

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

核内受容体結合能およびホルモン活性同時測定法に  
よる化学物質リスク評価

平成18年度  
総括・分担研究報告書

平成19（2007）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. 総括研究報告	
核内受容体結合能およびホルモン活性同時測定法による 化学物質リスク評価 下東康幸-----	1
II. 分担研究報告	
1. エピトープ解析、ポリクローナル抗体の設計作製および試験 野瀬 健-----	39
2. ファージディスプレイ法によるヒト核内受容体 48 種センシ ング抗体の作製 松島綾美-----	45
3. モノクローナル抗体の設計作製および試験、特に ERR $\gamma$ 認識 抗体について 下東美樹・徳永隆俊-----	53
4. エストロゲン関連受容体 $\gamma$ に対する化学物質の受容体応答解析 徳永隆俊-----	59
5. 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 下東美樹-----	65
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	71
IV. 研究成果の刊行物・別刷り-----	73

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括研究報告

核内受容体結合能およびホルモン活性同時測定法による化学物質リスク評価

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、48種のヒト核内受容体に対する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を目的に、それぞれ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を得る統括的な設計法・調製法を確立し、この抗体を分子ツールとし、核内受容体48種類すべてに対して環境化学物質の内分泌攪乱作用性を評価する、一般的なアッセイ法を確立することを目指す。このために、まず、ポリクローナル抗体によりセンシングアッセイ法を確立し、次いで、抗体ファージディスプレイ法、あるいは細胞融合法により調製したモノクローナル抗体によりアッセイの高効率化をはかる。既に平成17年度までにエストロゲン・女性ホルモン受容体およびアンドロゲン・男性ホルモン受容体について試験法を確立した。平成18年度には、新たに12種の核内受容体についてセンシング抗体の作製に取り組んだ。全48種のヒト核内受容体のうち36種について取り組みを開始し、本年度までに15種についてセンシング抗体アッセイ法を確立した。こうしたなか、自発活性化型ヒト核内受容体・エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型（ERR $\gamma$ ）について「ビスフェノールAがERR $\gamma$ のインバースアンタゴニストである」ことを初めて明らかとした。そして、特に『低用量効果』の渦中にある内分泌かく乱化学物質が非常に強く結合し、その活性に影響を及ぼすヒト核内受容体が現実に存在することが世界で初めて判明した。これは、48種すべての核内受容体をターゲットとする研究、試験の重要性を強調する重要な発見である。このように、全48種すべての核内受容体を視野に入れたセンシング抗体アッセイ法のプロジェクトは、化学物質および核内受容体を双方向から解析する新規な手法であり、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る。

分担研究者

野瀬 健（九州大学大学院理学研究院  
化学部門・助教授）

松島綾美（九州大学大学院理学研究院  
化学部門・助手）

下東美樹（福岡大学理学部・地球圏科学・  
生物学分野・講師）

（研究協力者）

徳永隆俊（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）

A. 研究目的

現代社会は、必需品や利便製品の生産などに多種多様な化学物質が利用されている。現在、世界では数万種類の化学物質が流通し、我が国においても毎年約300種の新たな化学物質が市場に投入されている。こうしたなか、化学物質のリスク評価は総合的で迅速性が緊要であり、その高度化が求められている。一般に、多数の化学物質の内分泌かく乱性のスクリーニングでは、ホルモン受容体（核内受容体）への結合性、ホルモン活性、および抗ホルモン活性のそれぞれについて試験されねばならず、煩雑であり、非効率的である。また、複数の試験の結果を基に、内分泌かく乱性の順位付けをするのは困難を伴う。

申請者らはこれまで「受容体センシング法」という、ホルモン受容体への結合性とホルモン活性の有無を1つの試験系で同時に評価するアッセイ法の開発に成功した。この方法は、リガンドが結合していない空(から)の受容体コンホメーション(アポ型)と、リガンドが結合した受容体コンホメーション(ホロ型)とは大きく異なること、また、アポ型からホロ型への変化の内容は、アゴニストとアンタゴニストでは異なることを利用し(図1参照)、こうした受容体コンホメーション変化の違いを感知・センシングする抗体を用いて、コンホメーションの変化量を化学物質の結合能と活性程度として定量するものである。

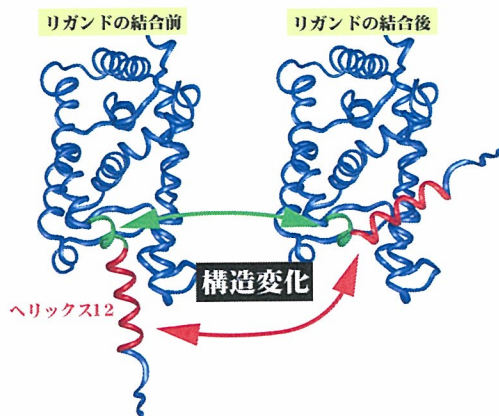


図1. 核内受容体のリガンド結合前(アポ型)および結合後(ホロ型)の構造  
リガンドがアゴニストとアンタゴニストでは、ホロ型コンホメーションのヘリックス12の位置取りが異なる。

この「受容体センシング法」を用いて、エストロゲン・女性ホルモン受容体およびアンドロゲン・男性ホルモン受容体について試験法を確立した(図2)。また、アゴニストとアンタゴニストが誘起する異なるコンホメーションをセンシングする高感度のモノクローナル抗体の選別に成功し、受容体結合性とホルモン活性および拮抗性を総合的に定量できることを示した。こうして、受容体センシング法は化学物質のホルモン受容体に対する統合的なリスク評価法として非常に優れた方法である。

ところで本年度、リガンド無しに初めから活性化コンホメーション、すなわち、ホロ型のコンホメーションになっている核内受容体がヒト48種類のうち10数種類もあることが判明した(図3)。これら自発活性化型受容体に対しては、レポーター遺伝子アッセイ

法および酵母 Two-hybrid アッセイ法は共にその高い活性を阻害する作用しか測定できず、したがって、インバースアゴニストしか評価できないことが明らかとなった。このことは、受容体センシング抗体法でも同様であった。そこで本年度、「化学物質がどのように働くか?」の観点から調べる新規な受容体センシング抗体法を考案することにした。

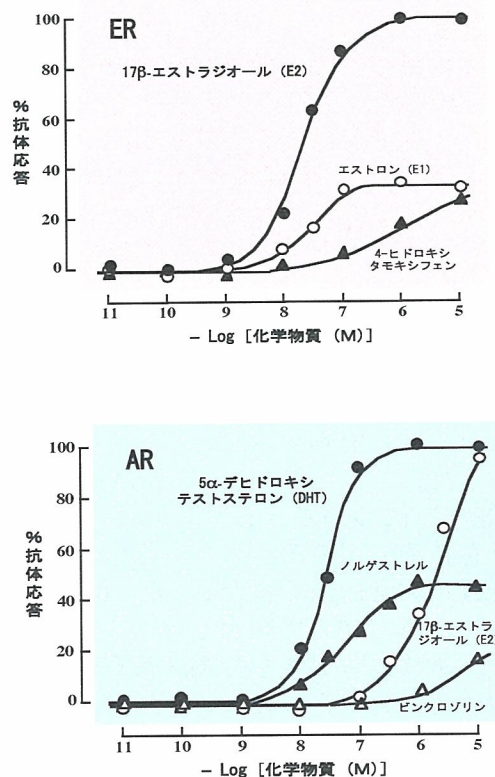


図2. 核内受容体コンホメーション変化センシング抗体法によるエストロゲン受容体(ER)およびアンドロゲン受容体(AR)での抗体応答活性



図3. 自発活性化型核内受容体 ERRγ の生理活性コンホメーション  
ヘリックス12が当初よりフタをした構造。

本研究課題では、高感度のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、さらには抗体ファージディスプレイ法を用いて受容体コンホメーション変化センシング抗体を取得し、各ホルモン受容体について内分泌かく乱性の順位付けを実施する。特に、ヒト 48 種の核内受容体すべてを視野に入れつつ、緊急度の高いホルモン受容体として、エストロゲン受容体ホモログ (ER $\beta$ 、ERR $\alpha$ 、ERR $\beta$ 、ERR $\gamma$ )、グルコルチコイド受容体 (GR) 等についてリスク評価として内分泌かく乱性の順位付けを実施することを目的とする。

