γ（ERRγ）に対してビスフェノールＡが非常に強力に結合することが明らかとされた。このため、ERα以外の全ての核内受容体に対しても内分泌かく乱の危険性を評価する必要性が高まり、本分担研究の重要性が増大した。ヒトゲノム解析の結果より、核内受容体タンパク質のアミノ酸配列が解析された。この核内受容体ファミリーに属する受容体タンパク質は互いに高いアミノ酸配列相同性を示すが、さらに構造相同性を示し５つのドメイン構造からなることが明らかとなっている。そのドメイン構造は A—E 領域に分けて考えられており、内分泌かく乱作用は特異的なリガンド・ホルモンの結合に関与するＥの領域・リガンド結合ドメイン（Ligand Binding Domain: LBD）で主に生じると考えられている。（図１）

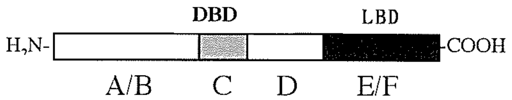

図１．　一般的な核内受容体のドメイン構造
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

このLBDは、リガンドが結合することにより立体構造を変化させ転写制御を行っている。それゆえ、このLBDにリガンドではない化学物質が結合し、誤った転写制御を引き起こすことが内分泌かく乱作用の本質であると考えられる。すなわち、内分泌かく乱化学物質はLBDに対してリガンドと同様に、もしくはリガンドの結合を遮断するように結合すると推定されている。

これまでにＸ線結晶構造解析の結果が報告された核内受容体の立体構造から次のような立体構造の変化が推定されている。リガンドがLBDに結合することに伴い、ヘリックス１２部分構造を大きく変化させる。よって、このヘリックス１２部分を特異的に認識する抗体を作製することにより、化学物質の受容体結合を評価することが可能となり、我々はこれまでに幾つかの核内受容体系での成功例を既に報告した。よって、４８種類の核内受容体の全てに対する抗体（センシング抗体）を本分担研究で作製し、それらの抗体についてのアッセイを行うこととした。

本年度の研究では、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(Ｅドメイン)におけるヘリックス１２相当部分のアミノ酸配列解析を実施した。また、同定したヘリックス１２部分を含む抗原作製用ペプチド１２種類をデザイン・化学合成して、ポリクローナル抗体作製を行った。

B. 研究方法

①　立体構造データの検索と入手

核内ホルモン受容体LBDのリガンド結合状態（アゴニストもしくはアンタゴニストが結合したもの）の立体構造は、PDB (Protein Data Bank)に登録されている。これらのＸ結晶構造解析データを、インターネットを通じて直接に入手した。

②　受容体構造の解析

PDBより入手した立体構造データは、分子モデリングプログラム InsightII / Discover（Accerlys社製）で解析した。コンピュータはSGI社製、グラフィックワークステーション02を使用した。

③　アミノ酸配列データの検索と入手

核内受容体のアミノ酸配列は、NCBI（National Center for Biotechnology Information）の遺伝子・タンパク質配列データベース Entrez から、それぞれ最新の配列取得した。また、配列相同性解析・およびドメイン構造の同定には解析プログラム・ClustalX を使用した。

④　ホモロジーモデリングによるエピトープ部位の決定

立体構造未知の核内受容体のエピトープ部位の決定ため、ホモロジーモデリングによる立体構造の構築を行った。ホモロジーモデリングソフトウェア・Modeller を用いて、構造未知の受容体LBDに対してアミノ酸配列の相同性が高く、かつ立体構造既知の核内受容体をPSI-BLASTで探索し、その中から相同性高い3種類の立体構造を鋳型構造として用い、立体構造を構築した。

⑤　抗原ペプチドの合成

構造解析により同定した受容体の第12ヘリックスを含むＣ端部分に相当する断片ペプチドをエピトープとして設定し、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、抗原配列中にシステインを持たないペプチドの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, φ = 1.8 cm, l = 75 cm) および逆相 HPLC (Lichrospher RP-18(e)、 φ = 25 cm 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により行った。

⑥ 架橋試薬のキャリアタンパク質 KLH 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) (16 mg/μl) に、MBS の DMF 溶液 (3.6 mg/12 μl) を 9.3 μl 添加し、室温で 30 分撹拌した。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。

⑦ エピトープペプチドの KLH への結合

上記で得られたペプチド 1 mg を添加した水溶液 500 μl に、トリス-（２-シアノエチル）ホスフィン水溶液 (5 mg/ml) を 200 μl 加えてシステインの SH 基を完全に遊離させた。これに、先に調製した KLH-MBS 複合体溶液(230 μl)および 0.2 M Na_2HPO_4 (115 μl) を加え、室温で３時間撹拌した。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。

⑧ ウサギへの免疫

先に調製したペプチド-KLH 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た後、ウサギ（ニュージーランドホワイト）に対して免疫した。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 法により確認した。

⑨ 抗体の精製

まず、採血した血液 30 ml を 37℃で１時間､その後､4℃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。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。

⑩ 免疫沈降

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℃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。

⑪ 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。

⑫ アフィニティ精製

調製した抗体の抗原ペプチドに対する応答を酵素免疫測定 (ELISA) により調べた。ELISA に用いるプラスチックプレートの調製は、次のように行った。１）ウシサイログロブリンに結合させたペプチドをプレートに吸着 (2.5 mg/ml, 50 ml/well)、２）1.5 時間インキュベート、３）洗浄、４）非特異的な吸着を防ぐ為に 2%BSA によりブロッキング。その後、試験に用いる抗体溶液を１時間・室温でインキュベートした後、洗浄操作を行い、HRP 標識された 2 次抗体(anti-rabbit IgG 抗体)によりペプチドに対する抗体応答を調べた。HRP の基質には過酸化水素を用い、酵素作用により生じた酸素原子が 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt) (ABTS) を発色させることにより 405 nm の吸光度をプレートリーダー検出した。

⑬ 受容体タンパク質の調製

アッセイに供する受容体タンパク質は、１）タンパク質として購入可能なものはタンパク質を購入、２）タンパク質の市販されていないものは cDNA として購入し、発現ベクターにサブクローニングして調製した。

（倫理面への配慮）

本研究課題では、抗体を作成するに当た

り、ウサギを実験動物として使用する。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ている。また、採血等に際しても麻酔をするなど痛みの無いように配慮するなど、倫理面の問題が生じない状況で行っている。所属部局・理学研究院においては「動物実験審査」システムが確立されており、本研究は審査を承認の上許可された。

一方、内分泌かく乱性の可能性のある化学物質を多種取り扱うが、量的には極めて微量であり、しかも、スクラバー付属のドラフトチャンバーが設備されており、特に危険性は無い。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。

