

図 23. 4-OHT と BPA の ERR γ 転写活性
4-OHT (●) および BPA (○) のレポーター
遺伝子アッセイ

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考えられた。

⑤ ショウジョウバエの化学物質応答解析

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。この研究では、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。

(3) 平成 18 年度の研究成果

平成 18 年度には、基本的には平成 17 年度に実施の各研究・実験項目を進展・展開させた。実験手法は確立したものを踏襲し、結果の解析も基本的には同様に実施した。したがって、ここでは新しく実施したこと、新しく改善・改良したこと、新しく得られた結果、などを報告する。

① ポリクローナルセンシング抗体の作製

本年度は、まず、分子モデリング法により 19 種類の核内受容体のアミノ酸配列情報および立体構造情報を収集・分析し、LDB における第 12 ヘリックス相当部分のアミノ酸配列解析を実施した。この解析により、立体構造が既知のものについては第 12 ヘリックスを同定し、また、立体構造が解析されていないものについては立体構造を構築し、第 12 ヘリックスを同定した。

核内受容体 12 種類について、抗原ペプチドを策定した。同定した第 12 ヘリックス部分を中心にし、前後数残基を含むようにデザインし、N 末端にシステインを持つペプチドを化学合成した。ウサギ・ポリクローナル抗体作製は外注して行った。

表 5. PDB (結晶構造解析データ) から特定した
核内受容体 LBD・第 12 ヘリックス領域
および抗原ペプチド配列

核内受容体	抗原ペプチドのアミノ酸配列	PDB
PXR	CDIHPFAT <u>PLMQEL</u> FGITG	1NRL
CAR	CHIQGL <u>SAMMPL</u> QEI	1XVP
HNF4 α	CAKIDN <u>LLQEML</u> LGGGS	1LV2
HNF4 γ	CVKIDN <u>LLQEML</u> LGGAS	None
NGFIB	CP <u>IIDKIFMD</u> TLPF	2GBD
NURR1	CEDLVPPPA <u>IIDKLF</u> LDLTL	1OVL
NOR1	CEDLVSPPS <u>IIDKLF</u> LDLTL	None
SF-1	CNEMPRNN <u>LLIEM</u> LQAKQ	1YOW
LRH-1	CGDVYPYNN <u>LLIEM</u> LHAKR	1YOK
ROR α	CVRLHF <u>PPLYKEL</u> FTSEF	1N83
ROR β	CVNTLFP <u>PPLYKEL</u> FNPDP	None
ROR γ	CAAFP <u>PPLYKEL</u> FSTET	None

None: 立体構造が決定されていない受容体
下線部分は第 12 ヘリックス相当部分

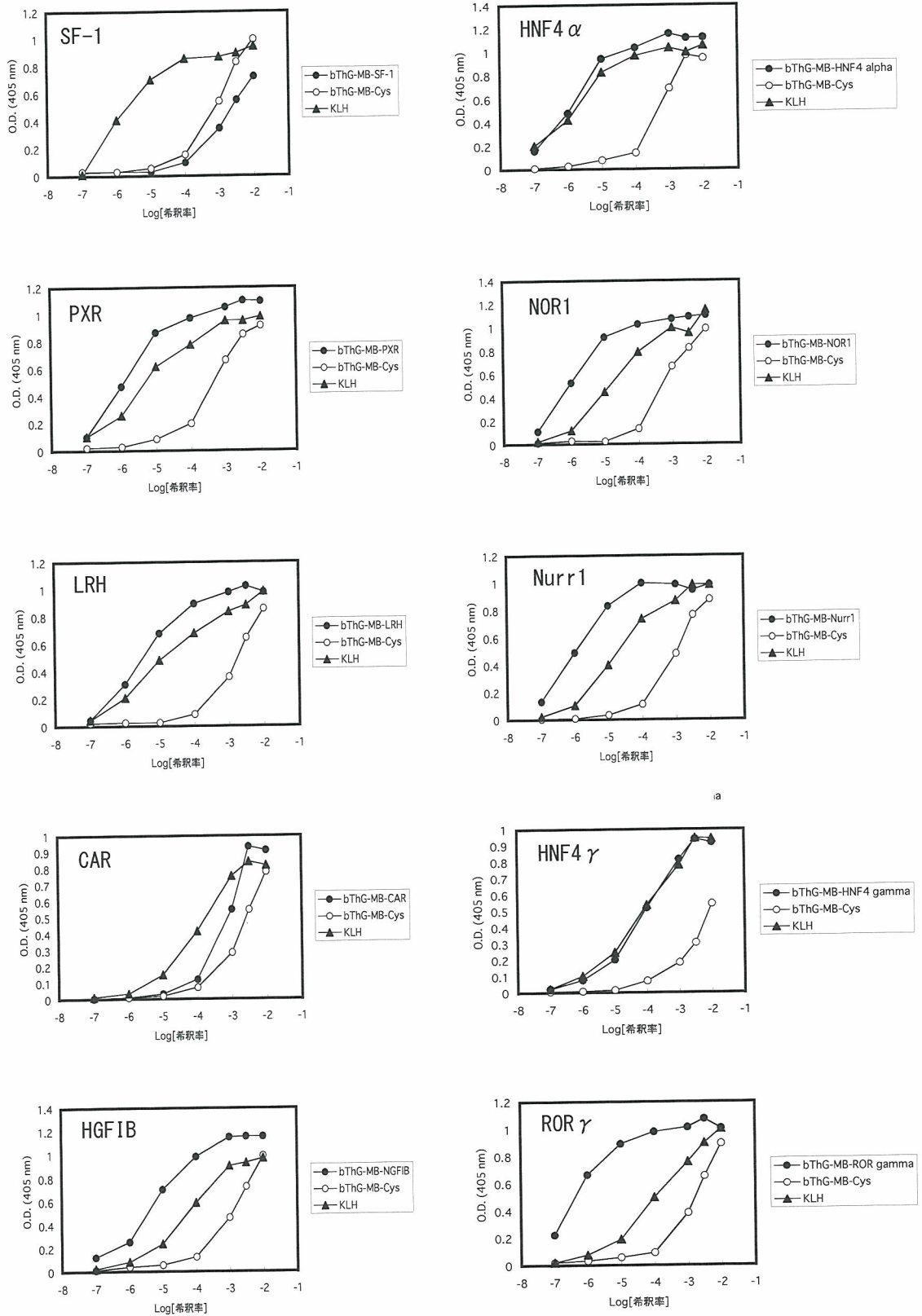


図 24 核内受容体 LBD 第 12 ヘルックス由来の抗原ペプチドに対するウサギ血清由来ポリクローナル抗体の力価の検討。

得られたウサギ抗血清より、キャリアタンパク質 KLH の抗体による免疫沈降、次いで合成抗原ペプチドによるアフィニティ精製によりポリクローナル抗体画分を調製した。こうして得られた抗体について、力価を測定した。現在までに力価の検討が終了したものは 10 種類の抗体である (図 24)。

SF-1 を除く全ての抗体において、抗原ペプチドを特異的に認識することを示す、明確な吸光度の上昇が確認された。SF-1 については、抗原ペプチドの認識が十分でなく (図 24)、現在、別個体のウサギを用いて免疫を行い、再度抗体の調製を実施している。ROR α 、ROR β については、現在、免疫を終了し、抗体の調製を行っている。

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

動物免疫を経る抗体作製法では、経済的・時間的なコストが高く、また、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である。こうしたなか、平成 16 年度より導入したファージディスプレイによる抗体法は、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、試験管内でテラーメ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。

本研究ではまず、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作製を行ない、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、実際にセンシング抗体を得ることに成功した。今回、抗体作製にいくつかの改良を加え、エストロゲン受容体に対して適用したところ、2つの抗体ライブラリーを使用することで高確率に有用な抗体を得ることができると判明した。これにより抗体選別技術が確立され、現在は、ステロイド受容体 (9 種) について同時並行でバイオパンニング (抗体選別操作) を実施し、残りの受容体についても拡張中である。

① ステロイドホルモン受容体抗原ペプチド

ヒト核内受容体 48 種のうち、ステロイドホルモン受容体に分類される GR、ER α 、ER β 、ERR α 、ERR β 、ERR γ 、AR、PR、MR の合計 9 種類について、抗原ペプチドの合成を行った。抗原ペプチドのアミノ酸配列は、リガ

ンド結合ドメイン (LBD) の第 12 ヘリックス (H12) 付近に設定して用いた (表 6)。それぞれの配列から成るペプチドを化学合成し、キャリアタンパク質 (KLH, BthG) に架橋した。

表 6. 9 種類のステロイドホルモン受容体 センシング抗体作製のためのエピトープ

	受容体名称	受容体略称	抗原ペプチドアミノ酸配列
1	NR3A1	ER α	CLYDLLLEMLDAHRLHA
2	NR3A2	ER β	CKNVVPVYDLLLEMLNAHV
3	NR3B1	ERR α	
4	NR3B2	ERR β	CGKVPMHKLFLEMLEA
5	NR3B3	ERR γ	
6	NR3C1	AR	CSVDFPEMMAEIIISVQVPKILS- GKVKPIYFHTQ
7	NR3C2	PR	CEMSEVIAAQLPKIL
8	NR3C3	GR	① CEMLAEIITNQIPKYSN ② CSIEFPEMLAEIITNQI
9	NR3C4	MR	CMLVEIISDQLPKVESGNAK

青字で示すのは、X 線結晶構造解析から同定された第 12 ヘリックス部位を指示する。

② バイオパンニング用ファージ抗体ライブラリーの調製

ファージ抗体ライブラリーには、昨年度と同様に、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。さらに、本年度より新たに Tomlinson J ライブラリーを使用することでより高確率に抗体を得ることを試みた。これら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組み込むことにより、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。