また、平成 17 年度に発見した「ビスフェノール A の受容体はエストロゲン関連受容体  $\gamma$  型・ERR $\gamma$  である」という新事実は、18 年度には、放射標識したビスフェノール A を用いた直接の受容体結合試験で証明することにした。ERR $\gamma$  については、その重要性および緊急性のため、優先してセンシング抗体アッセイ法の確立に取組むこととし、ポリクローナル抗体、ファージディスプレイ法および細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製を実施することにした。

## 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

核内受容体の第 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,  $\phi = 1.8$  cm,  $l = 75$  cm) および逆相 HPLC (Lichrospher RP-18(e),  $\phi = 25$  mm x 250 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/ $\mu$ l) に、MBS の DMF 溶液 (3.6 mg/12  $\mu$ l) を 9.3  $\mu$ l 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  $\mu$ l に、トリス- (2-シアノエチル) ホスフィン水溶液 (5 mg/ml) を 200  $\mu$ l 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  $\mu$ l) および 0.2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (115  $\mu$ l) 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。なお、17 種類の核内受容体に対する抗体 (11 種) について、作製を外注した。

#### (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行った。

#### 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) 調製した抗体の核内受容体に対する応答の解析

調製した抗体の核内受容体に対する応答をELISAにより調べた。核内受容体 ( $10^{-7}$ ~ $10^{-12}$  M, 90  $\mu$ l) を天然リガンド ( $10^{-6}$ ~ $10^{-10}$  M もしくは 0 M; 10  $\mu$ 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  $\mu$ l) を加えて 4  $^{\circ}$ 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  $\mu$ g/ $\mu$ l, 50  $\mu$ 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する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-ethyl-benzthiazoline-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  $\mu$ l/well とした。

### (7) センシングアッセイ

核内受容体 (40 nM, 90  $\mu$ l) に対して化学物質 ( $10^{-11}$ ~ $10^{-5}$  M, 10  $\mu$ 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  $\mu$ g/ $\mu$ l, 50  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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、基準のリガンド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

EC<sub>50</sub> 値の算出は以下のように行った (図 4)。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<sub>max</sub> (%) として、これをグラフより算出した。さらに、得られた

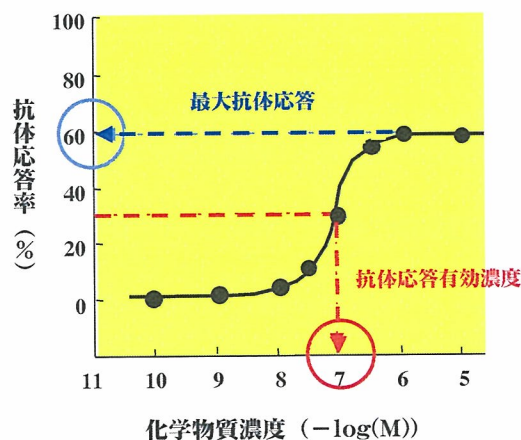


図 4. 受容体コンホメーション変化センシングアッセイの解析

シグモイド様曲線を解析プログラム ALLFIT で数理解析し、Rmax (%) 値の 50% に対応する化学物質濃度を抗体応答有効濃度 (EC<sub>50</sub>) とし、この値を算出した

上記のようにして求めた最大抗体応答性 Rmax (%) は、試験化学物質が受容体を活性化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、EC<sub>50</sub> 値は化学物質と受容体との結合の強さの指標となる。

### (9) エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型 (ERR $\gamma$ ) に対するコンホメーション変化センシングアッセイ

(8) までに記述された核内受容体に対するセンシング抗体アッセイは、既に女性ホルモン・エストロゲン受容体 (ER)、男性ホルモン・アンドロゲン受容体 (AR) について化学物質を試験する一般法として確立された。

今回特に、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) に対する受容体結合性が報告されたエストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) について先行してセンシング抗体アッセイ法を構築することにした。基本的に ER および AR のアッセイ系構築に準じて順次に実施した。ポリクローナル抗体作製にあたっては、エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型の第 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)に記されているのと同様に行った。

#### 【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

核内受容体 (NR) 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いだされている  $\alpha$  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 日目に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 NR 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 NR 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、NR のみを競合剤として用いた場合と NR に予めリガンドである化学物質を添加して用いた場合との間で NR 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、例えば、17 $\beta$ -エストラジオール (E<sub>2</sub>) 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 (4-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 NR に対する認識部位を調べることは、センシング能力がどのような分子認識の変化によって創製されるのかを分析し、より優れた抗体作製のために必要な要件である。抗原ペプチドを基本単位として、配列が一部重複するペプチド等を化学合成して、間接 ELISA を行って、抗体の反応性を比較した。

なお、モノクローナル抗体の作製、特性、センシング抗体法の確立の詳細に関しては、分担報告書を参照されたい。

## 【抗体ファージディスプレイ法によるモノクローナルセンシング抗体の調製】

### (1) 抗原ペプチド・スクリーニング用タンパク質の調製

NR について、化学合成した LBD の H12 付近の配列から成るペプチドを、キャリアタンパク質 (KLH、あるいは BthG) に架橋した。一方で、NR-LBD に相当する遺伝子断片をタンパク質発現ベクター・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体分子のスクリーニングに用いる NR-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 I 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 5)。

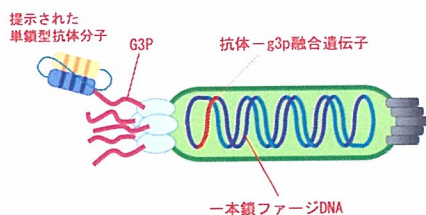


図 5. ファージ抗体の構造

抗原特異的な抗体を発見したファージ粒子を選択的に濃縮させるため、図 6 に示すようなバイオパンニングを 3 回繰返した。より効率的に抗体を得る必要があると認められたときは、特異的なファージ粒子をさらに濃縮することを目的として 4 回繰返以上返した。回収したファージは、過剰量の宿主菌 TG-1 に感染させ、培養プレートに播種した。育成後のプレートからシングルコロニーを回収することで、得られたファージ抗体群をモノクローナル化した。

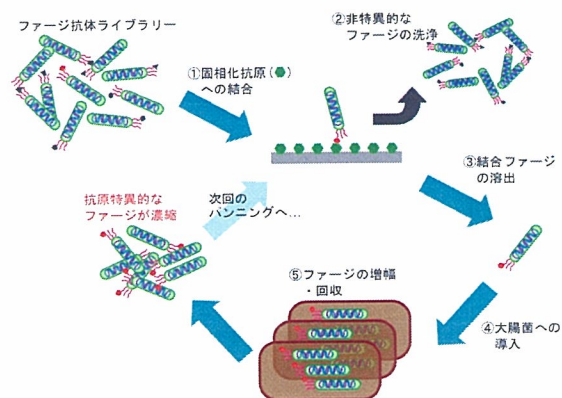


図 6. バイオパンニング

### (3) ファージクローンのスクリーニング

1 次スクリーニングのため、ペプチドによるバイオパンニングに引き続き、NR-LBD を用いた間接 ELISA を実施した。NR-LBD を 96 穴プレートに固定化、洗浄後、ブロッキングした。これにパンニング後のファージモノクローナル抗体を各ウェルに加え、反応させた。未結合の抗体を洗流後、M13 ファージ認識二次抗体 (Pharmacia 社) により結合ファージ抗体を検出することにより NR-LBD に特異的な結合能を持つファージクローンを探索した。得られたファージクローンに対して DNA のオリゴヌクレオチドについてシークエンス解析を実施し、提示された抗体分子のアミノ酸配列を確認した。