C. 研究結果

本研究で用いるセンシング抗体は、受容体のリガンド結合に伴う構造変化を感知する。そのセンシング抗体は核内受容体 LDB のヘリックス１２部分を主なエピトープとする。それゆえ、ヘリックス１２部分の同定が、本研究において重要な部分を占めるが、現在のところ全ての核内受容体 LBD の立体構造は決定されてはいない。本年度の研究においては、まず、表１に示すX線立体構造解析により立体構造が解析済みのもの８種類については、分子モデリングによりヘリックス１２を直接同定し、その前後１ー８残基を含む部分をエピトープとした。また、受容体サブタイプにおいて立体構造が判明しているものも（HNF4α と HNF4γ など）、同様に決定した（表 1）。

一方、立体構造が判明していない受容体については、アミノ酸配列相同性解析によりアミノ酸配列の類似性が最も高く、立体構造が判明している受容体 3 種類を鋳型構造として、ホモロジーモデリングソフトウェア「Modeller」により立体構造を構築した。それを基に、ヘリックス 12 領域を同定し、その前後の構造から抗体作製に有用な延長部分を決定して、エピトープとした。ホモロジーモデリングの例として図２に EAR2 の立体構造を示した。赤色で示す部分がヘリックス１２である。同様なホモロジーモデリングを TR2、TR4、hTLL、PNR、COUP-TF1、COUP-TF2 においても実施した。

表１　PBD（結晶構造解析データ）から特定した核内受容体 LBD・ヘリックス１２領域とエピトープペプチド

下線部分はヘリックス１２相当部分

Name	AMINO ACID SEQUENCE	PDB
PXR	CDIHPFATPLMQELFGITG	1NRL
CAR	CHIQGLSAMMPLLQEI	1XVP
HNF4α	CAKIDNLLQEMLLGGS	1LV2
HNF4γ	CVKIDNLLQEMLLGGAS	No
NGFIB	CPIIDKIFMDTLPF	2GBD
NURR1	CEDLVPPPAIIDKLFLDTL	1OVL
NOR1	CEDLVSPPSIIDKLFLDTL	No
SF-1	CNEMPRNNLLIEMLQAKQ	1YOW
LRH-1	CGDVPYNNLLIEMLHAKR	1YOK
RORα	CVRLHFPPLYKELFTSEF	1N83
RORβ	CVNTLFPPLYKELFNPD	No
RORγ	CAAFPPLYKELFSTET	No

No：立体構造が決定されていない受容体

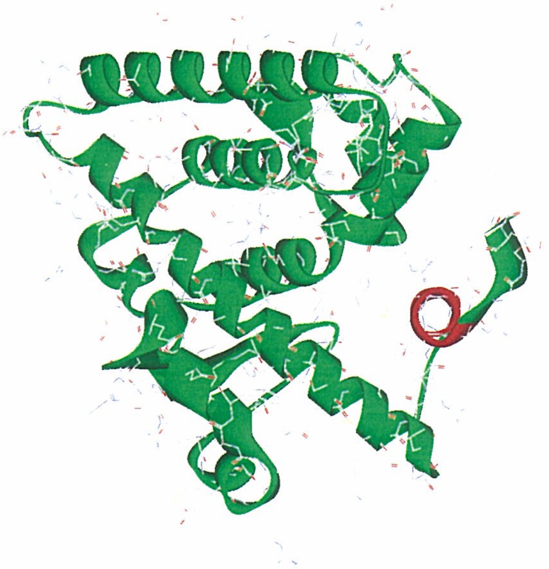

図２.　ホモロジーモデリングで構築した EAR2 の立体構造

赤色でヘリックス１２部分を示す

抗原ペプチドの合成は、自動固相合成機による Fmoc アミノ酸を用いた HBTU-HOBt 法で行った。今回合成した数種類のヘリックス１２を含むペプチドにおいては、水溶液に対する溶解性が著しく低く、そのような合成ペプチドはカラムクロマトグラフィ