さらに、組み込む抗体タンパク質の遺伝子をランダム化することにより、様々な単鎖型抗体タンパク質を提示したファージ抗体ライブラリーとなる。今回使用した 2 つのライブラリーは、ランダム化させた部位が異なるため、重複することのない独立したライブラ

リーである。これら2つのライブラリーは、抗体遺伝子を組み込んだ一本鎖ファージDNAを大腸菌 (TG1 株) にトランスフェクションされた状態で分与されているため、これを大量培養後、ファージレスキューと呼ばれる手法によりファージ抗体ライブラリーへの変換を行った。

ER α について Tomlinson J ライブラリーから3回のバイオパンニングを実施した結果、個体数 1.1×10^9 のファージが回収された。その後、モノクローナル化した184クローンについて1次スクリーニングを実施した結果、64クローンがペプチドへの結合性を示した (図25)。現在、これらのDNAシーケンス解析を実施中であるが、8クローンを配列解析した段階で、既に4クローンが異なる抗体を提示していることが判明した (図26)。これは、この方法によると確実に多くの抗体を得られることを示す。

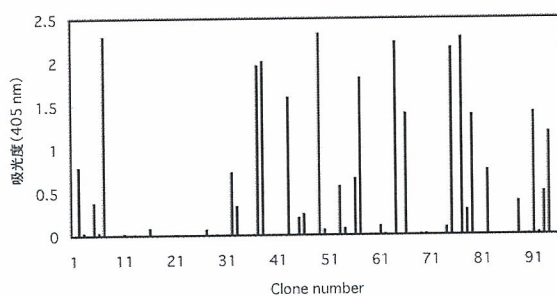
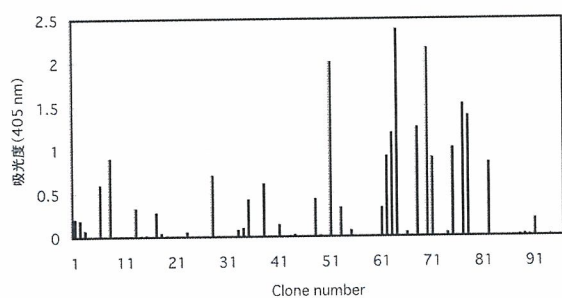


図25. 1次スクリーニングの結果 (ER α , Tomlinson J ライブラリー)
(上)クローン1~94、(下)クローン95~188。

③ MR、ERR センシング抗体の作製

GR と近縁な受容体である鉱質コルチコイド受容体 (MR) および ER α と近縁な受容体であるエストロゲン関連受容体 (ERR) についてバイオパンニングを実施した。バイオパンニングは、それぞれ3回繰り返した。回収されたファージの個体数は、MRで 6.4×10^6 、ERRで 2.1×10^5 であった。その後、モノクローナル化した94クローン (96穴マイクロウ

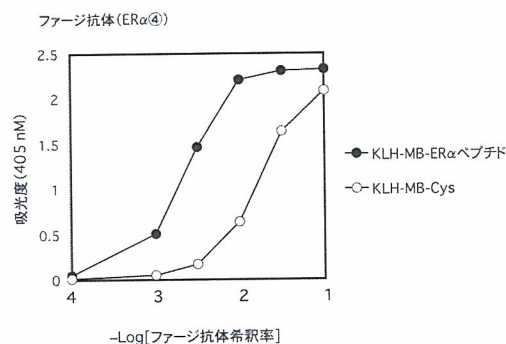
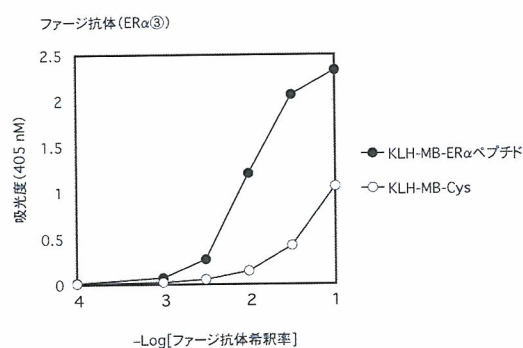
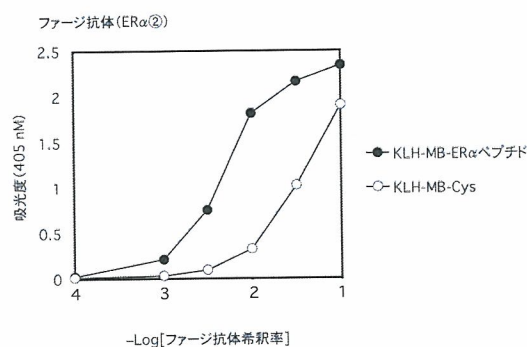
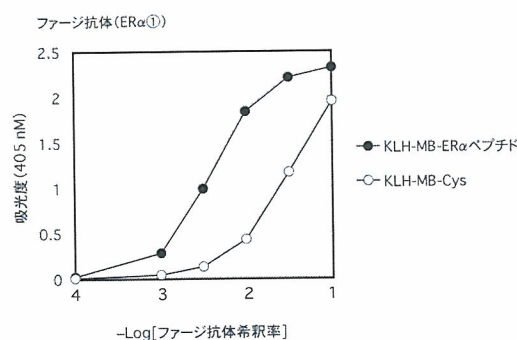


図26. ER α でのファージ抗体4種についての抗体力価の検討

エルプレート1枚) について1次スクリーニングを行った結果、MRで72クローン、ERRで3クローンがペプチドを認識する抗体を提示していることが判明した (図27、28)。

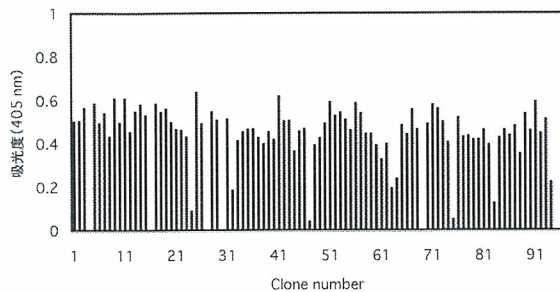


図 27. 硬質コルチコイド受容体・MR に対する 1 次スクリーニングの結果

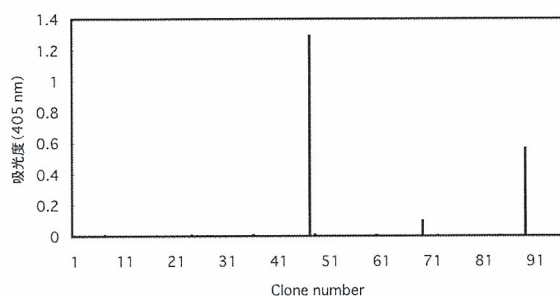


図 28. エストロゲン関連受容体・ERR に対する 1 次スクリーニングの結果

④ バイオパンニングによる抗体濃縮

一般的に、パンニング回数を増やすことでより結合親和性が高い抗体が得られる。昨年度からの ER α に対するファージ抗体作製において、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、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伺えた。

それらをモノクローナル化した後、188 クロオンを対象に 1 次スクリーニングを実施したところ、実に 163 クロオンがペプチド抗原を特異的に認識することが判明した。得られたファージクロオンの DNA シークエンス解析を行なったところ、異なる単鎖型抗体を提示しているファージを 4 種同定することができた。これら 4 種のファージクロオンからファージ抗体を調製し、力価の検討を行なった結果、いずれのファージ抗体も明瞭に抗原ペプチドを認識した (図 26)。しかしながら、GR で得られたファージ抗体の力価と同程度であり、バイオパンニングを 4 回繰り返すことの有効性は見られなかった。

バイオパンニングの回数を増やすことによって高親和性抗体を提示したファージを濃縮することを期待したが、結果として、回収されるファージに提示された抗体のパラエティが単一成分に近づくだけであった。つまり、バイオパンニング後に回収されるファージクロオンの個体数は増加したが、DNA のシークエンス解析の結果、ほとんどが同一のクロオンであった。結論として、バイオパンニングは 3 回が最適であると思われる。

表 7. 各受容体に対するバイオパンニングの結果一覧表(ステロイドホルモン受容体)

A	B	C	D	E
GR	I	3	6.7×10^5	3
ER α	I	4	1.3×10^9	163
	J	3	1.1×10^9	64
MR	I	3	6.4×10^6	72
ERR α	I	3	2.1×10^5	3
ERR β				
ERR γ				
ER β	I	3	解析中	解析中
	J	3		
AR	I	3	解析中	解析中
	J	3		
PR	I	3	解析中	解析中
	J	3		

(A) 受容体名、(B) ライブラリー名、(C) パンニング回数、(D) 回収されたファージの個体数、(E) 1 次スクリーニング後に得られたクロオンの数

③ モノクローナルセンシング抗体の作製

昨年 (平成 17 年) 度、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。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、抗原には同じ合成ペプチドを用いた。リンパ節細胞をミエローマ細胞と融合させ、得たハイブリドーマを培養した。今年度はこれらから、特異性の高い抗体産生細胞群を選別し、それぞれの細胞群のモノクローナル化に取り組み、成功した。

これは、一次スクリーニング後、直ちにモノクローン化を行い、最後に二次スクリーニングを行うように改善をはかったためである。この改善により、それまで首尾よく行かなかったモノクローン化に成功し、AR、GR、TR について抗原ペプチドを認識するモノクローンが得られた。二次スクリーニングに時間を取られると、目的外のクローンの増殖が勝り、モノクローン化しても目的のクローンが増殖されない欠点を矯める方法である。