必要に応じて合成ペプチドを固定化し、全長 NR (Panvera 社) を競合剤として用いた競合 ELISA 法による 2 次スクリーニングを実施した。NR のみを競合剤として用いた場合とリガンドを結合させた NR を用いた場合との間で抗体応答に差異のあるファージクローンを検定した。

### (4) コンホメーション変化センシングファージ抗体による化学物質応答

2 次スクリーニング後のファージ抗体を用いた競合 ELISA 法により、内因性アゴニストであるコルチゾール、外因性アゴニストである DEX、アンタゴニストであるミフェプリストン (RU486) によるコンホメーション変化センシング抗体法による化学物質評価を実施した。

#### 【*in vitro* 核内受容体応答解析】

(1) 核内受容体放射性リガンド飽和結合試験  
放射性リガンドを用いて飽和結合試験



(saturation receptor binding assay) が可能であるのは、対象の核内受容体に対して内在性リガンドが分かっており、それがトリチウム等で標識された化合物がある場合である。非放射性リガンド 10  $\mu$ M 共存下および非共存下で、放射性リガンド 0-100 nM の範囲でそれぞれ nonspecific binding、total binding を測定した。そのうえで、total binding から nonspecific binding を差し引くことで有効な specific binding を算定した。

放射性リガンドの核内受容体結合性については、specific binding を Schachard 解析した。解析された曲線より解離定数と単位蛋白質あたりの結合量を算定した。

なお、内在性リガンドが未解明であり、結合する合成リガンドも不明の場合は、各種トリチウム標識化学物質を用いてスクリーニング的な saturation receptor binding assay を実施する。一方、specific binding を得るために通常は結合試験の条件 (B/F 分離のためのデキストリン被膜活性炭の量、温度、受容体量など) の詳細な検討が必要である。

## (2) 核内受容体競合結合試験

specific binding が得られたとき、最大結合量の約 1/3 を与える量 (濃度) の放射性リガンドを用いて競合結合試験を実施する。当初 10 倍希釈により  $10^{-5}$ - $10^{-12}$  M の範囲で各種化学物質が放射性リガンドを置換する量を測定する。置換が認められた濃度域においては、希釈率を下げた詳細な解析を実施した。

### (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。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。さらに、ファージディスプレイ法は一般の抗体作製法とは異なり、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、動物愛護の観点からの倫理上の問題はない。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。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

### (1) 16 年度までの研究結果のまとめ

平成 14 年度から 16 年度までに実施した研究とその成果を基盤としているため、まずこれらの成果を取りまとめ、そのうえで新規な研究展開を正しく表記することとする。

#### 【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 H12 が結合化学物質にフタをするように構造変化する。これにより、抗体の受容体への結合量が減少し、この減少の程度を化学物質の濃度を変えて測定し、用量依存的な抗体応答性の変化の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は既に図 2 に示した。

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ことが判明した。図 6 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

ついて第1期に分析された503化学物質の

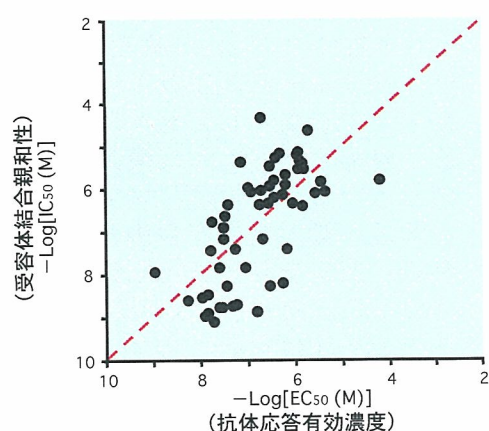


図7. 抗体応答有効濃度と受容体結合能

うち390種は、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予測した。その結果、① 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)、② 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)、③ 活性は弱い但其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)、④ 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(⑤)に分類した。その後解析した化学物質のほとんどは、第4グループ、あるいは第5グループに属した。これらの結果については最終的に一つの順位付けとして最終年度に収録する予定である。

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で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・ $17\beta$ -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8)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8)。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。

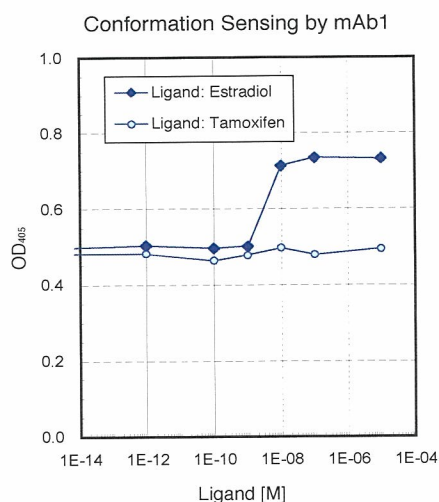


図8.  $17\beta$ -エストラジオール(E2)特異的センシングモノクローナル抗体mAb1

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、グループ2およびグループ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)の概ね良い正の相関性が示された(図9)。しかし、62種すべての化合物について正の相関性がみられた訳ではなかった。このポリクローナル抗体とモノクローナル抗体での差異は予想されたもの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。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

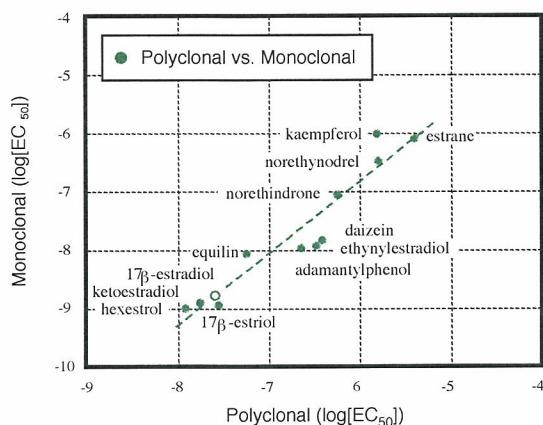


図9. ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いた時のセンシング抗体法における抗体応答有効濃度の相関性

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、あるいはインバーサゴニストである可能性があり、アンタゴニスト応答性の mAB2 のようなモノクローナル抗体を用いたアッセイで検討する必要がある。

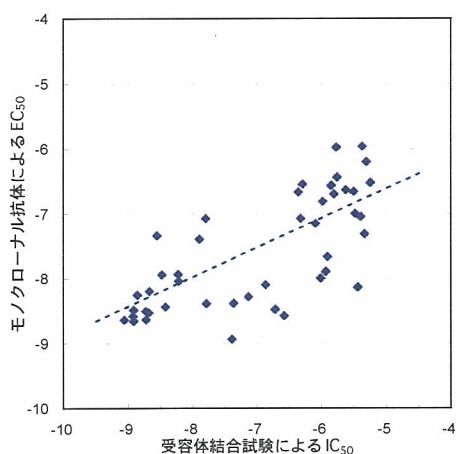


図10. 抗体応答有効濃度と受容体結合能との間の正の相関性

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。

### 【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アッセイ法】

男性ホルモン・アンドロゲン受容体（AR）についても、まずポリクローナル抗体の作製に成就した。センシングアッセイでは5 $\alpha$ -デヒドロキシテストステロン（DHT）を標準化学物質として試験系を構築した。その結果、得られた抗体がアポ型受容体とホロ型受容体について、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は既に図2に示した。

センシング抗体法によるARに対する詳細なアッセイを、これまでにAR受容体結合試験の結果が得られた一連の化学物質約250種について実施した。ARについては結合性のある化学物質は非常に少なく、大部分のものは結合しない。こうした結合性プロフィールは、センシング抗体法でも実際に示された。

