

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

グルココルチコイド受容体等の cDNA クローニングと発現

分担研究協力者 白須直人 九州大学大学院理学研究院・リサーチ・レジデント
（（社）日本食品衛生協会）

研究要旨

我々は昨年度までに、エストロゲン受容体を介した環境化学物質の内分泌かく乱性の順位予測について、コンホメーションセンシング抗体を用いた測定評価系の構築に成功している。しかしながら、内分泌かく乱作用はヒトに存在する 48 種の核内受容体が複合的に関与する複雑な制御システムに対して化学物質が影響を及ぼした結果発現される可能性が強い。このため、性ホルモン受容体以外の核内受容体に対しても化学物質の内分泌かく乱作用性を評価する必要がある。本研究では、当面解析・評価がきわめて重要な核内受容体についてもコンホメーションセンシング試験を拡張させるため、必須となる各種核内受容体遺伝子のクローニングと受容体タンパク質の発現・精製を実施した。その結果、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 α 、 β 、 γ)、甲状腺ホルモン受容体 β (TR β) およびプロゲステロン受容体 (PR) の cDNA クローニングに成功した。また、GR および ERR β 、 γ については大腸菌を用いたタンパク質発現系を確立し、受容体タンパク質を量的に確保する目処をつけるに至った。

A. 研究目的

平成 15 年度までに、エストロゲン受容体 (ER) を介した環境化学物質の内分泌かく乱性の順位予測について、化学物質の ER への結合に伴う受容体のコンホメーション変化を感知する抗体を用いた測定評価系の構築を達成している。しかしながら、内分泌かく乱作用はヒトに存在する 48 種 (表 1) の核内受容体が複合的に関与する複雑な制御システムに対する化学物質の影響の結果生じる可能性が強い。なかでも、副腎皮質ホルモン・グルココルチコイド受容体 (GR) はほとんどすべての細胞に発現し、その生理機能も多岐に及んでいるが、これに対する環境化学物質の影響が危惧されている。また、ヒトゲノム解析の完成によって、

内分泌かく乱作用に直接的に関与する ER に加えて、エストロゲン関連受容体 3 種 (ERR α 、 β 、 γ) の存在が明らかになっており、ER α 、ER β を加えた 5 種の受容体が相互に関連した機能調節の存在と、これへの化学物質の複合的な影響が懸念されるようになった。したがって、これらの核内受容体に対する環境化学物質の内分泌かく乱作用性の予測・順位付けを行うことはきわめて重要である。ER に対して構築に成功しているコンホメーションセンシング試験をこれらの受容体についても拡張するためには、センシング能を有する特異的抗体のスクリーニング時および実試験において必要となる受容体タンパク質の取得が必須である。本研究では、当面の解析・評価が重要かつ必須な GR

や ERR 等の各種核内受容体について、遺伝子クローニングおよび受容体タンパク質発現・精製系の確立を試みることにした。

表1 ヒト核内受容体ファミリー^a

TR α	TR β	RAR α	RAR β
RAR γ	PPAR α	PPAR β	PPAR γ
Rev-erb α	Rev-erb β	ROR α	ROR β
ROR γ	LXR α	LXR β	FXR
VDR	PXR	CAR	HNF4 α
HNF4 γ	RXR α	RXR β	RXR γ
TR2	TR4	TLL	PNR
COUP α	COUP β	EAR2	ER α
ER β	ERR α	ERR β	ERR γ
GR	MR	PR	AR
NGFIB	NURR1	NOR1	SF1
LRH1	GCNF1	SHF	DAX

a: グレーの網かけは今回クローニングした核内受容体を示す。

B. 研究方法

各種核内受容体の cDNA クローニング

(1) 受容体遺伝子の増幅

内分泌かく乱作用が懸念される核内受容体として、GR、ERR α 、ERR β 、ERR γ 、甲状腺ホルモン受容体 β (TR β)、およびプロゲステロン受容体 (PR) の遺伝子を取得するため、それぞれの遺伝子特異的なプライマーをデザインした。これらを用いて、ヒト腎臓もしくはヒト子宮由来の cDNA を鋳型とした PCR を実施することで、目的とする核内受容体遺伝子の全長およびホルモン結合領域 (LBD) に相当する遺伝子断片を増幅した。

(2) 発現コンストラクトの作製

PCR によって得られた核内受容体遺伝子断片を適切な制限酵素 2 種を組合せ用

いて消化し、大腸菌用タンパク質発現ベクターである pGEX6P-1 へ組込んだ。これにより目的の核内受容体タンパク質はグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として発現可能となる。

(3) 大腸菌を用いたタンパク質の発現

作製した核内受容体発現プラスミドを宿主大腸菌 XL1-Blue および BL21 の 2 種へ形質転換した。これらの形質転換体を少量の液体培地中で終夜培養し、大量培地へと植菌して 37°C で本培養を実施した。対数増殖期 ($OD_{600} = \sim 0.4$) に達した際に isopropyl 1-thio- β -D-galactoside を最終濃度 1 mM となるように添加し、さらに 3 時間振盪培養してタンパク質を発現させ、遠心分離によって集菌した。

(4) 受容体タンパク質の抽出

タンパク質発現誘導後に集菌した菌体ペレットに対して、数種のプロテアーゼ阻害剤を含む氷冷緩衝液中でリゾチーム処理を行い、さらに Triton X-100 (2%) および *N*-lauroylsarcosin (0.7%) 存在下で超音波破碎して受容体タンパク質を抽出した。抽出液を遠心分離し、可溶性画分を得た。

(5) 受容体タンパク質の精製

得られた可溶性画分をグルタチオンセファロース 4B 担体と 4°C でインキュベートし、GST 融合受容体タンパク質を結合させた。担体を洗浄の後、界面活性剤と還元型グルタチオン 10 mM を含む緩衝液によって、目的の受容体タンパク質を溶出させた。Extracti-Gel (PIERCE 社) によって界面活性剤を除去した後、FPLC を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによってタンパク質を精製した。

C. 研究結果

ヒト腎臓および子宮由来 cDNA を鋳型として用いた PCR の結果、GR、ERR α 、ERR β および ERR γ の全長遺伝子および LBD 領域をコードする遺伝子断片が得られた。また、TR β については全長が、PR については LBD 領域の遺伝子断片が増幅できた。得られた核内受容体クローンを発現ベクター pGEX6P-1 へサブクローニングし、宿主菌へ導入してタンパク質発現をさせた結果、発現誘導によって目的とする分子量の発現産物量の増加が電気泳動によって確認された (図 1)。

現在までに、GR、ERR β および ERR γ の LBD 領域について検討を行った結果、これらのタンパク質は界面活性剤を用いた一連の抽出操作によって可溶性タンパク質として比較的少量に得られ、続くグルタチオンセファロース担体によるアフィニティ精製とゲルろ過クロマトグラフィーを経て、本培養液 1 L あたり 1~2 mg の最終精製物を得ることができた。

