、採血等に際しても麻酔をしたりして痛みの無いように配慮するなど、倫理面での問題が全くない状況で行っている。所属部局・理学研究院でも「動物実験審査」システムが確立されており、審査を申請のうえ許可された。

一方、内分泌かく乱性の可能性のある化学物質を多数取り扱うが、量的にはきわめて少量であり、しかも、十分に換気されたチャンバー内で秤量し、希釈するなどの最大限の配慮をするので、特に危険性はない。実験室にはスクリーバが設置されたドラフトチャンバーが設備としてあり、また、揮発性試薬に対応するドラム式換気装置を実験室に備えている。さらに、研究に用いるファージはヒトに対する感染性が皆無であり、安全性の点でも問題がない。その他の実験に関しては、倫理上の問題を伴うものはない。

C. 研究結果

【エストロゲン受容体のコンホメーション変化センシング抗体法】

受容体に化学物質が結合すると、受容体が構造変化し、抗体の受容体への結合量が減少する。この減少の程度を化学物質の濃度を変えて測定すると、用量依存的な抗体応答性の変化として、相関曲線が描かれる。この曲線から抗体応答有効濃度 EC_{50} (nM) と最大抗体応答性 R_{max} (%) を算出する。この受容体コンホメーション変化センシング抗体法を、女性ホルモン・エストロゲン受容体 ER について内分泌かく乱作用が懸念されるとされた化学物質 503 種類について解析した。その代表的なプロットデータを図 3 に示す。

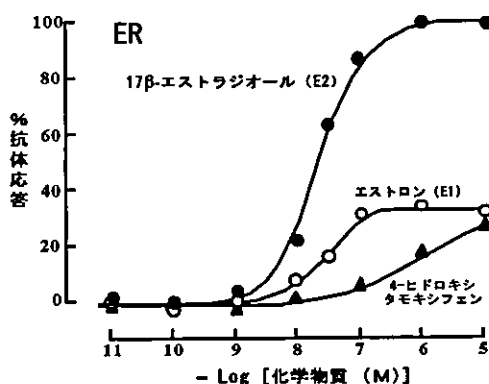


図 3. 各化学物質の用量依存曲線

用量依存曲線が描ける各々の化学物質について、抗体応答有効濃度 EC_{50} (M) とホルモン活性の程度を表す最大抗体応答性 (R_{max} %) を求める二次解析を実施した結果、これらはそれぞれ受容体結合試験から評定される受容体結合能およびレポーター遺伝子アッセイから評定されるホルモン活性と大まかに相関するものの、明確に収束した相関性は見られないことが判明した。図 4 に抗体応答有効濃度 EC_{50} (M) と受容体結合試験から評定される受容体結合能 IC_{50} (M) の良い正

の相関性を示す。

受容体センシング抗体法によって、ER について分析された 503 化学物質のうち 390 種類は、抗体に全く感応しなかった。残り 113 種類の化学物質については、応答有効濃度によるグループ化、次いで最大抗体応答性の序列化というスキームによって順位

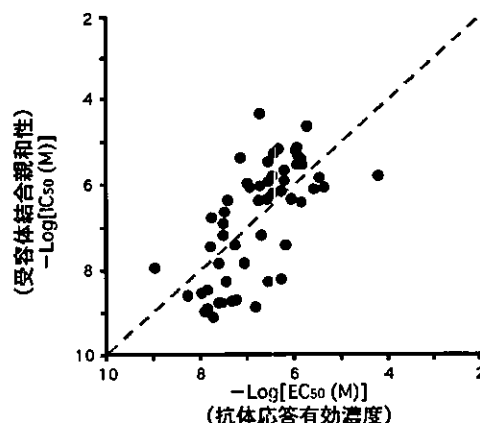


図 4. 抗体応答有効濃度と受容体結合能との間の正の相関性

予測が可能ながことが明らかとなった。その結果、抗体応答活性が非常に強い天然および合成エストロゲンを中心とした第 1 グループ 22 種、ある程度の強い活性を示す合成エストロゲンや天然エストロゲン誘導体を中心とした第 2 グループ 17 種、活性は弱いとその活性が明確に算定される化学物質の第 3 グループ 23 種、活性がきわめて弱く算定できない化学物質の第 4 グループ 51 種に分類された。受容体への結合能がきわめて弱く、したがって、 R_{max} (%) が非常に小さい化学物質 (第 4 グループ) は、 EC_{50} (M) がきわめて小さく、算定できなかった。また、不活性な化学物質 390 種は第 5 グループに分類した。

ポリクローナル抗体は、それぞれのコンホメーション変化構造に特異的な抗体の集合体と考えられる。したがって、もしこれらをモノクローナル抗体として別途に調製することができれば、アゴニストとアンタゴニストを区別ながら特異的に定量・測定

できるアッセイ系の構築が可能になる。この進化改良法を ER について実施し、まず、ER の H12 を抗原とするモノクローナル抗体を作製して解析した。その結果、センシングアッセイが可能なモノクローナル抗体が 3 種類得られた。

これらのうち、アゴニスト・ 17β -エストラジオール (E2) が誘起するコンホメーション変化を非常に高い特異性でセンシングする抗体 mAB1 (図 5) を用いたセンシングアッセイを実施し、ポリクローナル抗体の場合と比較した。その結果、両者の結果の間に強い正の相関が見られた。しかも、モノクローナル抗体の方が低い EC_{50} (M) を示し、感度がより高く (約 8 倍) なることが判明した (図 6)。その結果、受容体結合試験の結果と非常に良く一致し、センシング抗体法の抗体応答有効濃度 EC_{50} (M) と受容体結合試験から評定される受容体結合能 IC_{50} (M) の相関性の妥当性が証明された。また、モノクローナル抗体を使用した場合、アッセイに必要な抗体量も著しく少なくて済むことが分かった。