本実験に使用のARは、全長を発現したものであり、市販品である。核内受容体のアッセイでの本質的な問題の一つは、如何に受容体タンパク質を入手するかであり、そして、リガンド結合ドメイン（LBD）で充分か、それとも全長（全構造）体が必要なのか、ということである。ARは、そのN末端構造がLBDと相互作用しているといわれ、LBDのみでは解析が不良である。したがって、可能であれば全長体でアッセイすることが望まれる。

### 【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 $\alpha$ -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、昨年度までに、黄体ホルモン・プロゲステロン受容体（PR）とグルココルチコイド受容体（GR）に対する抗体について、精製、センシングアッセイ法の構築に成就した。得られた抗体は、抗原ペプチドと各受容体に対して良好な反応性を示し、代表的な化学物質に対して良いセンシング能を示した。現在までに、それぞれの受容体に対して約50種類ずつの化学物質のセンシングアッセイを実施し、検証中である。

## (2) 平成 17 年度の研究成果

### ① ポリクローナルセンシング抗体の作製

受容体の構造変化を感知するセンシング抗体は、核内受容体 LDB の  $\alpha$  ヘリックス 12 (H12) 部分を主なエピトープとする。このため、各核内受容体についてまず H12 を同定する必要がある。現在のところ、X 線結晶解析による立体構造が決定されている核内受容体 LBD は全体の約 1/4 しかない。

そこで、ヒトゲノム解析で解明された核内受容体の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、その配列を基に Clustal X 相同性解析を実施した。エストロゲン受容体  $ER\alpha$  の H12 に相当する部分のアラインメントの結果を図 12 に示す。H12 の長さによって一定の収束値はないが、大体 8~12 mer (アミノ酸残基数) である。また、アミノ酸の類似性は、グループ内ではかなり高いものの、グループ間では両親媒性ヘリックスの親水性側に特徴的な酸性アミノ酸配列が見られる。これは、コアクティブ

ータ結合に重要な配列である。

図 12 に示すように、H12 に相当する領域 (図中の下線) は、単純にアミノ酸配列の相同部位に重ならない。そこで、X 線結晶構造を参照しながら 2 次構造予測を行いヘリックス構造が推定された領域の前後をエピトープとすることとした。

抗体の作製にあたり、まず発現した受容体タンパク質が供給可能な核内受容体 17 種類について抗原ペプチドの設計、化学合成を実施することにした (表 3)。なお、H12 部分において相同性がきわめて高い核内受容体が存在した。表 3 に示す、番号 1、2、5、6 および 9 の同族核内受容体群である。これらについては、同じ抗体を用いることにした。したがって、化学合成したのは合計 11 種の抗原ペプチドである。

ペプチドの化学合成は、自動合成機にて、Fmoc 法で実施した。抗体の作製はその多くを外注にて実施した。

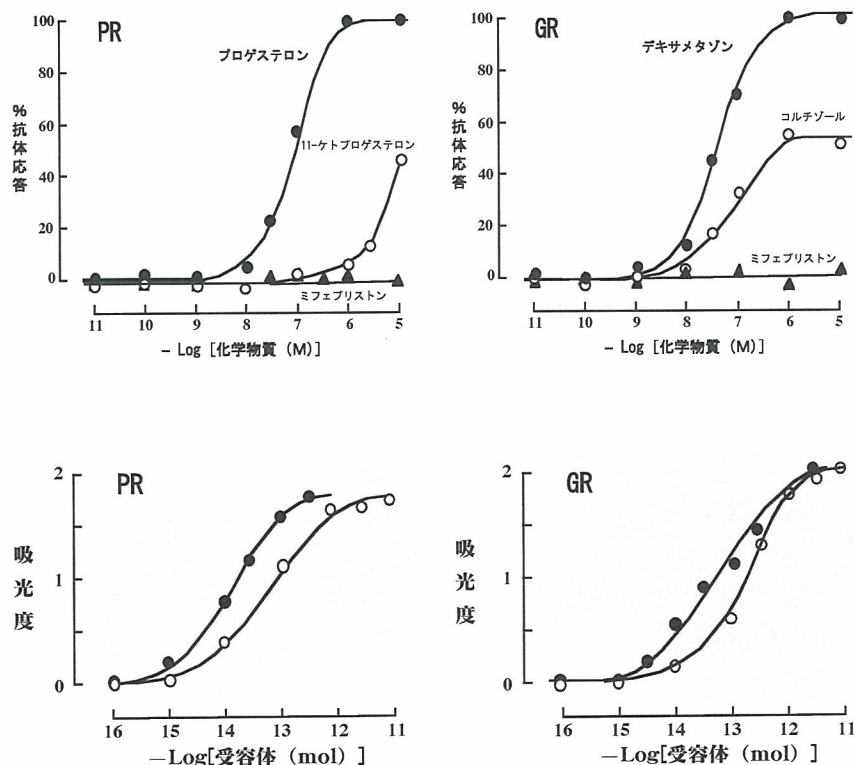


図 11. ポリクローナル抗体による核内受容体 2 種類のセンシング抗体法の解析結果

PR: プロゲステロン受容体、GR: グルココルチコイド受容体。

上段はセンシングアッセイ、下段はタイターチェック。

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 $\alpha$ -Ethynelestradiol-3-cycl opentaether	274	97.3
4	17-Epiestriol	11.6	102	36	Daidzein	324	38.0
5	Estriol	13.0	113	37	2,4,4'-Trihydroxybenzophen one	329	64.9
6	Diethylstilbestrol	13.5	79.0	38	5 $\alpha$ -Dihydrotestosterone	363	77.0
7	16-Ketoestradiol	14.9	64.4	39	Norethindrone	490	77.7
8	16 $\alpha$ -Hydroxyestrone	16.9	63.6	40	$\beta$ -Zearalanol	506	47.0
9	Ethynyl estradiol	17.1	91.0	41	Isoliquirtigenin	555	42.1
10	Diethylstilbestrol	22.9	74.1	42	4,4-Dihydroxydiphenyl	565	65.1
11	17 $\beta$ -Estradiol	23.1	100	43	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl) -4-methyl-n-pentane	608	12.0
12	6 $\beta$ -Hydroxyestradiol-17	23.3	42.0	44	4,4'-Dihydroxy benzophenone	610	56.9
13	6-Ketoestradiol	27.2	73.0	45	6-hydroxy-2- naphthyldisulfide	716	37.0
14	$\beta$ -Zearalanol	28.3	43.0	46	<i>p</i> -naphtholbenzein	833	42.0
15	Mestranol	29.2	82.0	47	6-hydroxyflavanone	969	43.0
16	$\alpha$ -Zearalanol	30.1	61.0	48	3',4',7-Trihydroxy isoflavone	1040	45.3
17	17 $\alpha$ -Estradiol	10.1	54.0	49	2,3,4,4'-Tetrahydroxy benzophenon	1190	48.2
18	Dehydrostilbestrol	32.9	61.0	50	$\beta$ -Estradiol-3-benzoate	1250	89.4
19	Coumestrol	35.8	61.0	51	Kaempferol	1280	50.6
20	6 $\alpha$ -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- $\beta$ -estradiol	67.4	80.7	55	Nonylphenol	2470	30.0
24	4-Hydroxyestradiol	81.0	85.0	56	6-Ketoestradiol-6-( <i>o</i> -carbox ymethyl)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-methyl phenyl)propane	4080	78.0
27	5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -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'-Dihydroxy diphenylmethane	55400	44.0
30	4,4'-Dihydroxytetraphenyl methane	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 EC<sub>50</sub> (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	抗体有効濃度 (log[EC <sub>50</sub> ])	最大抗体 応答性	化合物名	抗体有効濃度 (log[EC <sub>50</sub> ])	最大抗体 応答性
16-ketoestradiol	-8.93	1.08	17 $\alpha$ -ethynylestradiol- 3-cyclopenta ether	-7.66	1.27
17 $\beta$ -estradiol	-8.65	1.00	diethylstilbestrol dipropionate	-7.39	0.80
ethynyl estradiol	-8.63	1.28	estrone	-7.34	0.46
diethylstilbestrol	-8.63	1.09	2-methoxy- $\beta$ -estradiol	-7.31	0.96
17-epiestriol	-8.58	0.97	norethindrone	-7.15	1.10
$\alpha$ -zearalenol	-8.57	0.79	4-hydroxyestradiol	-7.07	0.72
6 $\alpha$ -hydroxyestradiol	-8.52	0.91	coumestrol	-7.07	0.94
6-ketoestradiol	-8.50	0.86	$\beta$ -estradiol-3-benzoate	-7.04	1.18
dihydroxytetraphenylmethane	-8.49	0.13	3',4',7-trihydroxyisoflavone	-7.00	1.16
17 $\beta$ -estradiol	-8.48	1.00	genistein	-6.81	0.76
17 $\alpha$ -estradiol	-8.48	1.00	6-ketoestradiol-6- (o-carboxymethyl)oxime	-6.70	1.01
16 $\alpha$ -hydroxyestrone	-8.47	0.96	norethynodrel	-6.66	1.12
estriol	-8.44	0.82	4-cyclohexylphenol	-6.66	0.40
6 $\beta$ -hydroxyestradiol-17 $\beta$	-8.39	1.04	isoliquirtigenin	-6.63	0.98
equilin	-8.38	0.72	4,4'-dihydroxydiphenyl	-6.56	0.68
4-(1-adamantyl)phenol	-8.28	0.56	4,4'-thiobis-phenol	-6.54	0.24
diethylstilbestrol	-8.25	0.96	5 $\alpha$ -dihydrotestosterone	-6.52	1.40
estrone 3-hemisuccinate	-8.20	0.50	4,4'-dihydroxydiphenyl- methane	-6.43	0.25
estriol 3-methyl ether	-8.13	0.89	2,3,4,4'-tetrahydroxy- benzophenone	-6.20	0.83
mestranol	-8.10	1.04	2,4,4'-trihydroxybenzo- phenone	-5.98	1.08
dehydrostilbestrol	-8.04	0.79	$\beta$ -zearalanol	-5.97	0.83
5 $\alpha$ -androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol	-7.99	1.05	kaempferol	-5.96	0.75
2-hydroxyestriol	-7.89	0.80	daizein	-5.32	1.22