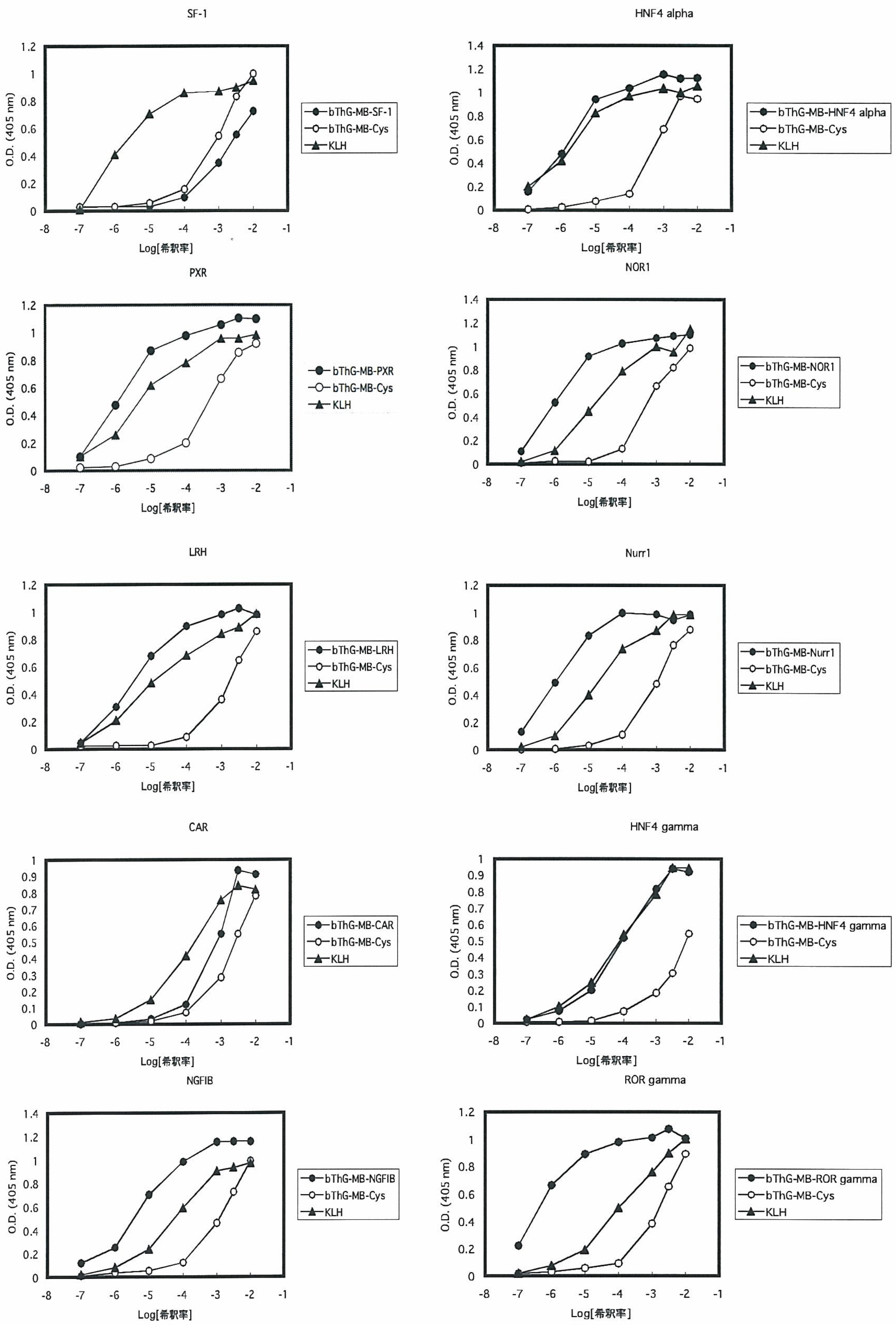

図３　ウサギ由来抗ヘリックス１２ポリクローナル抗体の力価の検討
10 種類の抗原ペプチドで作製したポリクローナル抗体を用いた

ーでの精製が困難で収率が低下した（データは省略）。

本分担研究においては、ポリクローナル抗体をウサギに免疫して作製した。得られた抗血清より抗体画分を調製して、抗体力価を検討した。現在までに力価の検討が終了したものは９種類の抗体である（図３）。

SF-1 を除く全ての抗体において、抗原ペプチドに特異的で明確な吸光度の上昇が確認された。SF-1 については、現在再度別個体のウサギを用いて免疫を行い抗体の調製を実施している。RORα、RORβについても、現在、免疫を終了し、抗体の調製を行っている。

D. 考察

本分担研究で用いるセンシング抗体法は、核内受容体の LBD に存在するヘリックス１２に対する抗体を調製することが最も重要な課題である。しかしながら、現在のところ核内受容体の立体構造は全てが解明されてはいない。それゆえ、立体構造を予測することが必要となり、本研究ではホモロジーモデリングを用いた。単純にアミノ酸配列のアラインメントからヘリックス 12 部位をおおまかに同定することは可能であるが、実際に立体構造を構築して注意深く解析すると、ヘリックス 11 とヘリックス１２の間のループ構造に当たる部分は各受容体間で長さが異なる。エピトープとして用いる部分は、リガンドの結合・非結合時で大きく構造が異なることが望ましい。このため、推定上のヘリックス１２からＮ端側もしくはＣ端側にエピトープ部位を設定する場合、分子表面に出る親水性アミノ酸残基、分子内部に向く疎水性アミノ酸残基、構造を曲げるプロリン残基がどのような配向をしているか実際に観察することが出来るモデリングは有用であった。

E. 結論

本分担研究により、９種類の核内受容体 LBD 抗ヘリックス１２ポリクローナル抗体が作製され、3 種類が調製中である。また、7 種類のエピトープ部位を決定し、抗原を調製中である。今後、これらを用いて受容体タンパク質と種々の化学物質を用いたセンシングアッセイを行う予定である。また、残りの受容体 LDB に対するセンシング抗体作製も行い、全ての受容体に対するポリクローナル抗体を作製しアッセイに共する予定である。

F. 健康危険情報

該当する情報はない。

G. 研究発表

論文発表

1. 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 (ERRγ)
Takatoshi Tokunaga, Xiaohui Liu, Hiroyuki Okada, Ayami Mastushima, Takeru Nose, Miki Shimohigashi, and Yasuyuki Shimohigashi
Peptide Science 2006, 176 (2006).

学会発表

1. 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撹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。

2. 徳永隆俊・劉　暁輝・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（ERRγ）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。

3. 野瀬　健、下東康幸、内分泌撹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。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ、出願・登録されていない。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

ファージディスプレイ法によるヒト核内受容体48種センシング抗体の作製

分担研究者　松島綾美　九州大学大学院理学研究院助手

研究要旨

内分泌かく乱作用は、ヒト核内受容体48種類が複合的に関与する複雑な制御機構に対して化学物質が影響を及ぼした結果発現される可能性が高く、全ての核内受容体において環境化学物質の内分泌かく乱作用性を評価することはきわめて重要である。一方、我々が開発したセンシング抗体法は、1段階の試験で化学物質の受容体結合性とホルモン活性についての評価を同時に与えるハイスループットな評価系であり、膨大な数の化学物質を48種の核内受容体について評価するためには最も有効な評価法である。そこで本研究では、48種の核内受容体において高効率にセンシング抗体を作製することを目的として、近年発展が著しいファージディスプレイ法を利用した最適なセンシング抗体作製系の確立に着手した。まずは、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を示し、実際にセンシング抗体を得ることに成功した。また、パンニング回数を増やすなど、幾つかの改良を加えた抗体作製法をエストロゲン受容体に対して適用し、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ことが判明した。これにより抗体選別技術が確立され、現在、ステロイド受容体（9種）に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。

A. 研究目的

ヒトゲノム解析の完成により、ヒトには48種の核内受容体が存在することが明らかにされ、環境化学物質による内分泌かく乱作用は、これらの核内受容体群が複合的に関与する複雑な制御システムに対する影響の結果生じる可能性が強いと懸念されている。事実、内分泌かく乱作用に直接的に関与するエストロゲン受容体2種（ERα、β）の他にエストロゲン関連受容体3種（ERRα、β、γ）の存在が明らかとされ、これらが一部の外因性リガンドを同じくすることから、5種の受容体が相互に連関した機能調節機構へ及ぼす環境化学物質の複合的な影響が危惧されている。

さらに、我々の調査の結果、核内受容体48種のうち、実に20種を超える受容体が脳神経系において機能発現していることが明らかとなり、かく乱作用の標的は内分泌系にとどまらず、脳神経系にまで及ぶ危険性が高いことが判明した。従って、すべての核内受容体において環境化学物質のかく乱作用の予測・順位付けを行うことは緊要な課題である。

我々は、核内受容体断片ペプチドを抗原とした動物免疫によって、コンホメーションセンシング能を有するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製に成功し、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

の問題を内包しており、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った。

そこで我々は、平成 16 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、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、まずは、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 ERαにおいて展開した。

昨年度までには、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 GR において示され、実際にセンシング抗体を得ることに成功している。本年度では、ERαにおいてバイオパンニング(抗体選別操作)のスキームを確立させ、ファージディスプレイのメリットである「迅速な抗体作製」すなわち、多くの抗原についての抗体作製を同時並行に行う系の確立を目的とした。今回は、まず、ステロイドホルモン受容体 9 種に対してバイオパンニングを展開した。これらを同時並行に行うことが可能であることが確認された後、その他の受容体に一挙に拡張する。

ところで、モノクローナル抗体によるセンシングアッセイは、ポリクローナル抗体によるセンシングの高効率化を目的とする。ある受容体について、多様な抗体成分の混合物であるポリクローナル抗体センシング抗体法が確立された場合、そのアッセイの感度を十分に配慮してモノクローナル抗体を作製する必要がある。そして、これは、バイオパンニングよる抗体クローンの選別に特別な注意が必要であることも意味する。本研究ではこうした抗体の選別をまず、ステロイドホルモン受容体 9 種に対して実施するものである。