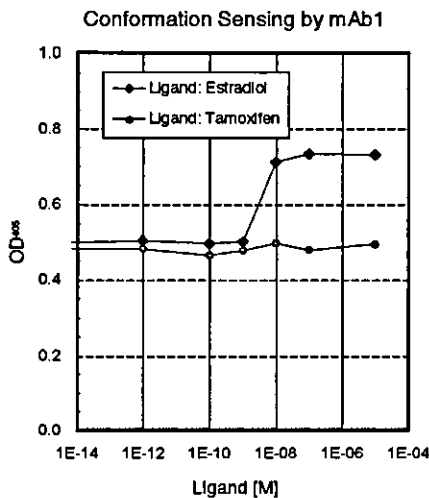


図 5. 17β -エストラジオール (E2) 特異的センシングモノクローナル抗体 mAB1

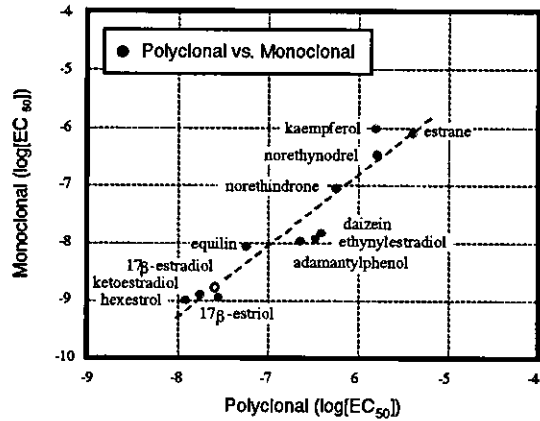


図 6. ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いた時のセンシング抗体法における抗体応答有効濃度の相関性

モノクローナル抗体 mAB1 を用いたセンシングアッセイを上記のグループ 1~3 の化学物質合計 62 種類について実施した。その結果、ポリクローナル抗体の場合と同様に、抗体応答有効濃度 EC_{50} (M) と受容体結合試験から評定される受容体結合能 IC_{50} (M) の良い正の相関性が示めされた。しかし、予想されたとおり、すべての化合物について相関性がみられた訳ではなかった。抗体応答有効濃度に相関性のないものはモノクローナル抗体の性質 (特性) によるものと考えられる。また、最大抗体応答性とレポーター遺伝子活性の間には相関性があまり見られなかったが、これもモノクローナル抗体の性質 (特性) によるものと考えられる。アンタゴニスト、あるいはインバースアゴニストである可能性があり、アンタゴニスト応答性のモノクローナル抗体 mAB2 を用いたアッセイで検討する必要がある。

ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の両方で抗体応答有効濃度と最大抗体応答性が算定できた化学物質は 62 種類のうち、45 種類であり、これらの結果をそれぞれ表 1、表 2 に示す。これらの結果を統合的に評価するために、現在、特に応答性の異なる化学物質について活性の再調査を含め、検証が必要である。

【アンドロゲン受容体のコンホメーション変化センシング抗体法】

男性ホルモン・アンドロゲン受容体 (AR) についても、エストロゲン受容体の場合と同様にまずポリクローナル抗体を作製した。抗原には α -ヘリックス 12 を中心とするペプチドを設定し、化学合成し、キャリアタンパク質に架橋したものをウサギに免疫して調製した。精製して得た抗体は十分な抗体価を示した。

センシングアッセイでは 5 α -デヒドロキシテストステロン (DHT) を標準化学物質 (ホルモン) として系の構築を検討した。その結果、DHT の結合していないアポ型受容体と 10 μ M DHT が結合しているホロ型受容体について、得られた抗体が有意な認識能力の差違 (約 30%) を示す条件設定に成就した。この条件下でアッセイした代表的な化学物質のセンシングアッセイの結果を図 7 に示す。DHT のほか、ノルゲストレル、ピנקロゾリン、17 β -エストラジオールに典型的な応答曲線、プロフィールが観察された。

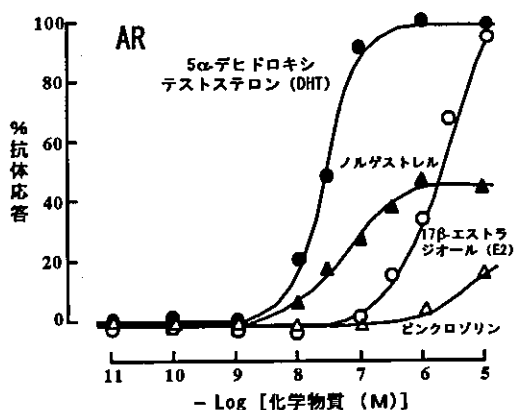


図 7. ポリクローナル抗体を用いたアンドロゲン受容体に対するセンシング抗体法

センシング抗体法による AR に対する試験を、化学物質 503 種に対して実施する。現

在まで、表 3 に示す一連の化学物質 100 種について詳細なアッセイを終了した。これらの化学物質は、これまでに AR に対して強い結合性が知られているもの、ある程度の結合性が知られているもの、結合しないことが知られているもので、試験することによって総括的な活性プロファイルが把握できる化合物群とした。

【その他の核内受容体のコンホメーション変化センシング抗体の調製】

抗原ペプチドの設計について、各種核内受容体の簡易ホモロジーモデリングより α -ヘリックス 12 を含む領域をエピトープ解析した。その結果に基づいて、まず、各種核内受容体に対する抗ウサギ・ポリクローナル抗体の作製に取り組んだ。調製方法および精製方法は、ER センシング抗体に習って順次に行った。その結果、現在までに、黄体ホルモン・プロゲステロン受容体 (PR) とグリコルチコイド受容体 (GR) に対する抗体について、精製を完了し、センシングアッセイ法の構築に成功した。

図 8 には、ER と AR を含めて、得られた抗体の抗原ペプチドと各受容体に対するタイターチェックの様子を表す。それぞれの抗体ともに高い応答性を示し、さらに受容体に対してやや強い反応性を示している。一方、図 9 にはこれらポリクローナルセンシング抗体を用いたアッセイの様子を比較・対照しながら示している。天然リガンド (ステロイドホルモン) といくつかの代表的な化学物質について試験した。その結果、それぞれのポリクローナル抗体が有効にそのセンシング応答性を示していることが分かる。