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 EC<sub>50</sub> (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。

抗原ペプチドの合成は、Fmoc アミノ酸を用いた HBTU-HOBt 法による固相自動合成で行った。合成したペプチドのうち数種類は、水溶液に対する溶解性が著しく低く、このような合成ペプチドのカラムクロマトグラフィーでの精製はなかなか困難を伴い、収率が低下した（データは省略）。

NR3A1_ER $\alpha$ _	YSMKCKNVVPLYD <u>LLLEMLDA</u> HRLHAPTSRG 490
NR3A2_ER $\beta$ _	LNMKCKNVVPLYD <u>LLLEMLNAH</u> VLRGCKSSI 490
NR3B2_ERR $\beta$ _	YSVKLQGGKVP <u>MHKLFL</u> EMLEAKAWARADSLQ 490
NR3B3_ERR $\gamma$ _	YNIKLEGKVP <u>MHKLFL</u> EMLEAKV----- 482
NR3B1_ERR $\alpha$ _	YGVKLEGKVP <u>MHKLFL</u> EMLEAMMD----- 483
NR3C1_GR_	FQTFLD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 489
NR3C2_MR_	FYTFRESHALKVEFPAMLVEIISDQLPKVES 490
NR3C3_PR_	LNTFIQSRLSVFEPPEMSEVIAAQLPKILA 490
NR3C4_AR_	FDLLIKSHMVSVDPEMMAEIIISVQVPKILS 490
NR2A1_HNF4 $\alpha$ _	QFVKLFGMAKIDNLLQEMLLGGSPSDAPHAH 490
NR2A2_HNF4 $\gamma$ _	QFVKLFGMVKIDNLLQEMLLGGASNDGSHLH 490
NR2B1_RXR $\alpha$ _	FFFKLIIGDTPIDTFLMEMLEA----- 480
NR2B2_RXR $\beta$ _	FFFKLIIGDTPIDTFLMEMLEA----- 480
NR2B3_RXR $\gamma$ _	FFFKLIIGDTPIDTFLMEMLET----- 480
NR2C1_TR2_	FFKGLIGNIRIDSVIPHILKMEPADYNSQII 490
NR2C2_TR4_	FFTGLIGNVSIDSIIPYILKMETAEYNGQIT 490
NR2E1_TLX_	FFKKTIGNVPIITRLLSDMYKSSDI----- 483
NR2E3_PNR_	FFRKTIGNTPMEKLLCDMFKN----- 480
NR2F1_COUPTFI_	FFVRLVGKTPIDTFLIRDMLLSGSSFNWPYMS 490
NR2F2_COUPTFII_	FFVRLVGKTPIDTFLIRDMLLSGSSFNWPYMA 490
NR2F6_EAR2_	FFMRLVGKTPIDTFLIRDMLLSGSFTFNWPYGS 490
NR0B1_DAX1_	FFRPIIGTVSMDMMLEMLCTKI----- 482
NR0B2_SHP_	FFRPIIGDVIAGLLGDMLLR----- 481
NR5A1_SF1_	YHKHLGNEMPRNLLIEMLQAKQT----- 483
NR5A2_LRH1_	YYKHLNGDVPYNNLLIEMLHAKRA----- 483
NR1A1_TR $\alpha$ _	LHMKVECPTE---ELFPPLFLEVFEDQEV--- 484
NR1A2_TR $\beta$ _	LHMKVECPTE---ELFPPLFLEVFED----- 481
NR1B1_RAR $\alpha$ _	ITLKMEIP---GSMPP <u>LIQEMLE</u> NSEGLDT 486
NR1B2_RAR $\beta$ _	ITLKMEIP---GSMPP <u>LIQEMLE</u> NSEGHEP 486
NR1B3_RAR $\gamma$ _	ITLKMEIP---GMP <u>PPIREMLE</u> NPMPFED 486
NR1C1_PPAR $\alpha$ _	QIIKKTESDAA---LHPL <u>LQE</u> IYRDMY---- 483
NR1C2_PPAR $\beta$ _	QRIKKTETETS---LHPL <u>LQE</u> IYKDMY---- 483
NR1C3_PPAR $\gamma$ _	QVIKKTETDMS---LHPL <u>LQE</u> IYKDLY---- 483
NR1D1_Rever $\beta$ $\alpha$ _	LSFRVDAQ----- 467
NR1D2_Rever $\beta$ $\beta$ _	LAFKVP----- 466
NR1F1_ROR $\alpha$ _	MAFKAIYPDI VRLHFPPLYKELFTSEFEPAM 490
NR1F2_ROR $\beta$ _	QVFKQSHPEIVNTLFPPLYKELFNPDCATGC 490
NR1F3_ROR $\gamma$ _	QIFQHLHPVIVQAAPPPLYKELFSTETESPV 490
NR1H2_LXR $\beta$ _	FALRLQ----DKKL <u>PPLSEI</u> WDVHE---- 481
NR1H3_LXR $\alpha$ _	FALRLQ----DKKL <u>PPLSEI</u> WDVHE---- 481
NR1H4_FXR_	MSWRVN----DHKFT <u>PLLCEI</u> WDVQ---- 480
NR1I2_PXR_	RLRLIQ---DIHPFATPLMQELFGITGS--- 484
NR1I3_CAR_	QIQHIQ---GLS-AMM <u>PLLQE</u> ICS----- 479
NR1I1_VDR_	RCLSFQP---E <u>CSMKLTPLV</u> EVFGNEIS--- 485
NR4A2_NURR1_	FYLKLEDLVPPPAIDKLFDLTLPF----- 484
NR4A3_NOR1_	FYLKLEDLVSPPSIDKLFDLTLPF----- 484
NR4A1_NGFIB_	FYLKLEDLVPPPAIDKIFMDTLPF----- 484
NR6A1_GCNF_	LEQLPLLFKVVLHSCKTSVSGKE----- 481

