

8. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、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糖質コルチコイド受容体における化学物質の内分泌攪乱作用性評価、第 52 回日本臨床検査医学会・第 45 回日本臨床化学会合同大会、2005. 11. 17-20。

G. 知的所有権の取得状況

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）
分担研究報告

細胞融合モノクローナル抗体の設計作製および試験

分担研究者 下東美樹 福岡大学理学部助手

研究要旨

ヒトには48種の核内受容体が存在する。内分泌かく乱作用は、こうした核内受容体が複合的に関与する結果発現される可能性がきわめて高く、様々な核内受容体につい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。主任研究者らはポリクローナル抗体を用いて、化学物質のホルモン受容体結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知・センシングする試験系を開発し、様々な受容体について成功している。しかし、モノクローナル抗体を利用した試験系は女性ホルモン・エストロゲン受容体（ER）に対しては確立しているが、その他の様々な受容体に展開していない。コンホメーション変化の認識において、異なるリガンドによる変化を高い選択性で識別するためには、より特異性の高いモノクローナル抗体が必要となる。そこで今回、まず環境化学物質の影響が危惧されている副腎皮質ホルモン・グルココルチコイド受容体（GR）、男性ホルモン・アンドロゲン受容体（AR）と甲状腺ホルモン受容体（TR）に対してモノクローナル抗体の作製に取り組んだ。受容体 α ヘリックス12（H12）部位のペプチドを抗原としてマウスに免疫し、ミエローマ細胞融合法により得られた多数のサンプルに対して、ELISAにより調べた。その結果、GRに関して、H12ペプチドに特異性の高い抗体クローン3種を見出し、現在これらについて、受容体存在下でホルモンおよび化学物質共存下での応答からクローンを特定するために、アゴニストを用いてスクリーニングを実施している。またARに関しては2種、TRに関しても1種見出し、GRと同様にスクリーニングを実施している。

A. 研究目的

内分泌かく乱性が懸念される多数の化学物質について、それらがホルモン受容体に及ぼす影響を効率よく検定することが急務となっているが、これまでのところ化学物質の内分泌かく乱作用のスクリーニングにおいては、①ホルモン受容体への結合性の有無および強さ、②受容体に結合する場合、ホルモン作用を示すのか？または、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）を示すのか？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の多くは、これら3つの活性を別途に試験するため煩雑であり、非効率的である。したがって、これら3つの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。一方、ヒトゲノム解析の完成により、48種の核内受容体が存在することが明らかにされた。内分泌かく乱作用は、こうした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す結果発現される可能性がきわめて高く、他の核内受容体につい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。

こうしたなか最近、主任研究者らは「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。さらに、エストロゲン受容体（ER）を介した内分泌かく乱作用が懸念される約500化学物質について内分泌かく乱作用性を評価し、アゴニストのみならずアンタゴニストにも応答性を示すモノクローナル抗体の調製にも成功している。また、この試験系の基盤となっている受容体コンホメーション変化は核内受容体すべてに共通する分子メカニズムであり、この方法は核内受容体48種類すべてに対して

適応可能な方法で、実際に ER と同様の性ホルモン受容体であるアンドロゲン受容体 (AR) についてもポリクローナル抗体において同時評価測定法の開発に成功している。しかし、昨年度までの検討では AR については特異的なモノクローナル抗体の調製に至っていなかった。

本研究では、より特異性の高いモノクローナル抗体を得ることでアッセイの感度や定量性を向上させ測定の効率を高めること、さらに、ホルモン作用の検定に加えて抗ホルモン作用との区別もつけられるような試験系を確立すること、そして、これらを用いて各種の化学物質の活性の判定と内分泌かく乱作用の順位予測を行うことを目的として、さらに鋭意に取り組むことにした。特に、特異的なクローンを取得するため、スクリーニングを徹底することとした。

今年度は、AR のみならず、生理機能も多岐に及んでおり、環境化学物質の影響が危惧されている GR と、PCB 類が直接相互作用すると考えられている TR に対しても、コンホメーション変化を高い選択性で識別認識できる抗体をモノクローナル作製すべく、徹底したスクリーニングを実施することとした。なお、この「細胞融合モノクローナル抗体の設計作製および試験」という本研究課題は昨年度まで桑田 治博士 (リサーチレジデント) が実施していたものを継続して実施するものである。

B. 研究方法

(1) 抗原ペプチドの調製

受容体のうち、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ヘリックス 12 (H12) 部位を抗原として選定した。そして、これに相当する配列の N 末端にシステインを付加したペプチドを化学合成した。合成は Fmoc 自動固相合成法により実施した。

(2) キャリヤタンパク質との結合

合成ペプチドを MBS 架橋剤によりシステイン残基を介して Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) と結合させ、ゲルろ過により精製して抗原とした。

(3) マウスへの免疫

免疫増強剤と混合するため、40 ng 相当量の抗原ペプチド溶液を等量のフロイント完全アジュバンドと混合した。この混合溶液を、

超音波破碎装置を用いて乳濁液エマルジョンにした。

(4) 皮下への注射

業者より購入した 8 週令オスの Balb/c マウス 2 匹を麻酔し、後肢の足蹠に抗原エマルジョンを 50 μ l ずつ皮下注射し、引き続き飼育した。

(5) 細胞融合

ミエローマ細胞の培養のため、マウス由来ミエローマ細胞 P3X63Ag8U.1 を 10% ウシ胎児血清含有 DMEM 培地中で、37°C・5% CO₂ 環境下で培養した。

(6) マウスのリンパ節の摘出

免疫後 9 日目に、マウス後肢大腿部より合計 4 個の肥大したリンパ節を摘出し、DMEM 培地中で破碎・ろ過した。そして、回収されたリンパ節細胞数を測定した。

(7) 細胞培養と選択培養

リンパ細胞とミエローマ細胞を 5:1 の割合になるように混合して遠心の後、ポリエチレングリコールを添加して細胞を融合させた。遠心による洗浄後、HAT 選択培地で再懸濁し、これを 96 ウェル培養プレート 4 枚に播き込んで培養した。

(8) 抗体産生細胞のスクリーニング

培養上清を採取するため、培養開始後 10 日頃から生存が認められたウェル中の細胞を順次 DMEM 培地で継代培養し、その培養上清を回収した。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。

(9) ELISA 法による一次スクリーニング

抗原として用いたペプチドとキャリヤタンパク質を 96 穴イムノプレート中に固相化し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス二次抗体を用いた間接 ELISA 法を実施した。ペルオキシダーゼは H₂O₂ を基質として 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt) (ABTS) を発色させる。発色した ABTS の吸光度 (405 nm) を調べることにより、ペプチドに反応するがキャリヤタンパク質には反応しないような抗体を産生する細胞を選別した。

(10) ELISA 法による二次スクリーニング

一次スクリーニングで陽性であった細胞

の培養上清を、各々カートリッジ式フィルターユニットを用いて限外ろ過し、低分子不純物を除去した。これらについて、ペプチド抗原を固相化し、受容体を競合剤として用いた競合 ELISA を実施した。ここで受容体のみを競合剤として用いた場合と受容体にあらかじめリガンドを添加して用いた場合との抗原抗体反応を比較することで、リガンド結合型とリガンド非結合型への結合に差異のあるような抗体の産生細胞を探索した。