表1. ポリクローナル抗体によるエストロゲン受容体センシング抗体アッセイの結果
抗体応答有効濃度および最大抗体応答性

順位	化合物名	抗体応答有効濃度 (nM)	最大抗体応答性 (%)	順位	化合物名	抗体応答有効濃度 (nM)	最大抗体応答性 (%)
1	Diethylstilbestrol Dipropionate	1.03	41.0	33	Estriol 3-methylether	269	79.7
2	Estrone	4.88	38.0	34	Nafoxidine	273	34.0
3	Hexestrol	10.1	54.0	35	17 α -Ethinylestradiol-3-cyclopentaether	274	97.3
4	17-Epiestriol	11.6	102	36	Daidzein	324	38.0
5	Estriol	13.0	113	37	2,4,4'-Trihydroxybenzophenone	329	64.9
6	Diethylstilbestrol	13.5	79.0	38	5 α -Dihydrotestosterone	363	77.0
7	16-Ketoestradiol	14.9	64.4	39	Norethindrone	490	77.7
8	16 α -Hydroxyestrone	16.9	63.6	40	β -Zearalanol	506	47.0
9	Ethinyl estradiol	17.1	91.0	41	Isoliquiritigenin	555	42.1
10	Diethylstilbestrol	22.9	74.1	42	4,4-Dihydroxydiphenyl	565	65.1
11	17 β -Estradiol	23.1	100	43	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane	608	12.0
12	6 β -Hydroxyestradiol-17	23.3	42.0	44	4,4'-Dihydroxybenzophenone	610	56.9
13	6-Ketoestradiol	27.2	73.0	45	6-hydroxy-2-naphthylsulfide	716	37.0
14	β -Zearalanol	28.3	43.0	46	p-naphtholbenzein	833	42.0
15	Mestranol	29.2	82.0	47	6-hydroxyflavanone	969	43.0
16	α -Zearalanol	30.1	61.0	48	3',4',7-Trihydroxyisoflavone	1040	45.3
17	17 α -Estradiol	10.1	54.0	49	2,3,4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	1190	48.2
18	Dehydrostilbestrol	32.9	61.0	50	β -Estradiol-3-benzoate	1250	89.4
19	Coumestrol	35.8	61.0	51	Kaempferol	1280	50.6
20	6 α -Hydroxyestradiol	42.3	73.0	52	Norethynodrel	1360	109
21	Equilin	48.3	50.1	53	4-Cyclohexylphenol	1420	33.0
22	Estrone 3-hemisuccinate	54.6	31.9	54	6-Benzoyl-2-naphthol	2050	10.6
23	2-Methoxy- β -estradiol	67.4	80.7	55	Nonylphenol	2470	30.0
24	4-Hydroxyestradiol	81.0	85.0	56	6-Ketoestradiol-6-(o-carboxymethyl)oxime	3310	104
25	2-Hydroxyestriol	94.3	91.0	57	Levonorgestrel	3610	52.9
26	Estrone acetate	106	38.2	58	2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane	4080	78.0
27	5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	107	92.0	59	Benzyl-4-hydroxybenzoate	7660	112
28	2-Hydroxyestradiol	144	88.0	60	Triphenylethylene	8090	58.0
29	Genistein	175	56.0	61	4,4'-Dihydroxydiphenylmethane	55400	44.0
30	4,4'-Dihydroxytetraphenylmethane	177	41.0	62	4-Octylphenol	133000	48.0
31	4-(1-Adamantyl)phenol	194	51.0				
32	4,4'-Thiobis-phenol	241	58.9				

[注] 上記の順位は抗体応答有効濃度 EC₅₀ (M) に基づいて付けられている。

表 2. モノクローナル抗体 mAb1 によるエストロゲン受容体センシング抗体アッセイの結果：抗体応答有効濃度および最大抗体応答性

#	化合物名	有効濃度 (log[EC ₅₀])	抗体 応答性	#	化合物名	有効濃度 (log[EC ₅₀])	抗体 応答性
1	16-ketoestradiol	-8.93	1.08	24	diethylstilbestrol dipropionate	-7.39	0.80
2	Ethynyl estradiol	-8.63	1.28	25	Estrone	-7.34	0.46
3	Diethylstilbestrol	-8.63	1.09	26	2-methoxy-β-estradiol	-7.31	0.96
4	17-epiestriol	-8.58	0.97	27	Norethindrone	-7.15	1.10
5	α-zearalenol	-8.57	0.79	28	4-hydroxyestradiol	-7.07	0.72
6	17 β-estradiol	-8.55	1.00	29	Coumestrol	-7.07	0.94
7	6α-hydroxyestradiol	-8.52	0.91	30	β-estradiol-3-benzoate	-7.04	1.18
8	6-ketoestradiol	-8.50	0.86	31	3',4',7-trihydroxyiso-flavone	-7.00	1.16
9	Dihydroxytetraphenyl-methane	-8.49	0.13	32	Genistein	-6.81	0.76
10	17α-estradiol	-8.48	1.00	33	6-ketoestradiol-6-carboxymethyl)oxime (o-	-6.70	1.01
11	16α-hydroxyestrone	-8.47	0.96	34	Norethynodrel	-6.66	1.12
12	Estriol	-8.44	0.82	35	4-cyclohexylphenol	-6.66	0.40
13	6β-hydroxyestradiol-17β	-8.39	1.04	36	isoliquirtigenin	-6.63	0.98
14	Equilin	-8.38	0.72	37	4,4'-dihydroxydiphenyl	-6.56	0.68
15	4-(1-adamantyl)phenol	-8.28	0.56	38	4,4'-thiobis-phenol	-6.54	0.24
16	Diethylstilbestrol	-8.25	0.96	39	5α-dihydrotestosterone	-6.52	1.40
17	Estrone 3-hemisuccinate	-8.20	0.50	40	4,4'-dihydroxydiphenyl-methane	-6.43	0.25
18	estriol 3-methyl ether	-8.13	0.89	41	2,3,4,4'-tetrahydroxy-benzophenone	-6.20	0.83
19	Mestranol	-8.10	1.04	42	2,4,4'-trihydroxybenzo-phenone	-5.98	1.08
20	Dehydrostilbestrol	-8.04	0.79	43	β-zearalenol	-5.97	0.83
21	5α-androstane-3β,17β-diol	-7.99	1.05	44	kaempferol	-5.96	0.75
22	2-hydroxyestriol	-7.89	0.80	45	daizein	-5.32	1.22
23	17α-ethynylestradiol-3-cyclopenta ether	-7.66	1.27				