B. 研究方法

(1) 抗原ペプチド・バイオパンニング用ファージ抗体ライブラリーの調製

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、ERα、ERβ、ERRα、ERRβ、ERRγ、アンドロゲン受容体 (AR)、プロゲステロン受容体 (PR)、鉱質コルチコイド受容体 (MR) の合計 9 種類について、抗原ペプチドの合成を行った。抗原ペプチドの配列は、リガンドの結合時に大きく構造変化を起こすリガンド結合ドメイン (LBD) の 12 番目のへリックス (H12) 付近を用いた (表 1)。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 1. 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

	名称	受容体	配列
1	NR3A1	ERα	CLYDLLLEMLDAHRLHA
2	NR3A2	ERβ	CKNVVPVYDLLLEMLNAHV
3	NR3B1	ERRα	CGKVPMHKLFLEMLEA
4	NR3B2	ERRβ	
5	NR3B3	ERRγ	
6	NR3C1	AR	CSVDFPEMMAEIISVQVPKILS-GKVKPIYFHTQ
7	NR3C2	PR	CEMMSEVIAAQLPKIL
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へリックス 12 部位

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(図 1)。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

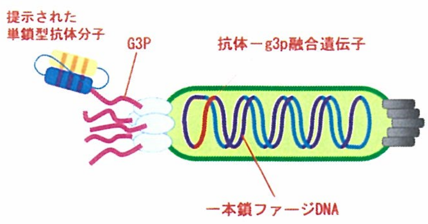

図１．ファージ抗体の構造

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。

(2) バイオパンニング

一般にファージディスプレイ法では、① 固定化抗原とファージ抗体ライブラリーの結合、② 洗浄、③ 結合ファージの溶出、④ 溶出ファージの大腸菌への再感染、⑤ 溶出ファージの増幅・回収、というバイオパンニングと呼ばれる一連の操作によって、抗原特異的な抗体を発現したファージ粒子を選択的に濃縮させる。本研究では、バイオパンニングを３回繰り返す方法を基本的に採用した。ERαにおいては、より効率的に抗体を得るために、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回繰り返したが、

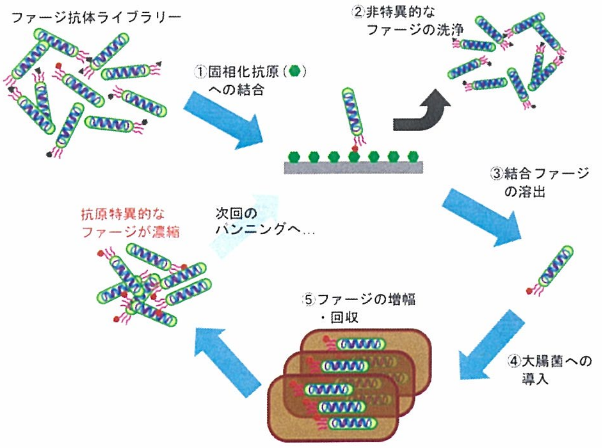

図２．バイオパンニング

期待されるほどの濃縮効果は得られなかった。このため、以後は３回に統一して実施した。一般的に、パンニング回数が増えることで結合親和性の高い抗体が得られるが、単一成分系に近づくため、少ない数の抗体しか得られなくなる（詳細は後述）。

抗原ペプチド（50 μg/ml in PBS）をイムノチューブ（Maxisorp, Nunc 社）に加え、終夜インキュベートして固定化した。洗浄後、2%スキムミルク-PBS（MPBS）にて 2 時間ブロッキングを行った。4 ml の MPBS 中に 5×10^{12} のファージを含むように調製した Tomlinson I もしくは J ライブラリーをイムノチューブに加え、2 時間反応させた。0.1% Tween20-PBS（TPBS）で 3 回、PBS で 3 回洗浄後、500 μl のトリプシン溶液（1 mg/ml）を加えて、抗原に結合したファージを溶出させた。

溶出ファージを宿主菌 TG-1 に感染させ、培養プレートに播種した。育成したコロニー群を液体培地によって懸濁させ、50 ml の 2×TY 培地（含 1%グルコース）に植菌して対数増殖期にまで 37℃で震盪培養した。遠心により培地を除いた後、10 ml の 2×TY で再度菌体を懸濁させ、5×10^{10} の KM13 ヘルパーファージを添加して 30 分間静置した。遠心して上清を除去した後、50 ml の 2×TY 培地（含 0.1%グルコース）で菌体を懸濁させ、30℃で終夜培養した。

パッケージングされたファージ粒子は培養上清に含まれるため、これをポリエチレングリコール沈殿法によって回収し、最終的に得られるファージペレットを 2 ml の PBS にて懸濁させた。

得られたファージ液のうち 1 ml を次回のパンニングに使用した。2 回目のバイオパンニングについては、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 25 μg/ml とし、3 回目には 10 μg/ml と希釈した。さらに、ライブラリー反応後の洗浄操作を 2 回目以降は TPBS、PBS 共に 20 回と厳しく変更した。

また、固定化抗原には、BthG 架橋体と KLH 架橋体を交互に使用することによって、ペプチドを特異的に認識するファージ抗体の選別・回収を行なった。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。

(3) ファージクローンのスクリーニング

3.1. 1次スクリーニング

得られたファージクローンから、ペプチドを特異的に認識するファージクローンを同定するため、合成ペプチド2.5 μg/ml を固定化抗原としたファージ抗体 ELISA を行った。多くのサンプルを同時に解析するために、96穴マイクロウェルプレートを用いてファージ抗体の調製を行い、そのまま ELISA の1次抗体として使用した。ペプチドを認識することが判明したファージクローンについてはDNA 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、同一のクローンである場合は1つのクローンを除いて廃棄した。

3.2. ファージ抗体力価の検討

1次スクリーニングで得られたファージクローンからファージ抗体を改めて調製し、ファージ抗体 ELISA による抗体力価の詳細な検討を行った。

3.3. 2次スクリーニング

単鎖型抗体 (scFv) を発現するファージクローンを同定するために、SDS-PAGE による確認を行った。まず、1次スクリーニングで得られたファージクローンを 96 穴マイクロウェルプレートに分注した各 100 μl の 2×TY 培地(含 1%グルコース)に植菌し、37℃、300 rpm で終夜培養した。培養液 2 μl を各 200 μl の 2×TY 培地 (含 0.1%グルコース) に植菌し、37℃、300 rpm で 2 時間培養後、最終濃度 3 mM の IPTG (Isopropyl-β-D-thio-galactoside) を添加した。30℃、300 rpm で 24 時間培養後、遠心により菌体を除いた上清を SDS-PAGE した。