(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、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。また、これらの実験に従事する研究者および学生に関しては、全員が「実験動物取扱」のための教育訓練のための講習を受けたうえで、「実験動物取扱者登録証」を取得して実施している。

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。

その他の実験に関しても、倫理上の問題を伴うものはない。

C. 研究結果

3種の核内受容体 AR、GR、TR に対して、モノクローナル抗体の作製を実施した。抗原には、ポリクローナル抗体を作製した時に使用した同じ化学合成ペプチドを用いた。これは、ポリクローナル抗体作製において高い抗原性を示したためである。現在までに、マウス下肢に免疫後、リンパ節細胞を摘出し、ミエローマ細胞と融合させて得たハイブリドーマを培養した。GR に関して細胞融合操作を行った結果、384 well (96 穴プレート 4 枚) 中 42 well で細胞の増殖が見られた。これらを 1 つずつスクリーニングしたところ、H12 ペプチドに特異性の高い抗体クローン 3 種 (#70, #94, #183) を見出した (図 1)。現在これらについて、受容体存在下でホルモンおよび化学物質共存下での応答からクローンを特定するために、アゴニストを用いてスクリーニングを実施している。

また、AR に関して細胞融合操作を行った結果、384 well 中 34 well に細胞の増殖が見られ、H12 ペプチドに特異性の高い抗体クローン 2 種 (#5, #6) を見出した (図 2)。TR に関して 384 well 中 28 well に細胞の増殖が見られ、H12 ペプチドに特異性の高い抗体クローン 1 種 (#6) を見出した (図 3)。現在得られた AR や TR のクローンに関して、GR と同様のスクリーニングを実施している。

有効な抗体クローンを得るためには、さらに細胞融合の操作を繰り返し、スクリーニングを試行する必要がある。このため、あと数回実施すべく、現在 2 回目の操作を行っている。

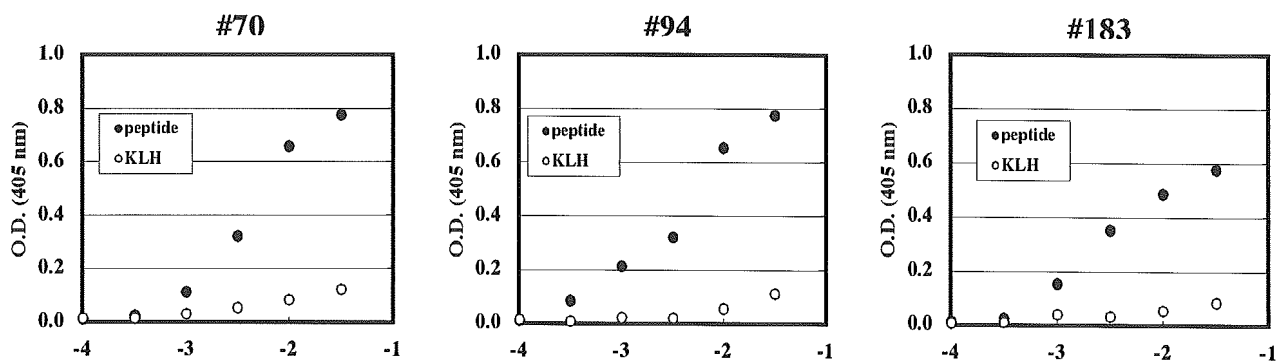


図 1. GR に対するクローン #70, #94, #183 の KLH やペプチドに対する抗体応答。横軸には培養上清の希釈率を、縦軸には二次抗体により発色した ABTS の吸光度を示している。

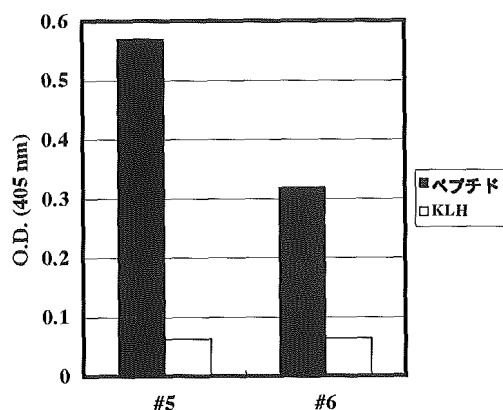


図2. AR クローン#5、#6 の KLH やペプチドに対する抗体応答

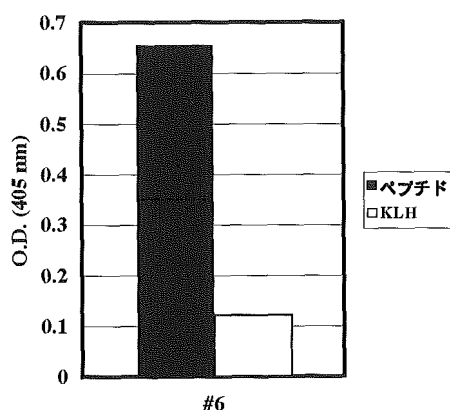


図3. TR クローン#6 の KLH やペプチドに対する抗体応答

D. 考察

モノクローナル抗体作製において、細胞融合の操作は成功しているが、キャリヤタンパク質に対するクローンが多く得られ、目的の H12 ペプチドに特異的なクローンが少なかった。ペプチド自体はポリクローナル抗体産生の成績から抗原性が高いと思われたが、4 プレート (約 400 試験穴) から 1-3 クローンと、意外と少なかった。これは、キャリヤタンパク質が H12 ペプチドに比べ非常に大きく、また、抗原性が高く、これに対する抗体産生細胞も多く存在するためだと考えられる。今後は用いる動物の数を増やして、細胞融合操作を行い、目的のペプチドに対するクローンの存在割合を高める必要がある。

また、ER センシングポリクローナル抗体について、抗原ペプチドを二等分したうち、C 端側断片ペプチドに対して結合する抗体が母体ペプチドに結合する抗体に比べ大きなセンシング能を持つことが分り、この C 端側断片ペプチドを抗原にすると大きなセンシング能を有するモノクローナル抗体が得られる可能性が考えられた。つまり、センシングポリクローナル抗体を用いて高いセンシング能を有する抗原配列を特定し、その抗原をペプチドとして設計・合成して、より多くのマウスに免疫することにより、比較的簡単に各受容体に対して高いセンシング能を有するセンシングモノクローナル抗体が作製できると考えられる。よって、今後は数多くのマウスに対して免疫すると同時に、高いセンシング能を得る抗原配列の確定を試みる。

E. 結論

平成 17 年度当初計画の AR、GR、TR に対するモノクローナル抗体作製に予定どおり着手した。これら 3 種の核内受容体すべてにおいて、H12 ペプチドに特異性の高い抗体クローンをそれぞれ数種得ることができた。現在、優れたセンシング能を有する抗 H12 センシングモノクローナル抗体を選別中である。今後、これらの抗体を用いてセンシング抗体アッセイ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

論文発表

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

2. 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).