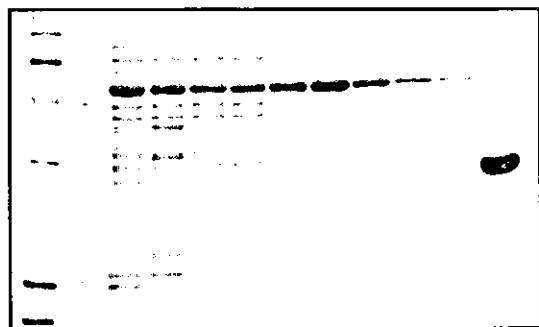


図 1 GR の電気泳動結果

レーン 1: マーカー (上から、200、116、66、45、31、21.5、14 kDa)、2: 発現誘導前、3: 発現誘導後、4: 不溶性画分、5: 可溶性画分、6: アフィニティ担体素通り画分、7: 担体結合画分、8~10: 溶出画分、11: 最終精製物 (GST-GR-LBD; 57.6 kDa)、12: GST 標品 (28.4 kDa)

D. 考察

当初、Triton X-100 存在下での超音波

破碎による菌体破碎、タンパク質抽出を試みたが、目的の発現産物のほとんどは不溶性画分として沈殿し、可溶性画分にはトレース量しか回収できなかった。菌体培養や発現誘導剤濃度等の検討を行っても顕著な改善は見られなかった。しかしながら、抽出条件の検討の結果、Triton X-100 に加えて陰イオン性界面活性剤である *N*-lauroylsarcosin を含む緩衝液中での超音波処理を行うことで、目的の受容体タンパク質の多くを可溶性タンパク質として回収することができた。得られた可溶性の GST 融合受容体タンパク質は、アフィニティ担体に対して良好な結合性を示したため、アフィニティ精製も効率的に遂行できた。

今回量的に得ることが可能となった GR や ERR に加えて、現在、TR や PR についてもタンパク質発現条件を検討中であり、これらと併行して各受容体に対する特異的抗体の作製を実施している。今後は、得られた受容体タンパク質を抗体スクリーニングに供してセンシング能を有する抗体を選別し、それらを用いたセンシング試験系を構築する予定である。

E. 結論

ER 以外の核内受容体についてのコンホメーションセンシング試験系構築に必要な受容体タンパク質を取得するため、ヒト GR、ERR α 、ERR β 、ERR γ 、TR β および PR 遺伝子の PCR クローニングを実施し、これを達成した。得られたクローンから大腸菌発現用コンストラクトを作製した。さらに、*N*-lauroylsarcosin を用いたタンパク質抽出によって、GR、ERR β および ERR γ のホルモン結合領域を可溶性タンパク質として量的に回収する系を確立した。

F. 健康危険情報

特に該当する情報はない。

G. 研究発表

研究開始直後であり、発表するまでの成果が現在のところ得られていない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究開始直後であり、出願・登録するまでの成果は現在のところ特に得られていない。

**厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告**

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

分担研究協力者 白須直人 九州大学大学院理学研究院・リサーチレジデント

研究要旨

我々はこれまでに、リガンド依存的なエストロゲン受容体のコンホメーション変化をセンシングするポリクローナルおよびモノクローナル抗体を作製し、当該受容体を介した環境化学物質の内分泌かく乱性の順位予測について、センシング抗体を用いた測定評価系の構築に成功している。しかしながら、内分泌かく乱作用は、ヒトに存在する 48 種類の核内受容体が複合的に関与する複雑な制御機構に対して化学物質が影響を及ぼした結果発現される可能性がきわめて強く、他の核内受容体群に対しても、化学物質の内分泌かく乱作用性を評価する必要がある。このためには、各受容体に対するコンホメーションセンシング抗体を作製せねばならないが、動物免疫や細胞融合を行う従来の抗体作製法は、費用と時間の双方において高コストで操作自体も煩雑であるため、多種類のセンシング抗体を得るためには、必ずしも最良の方法とはいえない。そこで本研究では、近年発展が著しい抗体ファージディスプレイ法を用いて、センシング抗体の取得を試みた。その結果、ヒト ER α のリガンド依存的なコンホメーション変化をセンシングする抗体を産生するファージを選別できる可能性が示された。本法は、従来のセンシング抗体作製法と比較してはるかに迅速かつ簡便であり、48 種という多種の核内受容体に対するセンシング抗体作製に適用できるものと考えられる。

A. 研究目的

ヒトゲノム解析の完成により、ヒトには 48 種の核内受容体が存在することが明らかにされた。環境化学物質による内分泌かく乱作用は、これらの核内受容体群が複合的に関与する複雑な制御システムに対する影響の結果生じる可能性が強い。事実、内分泌かく乱作用に直接的に関与するエストロゲン受容体 (ER) に加えて、エストロゲン関連受容体 3 種 (ERR α , β , γ) の存在が明らかとなっており、これらは一部の外因性リガンドをエストロゲン受容体と同じくすることが知られている。

ER にも α , β の 2 種が存在するため、

合計 5 種の受容体が相互に関連した機能調節機構の存在と、これへの化学物質の複合的な影響が懸念されるようになった。従って、48 種の核内受容体に対する環境化学物質の内分泌かく乱作用の予測・順位付けを行うことはきわめて重要である。我々は、核内受容体断片ペプチドを抗原とした動物免疫によって、コンホメーションセンシング能を有するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製に成功している。しかしながら、従来の動物免疫やハイブリドーマを用いた抗体作製法では、経済的・時間的なコストが非常に高く、免疫する宿主動物種にウサギやマウスなどを使用するため、哺乳類間

で高度に保存されているような抗原に対する高親和性抗体を得ることが難しい。また、動物免疫を経て得られる抗体は、ホスト内で強力に取捨選択されたものであるため、抗原認識や機能の多様性が低く抑えられる。これらのことは、48種という数多い核内受容体に対するコンホメーションセンシング抗体を得る上では大きなネックとなる。

一方、近年ではファージディスプレイ技術を用いた抗体作製法が進展してきた。ファージと呼ばれるウイルスの一種に抗体タンパク質を産生させるこの技術は、生体内の免疫システムを試験管の中で再現するものである。本法は、動物免疫を行うことなく抗体を得ることができるために上述のような従来の抗体作製法が内包していた種々の問題点が回避され、高効率にコンホメーションセンシング抗体が得られる可能性が高い。本研究では、ファージディスプレイ法を用いてヒト ER α に対するコンホメーションセンシング抗体の作製を試みた。

B. 研究方法

(1) 抗原ペプチド・抗原タンパク質の調製

リガンドの結合時に大きく構造変化を起こすことが知られている ER リガンド結合ドメイン (LBD) の 12 番目のヘリックス (H12) 付近の配列をもつペプチドを化学合成した。一方で、ER-LBD に相当する遺伝子断片をタンパク質発現ベクターである pGEX6P-1 へ組み込み、宿主大腸菌 BL21 へ導入した。これにより、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として ER-LBD を発現させ、グルタチオンセファロース 4B 担体を用いたアフィニティ精製を行って抗原タンパク質として用いる GST-ER-LBD を得た。