この方法を適用することとし、細胞融合操作(この段階で抗原ペプチドを認識するクローンをGRでは14種、ARでは7種、TRでは38種得る)ののちに手順を変え、それぞれのクローンについてモノクローン化を行った結果、現在までにGRでは2種(図29)、ARでは4種(図30)、TRでは20種(図31)のモノクローンを得た。現在、二次スクリーニングを行い、受容体の構造変化を識別する抗体産生モノクローンを選別している。

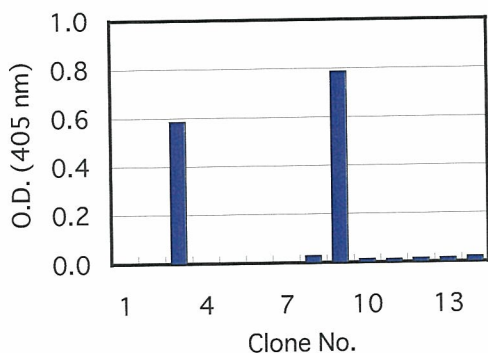


図29. GRモノクローン化各モノクローナル抗体の抗原ペプチドに対する力価を調べた。

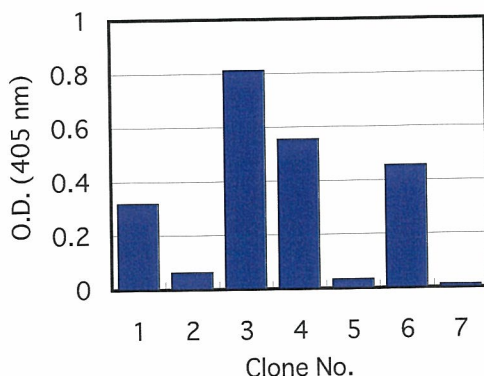


図30. ARモノクローン化各モノクローナル抗体の抗原ペプチドに対する力価を調べた。

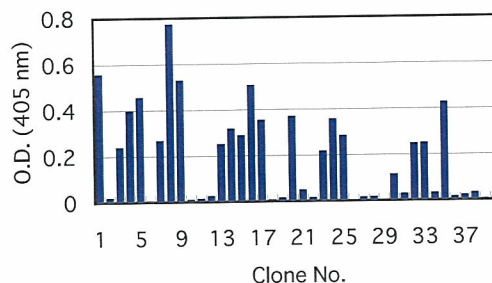


図31. TRモノクローン化抗体の力価

④ エストロゲン関連受容体 γ (ERR γ) の応答解析

まず、昨年度に引き続き自発活性化型核内受容体であるエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) について、*in vitro* の試験系で精査した。次いで、センシング抗体アッセイ法の確立のために抗体の作製に取り組んだ。既に上述のようにファージディスプレイ法による作製ではエストロゲン関連受容体3種に共通な抗体として調製を試みている。一方、ポリクローナル抗体、細胞融合法による抗体はERR γ に特異的な抗体を得るべく進めている。

① ERR γ 受容体の結合試験

昨年度は既述のように、放射標識された4-ヒドロキシタモキシフェン ($[^3\text{H}]4\text{-OHT}$) を用いた飽和結合試験への成功によって研究の展開を見た。ビスフェノールA (BPA) が結合するが判明したため、今年度はまず、放射標識された BPA、 $[^3\text{H}]$ BPA を用いた飽和結合試験を試みた。

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 ERR γ を発現した。 $[^3\text{H}]4\text{-OHT}$ の場合と同様に反応温度、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、 $[^3\text{H}]$ BPA の特異的結合を十分量与える要件の設定に成就した(図32)。

Scatchard プロット解析を行った結果、 K_d 値は 5.5 nM であり、 B_{max} は 18 nmol/mg であった。 $[^3\text{H}]4\text{-OHT}$ に比べ、 $[^3\text{H}]$ BPA では非特異的結合が小さく、特異的結合が全結合の約 90%あり、結合試験を行うに最適であると

判断された。また、 $[^3\text{H}]$ BPA を用いた競争結合試験でも BPA は $[^3\text{H}]$ 4-OHT での試験の結果と同様に非常に強い結合性が確認された。

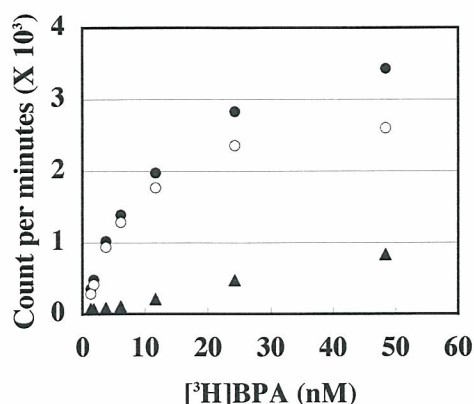


図 32. $ERR\gamma$ の飽和結合試験
 $ERR\gamma$ に対する $[^3\text{H}]$ BPA の全結合 (●) と非特異的結合 (▲)、特異的結合 (○) を示す。

② BPA のステロイド受容体結合性

ステロイドホルモン受容体 AR、GR、PR、さらに $ER\beta$ のそれぞれについて、表 1 に示される放射標識リガンドを用いて受容体結合試験を行った。その結果、4-OHT は $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 、 $ERR\gamma$ に強く結合することが確認された。一方、BPA は $ERR\gamma$ に最も強く結合し、 $ER\alpha$ と $ER\beta$ には 100 倍弱く、AR、GR、PR は結合しなかった。また、ER に対する内在性リガンドである 17β -エストラジオール (E2) は $ER\alpha$ と $ER\beta$ に対して強く結合し、 $ERR\gamma$ には全く結合しなかった。

表 8. 様々なステロイドホルモン受容体に対する BPA の結合能

ステロイドホルモン受容体 (^3H -標識リガンド)	Receptor binding affinities shown by IC_{50} (nM)		
	E2	4-OHT	BPA
$ERR\gamma$ ($[^3\text{H}]$ 4-OHT)	NB ¹⁾	10.3 ± 0.80	13.1 ± 2.34
$ER\alpha$ ($[^3\text{H}]$ E2)	0.98 ± 0.15	0.55 ± 0.11	1,040 ± 180
$ER\beta$ ($[^3\text{H}]$ E2)	1.27 ± 0.31	0.88 ± 0.14	1,320 ± 287
AR ³⁾ ($[^3\text{H}]$ DHT)	248 ± 52	NB	NB
GR ³⁾ ($[^3\text{H}]$ cortisol)	465 ± 125	1,130 ± 24	ND ²⁾
PR ³⁾ ($[^3\text{H}]$ progesterone)	527 ± 128	ND	NB

ND: 10^{-5} M において弱い結合が見られる
NB: 10^{-5} M においても全く結合が見られない

③ ポリクローナル抗体によるセンシングアッセイ

$ERR\gamma$ に対するポリクローナル抗体を調製するために、図 33 に示されるように抗原を設定し、ウサギに免疫した。得られた血清に対して、キャリアタンパク質抗体による免疫沈降による精製、抗原ペプチドを用いたアフィニティ精製を行い、抗体を作製した。



図 33. $ERR\gamma$ 抗体作製用の抗原配列
 $ER\alpha$ の抗原配列を基に $ERR\gamma$ に対する抗原部位を 2 ヶ所 (#1、#2) 設定した。

図 33 に示すように、第 12 ヘリックスに対して 2 ヶ所の抗原部位 (#1 と #2) を設定した。それぞれの抗原に対してウサギ抗体を調製した結果、図 34 に示されるように抗 #1 ペプチド抗体は抗原ペプチドを認識するものの、受容体を認識しなかった。一方、抗 #2 ペプチド抗体は抗原ペプチドと受容体の両方を認識した。したがって、以後の研究は受容体を認識した抗 #2 ペプチド-抗体を用いて行った。

$ERR\gamma$ は自発活性化型核内受容体であり、インバースアゴニストである 4-OHT が結合して始めてコンホメーション変化する。そこで、本研究では 4-OHT を基準化合物として用い、4-OHT が引き起こす $ERR\gamma$ のコンホメーション変化を抗体で感知・センシングする抗体アッセイ法として確立することにした。レポーター遺伝子試験 (図 23 参照) から推測される通り、BPA が結合した $ERR\gamma$ は活性コンホメーションにあるため、 $ERR\gamma$ 自身同様に抗体応答に変化がなかった。一方、4-OHT 結合 $ERR\gamma$ では、濃度依存的な抗体応答が見られた (EC_{50} 値は 62 nM) (図 34)。そこで、BPA 共存下で 4-OHT を反応させたところ、BPA の濃度依存的に 4-OHT による抗体応答が減少した (図 35)。

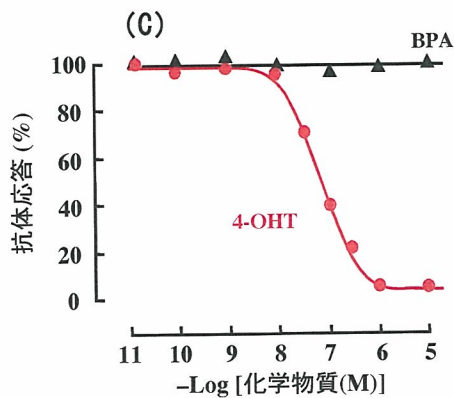
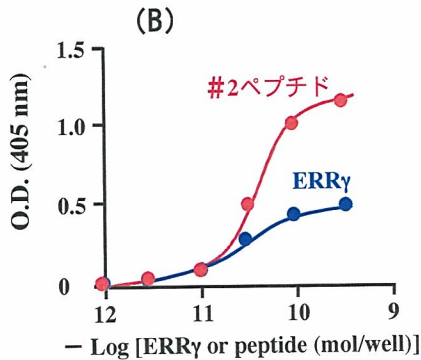
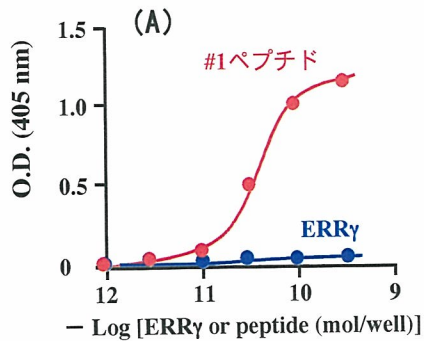