図 12. 核内受容体 LBD・ $\alpha$ ヘリックス 12 領域のアミノ酸配列アラインメント  
下線部分がヘリックス 12 相当部分。

本研究においては、ポリクローナル抗体はウサギに免疫して作製した（調製を外注依頼：樹ジーンネット社）。得られた抗血清より抗体画分を調製して、抗体力価を試験した。全ての抗体において、抗原ペプチドに特異的で、用量依存的な明確な抗体力価が認められた。現在、これらのアフィニティ精製に取りかかっており、逐次にセンシングアッセイ系構築のため受容体応答の解析を進めている。

## ② ファージディスプレイ法によるモノクローナルセンシング抗体の作製

これまでに、核内受容体の  $\alpha$ ヘリックス 12 を中心とした断片ペプチドを抗原にし、動物免疫によってコンホメーション変化に対する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、それを用いた内分泌かく乱作用性の簡便な評価系構築に成功している。しかしながら、動物免疫を経る抗体作製法では、①経済的・時間的なコストが高い、②核内受容体のように哺乳類間で高度に保存された分子への高親和性抗体を得ることは困難、③免疫動物体

表 3. センシング抗体作製のために設定した 17 種類の核内受容体 LBD  $\alpha$ ヘリックス 12 由来の抗原ペプチド

番号	名称	通称	配列
1	NR1A1	TR $\alpha$	CPT <u>ELFPPLFLEVF</u> E
	NR1A2	TR $\beta$	CPT <u>ELFPPLFLEVF</u> E
2	NR1B1	RAR $\alpha$	CKMEIPGSM <u>PPLIQEMLE</u> N
	NR1B2	RAR $\beta$	CKMEIPGSM <u>PPLIQEMLE</u> N
3	NR1B3	RAR $\gamma$	CKMEIPGMP <u>PPIREMLE</u> N
4	NR1C1	PPAR $\alpha$	CAL <u>HPLLQE</u> IYRDMY
	NR1C2	PPAR $\beta$	CSL <u>HPLLQE</u> IYKDMY
5	NR1C3	PPAR $\gamma$	CSL <u>HPLLQE</u> IYKDLY
	NR1H2	LXR $\beta$	CRLQDKKL <u>PPLSEI</u> WDV
6	NR1H3	LXR $\alpha$	CRLQDKKL <u>PPLSEI</u> WDV
	NR1H4	FXR	HKFT <u>PLLCEI</u> WDVQ
8	NR1I1	VDR	<u>CSMKLTPLV</u> EVFGNEIS
	NR2B1	RXR $\alpha$	CKLIGDTPIDT <u>FLMEML</u>
9	NR2B2	RXR $\beta$	CKLIGDTPIDT <u>FLMEML</u>
	NR3A2	ER $\beta$	CKNVVPLYD <u>LLLEMLNAH</u> V
11	NR3C2	MR	<u>CMLVEIISDQL</u> PKVESGNAK

赤字で示すのは、X線結晶構造解析から同定されたヘリックス 12

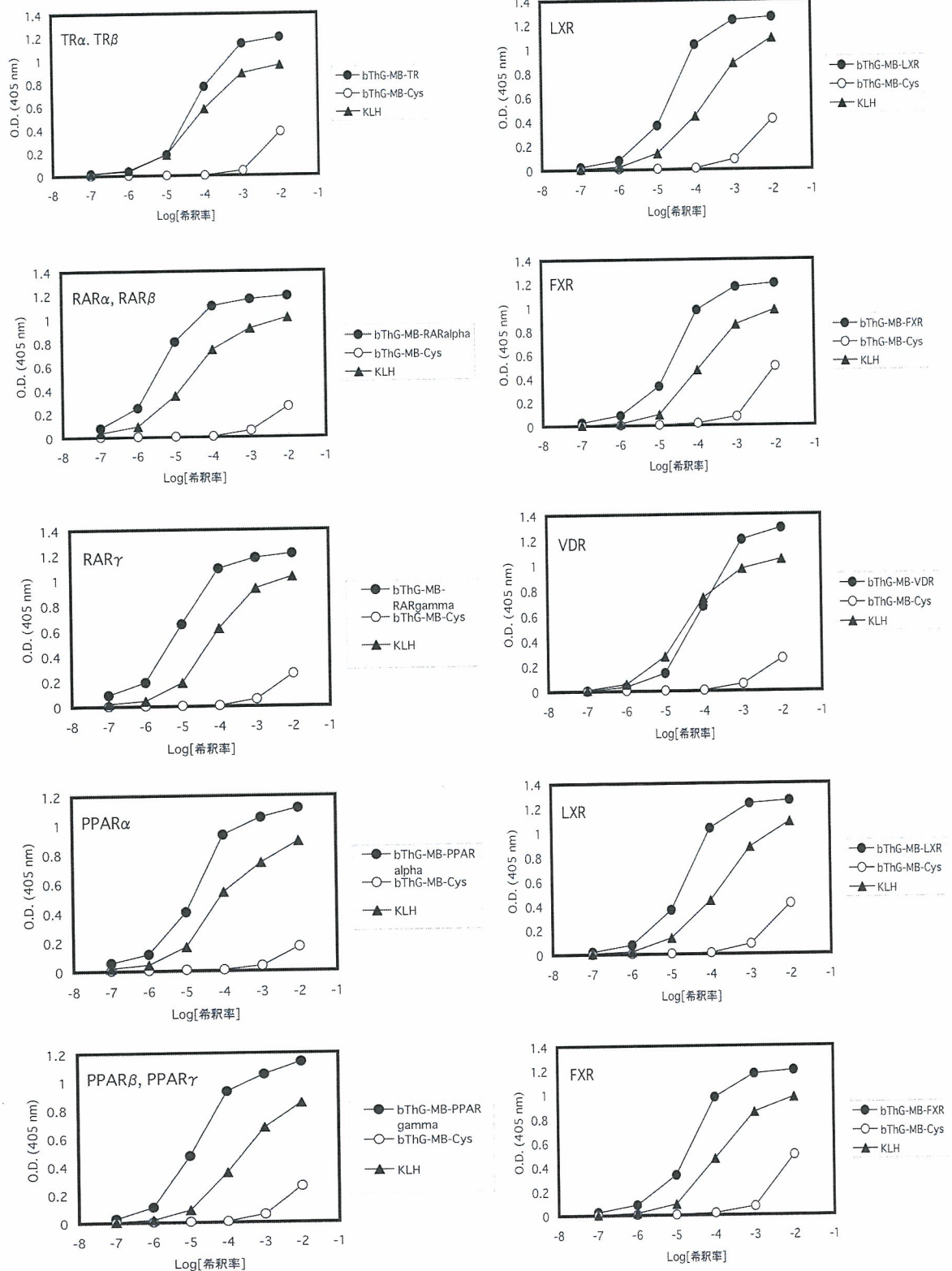


図 13. ウサギ由来抗ヘリックス 12 ポリクローナル抗体の力価の検討  
 表 3 における番号 1 ~ 10 の抗原ペプチドで作製したポリクローナル抗体を用いた。



内での強力な取捨選択により、得られる抗体の抗原認識および機能の多様性が低い、などの問題を内包しているのも事実であり、48種という数多くの核内受容体についてセンシング抗体を得る上では大きなネックである。

そこで、昨年度よりファージディスプレイによる抗体作製法を導入した。本手法は、ファージと呼ばれるウイルスに抗体タンパク質を産生させる手法で、試験管内でテーラードな抗体作製を可能にするものであり、高効率にセンシング抗体を得ることが期待される。本研究では、センシング抗体法の48種への展開を見据えた抗体作製系の確立を目的として、生体内のほぼ全ての細胞で発現する一般的な核内受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) についてセンシング抗体の作製を行ない、さらに改良した抗体作製系を ER $\alpha$  において展開した。今回、抗体選別操作に適切な抗原ペプチドをデザイン・使用することで目的の結合特異性を持つ抗体を選別することが可能であることが示され、実際に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ファージ抗体を得るに至った。