(2) バイオパンニング

ファージ抗体ライブラリーには、英国医学会議 (MRC) より入手した Tomlinson J ライブラリーを使用した。このライブラリーに含まれるファージは、抗体タンパク質の可変領域を単鎖化した遺伝子と G3P コートタンパク質遺伝子とが融合された遺伝子をもつため、対応する単鎖型抗体タンパク質がファージ表面に提示される (図 1)。

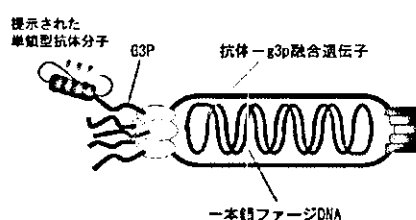


図 1. ファージ抗体の構造

一般にファージディスプレイ法では、①固定化抗原とファージライブラリーの結合、②洗浄、③結合ファージの溶出、④溶出ファージの大腸菌への再感染、⑤溶出ファージの増幅・回収、というバイオパンニングと呼ばれる一連の操作によって、抗原特異的な抗体を発現したファージ粒子を選択的に増幅させる。通常、このパンニングを 2~4 回程度繰り返すことで目的の抗体を得る (図 2)。

1回目のパンニング

H12 ペプチド (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS、含 10% トリフルオロエタノール (TFE)) をイムノチューブ (Maxisorp, Nunc 社) に加え、終夜インキュベートして固定化した。洗浄の後、2% スキムミルク-PBS (MPBS、含 10% TFE) にて 2 時間ブロッキングを行った。4 ml の MPBS (10% TFE) 中に 5×10^{12} のファージを含むように調製した Tomlinson J ライブラリーをイムノチュ

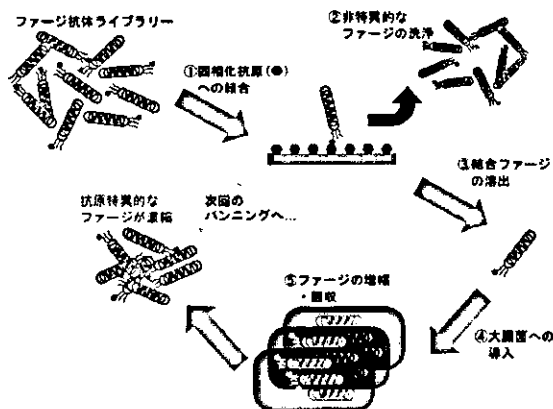


図2. バイオパンニング

ープに加え、計2時間反応させた。0.1% Tween20-PBS (TPBS、含10% TFE)で1回、PBS-10% TFEで2回洗浄した後、500 μ l のトリプシン溶液(1 mg/ml)を加えて、抗原に結合したファージを溶出させた。溶出ファージを宿主菌TG-1に感染させ、培養プレートに播種した。育成したコロニー群を液体培地によってけん濁させ、50 ml の2 \times TY培地(含1% グルコース)に植菌して対数増殖期にまで37 $^{\circ}$ Cで震盪培養した。遠心により培地を除いた後、10 ml の2 \times TYで再度菌体をけん濁させ、 5×10^{10} のKM13 ヘルパーファージを添加して30分間静置した。遠心して上清を除去した後、50 ml の2 \times TY培地(含0.1% グルコース)で菌体をけん濁させ、30 $^{\circ}$ Cで終夜培養した。パッケージングされたファージ粒子は培養上清上に含まれるため、これをポリエチレングリコール(PEG)沈殿法によって回収し、最終的に得られるファージペレットを2 ml のPBSにてけん濁させた。得られたファージ液のうち1 ml を次回のパンニングに使用した。

2 および3回目のパンニング

抗GST抗体(100 μ g/ml in PBS)をイムノチューブに固定化した。洗浄後、MPBS

にて2時間ブロッキングした。次に、100 μ g のGST-ER-LBDを含むように調製した2 ml のMPBSをイムノチューブに加え、4 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。チューブを洗浄した後、50 μ g のGSTタンパク質と前回のパンニングで得られたファージを含む2 ml のMPBSを添加して、4 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。インキュベート後の洗浄は、パンニング2回目では、TPBSで1回、次いでPBSで3回の洗浄操作を行った。3回目のパンニング時には、TPBSで10回、PBSで20回洗浄した。チューブから洗浄液を完全に除いた後、500 μ l の10 μ M 17 β -エストラジオール(E2)/PBSを加えて4 $^{\circ}$ Cで30分間転倒混和することにより、結合ファージの溶出を行った。溶出ファージ液のうち250 μ lを用い、1回目と同様の操作によりファージの増幅・回収を実施した。

(倫理面への配慮)

一般の抗体作製法とは異なり、ファージディスプレイ法は実験動物に痛みを与える抗原免疫や採血を行う必要がないため、今回の研究では動物愛護の観点からの倫理上の問題が大幅に軽減されている。また、研究に用いた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。

C. 研究結果

初回のパンニング時には、H12ペプチドを抗原としてイムノチューブに固定化した。抗原ペプチドの α ヘリックス性増大を見込んで、抗原固定化時から一連のパンニング操作にかけて、10% TFEを含む緩衝液を使用した。なお、トリプシン消化による結合ファージの溶出時にはTFEを使用していない。溶出ファージの力価を調べた結果、 9.2×10^7 の感染性を有するファージが溶出されたことが分か

った。溶出ファージは TG-1 に感染させて増幅し、KM13 ヘルパーファージによってパッケージングを行い、PEG 沈殿法によって回収した。回収したファージを用いて、2 回のパンニングを実施した。

2 回目のパンニングには、抗原として GST-ER-LBD を用いた。抗原のイムノチューブへの固定化は、ウサギ抗 GST 抗体を介した間接固定化法にて行った。ファージの結合反応時に相当量の GST タンパク質を共存させることで、不要な抗 GST ファージ抗体がチューブ中に多く残存することを抑えた。ファージの溶出には 10 μ M E2 溶液を用いた。これによって溶出してくるファージは、E2 の結合により誘起された ER-LBD のコンホメーション変化によって結合親和性が低下したものの、すなわち、ER のセンシング抗体を提示したファージであると期待される (図 3)。実際に、E2 溶液とのインキュベーションによって 2.1×10^8 のファージが溶出された。このうち半量を 3 回目のパンニングに使用した。

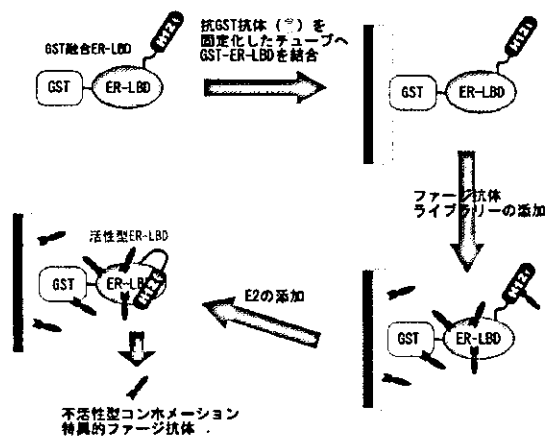


図 3. センシングファージ抗体取得を指向したパンニング法 (2、3 回目のパンニング時に実施)