図 34. ERR γ 認識抗体の抗体応答解析
 (A) 抗#1 ペプチド抗体、(B) 抗#2 ペプチド抗体
 (C) 4-OHT および BPA の濃度依存的な抗#2 ペプチド抗体に対する応答。

④ モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体の調製のために、上述の#2ペプチドを抗原として用いた。これは、H12 周辺部位から ERR γ の C 末端までの部位を含む (図 23 参照)。キャリアタンパク質 KLH と結合後、Ba1b/c マウスに免疫した。

マウスのリンパ細胞をマウス由来ミエロマ細胞 P3X63Ag8U.1 とポリエチレングリコールで細胞融合操作を行った。その結果、

388 well 中 185 well に細胞の増殖が見られ、その中で 45 well の抗体産生細胞群が抗原ペプチドを認識した。さらに、この 45 well のうち、4 well の抗体産生細胞群についてモノクローン化を行った。その結果、抗原ペプチドを認識するクローンが 3 種得られた (図 36)。それぞれのクローンについて二次スクリーニングを行った結果、4-OHT 結合型 ERR γ と 4-OHT 非結合型 ERR γ で抗体応答に差が見られるクローンが 1 種得られた (図 36C)。現在、このモノクローナル抗体を用いた試験法を検討している。

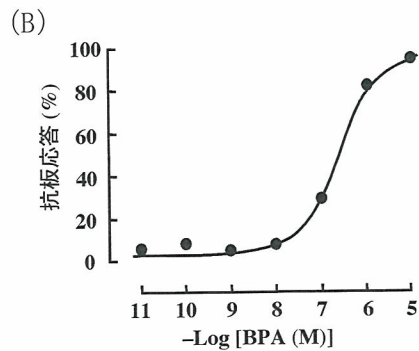
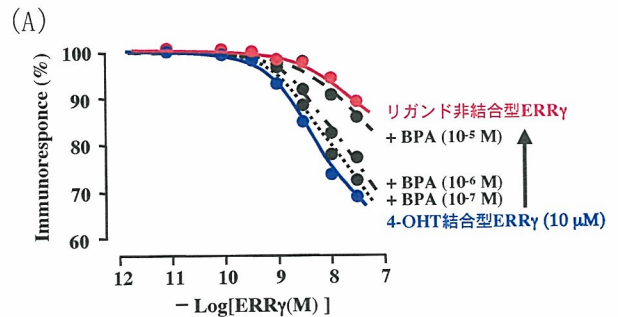


図 35. 4-OHT を基盤としたセンシング抗体アッセイ

4-OHT と共存させることにより BPA 濃度依存的な抗体応答が検出できる。(A) 受容体濃度依存性の調査、(B) BPA 濃度依存性の調査

⑤ ショウジョウバエの化学物質応答解析

ショウジョウバエに存在しているエストロゲン関連受容体 (*Drosophila* estrogen-related receptor: dERR) は、ヒトのエストロゲン関連受容体 ERR にも非常に良く似ている。ERR γ にビスフェノール A (BPA) が強く結合することが判明した現在、この dERR にも BPA が結合するかは重要な項目である。口述のように、BPA は dERR に結合する。

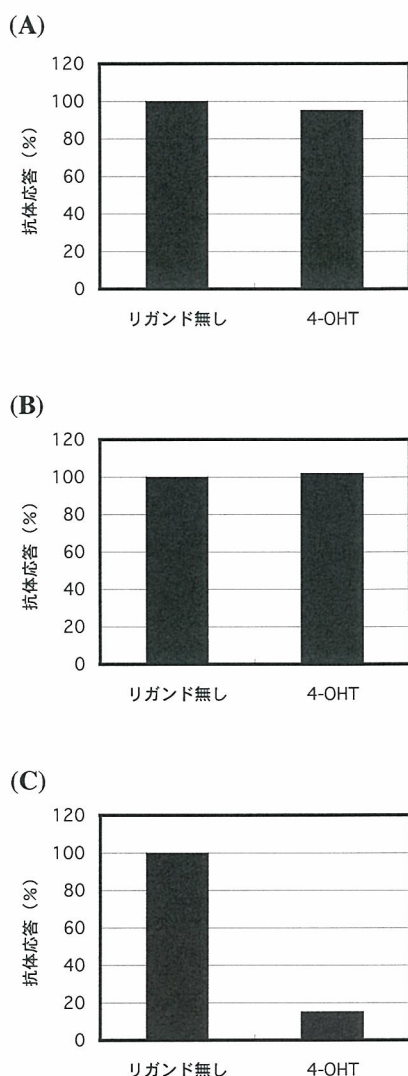


図 36. $ERR\gamma$ モノクローナル抗体の二次スクリーニング
 (A) mab- $ERR\gamma$ -#1、(B) mab- $ERR\gamma$ -#2、(C) mab- $ERR\gamma$ -#3、それぞれについて $10\ \mu\text{M}$ 4-OHT を反応させた場合の抗体応答変化。

本研究では、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、昨年度までに確立した雌および雄の生殖機能評価法および多世代繁殖試験系を改良して、ビスフェノールAの影響について調べた。

本年度の研究では、総産卵数と卵の成熟にかかる日数に与える BPA の効果を見ること

ができた。しかし、幼虫時に摂取する場合の影響については、最終濃度が 10^{-5} mol/l の場合についてのみ行うことができた。この濃度は、成虫での摂取の影響を調べた3段階の濃度のなかでは、最も影響が弱い条件であり、今後はこれら各濃度についても検討する必要があると思われる。また、本研究の昨年までの結果から、何代にもわたって化学物質の暴露を受けた場合、その影響が次第に強く現れることが観察されているので、BPA の場合も、継代試験を実施する必要がある。

一方、雄への影響については、現在、幼虫時と成虫時での摂取の評価実験を実施中であるが、羽化数に関して、明確な解析ができていない。今後、例数を増やして、影響の有無について検討する予定である。

D. 考察

本研究課題において最も重要なことは、内分泌かく乱作用が懸念される化学物質に対して、そのスクリーニングを簡便に実施できる方法論を開発すること、そして、実際に適用して懸念度について順位付けを実施することである。方法論としては「核内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」を確立した。本年度までに、この方法論を実際に適用するに当たってはいくつかの考察すべきポイントがあることが明確となってきた。

まず、核内受容体はヒト 48 種のすべてを標的とすべきであることである。これは、これまで検討されてきた主要3種の核内受容体 ER、AR、TR 以外の受容体に結合する内分泌かく乱化学物質が発見されたことによる。すなわち、我々が明らかとした「ビスフェノールAがヒト核内受容体 48 種のうちエストロゲン関連受容体 γ 型・ $ERR\gamma$ に強く結合する」事実により、 $ERR\gamma$ はもちろん、他の受容体すべてについて検討する必要があることが明らかとなった。これは、化学物質の生体暴露から考えると当然なことであるが、この受容体結合が何らかの影響をもたらすのか、それはどのような分子機構で影響するのか、などを明らかに

する検証の重要な端緒を与えることになる。

第二には、リガンド無しでも生理活性コンホメーションにある核内受容体の存在が明らかとなったことである。これまでは、すべての核内受容体において、リガンドの結合によりヘリックス 12 がコンホメーション変化し、これにコアクチベータが誘導されると考えられていた。しかし、最初から生理活性コンホメーションにある核内受容体、「自発活性化型核内受容体」は不活性になるときにヘリックス 12 がすれて、コンホメーション変化することになる。これらの事実は、「コンホメーション変化センシング」の意味が一様ではなく、コンホメーション変化が引き起す内容が違うことになる。

実際には、48 種すべての核内受容体を標的にスクリーニング法を開発する本研究課題の重要性が明確となった。また、ERR γ のような核内受容体の存在、あるいはビスフェノール A のような化学物質の存在の可能性が大きくなった。

平成 18 年度には、センシング抗体として先導的な役割を担うポリクローナル抗体について新たに 12 種の核内受容体のセンシング抗体作製に取り掛かった。特に、ビスフェノール A が結合する自発活性化型核内受容体 ERR γ については、有効な抗体の作製に成就し、新規なセンシング抗体アッセイ法の確立にも成功した。ERR γ については、ファージディスプレイ法および細胞融合法でもモノクローナル抗体の作製に着手しており、高効率化が期待される。

細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製においては、一次スクリーニングの後、モノクローン化したうえで二次スクリーニングするという方法に改良することができた。また、ファージディスプレイ法によるモノクローナル抗体の作製においては、2つの抗体ライブラリーを使用することで高確率に有用な抗体を得ることができると判明し、これにより抗体選別技術が確立された。

ERR γ におけるビスフェノール A については、放射標識したビスフェノール A によって直接にその高親和性結合が証明された。一方、

ショウジョウバエエストロゲン関連受容体 (dERR) に対してもビスフェノール A が結合することが判明した。これは、ショウジョウバエでの「生殖機能」とした継代的分析法におけるビスフェノール A の影響解析研究に大きな期待を持たせる結果である。