3.4. scFv (単鎖型抗体) の発現検討

得られたクローンからファージ抗体を作製し、新たに大腸菌 HB2151 株に感染させた。これを大量培養し、IPTG で発現誘導後、菌体を回収した。ここから Ni キレートカラムによりアフィニティ精製を行った。

(倫理面への配慮)

一般の抗体作製法とは異なり、ファージディスプレイ法は実験動物に痛みを与える抗原免疫や採血を行う必要がないため、今回の研究では動物愛護の観点からの倫理上の問題が大幅に軽減されている。また、研究に用いたファージはヒトに対する感染性が皆無であり、安全性の点でも問題がない。

C. 研究結果

(1) ERαセンシング抗体の作製

GR について Tomlinson I ライブラリーから合計 3 回のバイオパンニングを実施したところ、個体数 6.7×10^5 のファージが回収された。その後、モノクローナル化した 120 クローンについて 2 段階のスクリーニングを行った結果、ペプチド抗原濃度 2.5 μg/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 1 種を得ることに成就した。その一方で、多数のセンシング抗体を得るためにはバイオパンニング法の改良が必要であることが判明した (前年度報告)。

GR に続き、ERαのセンシング抗体の作製に着手した。その際、48 種の核内受容体を対象とした高効率的な抗体作製系の構築のために、ERαではパンニング回数を 4 回に増やし、特異的なファージ粒子をさらに濃縮することを試みた。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。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、個体数 1.3×10^9 のファージが回収されたことが確認された (表 2)。すなわち、GR でのバイオパンニングの結果と比較して、ERαでは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(図1)。

得られたファージクローンの 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種のファージクロー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 2)。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バ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

ージクロー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ーンであった。そこで、やはりバイオパンニングは 3 回が最適であると思われる。

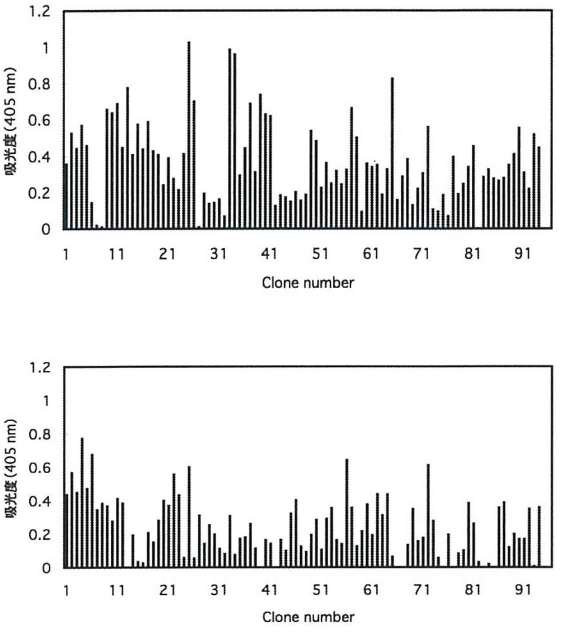

図 1. 1 次スクリーニングの結果(ERα)
(上)クローン 1〜94、(下)クローン 95〜188

(2) 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 ERα 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 穴マイクロウェルプレート 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 3、4)。

(3) 新規ライブラリーの導入

一連の結果より、受容体種によって得られるクローンの数が大きく変動することが判明し、48 種に展開した場合、安定して抗体が得られない危険性がある。そこで、Tomlinson I ライブラリーだけでなく、これとは全く別の抗体群で組成された Tomlinson J ライブラリーを合わせて使用することで、より多くのファージクローン得ることを試みた。ERα 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

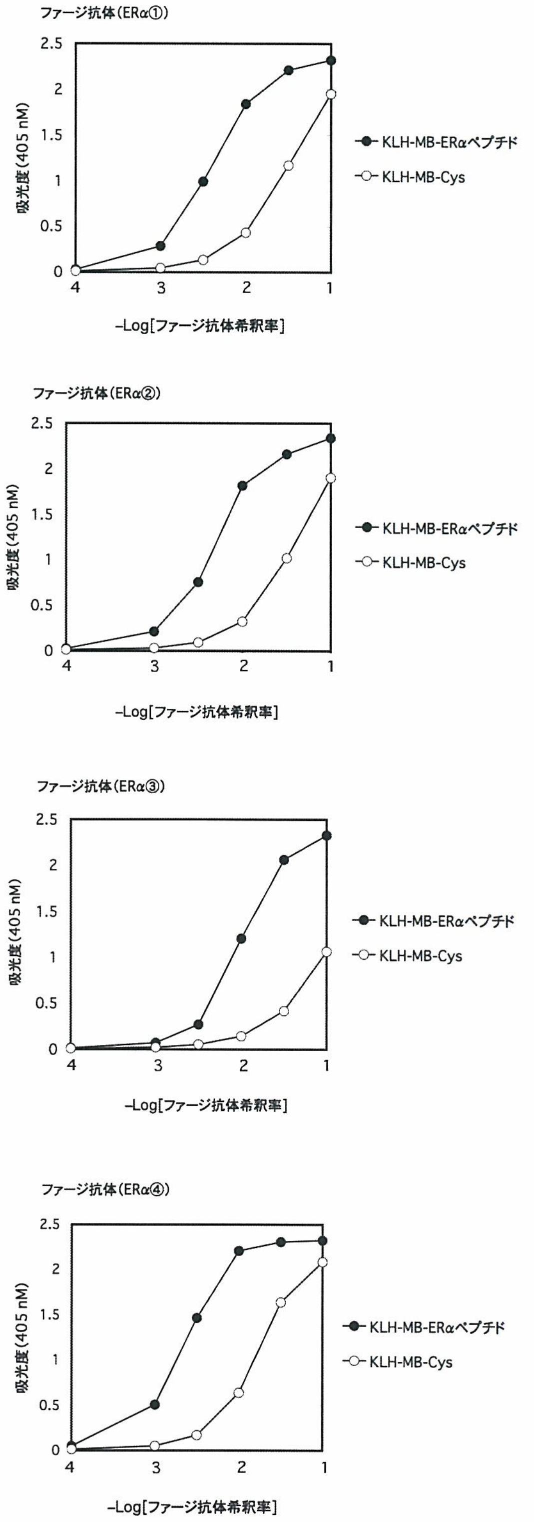

図 2. ERα でのファージ抗体 4 種についての抗体力価の検討

れた。その後、モノクローナル化した 184 クローン (96 穴マイクロウェルプレート 2 枚) 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 5）。現在、これらの DNA シークエンス解析を継続中であるが、8 クローンを解析した段階で、すでに 4 クローンが異なる抗体を提示していることが判明し、確実に多くの抗体を得たことが確認された。