学会発表

1. 劉 暁輝、松島綾美、徳永隆俊、野瀬 健、富永佳也、下東美樹、下東康幸、フラボンおよびイソフラボン類化合物によるショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体の転写活性化、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。

2. 劉 暁輝、松島綾美、徳永隆俊、野瀬 健、富永佳也、下東美樹、下東康幸、植物エストロゲン・フラボンおよびイソフラボン類によ

るショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体のアゴニスト活性、第 78 回日本生化学会大会、2005. 10. 19-22。

H. 知的財産権の出願・登録状況

本研究によって初めて実現したモノクローナル抗体を用いるコンホメーション変化センシングアッセイ法について、今後さらに有用な抗体を得たうえで特許を出願することを検討している。

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

エストロゲン関連受容体 γ に対する化学物質の受容体応答解析

分担協力研究者 徳永隆俊 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

ノニルフェノール (NP) やビスフェノール A (BPA) は、エストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) を介して内分泌かく乱作用を示すとされているが、NP と BPA の ER への結合能はエストロゲン・ 17β -エストラジオール (E2) に比べると非常に弱い。一方、エストロゲン関連受容体 (estrogen-related receptor; ERR) は、ER と非常によく似たアミノ酸配列をもつことから発見されたが、内在性リガンドや生理機能についてはほとんど分かっていない。ERR の活性に影響を与える ER の合成化合物がいくつか見つかり、また ERR は ER の標的遺伝子にあるエストロゲン応答配列 (ERE) と結合する。逆に、ER も ERR の応答配列 (ERRE) を認識する。こうしたことから、ERR と ER は相互に関連した機能制御系を形成している可能性がある。本研究では、ERR について一連の内分泌かく乱 (環境ホルモン) 候補化学物質のスクリーニングにより ER/ERR の構造機能相関解析を行うため、ERR のコンホメーション変化センシングアッセイ系を構築することを目的に、センシング抗体を調製した。しかしながら、化学物質の結合にもかかわらずほとんど構造変化が観察されない異常な応答が予見されたため、ERE にも ERRE にも結合する ERR γ に対して放射性リガンドを用いた詳細な受容体結合試験を行った。その結果、BPA が ERR γ に対して強い結合能を示すことが判明した。また、BPA の ERR γ に対する影響をレポータージーンアッセイにより調べた結果、4-OHT が ERR γ を不活性化する一方、BPA 自身は ERR γ のルシフェラーゼ活性に全く影響を与えないことが明らかとなった。しかし、4-OHT とともに BPA を細胞に曝露したところ、BPA の濃度依存的に ERR γ の活性が回復した。BPA は ERR γ に結合することにより、その構造を活性コンホメーションに安定化させるものと考えられた。今回の研究結果から、環境中に存在する BPA が ERR γ を介してヒトやその他の動物に影響を及ぼす可能性が示された。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質、いわゆる「環境ホルモン」としてノニルフェノール (NP) やビスフェノール A (BPA) による内分泌かく乱が懸念されている。BPA はエストロゲン受容体 (estrogen receptor; ER) を介して作用を示すとされているが、BPA の ER への結合能はエストロゲンに比べると非常に弱い。一方、最近になって BPA が低用量で生体の組織や行動に重大な影響を及ぼすという報告が相次いだ。こうした作用が本当に ER を介しているのか、「低用量問題」として議論の的になっている。BPA は

1891年にDianinによって初めて知られ、1905年にドイツのZinkeにより、アセトンとフェノールから初めて合成された化学物質であり、ポリカーボネート製のプラスチックなどに代用されており、身の回りに広く存在する。これが低用量で内分泌攪乱作用を示す問題の影響ははかり知れないほど重大である。ところで、核内受容体はステロイドやビタミン等の低分子量脂溶性生理活性物質をリガンドとする転写制御因子である。エストロゲン関連受容体 (estrogen-related receptor; ERR) は、ER と非常によく似たアミノ酸配列

をもつことから発見され、ヒトではERR α 、ERR β およびERR γ と3つのサブタイプが存在するが、内在性リガンドや生理機能についてはほとんど分かっていない。ERRの活性に影響を与えるERの合成化合物がいくつか見ついている。ERRはリガンドなしで活性化コンホメーションとなるが、合成化合物 Diethylstilbesterol (DES) や 4-Hydroxy-tamoxifene (4-OHT) はERRの転写活性を抑制する。E2やDES、4-OHTはERに対して、とても強く結合するが、ERRに対してはその結合能が大きく異なる。またERRは、ERの標的遺伝子にあるエストロゲン応答配列 (ERE) と結合する。逆に、ERもERRの応答配列 (ERRE) を認識する。こうしたことから、ERRとERは相互に関連した機能制御系を形成している可能性がある。

本研究では、ERRのコンホメーション変化センシングアッセイ系を構築することを目的に、センシング抗体を調製した。しかしながら、化学物質の結合にもかかわらずほとんど構造変化が観察されない異常な応答が予見されたため、EREにもERREにも結合するERR γ に対して放射性リガンドを用いた詳細な受容体結合試験を行った。その結果、BPAがERR γ に対して強い結合能を持つことが判明し、その結合能はDESやNPに比べ、とても強いものであった。また、BPAのERR γ に対する影響をレポータージーンアッセイにより調べた結果、4-OHTがERR γ を不活性化する一方、BPA自身は構成的活性 (アゴニスト非存在下で受容体が自発的に持っている活性) に全く影響を与えなかった。しかし、4-OHTとともにBPAを細胞に曝露したところ、BPAの濃度依存的にERR γ の活性が回復した。ERR γ の体内における役割は未解明のままであるが、ERR γ は体の至る所で存在し、胎児では脳において高レベルに発現することが知られている。また、妊娠中のラットにBPAを投与すると生まれてくるラットは行動障害になると考えられている。もしも、このような障害がERR γ を経由しているのであれば、ERR γ に対するBPAの効果解明は緊急を要するものと考えられる。そこで今回、ERR γ に対するBPAの効果を受容体結合試験やレポータージーンアッセイにより調べたので報告する。

B. 研究方法

(1) 受容体 ERR γ の調製

ヒト腎臓の cDNA より、PCR を用いて ERR γ の LBD 領域のクローニングを行った。得られ

た PCR 産物の塩基配列を確認したのち、これを発現ベクターに組み換え、大腸菌 (BL21) を用いて ERR γ -LBD の大量発現を行った。イソプロピル 1-チオ- β -D-ガラクトシド (IPTG) で発現誘導をかけること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発現し、GST と特異的に結合するグルタチオンセファロース 4B ビーズを用いて精製した。

(2) 飽和結合試験

飽和結合試験は、受容体の失活を防ぐため、4°Cで行った。GST-ERR γ -LBD と各濃度の [3 H] 標識された 4-OHT (ARC) を binding buffer 中で混合し、インキュベートした。非特異的な結合は過剰量の 4-OHT を放射標識された 4-OHT と併に加えることにより調べた。遊離の [3 H] 4-OHT はデキストラン被膜活性炭溶液を反応溶液に加えることにより取り除いた。

(3) 競争結合試験

一連の環境ホルモン候補物質の ERR γ に対する結合能は、 [3 H] 4-OHT の受容体結合を阻害する能力で評価した。評価する一連の化学物質を [3 H] 4-OHT と ERR γ と共に binding buffer 中で混合し、インキュベートした。遊離の [3 H] 4-OHT はデキストラン被膜活性炭により取り除いた。化学物質の IC₅₀ 値 ([3 H] 4-OHT 受容体結合を 50% 阻害する値) はプログラム ALLFIT により算出した。