モノクローナル抗体 mAb1 でのアッセイ結果であり、順位を示す番号付けはしていない。抗体応答有効濃度 EC₅₀ (M) の小さい順番、すなわち、受容体結合性の強い順番に、左上から右下まで並べている。

表3. アンドロゲン受容体のコンホメーション変化センシング抗体により
アッセイされた化学物質

化学物質		化学物質	
1	Testosterone	26	4-Octylphenol
2	17 α -Methyltestosterone	27	4,4'-Dimethoxytriphenylmethane
3	5 α -Dehydrotestosterone	28	Diethylstilbestrol dipropionate
4	Androstenedione	29	Esfenvalerate
5	Levonorgestrel	30	Procymidon
6	Testosterone enanthate	31	<i>m</i> -chlorobenzophenone
7	5 α -Androstane-3 β ,17 β -diol	32	Hydrocortisone sodium succinate
8	Testosterone, 19-nor	33	Hydrocortisone 21-hemisuccinate
9	Norgestrel	34	4-Hydroxyazobenzene
10	Mesterolone	35	<i>ortho</i> -Aminoazotoluene
11	Testosterone acetate	36	4-Hydroxy-4'-dimethylaminoazobenzene
12	17 β -Estradiol	37	Maneb
13	Progesterone	38	Estriol 3-benzyl ether
14	Cortisol	39	5 α -Androstane
15	Vinclozolin	40	4-Cholesten-3-one
16	<i>p/p</i> -DDE	41	11 α -Acetoxyprogesterone
17	5 α -Androstane-3,17-dione	42	Deoxycorticosterone 21-hemisuccinate
18	Testosterone propionate	43	Corticosterone 21-sulfate potassium salt
19	Testosterone, 11-keto	44	<i>p</i> -(<i>tert</i> -amyl)phenol
20	Hydroxymethylprogesterone acetate	45	Dicyclohexyl Phthalate
21	β -Estradiol 3-benzoate 17-n-butyrate	46	Dibenzyl phthalate
22	Estriol 3-methyl ether	47	Butylbenzyl phthalate
23	Estrone 3-methyl ether	48	Alachlor
24	4-n-Amylphenol	49	Octachlorostyrene
25	<i>p-n</i> -Hexylphenol	50	Trifluralin