以下に各実験項目について、これまでの経緯と本年度の研究・実験について概観し、その成果および問題点等を整理する。

ポリクローナル抗体センシングアッセイ

「リガンド活性化型核内受容体」のコンホメーション変化の主要な構造要因は、リガンドの結合に伴って起こる受容体 C 端の α ヘリックス 12 (H12) を含む部位がホルモンにフタをするように覆い被さる構造変化である。アゴニストが結合したとき、疎水性面と親水性面の両方から成る両親媒性ヘリックスの H12 は疎水性面をホルモン側にして受容体分子に結合することになり、受容体の分子表面には H12 の親水性面のみが現れている状態が創り出される。これにコアクチベータが結合する。

H12 ペプチドに対して結合するポリクローナル抗体には、疎水性面に特異的に結合する抗体成分、親水性面に特異的に結合する抗体成分、疎水性面と親水性面の境界領域に特異的に結合する抗体成分、ヘリックスではない伸びた構造に特異的に結合する抗体成分など、多様な抗体成分の混合物である。こうした抗体成分のうち、受容体の構造変化に伴って結合できなくなる成分が存在する。この成分の存在が抗体応答の差違を生み、この差違がセンシング抗体アッセイ法の基本的な原理である。

センシング抗体アッセイ法は、こうした原理に基づいて、まずエストロゲン受容体について例証された。H12 に対してポリクローナル抗体を作製して調べたところ、抗体応答の差違が約 30~40%も起こること、これを基調にして化学物質の濃度に応じたコンホメーション変化量を定量できることが判明した。こうして、「核内受容体コンホメーション変化センシング」アッセイの基本的な要件が成立す

ることが示され、受容体結合性を抗体応答有効濃度 (EC₅₀ (M))、ホルモン活性を最大抗体応答性 (Rmax (%)) として評価するアッセイ系が確立された。さらに、男性ホルモン・アンドロゲン受容体など、いくつかの核内受容体についても全く同様なアッセイ系の確立に成功したことから、この受容体センシング抗体法を核内受容体の全てに適用可能な方法論としての確立に成就した。

平成 18 年度における最大の進展の一つは、こうしたセンシング抗体アッセイが「自発活性化型核内受容体」でも成立することが証明されたことである。自発活性化型核内受容体では、リガンド無しのアポ型構造において H12 が既にフタをした構造になっている。インバースアゴニストが結合すると、H12 のフタがはずれるように構造変化する。H12 ペプチドに対して結合するポリクローナル抗体に存在する抗体成分のいずれかは、この構造変化で H12 に結合できなくなる。これが抗体応答における差違を生み、センシングが可能になる。こうしたセンシング抗体アッセイが、エストロゲン関連受容体 γ 型・ERR γ で実証された。

センシング抗体アッセイに最も重要なのは、リガンドの結合に伴って起こる構造変化、コンホメーション変化によって H12 に結合できなくなる抗体成分の存在である。センシングが成立には、まずこの抗体成分の存在が必須である。そして、感度の大きさはこの抗体成

分の量に依存する。このため、抗体作製が本質的に重要である。すべての抗体成分を含むのがポリクローナル抗体であり、したがって、ポリクローナル抗体の作製がこの方法の確立のキーステップとなる。

ポリクローナル抗体の作製においては、抗原ペプチドの分子設計がきわめて重要である。H12 そのものだけではセンシングに十分な抗体が産生されないことが分かっている。これは、構造変化が α ヘリックスのコンホメーション変化を伴っていることを示唆する。このため、H12 のN端側とC端側にいくらか伸ばしたペプチドを抗原に設定する。このとき、アミノ酸配列における構造的に特徴あるアミノ酸の存在に留意して設定する。

平成 17 年度には、発現受容体タンパク質が購入可能な 20 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。本年度は当初計画をさらに前倒して、現在までに新たに 12 種類の核内受容体について取り組んだ (図 38)。これまで総計 36 種の核内受容体について取組みを開始し、約 25 で抗体の生成を完了、うち 15 種類でセンシング抗体アッセイ法を確立した。

抗原ペプチド設計は、ほとんどの場合良好である。しかし、十分な抗体力価が見られないケースが稀に存在する。この原因は、抗原ペプチド設計の不備か、免疫動物の不調が考えられる。通常は、まず再度免疫すると良好

TR α	PPAR β	ROR γ	CAR	TR2	EAR2	GR	NOR1
TR β	PPAR γ	LXR β	HNF4 α	TR4	ER α	MR	SF-1
RAR α	Rev-erb α	LXR α	HNF4 γ	hTLL	ER β	PR	LRH-1
RAR β	Rev-erb β	FXR	RXR α	PNR	ERR α	AR	GCNF1
RAR γ	ROR α	VDR	RXR β	COUP-TF1	ERR β	NGFIB	DAX-1
PPAR α	ROR β	FXR	RXR γ	COUP-TF2	ERR γ	NLJRR1	SHP

16 年度以前済み (4)	17 年度済み (20)	18 年度実施 (12)	19 年度実施予定 (9)	H12 欠如受容体 (3)	自発活性化型受容体 (13)
------------------	-----------------	-----------------	------------------	------------------	-------------------

図 37. ヒト核内受容体 48 種の抗体作製の進捗状況

な抗体が得られることが多い。抗原ペプチド設計においては、核内受容体のほとんどが立体構造が知られていないため、ホモロジーモデリング (図 37) による H12 の確定が非常に重要である。この分子設計は、本プロジェクトの研究により、これまでにほぼ確立された。

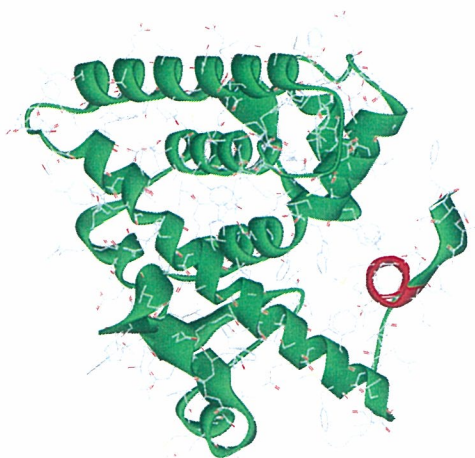


図 38. ホモロジーモデリングで構築した核内受容体の一般的な立体構造
ER α の構造で、ヘリックス 12 部分を赤色で示す。

センシング抗体アッセイ系構築のためには、受容体タンパク質が必須である。市販の受容体タンパク質は限られているので、タンパク質発現の実験が必要である。しかし、これはスクリーニングには大量が必要であり、これはどの試験系でも必須である。このため、効率的な発現系の構築が必要である。また、化学合成した抗原ペプチドもどの抗体作製にも必要であり、量的な調製が必要である。こうしたことを考慮したうえで実験を進めて行くことが肝要である。

内分泌かく乱作用性についての順位予測

本研究においては、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内分泌かく乱作用性の予測とその順位付けをめざしている。既にエストロゲン受容体 α 型 (ER α) について完成した。EC $_{50}$ (M) によるグループ化、Rmax (%) の序列化の手順によって、ER を介した内分泌かく乱作用性の順位予測について、受容体結合能とホルモン活性を同時に測定評価する基本的解析法が確立された。

抗体応答有効濃度を横軸に、最大抗体応答性を縦軸にして、ホルモン受容体の抗体応答性を各化学物質について解析した結果を例示すると、図 39 のようになる。抗体応答有効濃度 (横軸) を指標として見たとき、活性の強弱について第 1-第 3 グループに分けられる。現在までに試験した結果を EC $_{50}$ (M) を指標として分類したとき、抗体応答活性が非常に強い第 1 グループ、ある程度の強い活性の第 2 グループ、活性はかなり弱いとその活性が明確である第 3 グループに類別された。

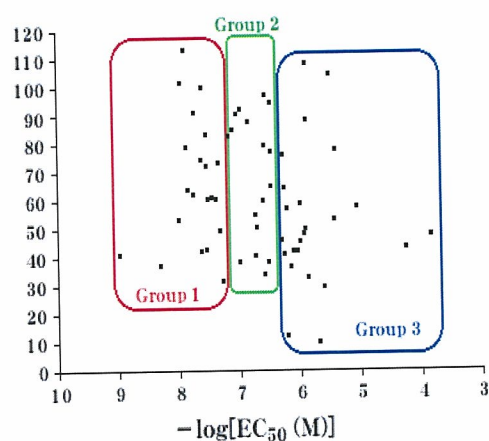


図 39. 化学物質のエストロゲン受容体コンホメーション変化センシング作用性解析

受容体への結合能がきわめて弱く、したがって、抗体応答有効濃度と最大抗体応答性が非常に小さい化学物質群 (第 4 グループ) は、抗体応答有効濃度が算定できず、図 39 にはプロットされない。また、エストロゲン受容体に全く結合しない残りほとんどの化学物質群 (第 5 グループ) も図にはプロットされない。

ファージディスプレイ法によるモノクローナル抗体の作製

細胞融合法によりモノクローナル抗体を作製する問題点の一つは、300-500 クローンのスクリーニングを個々別々に実施してようやく 1-3 個が入手できるという、抗体作製上の困難性である。もう一つは、抗体の安定継代、量的な取得がかなり困難であることである。こうした問題点を解決する単クローン抗体法として、抗体ファージディスプレイ

法がある。この方法は、試験管内でファージウイルスに抗体タンパク質を産生させる手法で、合目的な抗体作製を可能にするものである。

本研究では、この高効率にセンシング抗体を得ることが期待されるファージディスプレイによる抗体作製法を導入した。そして、17年度より新たに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作製の実験を開始した。その結果、バイオパンニングに適切な抗原ペプチドを用い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た。