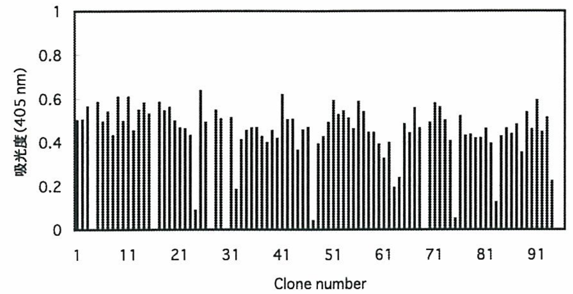

図 3. 1 次スクリーニングの結果（MR）

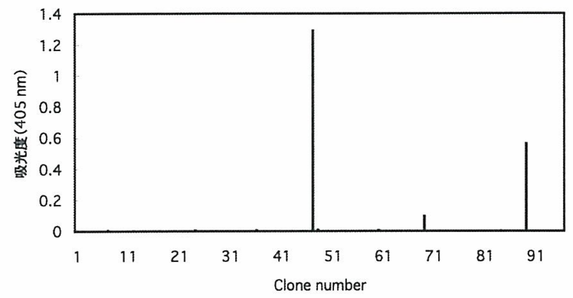

図 4. 1 次スクリーニングの結果（ERR）

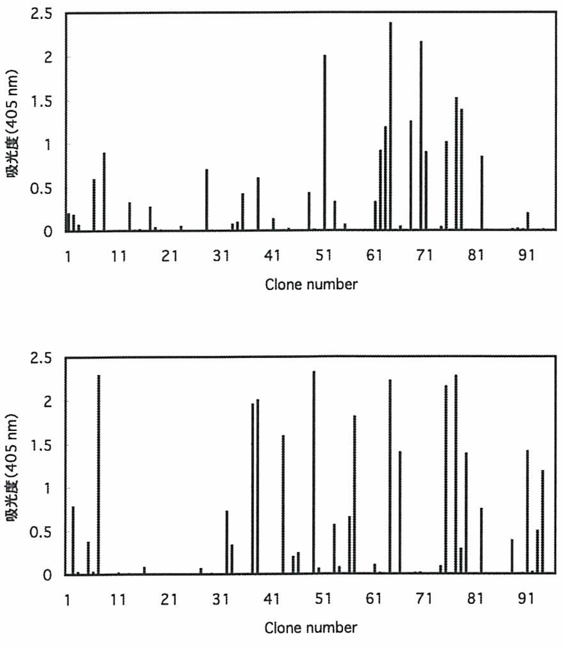

図 5. 1 次スクリーニングの結果（ERα, Tomlinson J ライブラリー）（上）クローン 1～94、（下）クローン 95～188

表 2. 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
ERα	I	4	1.3×10^9	163
	J	3	1.1×10^9	64
MR	I	3	6.4×10^6	72
ERRα	I	3	2.1×10^5	3
ERRβ				
ERRγ				
ERβ	I	3	解析中	解析中
	J	3		
AR	I	3		
	J	3		
PR	I	3		
	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ーンの数

D. 考察

前年度までに、バイオパンニングにおける抗原ペプチドの固定化方法についての最適化や、バイオパンニングの手法を工夫することでアンタゴニスト結合型構造を認識する抗体を合目的に選別する（作り分ける）ことが可能であることを明らかにした。本年度では、バイオパンニングの回数について最適化をおこない、3 回のバイオパンニングで十分であることが判明した。一方、複数の受容体において抗体作製を行ったが、受容体によって得られる抗体数にばらつきがあり、48 種の受容体で安定した抗体作製を行うには十分な結果が得られていないと判断した。このように、抗原によっては目的の抗体が得られないことは、ファージディスプレイの特徴の１つである。つまり、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分」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ため、ライブラリーの中に有用なファージ抗体が含まれていなければ決して得ることができない。そこで、Tomlinson I ライブラリーとことなる部位をランダム化した Tomlinson J ラ

イブラリーを新たに使用することで、安定した抗体作製を可能にする系の確立を試みた。実際、ERα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、解析途中であるにも関わらず、既にTomlinson Iライブラリーから得られた抗体数を上回る抗体が得られている。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、本プロジェクトにとって非常に有効である。

これまでの検討により、「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。これにより、バイオパンニング法の最適化に成就し、今後、ヒト核内受容体の全種について一挙に抗体作製を行うのみである。この操作は、同時並行に行うことができ、またルーチンな仕事となるため、短期間に結果が得られる。現在、残りのステロイドホルモン受容体（ERβ、AR、PR）についてバイオパンニングを行っている最中であり、同時並行解析が可能であることを確認でき次第、一挙に残りの受容体について抗体作製を拡張する予定である。

モノクローナル抗体の使用は、ポリクローナル抗体でセンシング抗体アッセイ法が確立し、そのアッセイの効果が確定した後に、どのように特異的な抗体が必要とされるのかによってスクリーニング・探索される抗体の種類が異なってくる。したがって、抗体作製においてはこうした点を充分に考慮して進める必要がある。しかしながら、実際には抗体の特異性は作製されたものを解析して初めて分かるものであるので、この拡張戦略は方法としては妥当なものと判断される。

バイオパンニングによって得られたファージ抗体クローンは、最終的には「ファージ抗体」ではなく、ファージに結合していない「単鎖型抗体」で化合物評価試験に使用することが理想である。これは、提示された単鎖型抗体と比較してファージそのものが大きいために物理的な障害となり、ファージ抗体では詳密な解析ができない可能性があるからである。そこで、得られたファージ抗体クローンから単鎖型抗体を発現する操作が必要であり、一般的には、バイオパンニングの際に使用している大腸菌 TG-1（サプレッサー株）から単鎖型抗体発現用の大腸菌HB2151（ノンサプレッサー株）に菌株を変えることによって行う。しかしながら、この手法による単鎖型抗体の発現は非効率的であり、多くのクローンが機能性の単鎖型抗体を発現できないことが知られており、今回の実験においても機能性の単鎖型抗体は得られなかった。そこで、センシング抗体の作製においては、菌株の変更ではなく、PCR を利用した変異導入法で単鎖型抗体を TG-1 株のまま発現させる。この手法は、機能性の単鎖型抗体の発現効率を劇的に改善させるだけでなく、全クローンを一度に処理できることが報告されており、我々の予備的な実験においても良好な結果を示している。

本年度までに、化学物質の影響評価には至っていないが、抗原ペプチドの合成は終え、さらに、その後のバイオパンニングから単鎖型抗体の発現までの一連の操作の最適化に成功しており、シームレスな（つなぎ目のない）抗体作製系の確立に成就した。なお、単鎖型抗体を利用した試験については、ポリクローナル抗体やマウス由来のモノクローナル抗体を用いた試験と同様の実験手法で行うことができる。

バイオパンニングは、系が確立されていれば3週間程度で終えることができ、さらに、複数の受容体について同時に実施することが可能である。そのため、その後のDNAシークエンス解析や単鎖型抗体の発現の期間を加味しても次年度の上半期に相当数の抗体取得を見積もることができる。したがって、本プロジェクトが完了する次年度末まではセンシング抗体法によるアッセイを全核内受容体において詳細に実施されることが十分に期待される。