### GR センシング抗体の作製

GR のアゴニスト結合型での H12 は、アンタゴニスト結合型の H12 よりも C 端側にずれていることが X 線結晶構造解析より分かっている。このため、この構造情報に基づいて 2 種のペプチドを用いると、① アゴニスト結合型 H12 を認識する抗体、② アンタゴニスト結合型 H12 を認識する抗体、③ いずれの構造も識別する抗体を得ることができる。これを可能する手法が「バイオパンニング」で

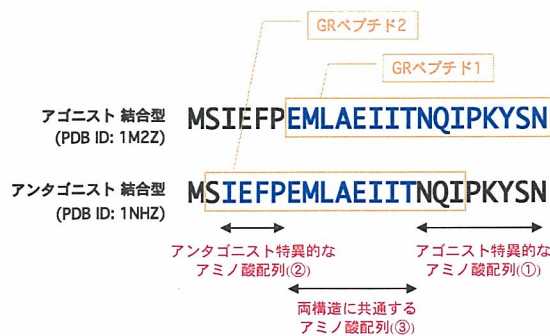


図 14. GR 抗原ペプチドの配列  
青で示す配列が H12 を形成。2 つのペプチドにより③を認識する抗体を選別。

あり、これによって選別することを計画した。平成 17 年度には、アゴニストおよびアンタゴニスト両方の化学物質評価に有効な抗体の取得が期待される③の選別に着手した (図 14)。

第 1 回目のバイオパンニングでは、GR ペプチド 1 を用いた。第 2 回目および 3 回目のバイオパンニングにおいては、より高親和性の抗体を回収するために固定化抗原の濃度を希釈し、また、ライブラリー反応後の洗浄操作を 20 回に増やして厳しくした。さらに、第 3 回目のパンニングにおいては、固定化抗原を GR ペプチド 2 に変更することで、アゴニスト結合型とアンタゴニスト結合型に共通する配列部分を認識する抗体が選別・回収されるように実施した。回収したファージは、過剰量の宿主菌 TG-1 に感染させ、培養プレートに播種した。育成後のプレートからシングルコロニーを回収することで、得られたファージ抗体群をモノクローン化した。

合計 3 回のバイオパンニングにおける溶出ファージの力価を調べた結果、 $6.7 \times 10^5$  のファージが回収された。これは効率としてはかなり良い成績である。これらをモノクローン化した後、得られた 120 クローンについて GR-LBD による 1 次スクリーニングを実施した。1 次スクリーニングでは 3/120 クローンにおいて有意に高い吸光度が検出され、特異的な結合が認められた (図 15)。

それらクロンの DNA シークエンス解析を実施したところ、2/3 クローンが同一の抗体分子を提示していることが判明した (図 16)。得られた 2 クローンについて 2 次スクリーニングを行なった結果、ペプチド抗原濃度 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、GR 濃度 1 nM 条件下での競合 ELISA においてリガンド有無の抗体応答に約 10% の差異を与えるセンシング抗体 scFv  $\phi$  A (上記クローン A 由来) を得ることに成功した (図 17)。

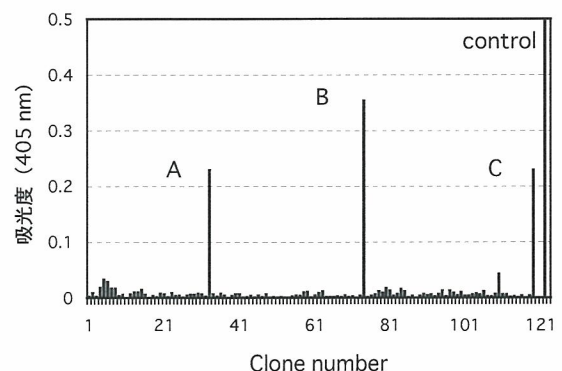


図 15. 1 次スクリーニングの結果 (GR)

Clone	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
A	SYAMS	-----	-----
B	SYAMS	-----	-----
C	RYSMR	YYADSVKG	GRPPFDYWGGTLVT
	* *		

Clone	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
A	RASQSISSYL	TASYLWS	YGYPNPFGQGTKVEI
B	RASQSISSYL	TASYLWS	YGYPNPFGQGTKVEI
C	RASQSISSYL	AASDLQS	NYSTPDTFGQFTKVEI
	*****	*** *	* **** *

図 16. 各ファージクローンに提示された抗体可変領域アミノ酸配列の相違

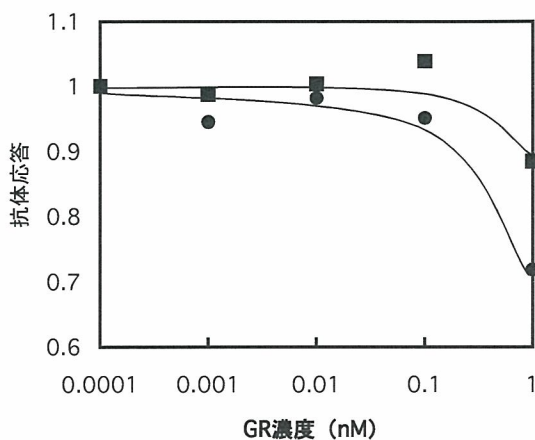


図 17. 2次スクリーニング (GR) の結果

scFv  $\phi$  A は、アゴニスト結合型とアンタゴニスト結合型の両方の構造において、リガンド依存的なコンホメーション変化を識別することが期待されるモノクローナル抗体である。そこで実際に、scFv  $\phi$  A を用いたセンシング抗体法による化学物質評価を実施し、内因性アゴニストであるコルチゾール、外因性アゴニストである DEX、アンタゴニストである RU486 をリガンドとした場合におけるセンシング能を調査したところ、いずれのリガンド結合に対しても鋭敏な抗体応答が検出された (図 17)。この結果は、バイオパンニングによって目的とするセンシング抗体の選別が可能であることを示す有力な証拠である。

### ER $\alpha$ センシング抗体の作製

ER $\alpha$  についても、GR 同様にセンシング抗体の作製に着手したが、48 種の核内受容体を対象とした高効率な抗体作製系の構築のために、パンニング回数を増やし、1 次スクリーニングをペプチド抗原のみで行うよ

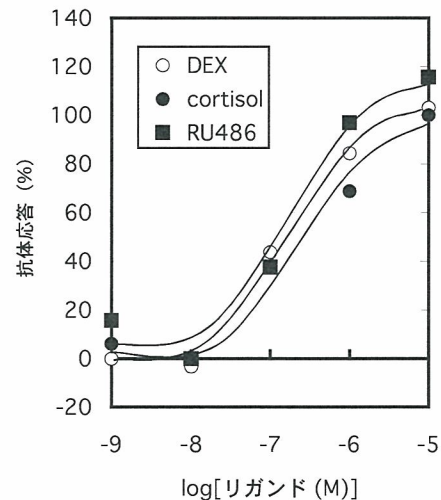


図 18. scFv  $\phi$  A によるコンホメーション変化センシングアッセイの結果

う改良した。4 回目のバイオパンニングにおける溶出ファージの力価を調べた結果  $1.3 \times 10^9$  のファージが回収されたことが確認され、目的抗体を提示したファージ粒子がかなり濃縮されたことが分かった。これらをモノクローナル化した後、188 クローンを対象に 1 次スクリーニングを実施したところ、実に 163 クローンがペプチド抗原を特異的に認識することが判明した。

### ③ モノクローナルセンシング抗体の作製

細胞融合法によって、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のと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。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する実験を実施した。