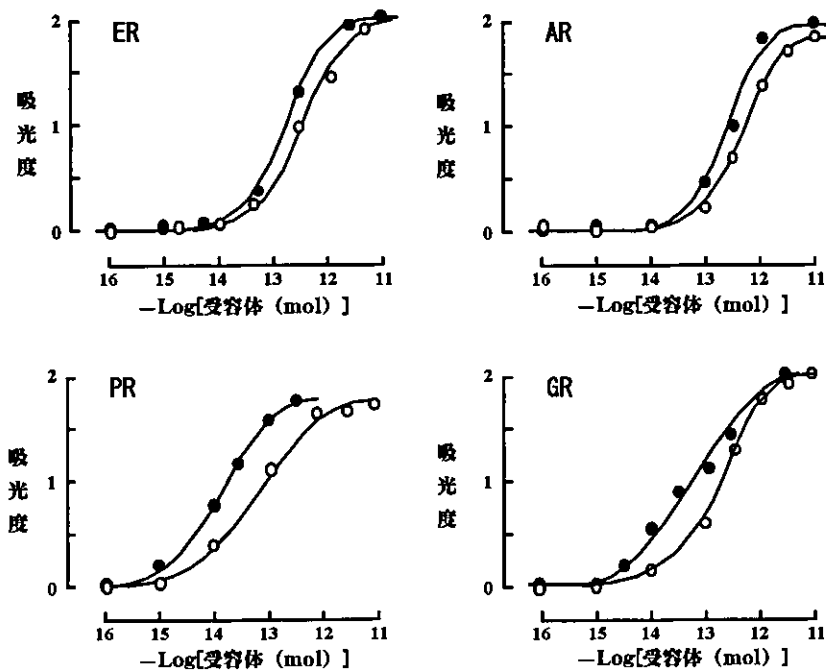


図8. 各種核内受容体に対するポリクローナル抗体の調製
抗原ペプチド (○) および受容体タンパク質 (●) に対するタイターチェック

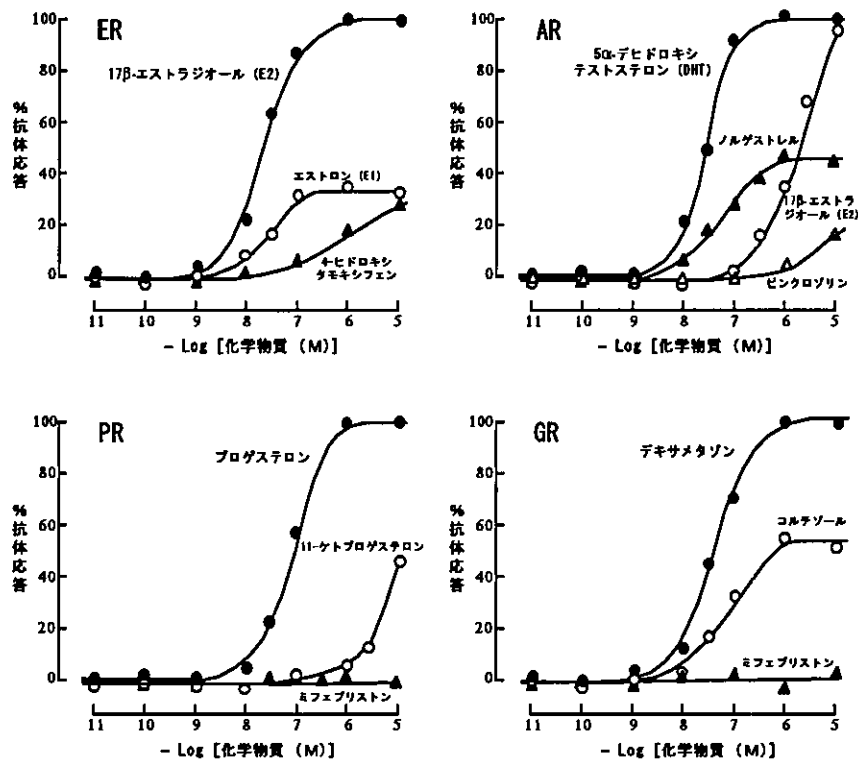


図9. ポリクローナル抗体による核内受容体4種類のセンシング抗体法の解析結果
 ER:エストロゲン受容体、AR:アンドロゲン受容体
 PR:プロゲステロン受容体、GR:グリコルコルチコイド受容体

D. 考察

ホルモンの結合に伴って起こる受容体（核内受容体）のコンホメーション変化の主要な構造要因は、受容体C端の α -ヘリックス12（H12）を含む部位がホルモンにフタをするように覆い被さる構造変化である。このため、ホルモンが結合することにより、疎水性面と親水性面の両方から成る両親媒性ヘリックスのH12は疎水性面をホルモン側にして受容体分子に結合することになり、受容体の分子表面にはH12の親水性面のみが現れている状態が創り出される。こうして、H12ペプチドに対して結合するポリクローナル抗体の抗体成分のうち、疎水性面に特異的に結合していた成分は受容体に結合できなくなる。この差違がセンシングアッセイの基本的な原理である。

こうした原理に基づいて、エストロゲ

ン受容体について、まず、ポリクローナル抗体を作製し、リガンド、あるいは化学物質の受容体結合に伴うコンホメーション変化をセンシングできるかを検討した結果、抗体応答の差違が約30~40%も起こること、これを基調にしてリガンド、あるいは化学物質の濃度に応じたコンホメーション変化量を定量できることが判明し、「核内受容体コンホメーション変化センシング」アッセイの基本的な要件が成立することが示され、受容体結合性を抗体応答有効濃度、ホルモン活性を最大抗体応答性として評価するアッセイ系の確立に成就した。さらに、男性ホルモン・アンドロゲン受容体についても全く同様なアッセイ系の確立に成功したことから、この受容体センシング抗体法を核内受容体の全てに適用可能な方法論として確立することができた。

さらに、ER センシング抗体を用いて 503 化学物質を試験し、 EC_{50} (M) を指標として、5 グループに分類されることが分かった。すなわち、抗体応答活性が非常に強い第 1 グループ、ある程度の強い活性の第 2 グループ、活性はかなり弱いとその活性が明確である第 3 グループ、活性がきわめて弱い第 4 グループ、そして、不活性な第 5 グループの合計 5 グループである。このうち、62 種類の化学物質は、活性の強弱から大まかなグループ (第 1~第 3 グループ) に分けられることが判明した (図 10)。 EC_{50} (M) と R_{max} (%) について 2 次解析した結果、 EC_{50} (M) と受容体結合試験の結果には良い正の相関性があることが判明した (図 4)。また、 R_{max} とレポーター遺伝子アッセイの結果も良い正の相関があった。受容体への結合能がきわめて弱く、したがって、 R_{max} (%) が非常に小さい化学物質 (第 4 グループ) 51 種類は、 EC_{50} (M) がきわめて小さく、算定できなかった。また、390 種類の化学物質は、エストロゲン受容体に全く応答しない化学物質群 (第 5 グループ) であった。

こうして、 EC_{50} (M) によるグループ化、次いで R_{max} (%) の序列化という手順・スキームによって、ER を介した内分泌かく乱作用性の順位予測について受容体結合能とホルモン活性を同時に測定評価する基本的解析法が確立された。抗体応答有効濃度を横軸に、最大抗体応答性を縦軸にして、ホルモン受容体の抗体応答性を各化学物質について解析した結果を例示すると、図 10 のようになる。抗体応答有効濃度 (横軸) を指標として見たとき、活性の強弱について第 1~第 3 グループに分けられる。受容体への結合能がきわめて弱く、したがって、抗体応答有効濃度がきわめて小さく、最大濃度での最大抗体応答性が非常に小さい化学物質群 (第 4

グループ) 51 種類は、抗体応答有効濃度が算定できず、図 10 にはプロットされない (表 2)。また、エストロゲン受容体に全く結合しない化学物質群 (第 5 グループ) も図 10 にはプロットされない。

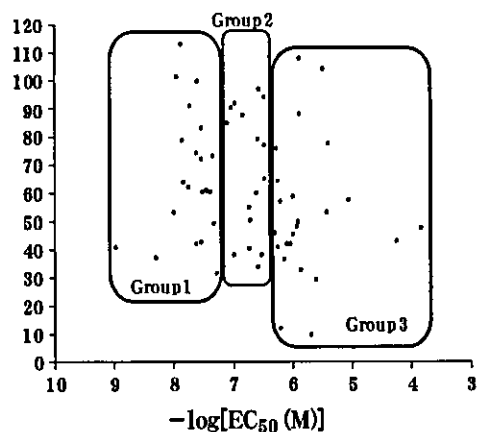


図 10. 化学物質のエストロゲン受容体
コンホメーション変化センシング
抗体による相互作用性解析

ポリクローナル抗体は、それぞれのコンホメーション変化構造に特異的な抗体の集合体と考えられる。したがって、もしこれらをモノクローナル抗体として別途に調製することができれば、アゴニストとアンタゴニストを区別ながら特異的に定量・測定できるアッセイ系の構築が可能になる。この進化改良法を ER について平成 14 年度より開始し、まず、ER の H12 を抗原とするモノクローナル抗体を作製して解析した。その結果、センシングアッセイが可能なモノクローナル抗体が 3 種類得られた。