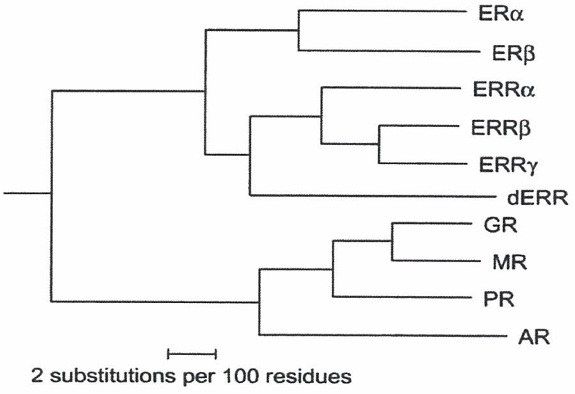

図6. ステロイドホルモン受容体の系統樹
dERR＝ショウジョウバエのERR

また、ステロイドホルモン受容体群は、進化的にきわめて近縁の受容体群であり、一次構造（アミノ酸配列）から三次構造（立体構造）まで高く保存されている（図 6)。その一方で、「リガンドの結合によって活性化される受容体」と「リガンドが結合しなくとも自発的に活性化状態を維持し、リガンド結合によって不活性化する受容体」の２種類が存在する。そのため、化学物質応答についても、「アゴニスト応答」「アンタゴニスト応答」「インバースアゴニスト応答」「インバースアンタゴニスト応答」を検討する必要があり、多くの化学物質について詳細に解析することは従来法（レポーター遺伝子法など）においては困難である。しかしながら、化学物質の結合性と活性の両方について同時に解析を行うセンシング抗体法では、これを網羅的に解析することが可能である。したがって、ステロイドホルモン受容体９種については、特に詳密な解析を行う予定であり、優れたセンシング能を持つモノクローナル抗体の作製はきわめて重要であり、ファージディスプレイ法によるオーダーメイドな抗体作製法は非常に有効である。

E. 結論

昨年度までに、ヒト GR のリガンド依存的なコンホメーション変化をセンシングする抗体の作製に成功しており、ファージディスプレイ法によって必要とするセンシング抗体をモノクローナル抗体として獲得できることが証明されている。本年度は、バイオパンニング法を 48 種のヒト核内受容体に展開可能な手法として確立することで、迅速かつ高確率に抗体作製を行うための技術的基盤を完成させた。また、単鎖型抗体への変換についても予備的な実験を終え、必要な試薬（精製のためのアフィニティビーズや単鎖型抗体での ELISA に使用する二次抗体など）の検討も終了している。さらに、最も時間を要する抗原ペプチドの合成をほぼすべて終了したことは大きな成果である。最終年度では、網羅的なセンシング抗体作製および本プロジェクトの第一義的な目的であるヒト核内受容体 48 種での化学物質影響評価を行う。

F. 健康危険情報

該当する情報はない。

G. 研究発表

学会発表

１. 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撹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。

2. 金森史花、岡田浩幸、徳永隆俊、松島綾美、下東康幸、核内受容体コンホメーション変化センシングアッセイにおけるファージディスプレイ法の導入、第６回泉屋コロキウム、2006.8.21-22。

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

モノクローナル抗体の設計作製および試験、特にERRγ認識抗体について

分担研究者　下東美樹　福岡大学理学部講師
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

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。こうしたなか、主任研究者らは環境ホルモン、ビスフェノール A がエストロゲン関連受容体（ERRγ）と強く結合することを発見し、48種の核内受容体を調査する必要性を強調した。一方、主任研究者らは受容体コンホメーション変化を感知・センシングする抗体を用いた効率的な試験系を開発し、様々な受容体についてセンシング抗体アッセイ法の確立に成功している。さらに、モノクローナル抗体を利用した試験系は、高い特異性をもつ抗体を得て、センシングの感度を高くしてより高精度なアッセイ系に進化させるために必須である。特に、細胞融合法によるアッセイ系はファージ抗体では得られないコンホメーション特異的な抗体が得られる可能性が高く、重要である。現在までに、女性ホルモン・エストロゲン受容体（ER）に対してほぼ完全に確立している。前年度までに男性ホルモン・アンドロゲン受容体（AR）、副腎皮質ホルモン・グルココルチコイド受容体（GR）、甲状腺ホルモン受容体（TR）について特異性の高い抗体産生細胞群を選別し、今年度はそれぞれの細胞群のモノクローン化に取り組み、成功した。今年度は特に、エストロゲン関連受容体γ型・ERRγのセンシング抗体アッセイ法の高効率化のため、ERRγのモノクローナル抗体の調製に鋭意取り組んだ。その結果、リガンドの有無により抗体応答に差が見られるモノクローナル抗体の調製に成功した。これらのモノクローナル抗体を用いた試験系を検討した。

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。現在までに検討されてきた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ったが、我々の核内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の確立によって、これらの同時評価が可能となった。

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が、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、すべての核内受容体について内分泌かく乱作用性を評価する必要がでてきた。これは、程度の差はあれ、化学物質の暴露が 48 種の核内受容体すべてにあることを考えると、当然な帰結である。こうしたなか、核内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、どの核内受容体にも適用可能な方法論であり、その重要性が非常に大きくなってきた。

さらに、主任研究者らは内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）であるビスフェノールA（BPA）が、ステロイドホルモン受容体である核内受容体第 3 グループに属するエストロゲン関連受容体（ERRγ）と非常に強く結合することを発見し、ますます 48 種の核内受容体に展開可能な効率的な試験法の重要性が増した。この ERRγについては現在、ポリクローナル抗体が作製され、アッセイ系の確立までに成就している。しかし、ERRγの重要性のため、今、さらに高感度なモノクローナル抗体が求められている。

核内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」である。核内受容体に天然のホルモンと同じ程度に結合する環境化学物質ビスフェノールA（BPA）が発見された現在、すべての核内受容体に対するスクリーニングが必須である。ERRγと同様に化学物質が結合する核内受容体の出現の可能性がある。また、各核内受容体に対しては多くの化学物質のスクリーニングが必須である。BPA と同様にある核内受容体に強く結合する化学物質出現の可能性がある。

センシング抗体アッセイ法を用いて、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た。また当初は、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あると認識されていた。

しかしながら、ERRγの出現により、核内受容体についてさらに詳しい分子メカニズムが明らかとなり、アッセイ法も改良・工夫が必要な状況となった。ERRγは、リガンドなしでもほとんどフル活性な状態にある。これは ERRγが初めから生理的に活性なコンホメーションにある、いわゆる「自発活性化型核内受容体」(self-activated nuclear receptors, SA-NR) であることに起因する。リガンドが結合して、リガンド結合ドメイン（LBD）の第 12 ヘリックスがフタをするようにコンホメーション変化するのと異なり、SA-NR では始めからフタをした構造になっている。