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 18)。このように、1 次スクリーニングでは、平均して 1、2 % 程度のクローンしか得られない。次いで、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、アゴニストを用いてスクリーニングを実施した。

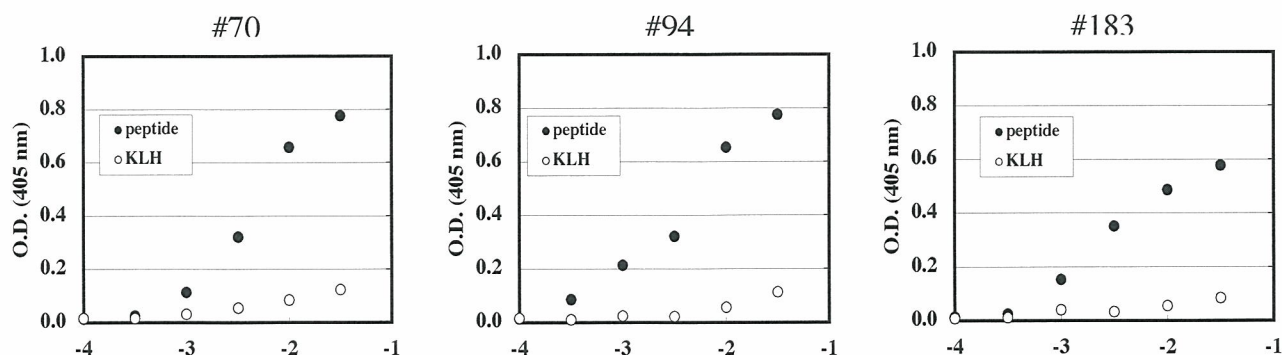


図 19. GR に対するクローン #70、#94、#183 の KLH やペプチドに対する抗体応答。横軸には培養上清の希釈率を、縦軸には二次抗体により発色した ABTS の吸光度を示している。

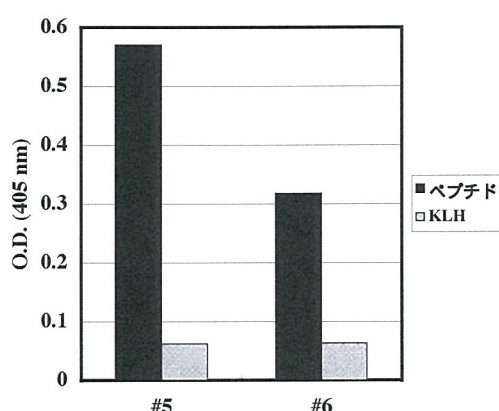


図 20. AR クローン #5、#6 の KLH、抗原ペプチドに対する抗体応答

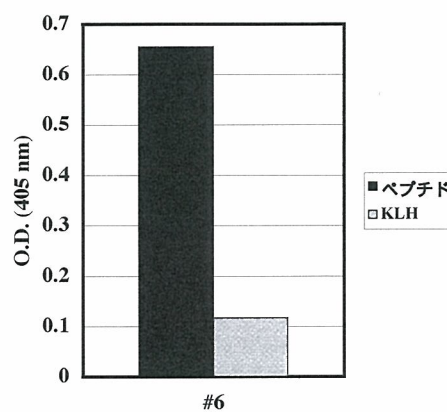


図 21. TR クローン #6 の KLH および抗原ペプチドに対する抗体応答

AR に関しては、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た。そして、これらの ELISA スクリーニングにより、AR の 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 20)。

TR に関しても 384 well 中 28 well に細胞の増殖が見られた。しかしながら、H12 ペプチドに特異性の高い抗体クローンは 1 種 (#6) しか見出せなかった (図 21)。こうして得られた AR や TR のクローン関係しても、GR と同様のスクリーニングを実施した。

上に指摘したように、有効な抗体クローンは約 400 well 中数種類しかなく、クローンを得る事自体が非常に困難を伴う。さらに、得られたクローンが目的のセンシングために有効かは、さらに調べる必要があり、その確率は決して高くない。したがって、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。

#### ④ エストロゲン関連受容体 $\gamma$ (ERR $\gamma$ ) に対する化学物質の受容体応答解析

ポリクローナル抗体によるセンシングアッセイにおいて、最初に調製した抗体が抗原ペプチドには感応するものの、受容体タンパク質に対しては感応しないという異常な応答性を示したエストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) について、*in vitro* の試験系で精査した。

**飽和結合試験**：ヒト腎臓の cDNA より ERR $\gamma$  のリガンド結合ドメインに対応するクローンを得て、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。精製条件を改良し、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。これを定常的な受容体タンパク質発現条件として確立した。次に、結合試験系を構築するため ERR $\gamma$  と結合が報告されている 4-ヒドロキシタモキシフェン

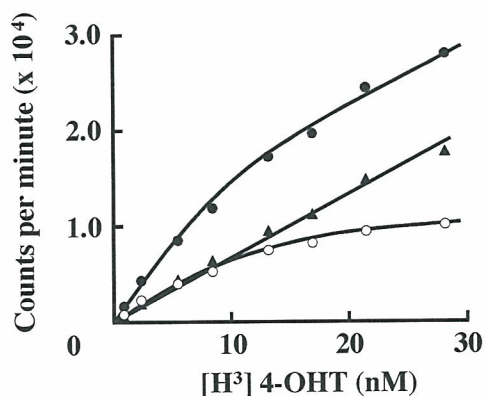


図 22.  $ERR\gamma$  飽和結合試験  
 $ERR\gamma$  に対する  $[H^3]4-OHT$  の全結合 (●) と非特異的結合 (▲)、特異的結合 (○) を示す。

(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 22)。

$[^3H]4-OHT$  の非特異的な結合が多く、条件設定に困難が伴ったが、特異的結合は全結合の 40~50%あり、結合試験を実施可能であった。飽和結合曲線からの Scatchard プロット解析の結果より、 $K_d$  (nM) および  $B_{max}$  (nmol/mg) について良好な解析値が得られた。しかしながら、この  $[^3H]4-OHT$  をトレーサーとして用いる飽和結合試験はかなり不安定であり、トレーサーの受容体結合が恒常的ではない、あるいは発現タンパク質の構造が十分に熟成されない (天然型の立体構造への巻き上がりが不十分) などの原因が考えられた。

**競合結合試験** : まず、競合結合試験に必要な受容体タンパク質として GST- $ERR\gamma$ -LBD を十分量確保する量的発現法を確立した。そこで、 $[^3H]4-OHT$  をトレーサーとして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、4-OHT が非常に強く結合すること、また、4-OHT のみならず合成エストロゲンである diethylstilbestrol (DES) もかなり強く結合することが判明した。これらについては繰り返し確認した。さらに、tamoxifen (TAM) も  $ERR\gamma$  に対して高い結合能を持つことが分かった。

表 4. 化学物質の  $ERR\gamma$  に対する結合能

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

(++) 強い活性、(+) 弱い活性、(-) 結合能無し

これらに対して、E2 などの内因性ホルモンや植物エストロゲン等は、 $ERR\gamma$  に対してほとんど結合しなかった。また、biochanin A などのイソフラボン類も  $ERR\gamma$  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、内分泌かく乱化学物質候補であるビスフェノール A (BPA) とノニルフェノールが  $ERR\gamma$  に対して強い結合能を示した。特に、BPA が 4-OHT に匹敵するほどの高い結合性 (13.1 nM) を示した。これまで内分泌かく乱化学物質候補とされる化合物が天然のホルモンに匹敵するほどの受容体結合性を示したことはなく、繰り返し確認した。

**化学物質の  $ERR\gamma$  受容体活性** :  $ERR\gamma$  のレポータージーンアッセイでの基盤活性は、非常に高い。4-OHT の  $ERR\gamma$  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 は基盤活性を抑制し、10  $\mu$ M で約 70%程度抑えた。この活性抑制は、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り、4-OHT は  $ERR\gamma$  のインバースアゴニストである。