これらのうち、アゴニスト・ 17β -エストラジオール (E2) が誘起するコンホメーション変化を非常に高い特異性でセンシングする抗体が 2 種類 (mAB1 および mAB3)、一方、アゴニスト E2 のみならず、アンタゴニスト・4-ヒドロキシタモキ

シフェン (HTM) の両方に応答性を示すモノクローナル抗体 1 種類 (mAB2) が得られた。特に後者の抗体は、E2 と HTM とで逆の応答性を示すことが判明し、アンタゴニストとアゴニストを「抗体認識の可・否」の応答性で識別できるため、定性的な解析にも、定量的な解析にも有用な分子ツールと期待され、きわめて重要な抗体を手にすることができた。

なお、エストロゲン様化学物質 62 種について、モノクローナル抗体 mAB1 を用いたセンシングアッセイを実施し、ポリクローナル抗体の場合と比較した。その結果、両者の結果の間に強い正の相関が見られた (図 6)。一方、モノクローナル抗体 mAB1 の方が低い EC_{50} (M) を示し、感度がより高く (約 8 倍)、受容体結合試験の結果と良く一致することが判明した。また、モノクローナル抗体を使用した場合、必要な抗体量も少なく済むことが分かった。

ところで、モノクローナル抗体 mAB1 を用いた解析においても、抗体応答有効濃度 EC_{50} (M) と受容体結合試験の受容体結合能 IC_{50} (M) との間に良い正の相関性が確認された (図 10)。一方、最大抗体応答性 R_{max} とレポーター遺伝子アッセイの結果との間には、必ずしも正の相関が見られず、これは期待された通りであった。すなわち、用いたモノクローナル抗体 mAB1 が、アゴニストである E2 が誘起するコンホメーション変化のみを特異的に識別する抗体であるため、このコンホメーションとは異なる構造に変化したものを同様に認識しえないためと思われる。こうした化学物質群が、アンタゴニストであるかどうかは試験されねばならず、これにはアンタゴニストが誘起するコンホメーション変化を感知するセンシング抗体が有効と思われる。現在、mAB2 を用いたアッセイを実施中であり、本研究課

題年度内にはこうした観点からの総括的な順位付けを完了の予定である。

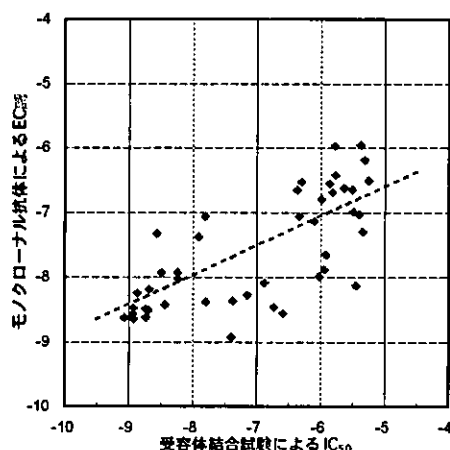


図 10. 抗体応答有効濃度と受容体結合能との間の正の相関性

モノクローナル抗体を用いる問題点としていくつかの点が明らかとなった。一つは、抗体の安定継代、量的な取得がかなり困難であること、もう一つは、300~500 クローンスクリーニングを個々に実施してようやく 1、2 個が入手できるという作製上の困難性である。こうした問題点を解決する単クローン抗体法として、抗体ファージディスプレイ法があり、現在 ER のコンホメーション変化センシング抗体について検討している。既に、特異的なファージ抗体作製の可能性があることが判明し、これについても今後検討して行く予定である。

2002 年ヒト・ゲノム解読の結果、核内受容体 48 種類の存在が明らかとなった。そして、化学物質の内分泌かく乱作用は、エストロゲンのみならず、すべての核内受容体を標的とした広領域な問題と認識されるようになった。受容体コンホメーション変化センシング抗体法は、すべての核内受容体に適用可能で、ER 以外の核

内受容体を介する、化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法を確立することは緊要の課題と思われる。

既にアンドロゲン受容体 AR については、ポリクローナル抗体によるセンシングアッセイ法を確立できた。また、同じ性ホルモン系のプロゲステロン受容体 PR、最近になって重要性が指摘されたグルココルチコイド受容体 (GR) についても、抗体の作製に成就した。また、これらの受容体の cDNA クローニング、発現ベクターへの組込み、受容体タンパク質の発現・精製などを逐次に進行している。48 種類をすべてポリクローナル抗体、モノクローナル抗体で実施するのは非常に困難を伴うと思われるが、ファージ抗体を用いると非常に現実的な課題となる。

化学物質のリスク評価、内分泌かく乱作用性のスクリーニングにおいて、エストロゲン関連受容体 (ERR α , β , γ) の解析は、エストロゲン受容体 ER β の解析も含めて、緊要の課題である。また、甲状腺ホルモン受容体 (TR) の解析は、特に、脳神経系への影響との関係で非常に重要である。この他、最近になってレチノイン酸 X 受容体 RXR に、トリブチルスズ (TBT) などの有機スズ化合物が非常に強く結合することが明らかにされた。このように、核内受容体へのさまざまな化学物質の影響は、特定の受容体系に集約して起こるよりも、どれもが暴露される可能性があり、その際の分子遭遇がお互いの分子どうしの結合性の有無、核内受容体側のコンホメーション変化の有無、など分子間の相互作用性に基づいて起こる要因が無視できないと思われる。

上述のように、化学物質の内分泌かく乱作用は、エストロゲンのみならず、すべての核内受容体を標的とした広領域な問題と認識されるようになってきた。本研究課題で方法論として確立した受容体