本年度いくつかの点で改良をはかり、抗体作製の高効率化に成功した。まず、パンニング回数を増やす効果について検討したところ、これまで採用していた3回という平均的な方法が妥当であることが判明した。

ファージディスプレイ法においては、抗原によって目的の抗体が得られないことがある。ファージ抗体ライブラリーは、抗体の「抗原認識部位の一部」をランダム化したライブラリーであり、すべての抗体分子を網羅するものではない。そこで、Tomlinson I ライブラリーと異なる部位をランダム化した Tomlinson J ライブラリーを新たに並用することで、安定した抗体作製を可能にする系の確立を試みた。ER α において Tomlinson J ライブラリーからのバイオパンニングを追加で実施したところ、Tomlinson I ライブラリーから得られた抗体を上回る数の抗体が得られた。1つの抗体ライブラリーと相性が悪く、有用な抗体が得られない受容体があったとしても、他方の抗体ライブラリーで対応することで、安定して抗体を供給できる。このように、2つのライブラリーから抗体作製を行うことは、本研究にとって非常に有効である。

「Tomlinson I および Tomlinson J の2つのライブラリーについて、間接固定化法で固定化した合成ペプチドによりバイオパンニ

ングを3回行う」ことで複数の抗体が安定して得られることが明らかとなった。こうして、バイオパンニング法の最適化に成就した。

細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製

平成18年度には、細胞融合法によるモノクローナル抗体作製において大きな改良に成就した。それは、選別に時間がかかることから有効なクローンを取得仕損なう欠点を改良するために、二次スクリーニングを後回しにしたことである。すなわち、一次スクリーニングの後、直ちにモノクローン化する手法に変えた。これにより、二次スクリーニングで有効な抗体が定常的に得られるようになり、大きな改善になった。

モノクローナル抗体を作製する意義は次のような理由による。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。

「細胞融合法」によるモノクローナル抗体作製については、まず、エストロゲン受容体で検討した。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。培養上清の試験の結果、センシングアッセイが可能なモノクローナル抗体が3種類（アゴニスト感応性のもの2種類、アゴニスト・アンタゴニスト両方に感応性のもの1種類）得られた。

アゴニスト感応性モノクローナル抗体 mAB1 (図8) を用いたセンシングアッセイをエストロゲン様化学物質62種について実施し、ポリクローナル抗体の場合と比較した。その結果、両者の結果の間に強い正の相関が見られた (図9)。一方、モノクローナル抗体 mAB1の方が低い EC₅₀ (M) を示し、感度がより高く (約8倍)、受容体結合試験の結果と良く一致することが判明した。また、モノクローナル抗体を使用した場合、必要な抗体

量も少なくて済むことが分かった。また、抗体応答有効濃度 EC_{50} (M) と受容体結合試験の受容体結合能 IC_{50} (M) との間に良い正の相関性が確認された (図 10)。

上述のように、モノクローナル抗体を作製する意義は、コンホメーション変化構造に特異的な抗体を特化して作製することである。本年度、抗体作製上の改良はこうしたモノクローナル抗体作製を大きく進展させた。今後、ポリクローナル抗体でアッセイ系が確立された核内受容体について、詳細アッセイの展開をはかるため、モノクローナル抗体作製が必須となる。細胞融合は、ファージディスプレイ法で得られないモノクローナル抗体を与える可能性が高く、有効な抗体クローンを得るために、有効なスクリーニングの検討も必要である。

エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) とビスフェノール A の受容体応答

昨年度には、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) α ヘリックス 12 について、調製したポリクローナル抗体が抗原ペプチドには非常に良く応答するものの、受容体タンパク質には全くに感応しないという異常な応答性を示した。この結果は、ポリクローナル抗体のエピトープが ERR γ のタンパク質構造において α ヘリックス 12 の一部構造のみを認識していることを示した。これはまた、ERR γ が抗原ペプチドのように自由に呈示されるような構造になっておらず、ある特定の構造を取っていることを強く示唆した。X線結晶構造解析からは、ERR γ H12 が既に結合リガンドにフタをしたような活性型立体構造を取っていることが判明している。したがって、フタ内面のみを認識する抗体が得られたのかも知れない。しかし、4-OHT との検討から、有効なセンシングは得られず、こうした自発活性化型核内受容体でまだ知られていない構造要因によるものと思われた。

本年度、ERR γ H12 について少し抗原部位をずらしたペプチドを免疫し、結果的にセンシング抗体を得るのに成功した (図 33, 34)。自発活性化型であるため、その抗体の受容体

認識は抗原ペプチドに対する応答よりもかなり小さく約 40%程度である (図 33)。ERR γ は当初から活性型構造にあり、H12 が堅固な構造に固定されているため、この差があると想定される。このような明確な差違は逆に、ERR γ H12 で内部に埋もれている面 (多分に疎水性面) があり、これでない部分を優先的に認識する抗体であることを示す証拠と考えられる。

実際、応答を調べてみると、4-OHT の濃度依存的な抗体応答が見られた (図 34)。これは、リガンド無しの受容体 ERR γ に 4-OHT が結合すると、用いたポリクローナル抗体自身が認識できなく部位が増大することを意味する。

ところで、この「4-OHT の抗体応答」は非常に感度が良く、 EC_{50} 値は 62 nM であった。これは、レポーター遺伝子アッセイで 4-OHT が示すインバースアンタゴニストとしての活性よりも 1桁違いであり、受容体結合能を数倍しか違わない。有効なモノクローナル抗体が得られると、受容体結合能に即応した活性値が得られる可能性が高い。

一方、BPA のインバースアンタゴニスト活性は BPA と 4-OHT を一緒に受容体 ERR γ に反応させることで解析されることが分かった。図 35 に示すように、BPA 共存下で 4-OHT を反応させたとき、4-OHT による抗体応答の減少が小さくなる。その程度は、BPA の濃度が大きいほど大きかった (図 35A)。この様子を一定濃度の受容体で解析すると BPA のインバースアンタゴニスト活性が評価される (図 35B)。この活性の EC_{50} 値は百数十 nM であり、実際の BPA の受容体結合性と比較すると幾分か鈍い。これも有効なモノクローナル抗体が得られると、受容体結合能に即応した活性値が得られる可能性が高い。

一方、ERR γ については *in vitro* の試験系で精査した。まず、トリチウム標識した BPA を用いた通常受容体結合試験系の構築に成就した。競合結合試験の結果、ビスフェノール A が ERR γ に非常に強く結合する、という事実がその直接的な結合試験および競合結合試験にて証明された。

BPA・ビスフェノールAは現在、「低用量問題」の渦中にある化学物質である。本研究でのこの結果は、この問題の本質がエストロゲン受容体以外の核内受容体を介して発現される内分泌かく乱作用である可能性を強く示唆する。特に、エストロゲン受容体2種はエストロゲン関連受容体3種と複雑な協同システムの中にあると考えられており、特に、これらのヘテロダイマーは、お互いにアロステリックに協同、あるいは干渉することが考えられている。

さらに今後も、ビスフェノールAのような化学物質、ERR γ のような核内受容体が発現する可能性が大きく、48種すべての核内受容体を標的とする研究、試験の重要性が強調される。

自発活性化型核内受容体・エストロゲン関連受容体 (ERR α 、 β 、 γ) の解析

ヒト核内受容体には48種類が存在する。これまでに「内分泌かく乱作用」が検討されてきたのは、主としてエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体および甲状腺ホルモン受容体の3種である。これまで世界的な規模で解析が進められてきたが、これらに強く結合する化合物は発見されていない。こうしたなか、レチノイン酸X受容体RXRに、トリブチルスズ(TBT)などの有機スズ化合物が非常に強く結合することが明らかにされた。そして、我々はビスフェノールAがERR γ に非常に強く結合することを発見した。化学物質の内分泌かく乱作用はエストロゲン受容体のみならず、すべての核内受容体を標的とした広領域な問題として考えるべき問題であることを端的に示している。

エストロゲン関連受容体(ER)の解析は緊要の課題である。ERには α 、 β 、 γ の3種類が存在する。特に、ERR γ は脳内での発現が顕著であり、しかも胎児期では相当な量的発現が知られており、この核内受容体について精査することは脳神経系への影響調査との関係で非常に重要である。

核内受容体へのさまざまな化学物質の影響は、特定の受容体系に集約して起こるよりも、

どれもが暴露される可能性があり、その際の分子遭遇がお互いの分子どうしの結合性の有無、核内受容体側のコンホメーション変化の有無、など分子間の相互作用性に基づいて起こる要因が無視できないと思われる。

自発活性化型核内受容体ERR γ については、「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」という方法原理を同じくしながら、内容的に異なるセンシング抗体アッセイが可能であることを実証した。ERR γ は化学物質が結合していない状態で活性化コンホメーションを取り、非常に高い構成的基盤活性をもつ核内受容体である。このERR γ に、例えば、4-OHTが結合すると、 α ヘリックス12を動かし、基盤活性が抑制される、いわゆるインバースアゴニスト活性が見られる。 α ヘリックス12が動くことによるコンホメーション変化を抗体がセンシング、定量する。このような抗体は、活性化コンホメーションにある受容体タンパク質では抗体の感応性が著しく低下、もしくは消滅していると考えられる。本年度、ERR γ に対するセンシング抗体の調製に成功したことで、自発活性化型核内受容体に一般的に適用可能な方法論が確立したことになる。