3 回目のパンニングにおいても、2 回目同様に GST-ER-LBD を抗原として使い、E2 溶液を結合ファージの溶出に使用したが、結合ファージの洗浄条件を厳しくした。E2 溶液による結合ファージの溶出によって、 4.8×10^5 のファージが得られた。

D. 考察

センシング抗体を産生するファージを高効率に得るために、まず、1 回目のパンニングの抗原として、TFA 存在下の H12 ペプチドを使用した。円二色性スペクトル解析によって H12 ペプチドの α ヘリックス性が TFA 存在下で顕著となることを確認しており、ヘリックス構造を特異的に認識するという要件に適うファージ抗体のパンニングに有効であろうと考えた。続く 2、3 回目のパンニングにはタンパク質抗原である GST-ER-LBD を用いた。

ファージライブラリー法を用いた抗体作製では天然型構造のタンパク質をそのまま抗原として使用できるため、構造特異的な抗体を得るにはきわめて有効な手段であると考えられる。また、E2 結合による ER-LBD のコンホメーション変化が固相への吸着によって妨げられないように、抗 GST 抗体を介して間接的に GST-ER-LBD の固定化を行った。今回、センシング能を有する抗体を提示したファージを選択的に溶出させるために E2 を含む緩衝液を用いた。これは、酸による pH 変化や酵素消化などの一般的に用いられる結合ファージの溶出法と比較すると、非常に緩い条件での溶出法と考えられるため、多くの結合ファージは溶出されないものと予想されたが、洗浄の条件が緩いためか、2 回目のパンニング時にも多数のファージが回収された。洗浄条件を厳しくした 3 回目のパンニング後では溶出ファージ数が 2 回目よりも減少していたが、それでも相当数のファージが溶出

しており、E2 依存的にファージ抗体が溶出しているものと期待される。今後、これらの中から真に ER のコンホメーション変化をセンシングできるファージをクローニングするため、モノクローナルファージ ELISA を実施する必要がある。目的の抗体を産生するファージが得られれば、これを大腸菌に再感染させることにより、大量に単一の抗体タンパク質を作製することが可能となる。

一方で、実験に使用した Tomlinson J ライブラリーは、 1.37×10^8 のファージ抗体のレパートリーを含むが、これは高い抗原親和性を持った抗体を得るのに必ずしも十分な数とはいえないため、48 種という多くの核内受容体を標的としたセンシング抗体を得るには、より多様性をもったライブラリーの作製を要するかもしれない。

E. 結論

ファージディスプレイ法を用いた抗体スクリーニングによって、ヒト ER α のリ

ガンド依存的なコンホメーション変化をセンシングする抗体を産生するファージを選別できる可能性が示された。本法は、従来のポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体作製法と比較してはるかに迅速かつ簡便であり、48 種という多種の核内受容体に対するセンシング抗体作製に適用できるものと考えられる。

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

発表を行うまでの成果は現在のところ得られていない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

知的所有権を取得するまでの成果は現在のところ得られていない。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
「化学物質リスク総合研究推進事業」
外国への日本人研究者派遣事業報告

グルココルチコイド受容体の基礎生化学的解析

派遣研究者・分担研究者 坂口和靖 九州大学大学院理学研究院助教授

研究要旨

副腎皮質ホルモン・グルココルチコイドは、末梢 T 細胞系において免疫抑制に重要である。一方、グルココルチコイド受容体 (GR) はほとんどすべての細胞に発現しており、その機能も多岐に及んでいる。こうしたなか、環境化学物質の GR への影響が危惧され、特に、T 細胞に対するアポトーシス誘導が懸念されている。平成 14 年度の研究者派遣事業において、この GR に関する生化学的な基礎研究を実施した。その結果、合成グルココルチコイド・デキサメタゾン (16 α -methyl-9 α -fluoro- Δ^1 -hydrocortisone:Dex) を用いた解析から、① GR 以外の受容体、あるいは結合タンパク質 3 種を同定、② マウス胎児胸線リンパ球におけるグルココルチコイド制御遺伝子として *Lcn2* を発見、③ Dex により培養上清にアポトーシスを誘導する因子が分泌されており、その可能な因子として Lipocalin 2 を同定するという、非常に興味深い成果が得られた。

A. 研究目的

平成 14 年度の食品・化学物質安全総合研究推進事業の「外国への日本人研究者派遣事業」(社・日本食品衛生協会)において、分担研究者・坂口和靖をアメリカ合衆国・国立衛生研究所 (NIH)、国立癌研究所 (NCI) のアッシュウエル博士のもとに派遣し、グルココルチコイド受容体の基礎生化学的解析の研究に従事した。本研究課題は、15 年度以降に実施予定であった、女性ホルモン・エストロゲン受容体以外の核内受容体に対するコンホメーション変化センシング抗体法において、特に受容体分子の生化学的は基盤を得るため、最もありふれて、どの細胞にも存在するグルココルチコイド受容体について検討するものである。この課題は交付申請の段階では上梓していなかったが、興味深い結果が一部えられたので、

別途に分担研究報告として作成するものである。

副腎皮質ホルモン・グルココルチコイドは、末梢 T 細胞系において免疫抑制に重要であり、一方、グルココルチコイド受容体 (GR) はほとんどすべての細胞に発現しており、その機能も多岐に及んでいる。こうしたなか、環境化学物質の GR への影響が危惧されている。なかでも、特に、T 細胞に対するアポトーシス誘導が懸念されている。グルココルチコイドは副腎皮質ホルモンであり、エストラジオールやアルドステロン等と同様にコレステロールを前駆体として生合成される。グルココルチコイド受容体 (GR) はステロイド/甲状腺ホルモン受容体スーパーファミリーに属し、グルココルチコイドが結合することによりホモ二量体となり細胞質より核内に移項しその機能を発揮

する。デキサメタゾン (16 α -methyl-9 α -fluoro- Δ^1 -hydrocortisone:Dex) は合成グルココルチコイドであり、強力な抗炎症・抗アレルギー作用を持つ。ところで、GR ノックアウトマウスにおいても、胸線におけるグルココルチコイド応答が見られ、GR 以外の核内受容体の存在が示唆されている。Dex は医薬品としても重要であり、その機能は主にグルココルチコイド受容体を介すると考えられているが、T 細胞に対するアポトーシス誘導機構は明らかとはなっていない。

本研究においては、Dex による T 細胞アポトーシス誘導機構の解明のために、① GR 以外のグルココルチコイドに対する受容体あるいは結合タンパク質の同定、② マウス胎児胸線リンパ球におけるグルココルチコイド制御遺伝子の解析、③ 胸線リンパ球のアポトーシスにおいてきわめて重要な働きをしている IAP-TRAF 系のユビキチン化経路を解析するために、TRAF2 タンパク質の cIAP1 によるユビキチン部位の同定を試みた。