(4) レポータージーン試験

HeLa 細胞をシャーレに播き、インキュベート後、ERRE レポータープラスミドと 1 μ g の ERR γ 発現プラスミドを細胞に導入した。24 時間後に 96 穴プレートにて化学物質を曝露した。化学物質のルシフェラーゼ活性は、受容体が自発的に持っている活性を 1 として、化学物質を加えた際の濃度依存的な値の増減を評価した。

C. 研究結果

(1) ERR γ 受容体の発現と飽和結合試験

ヒト腎臓の cDNA クローニングより ERR γ のクローンを得て、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大腸菌で発現した。精製条件の改良を重ね、最終的に 10 の培養液から約 5 mg の発現タンパク質を得ることができた。次に、結合試験系を構築するため、ERR γ と結合が報告されて

いる 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) の ^3H -標識体をトレーサーとして反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F 分離の条件を詳細に検討した。その結果、 ^3H 4-OHT の特異的結合を十分量与える要件の設定に成就した (図 1)。

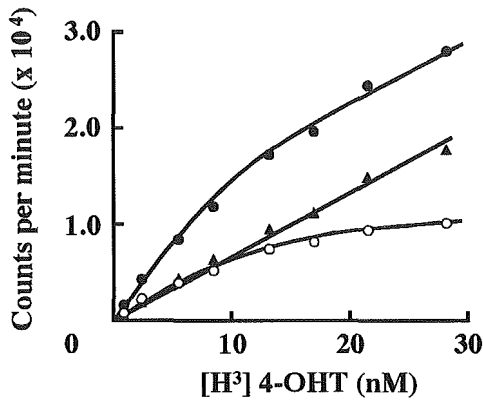


図 1. ERR γ 飽和結合試験
ERR γ に対する ^3H 4-OHT の全結合 (●) と非特異的結合 (▲)、特異的結合 (○) を示す。

表 1. 化学物質の ERR γ に対する結合能

化学物質	結合能
17 β -estradiol (E2)	-
estriol (E3)	-
ethynylestradiol	-
equilin	+
17 α -estradiol	+
coumestrol	+
estrone (E1)	+
dihydrotestosterone (DHT)	-
testosterone	-
progesterone	-
dexamethasone (DEX)	-
cortisone	-
cortisol	-
deoxycorticosterone	-
corticosterone	-
5 α -androstan-3 β , 17 β -diol	-
biochanin A	-
genistein	-
diadzein	-
zearalanone	-
gossypol	-
phenol red	-
phenol phthalein	-
methyl orange	-
methylene blue	-
diethylstilbestrol (DES)	++
tamoxifen (TAM)	++
4-nonylphenol	++
bisphenol A	++

(-) 結合能無し, (+) 弱い, (++) 強い

スキッチャードプロット解析を行った結果、 K_d 値は 11 nM であり、 B_{max} は 0.2 nmol/mg であった。予想以上に ^3H 4-OHT の非特異的な結合が見られたが、特異的結合は全結合の 40~50% あり、結合試験を行うに十分と判断された。また、受容体の発現量も結合試験を行うに十分な量が確保できた。

(2) ERR γ 受容体に対する様々な化学物質の結合能

結合試験可能な GST-ERR γ -LBD が十分量確保できたことにより、 ^3H 4-OHT を用いて様々な化学物質、生体の内因性ホルモンや合成エストロゲン、植物エストロゲンについて受容体競争結合試験を行った (表 1)。その結果、合成エストロゲンであり、ERR γ を不活性化することが報告されている diethylstilbestrol (DES) と、4-OHT に構造が良く似ている tamoxifen (TAM) は ERR γ に対して高い結合能を持つことが分った。また、E2 などの内因性ホルモンや植物エストロゲン等は、ERR γ に対してほとんど結合能を持たなかった。興味深いことに、ERRs を活性化させると報告のある biochanin A などのイソフラボン類は ERR γ に対してほとんど結合能を示さなかった。一方、驚くべきことに、環境ホルモン候補物質である BPA と NP が ERR γ に対して非常に強い結合能を示した。このように BPA と強く結合する受容体が発見されたのは初めてである。

(3) 化学物質の ERR γ 受容体活性

ERR γ のレポータージーンアッセイでの基盤活性は、例えばエストロゲン受容体と比較すると非常に高い。4-OHT の ERR γ への影響を調べたところ、これを不活性化することが判明した。図 2 に示すように、4-OHT は構成的基盤活性をその 30~40% までに抑えた。この不活性化は、いわゆるインバースアゴニスト活性と呼ばれるものである。

一方、BPA は ERR γ の基盤活性に影響を与えないことが分かった。受容体結合試験では、BPA は ^3H 4-OHT の結合を濃度依存的に置換・阻害する。そこで、4-OHT の基盤活性に対するインバースアゴニスト活性に対する BPA の影響を調べた。4-OHT とともに BPA を細胞に曝露したところ、BPA の濃度依存的に ERR γ の活性が回復した。以上より、BPA は ERR γ に結合することにより、その構造を活性コンホメーションに安定化させる能力をもつと

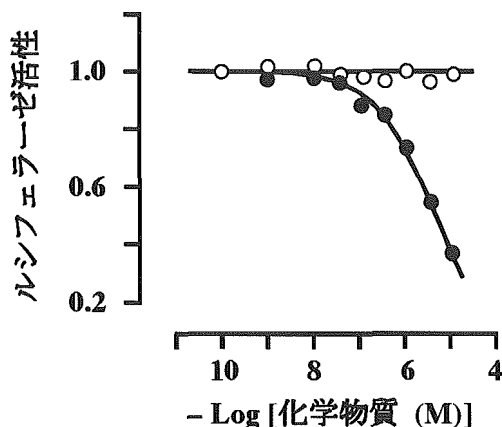


図2. 4-OHT と BPA の ERR γ 転写活性
4-OHT (●) と BPA (○) のレポータージ
ーンアッセイ

考えられた。

D. 考察

レポータージーンアッセイでは ERR γ は非常に強い構成的基盤活性を示し、その活性は ER α に比べ 10 倍以上も強い。これは、ERR γ がリガンド無しで非常に安定な活性型構造を形成していることを示唆する。4-OHT は受容体の活性型構造を壊すように構造を変化させるものと思われる。BPA はこうした活性型構造に影響しないように結合していると考えられる。

この BPA の ERR γ に対する影響は、ER と ERR のクロストーク解明の糸口になるのではと思われる。E2 と 4-OHT は ER に結合し、4-OHT と BPA は ERR γ に結合する。4-OHT は ER に対しては組織特異的なアンタゴニストとして働き、ERR γ に対してはインバースアゴニストとして働く。そして、BPA は ERR γ の活性型構造を安定化させると考えられる。また、ER α と ERR γ は同じ DNA 結合能を持つことが知ら

れており、このような潜在的なクロストークは BPA のエストロゲン様活性を説明するのかも知れない。

ヒト ERR γ は胎児では脳に多く発現しており、成人では体の様々な部位で発現している。近年、BPA の低用量問題が注目され、さまざまな効果が報告されている。一方で、BPA の低用量における効果は無いという報告もある。本研究結果は、この BPA に関する低用量問題の解決に端緒を与えるかも知れない。