コンホメーション変化センシング抗体法は、すべての核内受容体に適用可能な方法である。コンホメーション変化センシング抗体法を、核内受容体を介する全般的な、化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法を確立することは緊要の課題と思われる。

E. 結論

化学物質の内分泌かく乱作用は、化学物質のホルモン受容体応答性に密接に関連している。こうしたなか、内分泌かく乱作用が懸念される非常に多数の既存の化学物質を、迅速に精度高くスクリーニングする方法が必要とされている。我々は、「化学物質のホルモン受容体への結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知・センシングする」という、全く新しい着想に基づく「ホルモンの受容体結合性およびホルモン活性の同時測定評価法」を開発した。本研究課題ではこのホルモン受容体コンホメーション変化センシング抗体法を核内受容体一般の評価法として確立することを第一の目的とした。その結果、エストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体の両方においてセンシング抗体法の確立に成功し、また、他の核内受容体でも抗体の調製に成就し、一般的に適用可能な方法として確立した。さらに、「化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法」として確立するために、化学物質 503 種についてエストロゲン受容体に対してセンシング抗体法を実施し、ポリクローナル抗体を用いたアッセイを完了した。その結果、抗体応答性の観測された 62 種の化学物質について、受容体結合性と抗体応答有効濃度 EC₅₀ (M) と受容体結合試験の受容体結合能 IC₅₀ (M) との間に良い正の相関性が確認された。また、最大抗体応答性 R_{max} とレポータ

一遺伝子アッセイの結果との間にも、大まかな正の相関が見られた。これらの結果を総合的に評価し、順位付けすることが可能なことが示された。

一方で、モノクローナル抗体を用いた詳細な検討を実施した。受容体結合性のある 62 種についてアゴニスト特異的なモノクローナル抗体での試験において、受容体結合性と抗体応答有効濃度に良い正の相関性があり、感度はポリクローナル抗体よりも 8 倍良好であることが判明した。今後、アンタゴニストに特異的な抗体応答の解析から ER については順位付けを完了の予定である。

受容体コンホメーション変化センシング抗体法は、化学物質の内分泌かく乱作用性を高精度に予測する方法論であり、すべての核内受容体に適用可能なスクリーニング法である。本研究課題では基盤技術の導入に成功した。今後、性ホルモン以外の多くの核内受容体について非常に多数の化学物質をスクリーニング方法として確立することは緊要の課題と思われる。

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

G. 研究発表

論文発表

1. Cloning and characterization of estrogen receptor α in *mummichog*, *Fundulus heteroclitus*, H. Urushitani, M. Nakai, H. Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu, and T. Uiguchi, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **203(1-2)**, 41-50 (2003).
2. Structure-function studies on the ligand-receptor π interactions, T. Nose, *Peptide Science* 2002, 9-12 (2003).
3. Biochemical evaluation of hormonal activity of endocrine disruptors by sensing

the estrogen receptor conformation changes, D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Tokunaga, T. Nose and Y. Shimohigashi, *Peptide Science* 2002, 127-130 (2003).

4. The structure-activity studies of *Drosophila* FMR family-related peptides, T. Tokunaga, M. Otani, A. Matsushima, T. Nose, M. Shimohigashi, S. Aimoto, and Y. Shimohigashi, *Peptide Science* 2002, 265-268 (2003).

5. The effect of the peptide corresponding to the No. 12 α -helix on the conformation change in the estrogen receptor activation, H. Ishimori, D. Asai, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose and Y. Shimohigashi, *Peptide Science* 2002, 437-438 (2003).

6. cDNA Cloning of the Housefly Pigment-dispersing Factor (PDF) Precursor Protein and Its Peptide Comparison among the Insect Circadian Neuropeptides, A. Matsushima, S. Sato, Y. Chuman, Y. Takeda, S. Yokotani, T. Nose, Y. Tominaga, Y. Shimohigashi and M. Shimohigashi, *J. Pept. Sci.*, **10**, 82-91 (2004).

7. Structural Characteristics of *Drosophila* Estrogen-related Receptor Ligand Binding Domain to Capture the Peptide and Non-peptide Ligands. X.H. Liu, A. Matsushima, N. Shirasu, Y. Tominaga, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi, and T. Nose: *Peptide Science* 2004, 303-304 (2005).

8. Highly Sensitive Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor. O. Kuwata, T. Honda, D. Asai, T. Tokunaga, A. Shibuya, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2004, 333-334 (2005).

9. Ligand-inducing Conformation Changes in the Estrogen Receptor C-Terminal Tail Moiety and Their Sensing by Polyclonal Antibodies. A. Shibuya, T. Tokunaga, D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2004, 351-354 (2005).