B. 研究方法

① GR 以外のグルココルチコイドに対する受容体あるいは結合タンパク質の同定

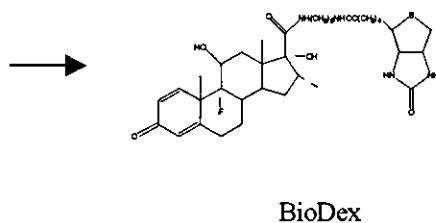
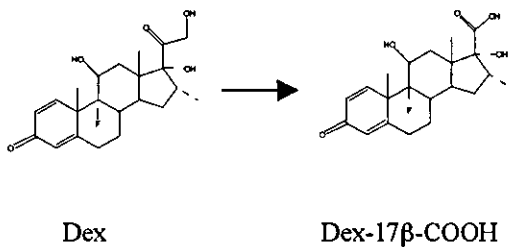


図1 BioDex の合成スキーム

まず、Dex の 17 β 位を過ヨウ素酸処理によってカルボキシル化した後、リンカーを付加したビオチン誘導体 5-(biotin-amido)pentylamine と EDC-HOBt 法によりカップリングすることによってビオチン化 Dex (BioDex) を合成した (図1)。

② マウス胎児胸線リンパ球におけるグルココルチコイド制御遺伝子の解析

野生型 (WT) および GR ノックアウト (GRKO) マウスの 18d 胎児の胸線リンパ球について、DNA マイクロアレイ (10,000-cDNA element mouse expression microarray, NCI) を用いて Dex 制御遺伝子の解析を実施した。

③ TRAF2 タンパク質の cIAP1 によるユビキチン部位の同定

IAP (inhibitor of apoptosis) 分子は、T 細胞において種々のアポトーシス刺激を阻害することが知られているが、その正確な機能は明らかではない。IAP ファミリーの一員である cIAP1 はユビキチンリガーゼ E3 活性を持ち、cIAP1 自身や TRAF2 分子をユビキチン化し、その機能を調節することが示されている。今回、TRAF2 のユビキチン部位を同定する目的で、*in vitro* translation 法により [³⁵S-Met]ラベル化 HA-TRAF2 を発現し、48 位 Lys 残基を Arg 残基に置換した K48R ユビキチンを用いてユビキチン化実験を実施した。この際、E1 および E2 としては小麦 E1 およびヒト UbcH5B をそれぞれ使用し、E3 酵素には GST-cIAP1 を用いた。

A. 研究結果

① GR 以外のグルココルチコイドに対する受容体あるいは結合タンパク質の同定

合成した BioDex は TLC で単一バンドであり、質量分析によってその分子量は計算値と一致した。この BioDex を用い

て、ヒト末梢血単核球より得られた可溶化物より、アビジンビーズにより Dex 結合タンパク質をアフィニティー精製した。その結果、SDS-PAGE 上で 70~100 kDa に少なくとも 3 本のバンドが確認された。これらのバンドを切り出した後、タンパク質をゲル中でトリプシンにより酵素消化した。現在、これらのバンドについてマスペクトルを用いた解析を実施中である。

② マウス胎児胸線リンパ球におけるグルココルチコイド制御遺伝子の解析

DNA マイクロアレイ実験の結果、興味ある遺伝子のひとつとして *Lcn2* を見出した。*Lcn2* の遺伝子産物 Lipocalin 2 は、分泌タンパク質である Lipocalin ファミリーに属し、脂肪類、ステロイド、胆汁酸などの疎水性の有機小分子を結合することが知られている。半定量的 PCR 法において、WT では Dex により *Lcn2* が 10 倍以上転写活性化されていることが示された。一方 GRKO では、その誘導は低かった。

一方、T 細胞系 2B4 細胞を用いた予備実験において、細胞を BioDex 存在下と 24 時間培養した後、その培養上清をアビジンビーズ処理して BioDex を取り除いた。これを新しい 2B4 細胞に加えたところ、その細胞の 74% がアポトーシスを起こした。

これらの結果は、Dex により培養上清にアポトーシスを誘導する因子が分泌されており、Lipocalin 2 がその因子である可能性を示唆する。

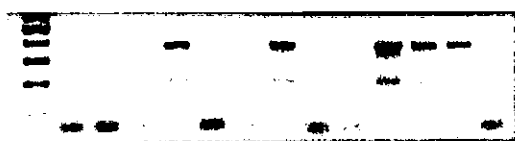


図2 *Lcn2* 遺伝子の発現 テンプレート

には 1-3:GR2KO, 4-6:GR2KO/Dex, 7-9:WT, 10-12:WT/Dex, 13:genomic を使用した。希釈は、1, 4, 7, 10=1/1, 2, 5, 8, 11=1/5, 3, 6, 9, 12=1/25

③ TRAF2 タンパク質の cIAP1 によるユビキチン部位の同定

ユビキチン化実験により、主としてモノ、ジユビキチン体の生成が見られたが、より大きなポリユビキチン体も観察された。これは、ポリユビキチン化が 48 位以外の Lys 残基を介して起こっている可能性を示している。プロテアソームの認識に重要な役割を果たしているポリユビキチン化は 48 位 Lys 残基を介し、63 位 Lys 残基を介したポリユビキチン化は DNA 修復やエンドサイトシスなどの調節に深く関わっていることが知られている。このことより、TRAF2 のユビキチン化による調節は、プロテアソーム分解系ではなく、局在化などの他の機構による可能性を示唆している。

D. 考察

以上のように、GR と他の核内受容体スーパーファミリーのクロストークによる機能調節機構の可能性を含めた研究の基盤を構築するために、グルココルチコイド応答における一連のシグナル伝達に関する研究を実施し、2、3 の興味深い結果を得た。

グルココルチコイド受容体 (GR) はほとんどすべての細胞に発現している、いわば万能受容体である。留意したいのは、GR の機能が非常に多岐に及んでいることである。そして、環境化学物質の GR への影響が危惧されていることである。特に、T 細胞に対するアポトーシス誘導が懸念されており、グルココルチコイド受容体に対する環境化学物質の精確な応答解析はきわめて大切である。グルココルチコイドは副腎皮質ホルモンであり、エストラジオールやアルドステロン等と同様にコレステロールを前駆体として生合

成される。このため、多種多様な化学物質が結合し、ホルモン活性を誘導する可能性がある。その受容体解析は必須である。

E. 結論

末梢 T 細胞系において免疫抑制に重要である副腎皮質ホルモン・グルココルチコイドの受容体 (GR) は、ほとんどすべての細胞に発現している。こうしたなか、環境化学物質の GR への影響が危惧され、特に、T 細胞に対するアポトーシス誘導が懸念されている。平成 14 年度の研究者派遣事業において、この GR に関する生化学的な基礎研究を実施した。特に、合成グルココルチコイドの 1 つであるデキサメタゾン (16 α -methyl-9 α -fluoro- Δ^1 -hydrocortisone:Dex) を用いた解析から、い① GR 以外の受容体、あるいは結合タンパク質 3 種を同定、② マウス胎児胸線リンパ球におけるグルココルチコイド制御遺伝子として *Lcn2* を発見、③ Dex により培養上清にアポトーシスを誘導する因子が分泌されており、その可能な因子として Lipocalin 2 を同定するという、