今回の研究結果は一方で、ERR γ の真の役割を解明することが重要であることを示している。ERR γ に対する BPA の効果は、その特異的な活性のために、通常のレポータージーンアッセイではその効果を見ることはできない。今後とも ERR γ に関して詳細な検討が必要とされる。また、今まで注目されていなかった ERR γ が重要であると考えられることから、核内受容体全部 (48 種類) を対象として化学物質のスクリーニングして調べることの必要性が強調される。

E. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

F. 研究発表

学会発表

1. 高柳明香、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ (ERR γ) の発現および結合試験系構築、日本内分泌攪乱化学物質学会第 8 回研究発表会、2005. 9. 27-29。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

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

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

研究分担者 下東美樹 福岡大学理学部助手

研究要旨

ショウジョウバエには、ヒトのエストロゲン受容体に非常に良く似た核内受容体・エストロゲン関連受容体（*Drosophila estrogen-related receptor: dERR*）が存在している。このdERRの内在性のリガンドは未だ同定されていない。一方、体内にある生物時計が刻む概日リズム（サーカディアンリズム）の関与する核内受容体様タンパク質・転写因子も、ヒトとショウジョウバエの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。本研究は、ショウジョウバエでの核内受容体を介した内分泌ホルモン作用を「生殖機能」を指標として用いた継代的分析法として発展させ、有効な内分泌かく乱作用 *in vivo* 解析法として確立することを目指している。本年度は、これまでの雌での評価法確立と試験研究を引き継ぎ、雄生体への環境化学物質の影響を産卵数と羽化数の変遷で評価出来る試験系、並びに多世代繁殖試験系を確立した。

A. 研究目的

環境ホルモン、内分泌かく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、ここ数年、ヒトのゲノム解析の完成を受け、「核内受容体」全般（ヒトの場合は48種類）の問題に拡張して考えられている。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るようになってきた。特に、脳神経系受容体に対する化学物質の反応性の解析が緊要の課題と考えられるようになった。こうしたなか、最適な実験動物として継代が短期間で起こり、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、ショウジョウバエを用いた試験系の構築への期待が大きくなった。

本研究課題は、特に *in vivo* 生体系での内分泌かく乱作用の影響を評価する実際的な試験系の開発をめざすものである。これは女性ホルモン・エストロゲン受容体等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けるホルモン活性に対応する最大抗体応答性 R_{max} (%) について、生物活

性の指標算定を目的とするものである。内分泌かく乱物質リスク評価において、*in vivo* 解析は最も重要な要素である。しかも、継代的な評価が可能であることは重要な要素である。化学物質リスク研究における主任研究者の研究課題はホルモン作用を誘起するコンホメーション変化をセンシングする評価法であるが、レポーター遺伝子解析よりもより直接的な *in vivo* 解析が可能と考えられる本法は非常に有効な検証法になり得るため、是非に必要な試験法と思われる。

本研究の最大の特徴は、内分泌かく乱化学物質の「ヒト影響モデル」としての動物実験にショウジョウバエを選び、その多世代繁殖毒性試験系の構築をめざすことにある。ショウジョウバエは昆虫でありながら、染色体構成、遺伝子組成など、遺伝学的に哺乳類に非常に近い動物であり、したがって、実験動物としてはヒトモデルとして最適な種の一つである。ショウジョウバエの最大の特徴は、世代継代がわずか2週間程度で進むことであり、また、乾燥酵母などからなるエサの粉末を溶解凝固させたもので食餌するため、これに化学物質を一定濃度で混合し、その影響を染色体の異常、突然変異遺伝子、行動異常

として観察することが容易であることである。実地には、雌の産卵数を計数するのみで、雄雌の生物体への直接的な生殖影響を観察・監修できる貴重な実験系である。こうした生体での試験には、並行して実施する試験管 (*in vitro*) での試験が必要である。したがって、これまで受容体試験、センシング抗体試験などの構築に成功した主任研究者らの成果を基礎にはじめて展開できるものである。「ヒト影響モデル」動物実験の安定なアッセイ系の開発は緊急な課題であり、本研究ではショウジョウバエをモデルに、化学物質リスク研究事業において *in vitro* 試験系の検証試験系として *in vivo* 試験系を確立しようとするものであり、これまでにない新規な手法を提供するものである。本研究の最終目標は、こうしたアッセイ系を用いて一連の多数の化学物質の内分泌かく乱作用を評定することにある。

本年度は、昨年度までに確立したショウジョウバエ雌生体への影響を評価できる多世代繁殖毒性試験系を改変し、雄生体へのノニルフェノールの影響を交配相手の雌の産卵数と羽化数の変遷で検討した。特に、この化学物質の影響が誕生と同時の食餌する場合と、成虫になってから開始する場合でどのように異なるかを検討した。

なお、平成 16 年度までは化学物質リスク研究推進事業の「外国研究機関等への研究委託事業」(社)・日本食品衛生協会)において、「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」の実験研究として、共同研究者であるカナダのダルハウジー大学・生命科学センターの Ian A. Meinertzhagen (イアン アンソニー マイナーザーゲン) 教授が主導的に実施してきたが、本年度よりはこれまで検証実験を担当していた本分担研究者が引継いで担当するものである。

B. 研究方法

① ショウジョウバエの系統

通常研究に用いられているキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の野生型には Oregon R と Canton S があるが、産卵数の評価には昨年までの実験結果から Canton S が適切であることが分かっていたので、本年度は Canton S を用いた。産卵数の計数・カウントにあたっては、プレート培地に産卵させ、ショウジョウバエを炭酸ガス麻酔で新しい培地に移動させたのちに、1 cm マス目

のカウント用網目を被せて、実体顕微鏡下でカウンターを用いて実数を算定した(図1)。産卵場所は均一でなく、ばらつきがあるために全産卵数を求めた。さらにそこから羽化してくるハエの数をカウントした。



図1 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S 雄の化学物質食餌投与試験における実験

飼育培地は次のようにして作製した。水 1 ℓ に、粉末寒天 8 g、砂糖 100 g、とうもろこし粉 40 g、乾燥酵母 60 g を入れて、強火で沸騰するまで煮込む。沸騰したのちは、さらに弱火で 20 分煮沸する。液体培地が冷めたのちに、ボーキニン 5.3 ml、プロピオン酸 2 ml、ペニシリン 6.67 万ユニット、ストレプトマイシン 16.67 万ユニットを入れて十分に攪拌する。これを直径 9.2 mm のシャーレに液体培地を 24 ml 入れて冷蔵保存する。

② 継代テストの次世代に用いる卵

次世代への継代に用いる卵は、産卵された日が一定であることが望ましい。産卵数に急激な変化がなく、また、一定の数が確保できる日として、昨年までの実験結果から、3 日目を選び 3 日目に産卵された個体群から次世代へ継代した。

③ 交配に用いるショウジョウバエの数

産卵数および羽化数が、雄の生殖能力を反映する交配数を決定する必要がある。何匹ずつの組み合わせで交配するのがよいかを検討した。昨年までの実験結果から、キイロショウジョウバエ Canton S では、雌雄 10:10 で交配させると、雌の産卵能力を反映することがわかっている。しかし、この組み合わせ数では、雄が過剰にいるため、産卵数や羽化数に雄の生殖能力が反映されない。そこで、雌雄 5:2、10:2、15:2、20:2、2