学会発表

1. 野瀬 健、中井 誠、浅井大輔、河野道昭、矢可部芳州、下東康幸、エストロゲン・女性ホルモン受容体のホモロジーモデリング、平成 14 年度日本生化学会九州支部例会、2002. 5. 18~19。
2. 浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、エストロゲン受容体コンホメーションセンシング抗体による内分泌かく乱物質のホルモン応答の生化学的評価、第 39 回ペプチド討論会、2002. 10. 16~18。
3. 石盛英樹、浅井大輔、中井 誠、矢可部芳洲、野瀬 健、下東康幸、エストロゲン受容体コンホメーション変化における第 12 α -ヘリックス相当ペプチドの受容体活性化への効果、第 39 回ペプチド討論会、2002. 10. 16~18。
4. 浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、坂口和靖、下東康幸、ホルモン受容体コンホメーションセンシング抗体による内分泌かく乱化学物質の統合的評価、日本内分泌攪乱物質学会第 5 回研究発表会、2002. 11. 25~26。
5. 徳永隆俊、浅井大輔、桑田 治、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、小泉 修、下東康幸、アンドロゲン受容体コンホメーション変化センシング抗体の作製、平成 15 年度日本生化学会九州支部例会、2003. 6. 1。
6. 渋谷あゆみ、浅井大輔、徳永隆俊、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、下東康幸、コンホメーション変化センシング抗体によるエストロゲン受容体応答の解析、平成 15 年度化学関連支部合同九州大会、2003. 7. 5。
7. 中垣雅之、山本典史、野瀬 健、下東康幸、関谷 博、環境ホルモン関連分子塩化ビフェニル類に関する幾何構造と電子構造、第 40 回化学関連支部合同九州大会、2003. 7. 5。
8. 桑田 治、本田 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、白須直人、野瀬 健、下東康幸、モノクローナル抗体を用いた高感度なエストロゲン受容体コンホメーション変化センシングアッセイ法、平成 15 年度日本内分泌攪乱化学物質学会、2003. 12. 2~3。
9. 徳永隆俊、浅井大輔、渋谷あゆみ、桑田 治、野瀬 健、中井 誠、矢可部芳州、毛利資郎、小泉 修、下東康幸、化学物質のエストロゲン受容体応答解析：コンホメーション変化センシング抗体による受容体結合能およびホルモン活性の同時評価、平成 15 年度日本内分泌攪乱化学物質学会、2003. 12. 2~3。
10. 野瀬 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、本田 健、桑田 治、白須直人、下東康幸、核内受容体コンホメーション変化センシング抗体を用いる内分泌かく乱物質リスク評価法における抗体設計法、平成 15 年度日本内分泌攪乱化学物質学会、2003. 12. 2~3。
11. 桑田 治、本田 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、白須直人、野瀬 健、下東康幸、化学物質のエストロゲン受容体結合に伴うコンホメーション変化とモノクローナル抗体を用いる高感度センシングアッセイ法、平成 15 年度内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果発表会、2004. 1. 23~24。
12. 徳永隆俊、浅井大輔、近藤 薫、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、下東康幸、蛍光トレーサーを用いた環境化学物質の核内受容体（エストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体）に対する高効率結合試験、平成 15 年度内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果発表会、2004. 1. 23~24。
13. 野瀬 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、本田 健、桑田 治、白須直人、下東康幸、受容体のアポ/ホロ構造の差構造解析による受容体結合性予測用センシング抗体の開発、平成 15 年度内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果発表会、2004. 1. 23~24。
14. 松島綾美、横谷 聡、金木淳史、Ian A. Meinertzhagen、下東美樹、下東康幸、イェバエの脳神経ペプチド FMRFamide の cDNA クローニングと筋収縮活性、平成 16 年度日本生化学会九州支部例会、2004. 5. 29~30。
15. 渋谷あゆみ、徳永隆俊、浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、下東康幸、エストロゲン受容体 C 末端可動部分のコンホメーション変化と抗体によるセンシング、平成 16 年度日本生化学会九州支部例会、2004. 5. 29~30。

16. 渋谷あゆみ、エストロゲン受容体コンホメーション変化センシングアッセイ、第4回度泉屋コロキウム、2004. 8. 19~20。
17. 劉 暁輝、高柳明香、オーファン核内受容体：ヒトおよびショウジョウバエのエストロゲン関連受容体 (ERR) の構造機能相関関係、第4回度泉屋コロキウム、2004. 8. 19~20。
18. 桑田 治、本田 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、白須直人、野瀬 健、下東康幸、Highly Sensitibe Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor、1st Asia-Pacific International Peptide Symposium / 41st Japanese Peptide Symposium (APIPS-JPS 2004)、2004. 11. 1~3。
19. 渋谷あゆみ、徳永隆俊、浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、下東康幸、Ligand-inducing Conformation Changes in the Estrogen Receptor C-Terminal Tail Moiety and Their Sensing by Polyclonal Antibodies、1st Asia-Pacific International Peptide Symposium / 41st Japanese Peptide Symposium (APIPS-JPS 2004)、2004. 11. 1~3。
20. 劉 暁輝、松島綾美、白須直人、冨永佳也、下東美樹、下東康幸、野瀬 健、Structural Characteristics of *Drosophila* Estrogen-related Receptor Ligand Binding Domain to Capture the Peptide and Non-peptide Ligands、1st Asia-Pacific International Peptide Symposium/41st Japanese Peptide Symposium (APIPS-JPS 2004)、2004. 11. 1~3。
21. 徳永隆俊、桑田 治、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、毛利資郎、小泉 修、下東康幸、男性ホルモン・アンドロゲン受容体コンホメーション変化センシングアッセイの確立、平成 16 年度環境ホルモン学会、2004. 12. 14-15。
22. 渋谷あゆみ、徳永隆俊、浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、下東康幸、エストロゲン受容体コンホメーション変化センシング抗体のエピトープ選定、平成 16 年度環境ホルモン学会、2004. 12. 14-15。
23. 野瀬 健、徳永隆俊、渋谷あゆみ、浅井大輔、下東康幸、Computational structural analysis of the nuclear receptor conformation changes from the ligand-free apo form to the ligand-bound holo form、International Symposium: The Environmental Risk of Endocrine Disrupter -Fruits of Research and Future Perspectives-、2005. 1. 22~23。
24. 徳永隆俊、桑田 治、渋谷あゆみ、浅井大輔、毛利資郎、小泉 修、野瀬 健、中井 誠、矢可部芳州、下東康幸、The ELISA-based Conformation Change Sensing Assay: Simultaneous Evaluation of Receptor Binding and Hormonal Activity of Endocrine Disruptors、International Symposium: The Environmental Risk of Endocrine Disrupter -Fruits of Research and Future Perspectives-、2005. 1. 22~23。

H. 知的財産権の出願・登録状況

- (1) 特願 2002-297246 下東康幸・浅井大輔・中井 誠・矢可部芳洲「センシング抗体及び受容体コンホメーションセンシングアッセイ」
- (2) 特願 2002-324818 下東康幸・中井 誠・浅井大輔・矢可部芳洲「蛍光リガンド及び化学物質のアンドロゲン受容体への結合強度測定