非常に興味深い成果が得られた。今後、こうした生化学的な解析研究と並行して、GR を介した内分泌かく乱作用性の解析を本研究事業の重要な研究標的として取り組むことにし、平成 15 年度以降にエストロゲン受容体 (ER)、アンドロゲン受容体 (AR)、甲状腺ホルモン受容体 (TR) に加えて GR をまず取り上げることにした。既にこの遺伝子クローンを入手したので、これを用いた量的な受容体タンパク質発現系を構築する予定である。

F. 健康危険情報

現在のところ特に、該当する情報は無い。

G. 研究発表

研究開始直後であり、発表するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

研究開始直後であり、出願・登録するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
「化学物質リスク研究推進事業」
外国への日本人研究者派遣事業報告

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

派遣研究者・分担研究者 野瀬 健 九州大学大学院理学研究院助教授

研究要旨

近年、核内受容体のみならず、環境化学物質の神経系や内分泌ホルモン系の G タンパク質共役受容体への影響が危惧されている。ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン・hCG は、妊娠初期の卵巣黄体を刺激してプロゲステロン産生を高め、妊娠の維持に重要な働きをする一方、腫瘍マーカーとして臨床応用されているタンパク質である。本派遣研究では、培養細胞 HEK293 において、 β -アドレナリン受容体アゴニスト・イソプレテノール刺激が hCG α の量的な産生を引き起すこと確認・同定した。この結果は、内分泌かく乱作用は性ホルモン受容体などの核内受容体と同様に、G タンパク質共役受容体でも起こりうることを直接に示した非常に興味深い成果である。ヒトゲノムの解析では 700 種以上の存在が推定されている 7 回膜貫通型 G タンパク質共役受容体において、多様な化学物質による攪乱の可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

平成 15 年度化学物質リスク研究推進事業「外国への日本人研究者派遣事業（社）日本食品衛生協会）において、分担研究者・野瀬 健をイタリア国・国立衛生研究所（Istitute di Superiore Sanità）の Tommaso Costa 教授のもとに派遣した。化学物質リスク評価研究の進展に伴い、従来内分泌かく乱化学物質、いわゆる環境ホルモンの作用部位として想定されていた核内受容体に加え、別の種類の薬物受容体である 7 回膜貫通型受容体に対するかく乱作用も懸念される様になった。こうしたなか、派遣先の Costa 教授らは化学物質を 7 回膜貫通の G タンパク質共役受容体・ β -アドレナリン受容体の存在する特定の培養細胞 HEK293 に投与すると、その刺激により未知のタンパク質性物質が強く発現誘導されることを発見

した。この結果は、化学物質によりタンパク質産生系が刺激・誘導されて量的な生産を伴う細胞が存在することを示唆した。本研究の第一の目的は、このタンパク質を特定・同定することである。

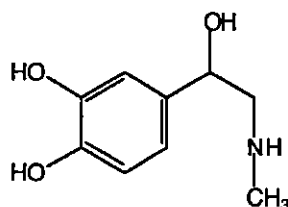
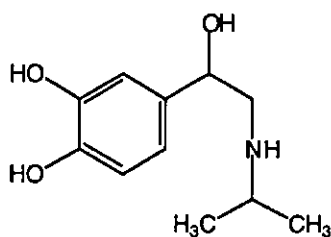
同定されたタンパク質は hCG であった。hCG: ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin; hCG) は、 α および β の 2 つの異なるタンパク質が非共有結合によりサブユニット構造を形成した分子量約 38,000 の糖蛋白ホルモンである。 α サブユニットは LH (黄体形成ホルモン)、FSH (卵胞刺激ホルモン)、TSH (甲状腺刺激ホルモン) に共通である。hCG は主に絨毛組織において産生され、妊娠初期の卵巣黄体を刺激してプロゲステロン産生を高め、妊娠の維持に重要な働きをしている。このほか、胎児精巣に対する性分化作用や母体甲状腺刺激作用

も報告されている。

一方、hCGは絨毛性腫瘍のほか、子宮、卵巣、肺、消化管、膀胱の悪性腫瘍などにおいて異所性発現する事例が多い。このため、腫瘍マーカーとしてhCGは実際に臨床検査において使用されている。Costa教授はヒト胎児腎臓細胞HEK293において β -アドレナリン受容体アゴニスト・イソプレテノールの刺激により発現量が上昇する遺伝子をDNAチップを用いた解析から明らかとし、非常に大きく発現量が増加する遺伝子の同定に成功した。その遺伝子がhCG関連遺伝子であることが判明したため、派遣研究者は、HEK293細胞を用いてイソプレテノール刺激により分泌量が増加するタンパク質の同定を試みた。

B. 研究方法

① HEK293細胞のイソプレテノールによる刺激



アドレナリン

図1. イソプレテノールとアドレナリン

まず、HEK293細胞を培養フラスコ内で

DMEM培地下において培養した。次いで、無血清培地に移して培地交換した後、さらにHEK293細胞刺激のためイソプレテノール(図1)を加え、48時間培養した。その後、培地上澄を回収した。

② 培地上澄からのタンパク質の回収

HEK293細胞を培養した液体培地から、発現タンパク質の回収を行った。まず、分子量で分離を行う遠心濃縮器を使用した。その際、分画分子量10,000および30,000のセントリコンYM-10およびYM-30(ミリポア社)を用いた。培地2mlをセントリコンに測り取り、遠心機で常温、3,000xGの条件で遠心濃縮・脱塩操作を行い、液量を約50 μ lとした。

一方、別の回収法として、アセトン沈殿法を実施した。培地5mlについて氷酢酸でpHを5.3に調整後、2倍容量のアセトンを加え、氷冷下で1時間放置後、生じた沈殿を遠心して回収した。

また、hCGを特異的に吸着することが知られているビタチェンジカラムクロマトグラフィー法を検討した。さらに、サンプルの効率的な前処理法を確立する目的で、アセトン沈殿法の後にセントリコンによる脱塩を行う方法も検討した。これらの方法によるタンパク質の回収効率を、SDS-PAGEで検討した。

③ SDS-PAGE

SDS-PAGE(12.5%ゲル)を用いてHEK293細胞培養液中で発現量の上昇するタンパク質の分離・分析を行った。

④ ウェスタンブロッティング

イソプレテノールにより誘導されるタンパク質がhCG α であるかを同定するためにウェスタンブロッティングを実施した。それぞれの方法で処理したタンパク質サンプルをSDS-PAGEで分離後、PVDF膜に