5:2の組み合わせで、産卵数と羽化数を調べた。交配後、3日目の産卵数をカウントした後、25°Cで飼育、羽化した成虫の数をカウントした。

④ 化学物質のショウジョウバエ産卵数の継代テスト

キイロショウジョウバエ Canton S の継代的な飼育試験において、食餌培地に17β-エストラジオールとノニルフェノールを加えてその影響を評価した。用いた培地での最終濃度は、ノニルフェノールについては10⁻³ mol/l、10⁻⁵ mol/l、10⁻⁷ mol/l、17β-エストラジオールでは10⁻⁵ mol/lになるように調整し、飼育培地を作製した。コントロールとしては、これらの化学物質を溶かす溶媒として用いたエタノールを使用した。

親世代 (P) は通常の培地で生育し、羽化後これらの化学物質の入った培地に移した。その成虫の産卵数をカウントした。第1子世代 (F1) および第2世代 (F2) は、培地に生みつけられた卵から孵化し、幼虫時から同じ食餌培地で育った成虫を示す。

雌への化学物質の影響を排除し、雄への化学物質の産卵数と羽化数への影響を調べるために、第1子世代 (F1) 以降は化学物質を含む飼育培地に羽化後3日目に産卵させたプレートから育った個体群から雄のみを選出し、その雄2匹に対して通常培地で飼育した処女雌20匹を交配させた。化学物質を含む新しい培地で、4日目まで産卵数をカウントした。本研究では、第2世代 (F2) まで、産卵数をカウントすることができた。

C. 研究結果

雄の生殖能力を反映する交配数

雄の生殖能力を反映する交配数を決定するために、雌雄5:2、10:2、15:2、

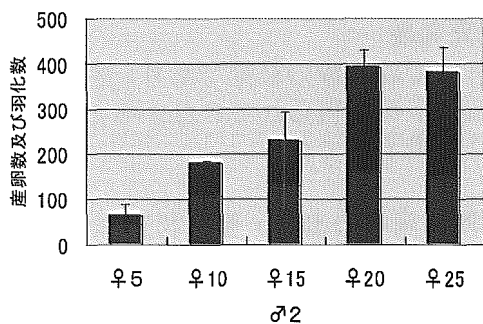


図2 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S 雄2匹に対する雌の交配数とその産卵数および羽化数

20:2、25:2の組み合わせで、産卵数と羽化数を調べた結果、次の結果を得た。雌雄5:2、10:2、15:2、20:2では、産卵数は、メスの数に比例して増加した。雌雄25:2の組み合わせでは、雌雄20:2の産卵数とほぼ同じであった。これは、用いたシャーレの空間許容度が限界に達したためと考えられた。しかし羽化数は、雌雄5:2、の交配群からの卵に対して、雌雄10:2、15:2、20:2、25:2の交配群からの羽化数は、ほぼ同じで約200%であった。従って、雌雄10:2、15:2、20:2、25:2の組み合わせによる羽化数は、雄の生殖能力を反映しているものと考えられた (図2)。

化学物質食餌による継代テスト

キイロショウジョウバエ Canton S では、雌雄10:2、15:2、20:2、25:2の交配数では、3日目の卵からの羽化数が雄の生殖能力を反映することが判明した。しかし、雌雄25:2では、産卵数が制限されていることが推測されるので、交配数20:2で化学物質を含む飼育培地による継代テストを行った。キイロショウジョウバエ Canton S の親世代を、化学物質を含む飼育培地で産卵させた場合、ノニルフェノール10⁻⁵ mol/l および10⁻⁷ mol/l、17β-エストラジオール10⁻⁵ mol/l において3日目の産卵数および羽化数は5~40%増加することが判明した。しかしながら、非常に興味深いことに、孵化直後の幼虫から化学物質を含む飼育培地で育った次世代のショウジョウバエの羽化数は、ノニルフェノール10⁻⁵ mol/l および10⁻⁷ mol/l、17β-エストラジオール10⁻⁵ mol/l において90~50%に顕著に減少した。ノニルフェノール10⁻⁵ mol/l では、この傾向

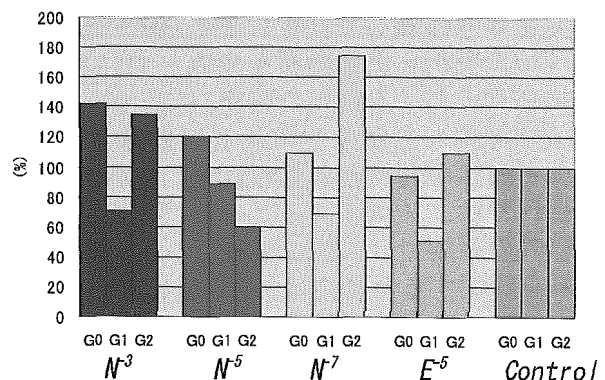


図3 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* Canton S の継代羽化数におよぼす化学物質の影響

はその次の世代、すなわち、継代テストの第2世代 (F2) で、さらに強い影響として観察された。一方ノニルフェノール 10^{-3} mol/l、ノニルフェノール 10^{-7} mol/l では、継代テストの第2世代 (F2) で、羽化数の回復が見られた (図3)。

D. 考察

ショウジョウバエのゲノムプロジェクトが完成して、その中でヒト・エストロゲン受容体と相同な遺伝子が確認され、*Drosophila* ERR (ショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体) と呼ばれている。ショウジョウバエ ERR はヒト・エストロゲン受容体と非常に類似しており、ショウジョウバエにもエストロゲン受容体があると強く示唆される。現在は、この受容体のリガンドは明らかになっていないが、*in vivo* での内分泌かく乱作用の評価法を確立する意義は高い。ショウジョウバエは、約10日で卵から成虫になる。したがって、高等動物に比べると短い期間で何代もの経過を見ることが可能である。例えば、我々ヒトで10代の経過を見るのに約200年かかるのに比べ、ショウジョウバエは約100日で経過を見ることができる。このため、ショウジョウバエによる評価法を確立することは重要な意味があると考えられる。

現在、F2までの実験を実施したが、興味深い結果とともに、問題点もいくつか明らかとなった。結果をまとめると、コントロールと比較して、羽化後に、ノニルフェノール 10^{-3} mol/l、 10^{-5} mol/l、 10^{-7} mol/l を摂取した個体群は羽化後3日の産卵数羽化数が増加する傾向がある。孵化直後から、化学物質を含む飼育培地で生育した第1世代、第2世代の雄による羽化数は減少していた。親世代では幼虫時の精巣における精原細胞が正常に分化し、羽化後はじめて化学物質を摂取するのに対して、第1世代、第2世代の雌は幼虫時から化学物質を摂取しているので、幼虫時における精巣の発達、そこで進行する精原細胞の分化に化学物質が影響を及ぼした可能性が高いと考えられた。しかし、第2世代では、ノニルフェノール (10^{-5} mol/l) 以外の系列では、逆に増加していた。この結果を説明するためには、化学物質を暴露した個体群の一生を通じての総産卵数、羽化数を調べる必要がある。今回の実験では、羽化後

3日目の卵の数とそこから羽化する個体数のみを計測したので、羽化数の減少が、これらの個体群の一生を通しての全羽化数が減少しているのか、あるいは、精原細胞から成熟精子への減数分裂の速度に変化が起こったのかを特定することができない。個体群の総生殖能力を評価するための方法として、例えば、組織学的な評価法の検討が求められる。