上述のように、化学物質の内分泌かく乱作用は、エストロゲンのみならず、すべての核内受容体を標的とした広領域な問題と認識すべきである。本研究課題で方法論として確立した「受容体コンホメーション変化センシング抗体アッセイ法」は、こうして、すべての核内受容体に適用可能な方法である。コンホメーション変化センシング抗体法を、核内受容体を介する全般的な、化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法として確立することはきわめて重要である。

ショウジョウバエのエストロゲン関連受容体(dERR)へのビスフェノールAの応答解析

ショウジョウバエに存在するエストロゲン関連受容体(dERR)は、ヒト核内受容体のエストロゲン関連受容体(ER)3種の祖先型構造をもつ。したがって、両者は構造的に良く

似ている。dERR の内在性リガンドはこれまで知られていない。この dERR にビスフェノール A が結合するかを調べた。図 40 に示すように約 50%ではあるが、特異的結合が観察された。したがって、ショウジョウバエにおけるビスフェノール A の効果は、少なくとも dERR を介する作用、影響があるものと判断される。

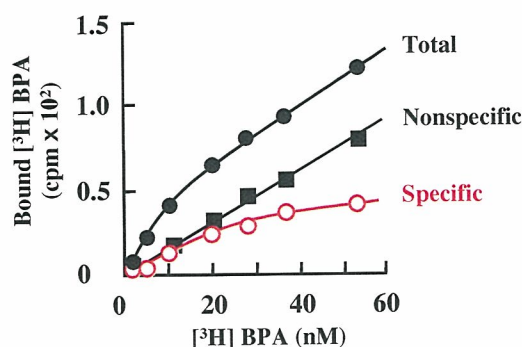


図 40. dERR 飽和結合試験
放射標識された BPA を用いた飽和結合試験の結果。

ショウジョウバエにはエストロゲン関連受容体が 1 種存在するのみであり、これにサブタイプは存在しない。また、エストロゲン受容体は存在しない。in vivo 継代試験の結果は、したがって、ほ乳動物での効果を検証するのに道標的、先導的な役割を果すものと思われる。

E. 結論

化学物質の内分泌かく乱作用は、化学物質のホルモン受容体応答性に密接に関連している。こうしたなか、内分泌かく乱作用が懸念される非常に多数の既存の化学物質を、迅速に精度高くスクリーニングする方法が必要とされている。我々は、「化学物質のホルモン受容体への結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知・センシングする」という着想に基づく「ホルモンの受容体結合性およびホルモン活性の同時測定評価法」を開発した。本研究課題では、このホルモン受容体コンホメーション変化センシング抗体法を核内受容体一般の評価法として確立するこ

とが第一の目的である。

本年（平成 18 年度）、抗体作製において大きな進展があった。一つは、ポリクローナル抗体作製において、「自発活性化型核内受容体」のセンシング抗体作製に成功したことである。これにより、核内受容体に存在する二つのタイプ（リガンド活性化型および自発活性化型）の受容体の両方に対して、抗体を作製できる方策が完備することとなった。次いで、ファージディスプレイ法で 2 つのライブラリーを併用することで確実にモノクローナルが得られるように改良できたことが上げられる。さらには、細胞融合法で確実にモノクローナルが得られるようにする方策として、二次スクリーニングに先立ってモノクローナル化する改良がある。こうして、あらゆるセンシングができるポリクローナル抗体、センシング能力の高いモノクローナル抗体の作製が可能となった。

さらに、「化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法」として確立するために、化学物質についてエストロゲン受容体に対してセンシング抗体法を実施し、ポリクローナル抗体を用いたアッセイを完了した。その結果、抗体応答性の観測された化学物質について、受容体結合性と抗体応答有効濃度 EC₅₀ (M) および受容体結合試験の受容体結合能 IC₅₀ (M) との間、また、最大抗体応答性 R_{max} およびレポーター遺伝子アッセイの結果との間にも、正の相関性が確認された。これらの結果を総合的に評価し、順位付けすることが可能なが示された。

一方で、エストロゲン受容体 ER α に対してアゴニスト特異的なモノクローナル抗体を用いた詳細な検討を実施し、受容体結合性のある化学物質について、受容体結合性と抗体応答有効濃度に良い正の相関性があり、感度はポリクローナル抗体よりも 8 倍良好であることを明らかとした。ER α 以外の核内受容体についても抗原ペプチド特異的な抗体クローナルを得た。さらには、アゴニスト、アンタゴニストへの受容体応答を効率的に識別するモノクローナル抗体を得るために、ファージディスプレイ抗体作製法を導入した

が、グルココルチコイド受容体 (GR) について、非常に効率的なセンシング抗体の調製に成功した。

今後、ポリクローナル抗体で先導的にセンシング能に優れた抗体の調製をはかり、次いで、対象の核内受容体の抗体応答特性に応じた反応性のモノクローナル抗体を主にファージディスプレイ法から、さらには細胞融合法で得るスキームで実施する予定である。エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) におけるビスフェノールAの高活性応答を契機として、さまざまな検討が始まった。ERR γ がビスフェノールAの受容体である新発見は、現在、さまざまな分野で解析が始められるようになった。

こうした緊要の課題、化学物質、核内受容体の発見は、ヒト核内受容体48種すべてを視野に入れた本研究課題では当然に予想されたことである。しかしながら、実際に『ERR γ におけるビスフェノールAの高活性』が起こると、これにまつわる多くの検討が必要となる。このような事例は、今後も出現する可能性が高い。

受容体コンホメーション変化センシング抗体アッセイ法は、化学物質の内分泌かく乱作用性を高精度に予測する方法論であり、すべての核内受容体に適用可能なスクリーニング法である。本研究課題では既に基盤技術の導入に成功した。今後、ヒト、あるいは関連する動物種の核内受容体全般について特異な化学物質をスクリーニングする方法として確立することは緊要の課題である。

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

論文発表

1. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor γ (ERR γ) with high constitutive activity. S. Takayanagi, T. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi; *Toxicol. Lett.* **195**, 95-105 (2006).

2. Conformation Sensing Assay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal α -helix of Glucocorticoid Receptor and Progesterone Receptor. T. Tokunaga, H. Okada, T. Nose, and Y. Shimohigashi; *Peptide Science* **2005**, 291-294 (2006).

3. α -Helix peptides for bio-panning in the phage display method to obtain the antibodies specific for conformation-change in nuclear receptors. H. Okada, T. Tokunaga, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi; *Peptide Science* **2005**, 475-478 (2006).

4. Structural isoforms of the circadian neuropeptide PDF expressed in the optic lobes of the cricket *Gryllus bimaculatus*: Immunocytochemical evidence from specific monoclonal antibodies. T. Honda, A. Matsushima, K. Sumida, Y. Chuman, K. Sakaguchi, H. Onoue, I.A. Meinertzhagen, Y. Shimohigashi, and M. Shimohigashi; *J. Comp. Neurol.* **499**, 404-421 (2006).

5. Conformation Change of α -Helix Peptide for Sensing of Deactivation of Nuclear Receptor: Immunoassay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal α -Helix 12 of Estrogen-related Receptor γ (ERR γ). T. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Matsushima, T. Nose, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi; *Peptide Science* **2006**, 176, (2006).

6. Functional analysis of F-domain peptides important for the basal constitutive activity of human nuclear receptor. H. Okada, N. Shirasu, and Y. Shimohigashi; *Peptide Science* **2006**, 177, (2006).

学会発表

1. 岡田浩幸、白須直人、下東康幸、Evolutionary Trace Analysis of Human Nuclear Receptors For Exploration of Functional Structural Essentials in the C-terminus Extensions, 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006. 6. 16-23.

2. 金森史花、岡田浩幸、野瀬 健、下東康幸、鉱質コルチコイド受容体を介した内分泌攪乱作用性評価のためのコンホメーション変化センシング抗体の作製、第43回化学関連支部合同九州大会、2006. 7. 8。

3. 岩崎 茜、武田行正、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ショウジョウバエ及びイエバエに共通した選択的スプライシング機構、第43回化学関連支部合同九州大会、2006. 7. 8。

4. 武田行正、岩崎 茜、佐藤聖児、松島綾美、下東美樹、下東康幸、選択的スプライシングおよび選択的ポリ A 付加機構によるフタホシコオロギ時計遺伝子 *period* mRNA の多様性、第 6 回日本蛋白質科学会年会、2006. 4. 24-26。
5. 金木淳史、吉田太一、磯崎 要、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ショウジョウバエ概日リズム神経ペプチド PDF 受容体のクローニングと遺伝子発現解析、平成 18 年度日本生化学会九州支部例会、2006. 5. 20-21。
6. 武田行正、高野克太、岩崎 茜、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ショウジョウバエ時計遺伝子 *period* における新規 mRNA アイソフォーム群の同定、平成 18 年度日本生化学会九州支部例会、2006. 5. 20-21。
7. 岩崎 茜 1、武田行正 1、松島綾美 1、下東美樹 2、下東康幸 1 ショウジョウバエとイエバエに保存される概日時計遺伝子、*period* 選択的スプライシングの同定、平成 18 年度日本生化学会九州支部例会、2006. 5. 20-21
8. 武田行正、岩崎 茜、佐藤聖児、松島綾美、下東美樹、下東康幸、Alternative splicing and polyadenylation mechanisms diversify the clock gene *period* mRNA isoforms in the fruit fly *Drosophila melanogaster*、20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。
9. 岩崎 茜、武田行正、松島綾美、下東美樹、下東康幸、Alternative pre-mRNA splicing mechanisms in the circadian clock gene *period* conserved between fruit fly *Drosophila melanogaster* and house fly *Musca domestica* 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。
10. 横谷 聡、松島綾美、下東康幸、Conformation Change-Sensing Assay to Measure the Metal Binding to Prion Protein N-terminal Octarepeat Domain by Using SAF-32 Monoclonal Antibody、20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。
11. 松島綾美、是恒幸恵、吉田太一、金木淳史、磯崎 要、下東美樹、下東康幸、Characterization of an insect G protein-coupled receptor activated by FMRamide-related peptides present in the housefly *Musca domestica*、20th