タンパク質を転写した。転写後の PVDF 膜において抗ヒト hCG α 特異的抗体（米国立衛生研究所（NIH）製）を用いての抗体応答反応を解析した。

C. 研究結果

① 培地からのタンパク質の回収効率

タンパク質を回収するために当初、遠心濃縮法、アセトン沈殿法、カラム法の 3 種の方法を検討した。遠心濃縮法およびアセトン沈殿法では効率的にタンパク質が回収されたが、ビタチェンジを用いるカラムクロマトグラフィー法は操作が煩雑であったため、量的な調製には不適であると判断された。さらに、アセトン沈殿法により沈殿タンパク質を回収した後に、引き続きセントリコンによる脱塩を行うことによる、2 段階の方法を検討したところ、この組み合わせにより、脱塩およびタンパク質濃縮の効率が大きく向上したため、以後この方法を用いた。これにより簡便で多量にタンパク質沈殿を得ることができることが判明した。

② SDS-PAGE

培地から回収されたサンプルを用いて、SDS-PAGE を行ったところ、分子量約 18,000 のタンパク質が非常に高濃度で検出された。分子量より、このタンパク質は hCG α である可能性が示唆されたので、米国 NIH より入手した hCG α と同一ゲル上で再度 SDS-PAGE を行ったところ、ほぼ同じ泳動距離を示すことがすることが判明した（図 2）。

③ hCG α の同定

米国 NIH より入手の抗 hCG α 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、この抗 hCG α 抗体と特異的に結合するタンパク質のバンドが同定された。その分子量は約 18,000 であることが判

明した（図 3）。これにより、分子量 18,000 のタンパク質は hCG α であると同定された。

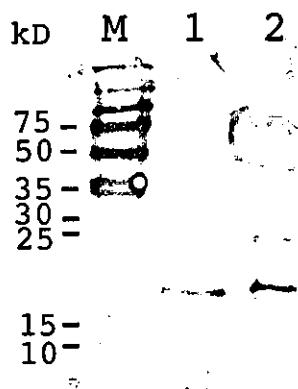


図 2. SDS-PAGE による HEK293 細胞からイソプレテノール刺激により分泌されるタンパク質の同定

レーン 1 : NIH 標準 hCG α (500 ng) , レー
ン 2 : HEK293 培養後培地上澄 150 μ l , M :
アマシャム社製レインボウ分子量マーカー

また、標準 hCG α とのタンパク質バンド濃度の比較による発現タンパク質量の定量を行ったところ培地上澄 150 μ l あたり 500 ng 以上という hCG α の量的な産生 (3.3 μ g/ml に相当) が起っていることが確認された。

現在、このサンプルの質量分析 (MALDI-TOF-MS) での解析を実施している。今後さらに、糖鎖構造の解析を実施し、正常型の糖鎖付加が行われているかの確認を行う予定である。

D. 考察

7 回膜貫通型受容体・ β -アドレナリンの受容体アゴニストである一般の化学物質によりの刺激により、本来 β -アドレナリンと無関係と思われる hCG α というホルモタンパク質が分泌されることが

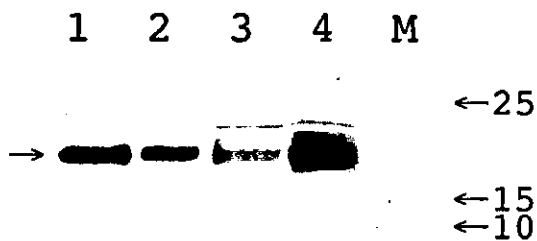


図3. ウェスタンブロット解析による
hCG α の同定と定量

レーン 1: NIH 標準 hCG α (500 ng)、レーン 2: NIH 標準 hCG α (250 ng)、レーン 3: アセトン沈殿+セントリコン処理した HEK293 細胞培養培地上澄 (150 μ l)、レーン 4: セントリコン処理した HEK293 培養培地上澄 (150 μ l)

判明した。未だその機構は不明であるが、この結果はヒト胎児腎臓細胞由来の HEK293 細胞において、化学物質の投与により未知のタンパク質発現系が誘導され、ホルモンタンパク質の産生・分泌を促進したことを示す。この事例は、HEK293 細胞に特有な事象であるかどうかは不明であるが、今後、多くの細胞系であるいは生体系で 7 回膜貫通型受容体に対する化学物質のリスク評価を行う必要性を強く

示唆した。

E. 結論

HEK293 細胞を β -アドレナリン受容体アゴニストであるイソプレテノールで刺激すると、ホルモンタンパク質が発現・分泌されることが判明した。この結果より、今後の化学物質リスク研究においてより広範な受容体、すなわち、核内受容体のみならず G タンパク質共役型のホルモン受容体や神経伝達物質受容体をも標的とした研究が求められると考えられた。

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

派遣研究終了直後であり、発表するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

H. 知的財産権の出願・登録状況

派遣研究研究終了直後であり、出願・登録するまでの成果が現在のところ特に得られていない。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
「化学物質リスク研究推進事業」
外国人研究者招へい事業研究報告

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

Use of the *Drosophila* central nervous system to examine
neural risk assessment of chemicals

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

平成 16 年 3 月 7 日～平成 16 年 3 月 21 日（15 日間）に、カナダ・ダルハウジー大学・生命科学センターのイアン アンソニー マイナーザーゲン（Ian A. Meinertzhagen）教授を表記の共同研究課題で招へいた。3 月 9 日から 3 月 15 日までの間は九州大学大学院理学研究院・構造機能生化学研究室にて、環境化学物質受容体応答解析研究グループのメンバーを交えて、各種受容体試験系の構築に関して、特に、ショウジョウバエ神経系受容体のうち核内受容体の表面プラズモン共鳴（SPR）解析による化学物質の相互作用解析の方法を策定するために、具体的な操作法や解析法等について意見交換を行った。また、共焦点レーザー顕微鏡による受容体免疫染色組織の微細構造観察に関するワークショップを開催し、特に主任研究者側から、モノクローナル抗体作製における精製度の差違が及ぼす影響の具体的な例を示し、実際の精製法について教示・指導した。3 月 16 日にはセミナーハウスにおいて講演会を開催した（参加者 45 名）。3 月 17 日から 3 月 19 日までの間は九州大学大学院理学研究院・構造機能生化学研究室にて、環境化学物質受容体応答解析研究グループおよび共同研究者：福岡大学理学部地球圏科学科生物学教室のメンバーを交えて、ショウジョウバエ卵産生における継代的な化学物質応答解析の再現性を確保するための方策を検討するため、食餌法や卵数カンウント法、ミュータント使用について意見交換を行った。また、受容体免疫染色組織の固定化について Meinertzhagen 教授から凍結置換法などについて技術指導を受けた。このように、研究打合せのみならず、技術交流等で非常に意義深い成果が得られた。

A. 研究目的

平成 15 年度の化学物質リスク研究推進事業の「外国人研究者招へい事業」（社・日本食品衛生協会）において、招へいする外国人研究者・Ian A. Meinertzhagen 教授（カナダ・ダルハウジー大・生命科学センター）は、脳神経系の束一系活動リズムや行動リズムの