今回、ノニルフェノールとエストラジオールを用いて検討した。最近になって、主任研究者らはヒト・ERRの γ 型にビスフェノールAが非常に強く結合することを明らかとした。dERRが最もよく似ているヒト型ERRが γ 型であり、進化原形とも言える。次年度はビスフェノールAについてその影響を試験することにしたい。ビスフェノールAのような化学物質も含め、多種多様な化学物質について検討することが重要と思われる。

E. 結論

本研究により、ショウジョウバエ雄の初期の生殖能力に及ぼす化学物質の影響についての評価法を確立した。野生型Canton Sは、産卵数羽化数にばらつきが少ないため、継代飼育による評価法に適している。雌10匹：雄10匹の交配数は、雌の産卵能力を反映し雌20匹雄2匹の交配数は雄の生殖能力を反映する。 17β -エストラジオール 10^{-6} mol/l とノニルフェノール 10^{-5} mol/l、 10^{-7} mol/l を含む培地で飼育すると、濃度により、世代を重ねるごとに産卵数羽化数が減少する場合と羽化数が回復する傾向があった。今後の課題として、化学物質の濃度差による影響の違いを、個体群の総生殖能力で評価する方法の検討が必要である。

F. 健康危険情報

現在のところ特に、該当する情報はない。

G. 研究発表

これまでは実験の初期であり、発表するまでの成果が特に得られていなかった。次年度よりは発表予定である。

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。

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
X.H. Liu, A. Matsushima, N. Shirasu, Y. Tominaga, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi, T. Nose	Structural Characteristics of <i>Drosophila</i> Estrogen-related Receptor Ligand Binding Domain to Capture the Peptide and Non-peptide Ligands	<i>Peptide Science</i> 2004	2004	303-304	2005
O. Kuwata, T. Honda, D. Asai, T. Tokunaga, A. Shibuya, N. Shirasu, T. Nose, Y. Shimohigashi	Highly Sensitive Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor.	<i>Peptide Science</i> 2004	2004	333-334	2005
A. Shibuya, T. Tokunaga, D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose,	Ligand-inducing Conformation Changes in the Estrogen Receptor C-Terminal Tail Moiety and Their Sensing by Polyclonal Antibodies	<i>Peptide Science</i> 2004	2004	351-354	2005
H. Okada, T. Tokunaga, N. Shirasu, A. Matsushima, T. Nose, Y. Shimohigashi	α -helix peptides for bio-panning in the phage display method to obtain the antibodies specific for conformation-change nuclear receptors	<i>Peptide Science</i> 2005	2005	291-294	2006
S. Yokotani, T. Honda, M. Kawano, A. Matsushima, Y. Shimohigashi	Monoclonal antibody sensing assay for conformation change induced by metal binding to prion protein N-terminal octarepeat domain	<i>Peptide Science</i> 2005	2005	455-456	2006
T. Tokunaga, H. Okada, T. Nose, Y. Shimohigashi	Conformation Sensing Assay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal α -helix of Glucocorticoid Receptor and Progesterone Receptor	<i>Peptide Science</i> 2005	2005	475-478	2006

研究成果の刊行物・別刷り

Structural Characteristics of *Drosophila* Estrogen-related Receptor Ligand Binding Domain to Capture the Peptide and Non-peptide Ligands

Xiaohui Liu¹, Ayami Matsushima¹, Naoto Shirasu¹, Yoshiya Tominaga²,
Miki Shimohigashi², Yasuyuki Shimohigashi¹, and Takeru Nose¹

¹Laboratory of Structure-Function Biochemistry, Kyushu University,
Fukuoka 812-8581, Japan, and ²Laboratory of Biology,
Fukuoka University, Fukuoka 814-0810, Japan
e-mail: xiaohuiscc@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

In order to establish the binding assay system for Drosophila estrogen-related receptor (dERR), we examined a few triturated ligands for expressed dERR-ligand binding domain (LBD). None of those compounds that were reported as binders for mammalian ERR revealed binding activity. When constructed a 3D model of the dERR-LBD, its ligand-binding pocket exhibited a very limited space, suggesting a rather tiny size of ligand for receptor activation.

Keywords: computational analysis, estrogen receptor, estrogen-related receptor, ligand binding domain.

Introduction

A series of estrogen-related receptors (hERR α , β , γ) have recently been found in human as components to modulate the ordinary estrogen receptors (hER α , β), and they appeared to be a novel target of endocrine disruptors. No ER-like receptors have been found in the genome of the fruit fly *Drosophila melanogaster*, but instead an ERR-like nuclear receptor was revealed. When the amino acid sequences were compared, this termed as the *Drosophila* estrogen-related receptor (dERR) was found to resemble most closely the hERRs at both the DNA binding domain (DBD) and the ligand-binding domain (LBD) [1]. Thus, this receptor likely belongs to the steroid hormone subfamily NR3 of nuclear receptor.

In the present study, we carried out the cDNA cloning of full-length dERR, expression of dERR-LBD, and the receptor-binding assay. In addition, we carried out a computational analysis of dERR-LBD to understand the result of the receptor binding assay.

Results and Discussion

We first amplified dERR cDNA clone by PCR using dERR-gene-specific primers (ERR-*EcoRI*:5'CCGGAATTCATGTCCGACGGCGTCAGCAT3', ERR-*Sall*:5'CGAGTCGACTCACCTGGCCTGGCCAGCGGCTCGA3') for five different

cDNA libraries derived from *Drosophila* embryo, larvae-pupae, adult head, ovary, and adult testis. Eventually, from the testis cDNA library, we obtained a full-length of dERR cDNA clone, which is comprised of 1,455 bp oligonucleotides with a mature protein of 482 amino acid residues.

The amino acid sequence of clarified dERR was aligned together with hERRs and hERs for analysis of domains. A cDNA fragment (residues 734-1455, n=241) corresponding to the LBD was subcloned into pGEX-6p-1 vector for its expression in *E. coli* BL-21 cells as a GST-fusion protein. For screening of the ligands of dERR, we used purified GST-dERR-LBD fusion protein and newly developed the radio-ligand binding assay system. In this binding assay, we utilized polyethylene glycol for receptor protein precipitation followed by rapid filtration. While natural ligand is not known yet, the ER agonist diethylstilbestrol (DES) and the selective ER modulator 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) have been identified as hERR γ antagonists [2-4]. Thus, we used tritiated analogues of these compounds as tracers. However, no obvious specific binding was observed, suggesting that the structure of dERR binding site is different from that of hERR γ .

Homology modeling using four different ERR-LBD structural data as templates was carried out to construct a 3D model structure of dERR. The binding site analysis revealed that dERR-ligand binding pocket (LBP) has a binding pocket rather smaller than mouse ERR γ -LBD-LBP (data not shown). When compared the structure of mERR γ -LBD containing DES or 4-OHT, it was found that dERR-LBD places the residual indole group of Trp-459 in the LBP. Apparently, this makes DES and 4-OHT to be unable to bind to this small pocket of dERR (Fig. 1).