International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。

12. 金木淳史、吉田太一、磯崎 要、松島綾美、下東康幸、下東美樹、cDNA cloning and gene expression analysis of G protein-coupled receptors of circadian neuropeptide PDF in the fruit fly *Drosophila melanogaster*、20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology、2006. 6. 16-23。
13. 武田行正、岩崎 茜、松島綾美、下東康幸、下東美樹、Diversely regulated circadian clock gene *period* transcripts in the cricket *Gryllus bimaculatus*、第28回比較生理生化学会、2007. 7. 27-29。
14. 徳永隆俊、核内受容体コンホメーション変化センシングアッセイ: 化学物質の標的受容体への結合能およびホルモン活性の同時評価とリスク評価への応用、第6回泉屋コロキウム、2007. 8. 21-22。
15. 劉 暁輝、徳永隆俊、ビスフェノール A の結合によるヒトエストロゲン関連受容体 γ (ERR γ) の転写活性化、第6回泉屋コロキウム、2007. 8. 21-22。
4. 岡田浩幸、Evolutionary Trace 法によるヒト核内受容体リガンド結合ドメインにおける特異機能発現部位の同定、第6回泉屋コロキウム、2007. 8. 21-22。
16. 金森史花、鋳質コルチコイド受容体を介した内分泌攪乱作用評価のためのコンホメーション変化センシング抗体の作製、第6回泉屋コロキウム 2007. 8. 21-22。
17. 岡田浩幸、Evolutionary Trace 法によるヒト核内受容体リガンド結合ドメインにおける機能発現部位の同定、泉屋コロキウム、2007. 8. 21-22。
18. 徳永隆俊、劉 暁輝、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東美樹、下東康幸、Conformation Change of α -Helix Peptide for Sensing of Deactivation of Nuclear Receptor: Immunoassay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal α -Helix 12 of Estrogen-related Receptor γ (ERR γ)、第 43 回ペプチド討論会-PEM4、2006. 11. 5-8。
19. 岡田浩幸、白須直人、下東康幸、Functional analysis of F-domain peptides important for the basal constitutive activity of human nuclear receptor、第 43 回ペプチド討論会-PEM4、2006. 11. 5-8。

20. 金木淳史、吉田太一、磯崎 要、松島綾美、下東美樹、下東康幸、Molecular Cloning and in situ Hybridization of Circadian Neuropeptide PDF Receptor in the Fruit Fly *Drosophila melanogaster*、第43回ペプチド討論会-PEM4、2006. 11. 5-8。
21. 武田行正、住吉美保、古賀啓太、伊東正史、松島綾美、下東美樹、下東康幸、Multiple Post-Transcriptional Regulations in Circadian Pacemaker Neuropeptide pdf Gene、第43回ペプチド討論会-PEM4、2006. 11. 5-8。
22. 古賀啓太、高山泰昌、平村大輔、武田行正、金木淳史、松島綾美、下東康幸、下東美樹、Immunological Confirmation of Circadian-related Neuropeptide PDF-Isoform Peptide in the Cricket *Gryllus bimaculatus*、第43回ペプチド討論会-PEM4、2006. 11. 5-8。
23. 武田行正、岩崎 茜、松島綾美、下東康幸、下東美樹、Diversely regulated circadian clock gene period transcripts in the cricket *Gryllus bimaculatus*、第43回ペプチド討論会-PEM4、2006. 11. 5-8。
24. 松島綾美、是恒幸恵、金木淳史、磯崎要、下東美樹、下東康幸、Structure-activity studies of FMRFamide-related peptides in activating the specific receptor present in the housefly *Musca domestica*、第43回ペプチド討論会-PEM4、2006. 11. 5-8。
25. 下東康幸、徳永隆俊、劉 曉輝、岡田一志、高柳明香 ビスフェノールAの標的受容体は脳内に高発現の核内受容体・エストロゲン関連受容体 γ 型(ERRg)である、環境ホルモン学会第9回研究発表会、2006. 11. 11-12。
26. 野瀬 健、下東康幸 内分泌攪乱物質ビスフェノールAのエストロゲン関連受容体 γ 型(ERRg)へのドッキングモデリング、環境ホルモン学会第9回研究発表会、2006. 11. 11-12。
27. 松島綾美 1、角田佳充 2、寺本岳大 2、小柴琢己 3、川畑俊一郎 3、木村 誠 2、下東康幸 1 ビスフェノールAのエストロゲン関連受容体 γ 型(ERRg)複合体のX線結晶構造解析、環境ホルモン学会第9回研究発表会、2006. 11. 11-12。
28. 徳永隆俊・劉 曉輝・岡田浩幸・松島綾美・野瀬 健・下東康幸 エストロゲン関連受容体 γ 型(ERR γ)のコンホメーション変化センシング抗体アッセイ：ビスフェノールAの受容体応答活性、環境ホルモン学会第9回研究発表会、2006. 11. 11-12。
29. 劉 曉輝・徳永隆俊・岡田浩幸・松島綾美・下東康幸 エストロゲン関連受容体 γ 型(ERR γ)の部位特異的アミノ酸変異による内分泌攪乱化学物質ビスフェノールAの受容体結合部位の同定、環境ホルモン学会第9回研究発表会、2006. 11. 11-12。
30. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、ビスフェノールAのエストロゲン関連受容体 γ 型(ERR γ)への高親和性：ビスフェノールAの必須構造要因、環境ホルモン学会第9回研究発表会、2006. 11. 11-12。
31. 下東美樹、海部匡慶、西絵利香、澤田隆行、徳永隆俊、劉曉輝、松島綾美、I. A. Meinertzhagen、下東康幸、ショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体(dERR)と環境ホルモンのリスク評価のためのショウジョウバエ *in vivo* 継代試験の確立、環境ホルモン学会第9回研究発表会、2006. 11. 11-12。
32. 岡田浩幸、白須直人、下東康幸、進化トレース法による恒常活性を強く保持するヒト核内受容体の構造解析、日本分子生物学会2006フォーラム、2006. 12. 6-8。
33. 下東康幸、ビスフェノールA受容体：その構造と活性、環境ホルモン学会第14回講演会ー低用量問題の現状と今後ー、2007. 2. 28。

H. 知的財産権の出願・登録状況

当該年度に該当の出願・登録の実績はなかった。

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

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

核内受容体に対する化学物質・リガンドの結合は、12個の α -ヘリックス構造からなるリガンド結合ドメインで起こる。これまでの研究で、代表的な核内受容体であるステロイドホルモン受容体においては、リガンド非結合（アポ型）、アゴニスト結合（ホロ型）、アンタゴニスト結合（ホロ型）の3つの状態において、それぞれ立体構造・コンホメーションが異なることが知られている。今日までのヒトゲノム解析により、ヒトには48種類の核内受容体の存在が明らかにされた。それら48種類の核内受容体それぞれにおいても、リガンドの結合した立体構造は、3つの異なるコンホメーションが存在すると想定されている。これまでの研究において、我々は受容体のアポ型からホロ型へのコンホメーション変化を抗体で感知・センシングする方法を用いることにより、化学物質が核内受容体を介して示す内分泌かく乱作用のリスク評価に資するデータを得ることができることを見出した。このセンシング法の最も重要な分子ツールは、受容体のコンホメーション変化を高感度で感知するセンシング抗体である。このため、本分担研究において、このセンシング法の48種類の核内受容体への適用を図るために、センシング抗体をポリクローナル抗体として迅速に作製することとした。今年度は12種類の受容体に対応した12種のポリクローナル抗体の作製に着手し、既に9種類の抗体作製に成就した。また、立体構造未知の7種類の核内受容体の抗体エピトープのデザインを実施した。立体構造未知の核内受容体に対する抗体エピトープのデザインにあたっては、ホモロジーモデリングを実施し、核内受容体ヘリックス12に相当する部位を同定することにより行った。

A. 研究目的

核内受容体は生体内で特異的なリガンド・ホルモンと結合することにより調節を受ける転写因子の一つのグループである。女性ホルモン受容体、男性ホルモン受容体など、性ホルモン受容体がこのグループに含まれている。ヒトゲノム解析研究が終了した結果、ヒトには少なくとも48種類の核内受容体が存在することが判明した。現在、それらの核内受容体すべてに対するリガンドが判明してはいないが、立体構造およびアミノ酸配列解析の結果は、すべての核内受容体においてリガンド既知の性ホルモン受容体を含むステロイド受容体の活性化機構と類似の活性化機構が存在することを示唆した。そこで、これらすべて

の核内受容体に対する環境化学物質・環境ホルモンの影響が懸念され、それらの影響を検討する必要性が生じた。本研究においてはヒトの核内受容体48種類すべてを対象に研究を行うこととした。従来の環境ホルモン問題においては、環境化学物質の暴露によって最も顕著に影響を受ける核内受容体として、女性ホルモン（エストロゲン）受容体 α （ER α ）が注目されてきた。これは、ER α は主に生殖に関与し、野性生物において多くの生殖異常が発見された事実から、人類においてもER α を介したかく乱作用は子孫、特に個体数の減少に直結すると考えられていたからである。しかしながら、本研究班の下東らの研究において、別の核内受容体・エストロゲン関連受容体