神経生理学、免疫組織学等の分野の研究において、国際的に第一人者であり、その精緻な実験構成から成る研究手法と研究展開は高く評価されている。Meinertzhagen 教授と受入の主任研究者・下東とは、昆虫などの動物の活動・行動の日周性リズム（概日リズム）という生物時計の分子機構解明、特に、リズム

ム伝達に関する神経伝達物質の研究で共同している。例えば、最近になって、昆虫・フタホシコオロギの概日リズムペースメーカーホルモンである神経ペプチド PDF の研究において、PDF がリズム伝達の神経情報伝達のみならず、細胞核内へ移行し、リズム発振・振動にも深く関与していることを明らかとした。この事実は、このホルモンペプチド PDF には神経終末シナプスでの細胞膜受容体のみならず、核内受容体を持つことを意味し、現在これらの探索研究を進めている。ところが、概日リズムの乱調やズレに光、音などの外因性刺激に加えて様々な化学物質の受容体応答に起因する可能性が危惧されるに至った。こうした研究の経緯は、環境ホルモン学会等で内分泌攪乱化学物質の神経系での影響が指摘、危惧され始めたことと非常によく符合するものであった。そこで、Meinertzhagen 教授と受入れの主任研究者・下東とは、ヒトに最も近い昆虫モデル系として多くの研究に用いられているショウジョウバエを対象として、化学物質の影響を系統的に試験するアッセイ系の確立をめざして協同することに合意し、昨年より共同研究を開始した。この研究課題は、主任研究者の研究課題「環境ホルモン受容体センシング方による内分泌かく乱性の順位予測」の神経系受容体（核内受容体および細胞膜受容体）の攪乱性、リスク評価の一環をなすものであり、緊要必須な課題と判断される。

B. 共同研究の成果

環境ホルモン、内分泌攪乱物質としての環境化学物質の危険性（リスク）は、これまでは性腺や甲状腺を中心とした核内受容体の応答を基点とする内分泌系での異常応答が問題とされてきた。しかしながら、ごく最近になってヒトのゲノム

解析の完成を受け、「核内受容体」全般の問題に拡張・拡大して考えられるようになった。さらには、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性が危惧され、緊要の課題と位置づけられるようになってきた。ところが、従来の内分泌攪乱化学物質の研究者で、核内受容体と同時に脳神経系受容体について検討できる研究者は、日本国内はもとより、国際的にもきわめて少ない。このため、研究の進展をはかるためには脳神経系研究に経験のある研究者間で高効率な研究展開を企画することが是非に必要である。主任研究者・下東はこの 20 数年来の脳神経系受容体の研究者であり、その研究手法や概念を新たに内分泌攪乱物質研究に導入し、新規な方法論を開拓し、成果をあげてきた。そして、現在、内分泌攪乱物質問題におけるリスク評価を脳神経系受容体、特に概日リズムに関わる脳神経系研究へ展開すべく準備を進めている。この過程で、最適な実験動物として遺伝子研究が容易なショウジョウバエが有力であることが判明し、この分野での世界的な権威である Meinertzhagen 教授との共同研究が必須の要件となってきた。特に、脳神経系での共同研究の成算を得るためにも同教授との密接な連携が必要であり、今回 Meinertzhagen 教授の招へいが実現した。今回の招へい事業では、2 週間の招へい期間に効果的に事業を進めることを目標に以下の事項について特に留意して協同した。まず、共同研究として進めている研究課題の問題点を検討し、その解決法について意見交換・議論すること、さらには、Meinertzhagen 教授および主任研究者・与する核内受容体は両方で非常に類似しており、共通する分子機構が推定されている。特に、CLOCK、CYCLE（ヒトでは BMAL）は時計神経細胞の中核をなす転写因子として機能している。

Meinertzhagen 教授との共同研究では、ショウジョウバエの脳神経の概日リズム振動受容体の化学物質応答を解析する目的で、これらの核内受容体タンパク質について、① CLOCK および CYCLE タンパク質の発現と化学物質応答、② レポーター遺伝子アッセイによる CLOCK/CYCLE 転写活性への影響評価、そして、③ CLOCK および CYCLE の抗体作製と化学物質影響の免疫組織学的解析、の研究課題に取り組んでいる。

①のタンパク質発現においては、核内受容体の一種である CYCLE について、その発現に成功し、精製し、タンパク質の特性について解析が進んでいる。今年度、SPR によって解析の結果、CYCLE がホモダイマーを形成することを初めて明らかとした。これまで、生物時計に関わる核内受容体の発現はほとんど例がなく、こうした生化学研究の重要性が判明した。一方、CLOCK はその分子サイズが CYCLE の約 2 倍あるためか、その全構造発現に成就できないでいる。このため、リガンド等の相互作用性が期待されている C 端側で完全に保存された構造をもつドメインのみで発現することに合意した。この際、分子サイズの適否を他の核内受容体タンパク質発現の事例を参照しながら詳細に検討した。ところで、打ち合わせのなかで、抗体を用いた免疫組織学的観察による神経細胞内でのタンパク質発現の解析（課題③）の重要性を再確認した。なお、課題③のショウジョウバエの化学物質食餌による解析については委託事業で詳しく解説する。

もう一つの共同研究である「概日リズム伝達の神経ペプチド PDF 受容体の化学物質応答解析」については、① PDF 受容体のクローニング、発現と化学物質応答、② 概日リズム伝達の新規神経ペプチドおよびその受容体の探索、影響評価、そ

して、③ 神経ペプチドおよびその受容体の抗体作製と化学物質影響の免疫組織学的解析、の課題が進行中である。これらの中で、特に②の課題において C 末端に Phe-Met-Arg-Phe-NH₂ のテトラペプチド構造をもつ FMRFamide 関連ペプチド (FaRP) をイエバエ、クロキンバエから同定し、さらにこれらの受容体の cDNA クローニングにも成功したので、今回の招へい期間中はまず、成果の取りまとめについて打ち合わせを行った。FMRFamide 受容体は、典型的な GPCR であり、今後は動物細胞に発現させて結合試験系を確立し、化学物質の結合性を検討することとした。この発現については、G タンパク質の α サブユニットを融合させて GDP 結合の解析から化学物質を検討することになった。このように外国人研究者として Meinertzhagen 教授を招へれた。蛍光顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡による微細構造観察では、切片作製やカバーガラスの重要性が指摘され、カバーガラス製品として日本製のきわめて優れたものがあることが紹介された。こうした細微にわたる技術指導は Meinertzhagen 教授を招へいして初めて可能になることと思われ、非常に有益であった。また、主任研究者側から呈示したモノクローナル抗体を用いた精製度の差が及ぼす影響については、驚愕するほどの結果の差に Meinertzhagen 教授も実際の精製について非常に熱心に取り組んだ。このように今回の招へい事業は有意義なうちに終えることができた。

E. 外国人研究者のレポート

First of all I greatly appreciate Japan Food Hygiene Association for giving this marvelous opportunity to visit Japan to facilitate our on-going projects. I had such a wonderful time during the visit,