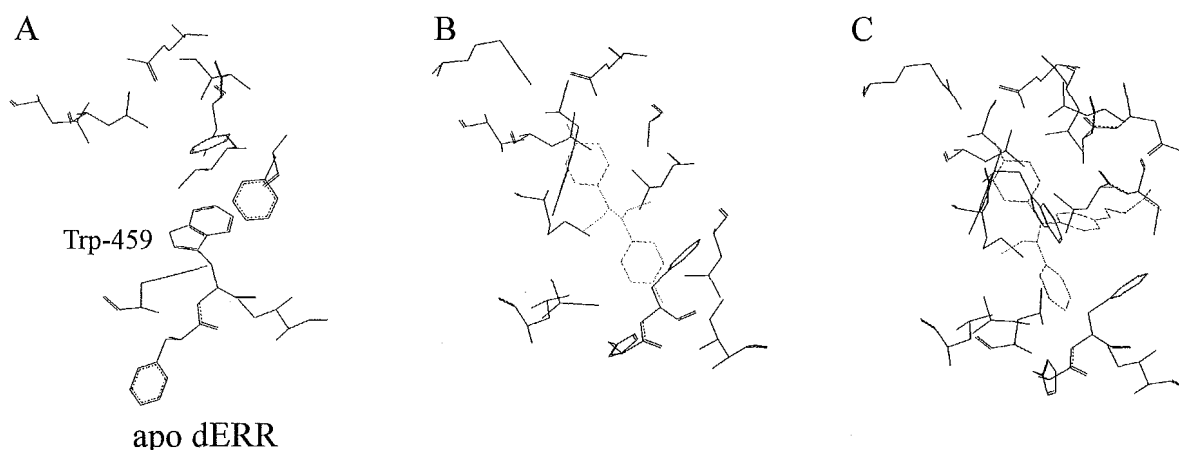


Figure 1. Comparison of ligand binding pockets of dERR (A: by homology modeling), mERR γ with DES (B: 1S9P), and mERR γ with 4-OHT (C: 1S9Q). Ligand molecules of DES (B) and 4-OHT (C) were depicted in gray scale.

References

1. Östberg, T., Jacobsson, M., Attersand, A., Urquiza, AM., and Jendeberg, L. (2003) *Biochemistry*, **42**, 6427-6435.
2. Tremblay, G.B., kunath, T., Bergeron, D., Lapointe, L., Champigny, C., Bader, J.A., Rossant, J., and Giguère, V. (2001) *Genes Dev.* **15**, 833-838.
3. Tremblay, G.B., Bergeron, D. and Giguère, V. (2001) *Endocrinol.* **142**, 4572-4575.
4. Coward, P., Lee, D., Hull, M.V., and Lehmann, J. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8880-8884.

Highly Sensitive Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor

Osamu Kuwata, Takeshi Honda, Daisuke Asai, Takatoshi Tokunaga,
Ayumi Shibuya, Naoto Shirasu, Takeru Nose, and Yasuyuki Shimohigashi

*Laboratory of Structure-Function Biochemistry, Department of Chemistry, Faculty
and Graduate School of Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan*
e-mail: kuwatascc@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp

Estrogen receptor (ER) changes its conformation upon ligand binding. Mouse monoclonal antibodies (mAbs) were raised against an ER C-terminal 17-mer peptide involved in such a conformation change, and a set of mAbs were demonstrated to detect efficiently the receptor conformation change. The results indicate that these mAbs can be used as a sensitive molecular tool to evaluate the potential risk of environmental xenoestrogenic chemicals.

Keywords: conformation change, conformation-sensing, endocrine disruptors, estrogen receptor, monoclonal antibody.

Introduction

Rapid and effective evaluation of the biological effects of suspected environmental chemicals has become increasingly important to shed light on the critical issue of endocrine disruption in humans and animal wildlife. Xenoestrogenic effects caused by environmental chemicals cause most threat to mammalian hormonal activities, and the estrogen receptor (ER) is the major target of endocrine disrupting chemicals (EDCs). The ER and other nuclear receptors are known to change their conformation after binding ligands, as evidenced by X-ray crystallographic analyses. The resulting relocation of the C-terminal α -helix numbered 12 (H12) within the ligand-binding domain of the receptors is the most prominent and common feature of ligand-induced conformation change, which leads to an ultimate hormonal action. We have previously demonstrated that a rabbit antiserum raised against human ER α -H12 peptide was able to detect this conformation change in ER [1]. Here we present the preparation of a number of mouse monoclonal antibodies (mAbs) that detect such changes even more efficiently.

Results and Discussion

A 17-mer peptide corresponding to the ER α H12 moiety was synthesized and immunized into the footpads of Balb/c mice. Lymph cells were isolated ten days

after immunization and fused with mouse myeloma cells to obtain hybridomas. Among hundreds of antibody-secreting hybridomas tested, a number exhibited affinities towards both the peptide and ER α in the early rounds of screening by competitive ELISA. From among these, antibodies were selected that could detect the conformation change induced by 17 β -estradiol (E₂), an agonist of ER. This selection assay (*conformation sensing assay*) was carried out using the competitive ELISA method to detect and differentiate the different affinities toward ligand-bound and -free ERs. Several mAbs showed conformation-sensing capabilities similar to those of the previous polyclonal antibodies. Eventually, a few were found to possess higher efficiency in sensing, because they required smaller amounts of the ER as the competitor and of H12 peptide as the immobilized antigen.

The conformation-sensing mAbs were further applied to assay several tens of known chemicals. The effective concentrations of chemicals to elicit a half maximal immunological response from the mAb, the EC₅₀ value, correlated well with, but were lower than those of the polyclonal antibody (Fig. 1). These results clearly indicate that the mAbs were > 10 times more sensitive. The fact that their EC₅₀ values are almost compatible with those obtained in the competitive receptor binding assays suggests that the conformation change detected by our mAbs reflects appropriately the ligand-binding.

For mAbs that displayed conformation-sensing capabilities, the epitopes were analyzed using sequence analogs of antigen peptides that were additionally synthesized. In a conformation sensing assay using different ligands, one set of mAbs was sensitive to the conformation change induced only by E₂, while another mAb displayed a differential sensitivity toward an antagonist-induced change as well. The difference in the ligand sensitivity among these sets of mAbs is relevant to the difference in the location of their respective epitopes within the H12 moiety, indicating that the mAbs are sufficiently specific to distinguish the different conformation changes induced by agonists and antagonists. In conclusion, the use of these mAbs should allow a highly effective and accurate evaluation of the latent risk of EDCs.

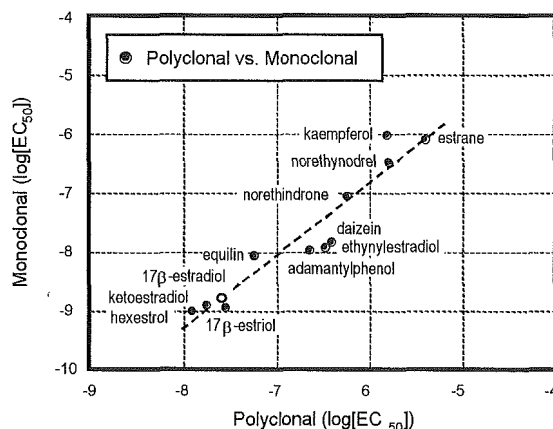


Figure 1. Correlation of the conformation sensing assays using polyclonal and monoclonal antibodies against ER α . Chemicals were assayed and their effective concentrations to elicit half-maximal immunological responses were plotted against each other. Correlation coefficient was 0.96, and regression coefficient was 0.63.

Reference

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