SA-NR では、第 12 ヘリックスがフタをした状態から、フタがズレる、あるいはフタが開くようにコンホメーション変化する。これをセンシングする抗体が必要である。一方、アッセイ法を確実にするためには、コンホメーション変化を確実に起こす化合物を基準にして、この変化を元に戻す変化をセンシングする抗体が必要である。

本研究では、ER の他に、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性ホルモン受容体であるアンドロゲン受容体（AR）、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 について、高感度なモノクローナル抗体を作製する。さらに、BPA が強く結合する SA-NR である ERRγについて、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作製すべく、モノクローナル抗体の作製を実施することとした。

A. 研究方法

モノクローナル抗体の作製法

(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) キャリアタンパク質との結合

合成ペプチドをキャリアタンパク質に結合するにあたり、ペプチドN末端のシステイン残基チオール基を介して架橋剤MBSによりKeyhole Limpet Hemocyanin（KLH）と結合させた。結合体は、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、超音波破砕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 μl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℃・5% CO_2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培地中で破砕・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アタンパク質を96ウェル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 H_2O_2 を基質として2-2'-azinodi- [3-ethylbenz-thiagoline sulfonate（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ア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する。

B. 研究結果

GRに対して細胞融合操作を行い、388 well中42 wellに細胞増殖が見られ、その中でH12ペプチドに特異性の高い抗体産生細胞群3種を見出した。同様にARでは2種、TRでは1種見出した。今年度はまず、これらのクローンが受容体の構造変化を識別するのかどうか、二次スクリーニングを行った。受容

体存在下で、ホルモンおよび化学物質による抗体応答変化を調べた結果、GR において 3 種中 1 種見出すことができた。このクローンについて限界希釈法によりモノクローン化を行った。96 well 中 3 well において細胞増殖が見られたが、抗原ペプチドを認識するクローンは存在しなかった。また、AR や TR では受容体存在下で、ホルモンおよび化学物質による抗体応答変化の見られるクローンは見出せなかった。

再度細胞融合操作、一次スクリーニングを行った結果、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 種得ることができた。手順を変え、この段階で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 1)、AR では 4 種（図 2)、TR では 20 種（図 3）のモノクローンを得ている。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。

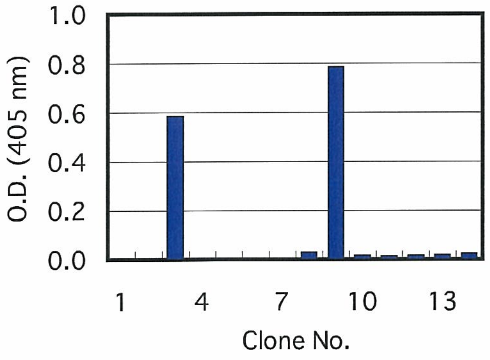

図 1.　GR モノクローン化
各モノクローナル抗体の抗原ペプチドに対する力価を調べた。

一方、核内受容体であるエストロゲン関連受容体（ERRγ）は、リガンド非結合でも活性型構造を保ち、構成的活性を示す受容体である。内在性リガンドについては未解明であり、インバースアゴニストである 4-ヒドロキシタモキシフェン（4-OHT）で不活性化されることが知られている。また、最近ビスフェノール A が ERRγに結合することが明らかとなり、内分泌かく乱作用における ERRγの影響

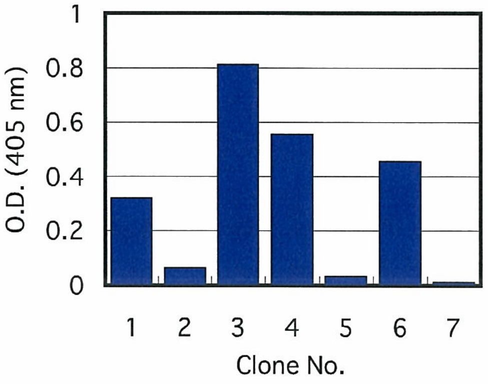

図 2.　AR モノクローン化
各モノクローナル抗体の抗原ペプチドに対する力価を調べた。

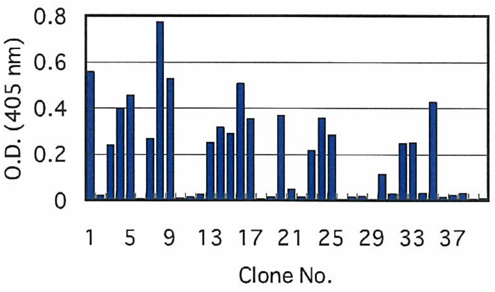

図 3.　TR モノクローン化
各モノクローナル抗体の抗原ペプチドに対する力価を調べた。

が注目されている。

そこで今回、ERRγについてもモノクローナル抗体作製に取りかかった。通常、リガンドの結合により受容体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）部位を抗原としているが、以前の研究から H12 部位の C 端側が重要であることが分っている。今回は H12 周辺部位から ERRγ の C 末端までの部位を抗原部位として選定した（図 4)。キャリアタンパク質と結合後、Balb/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ーマ細胞 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。抗原ペプチドを認識した 45 well の内、4 well の抗体産生細胞群に

図 4.　ERRγ抗原配列
ERαの抗原配列を基にERRγに対する抗原部位を設定した。

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 5）。それぞれのクローンについ

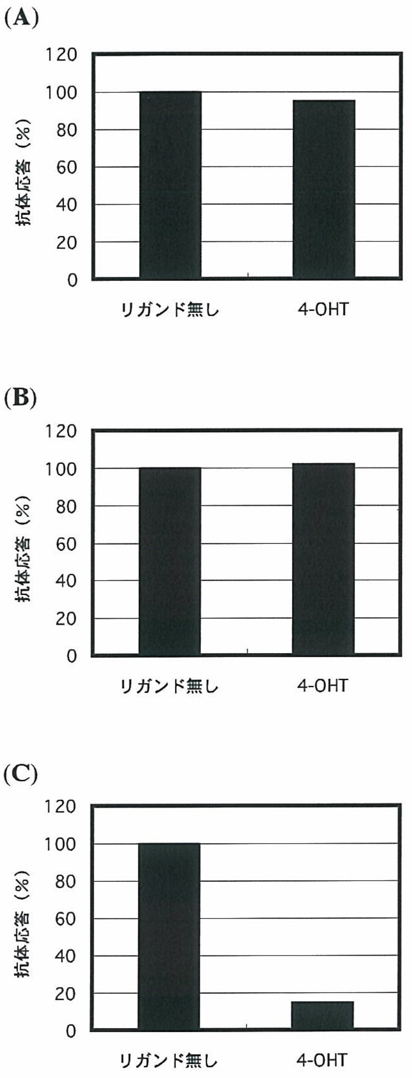

図 5.　ERRγモノクローナル抗体の二次スクリーニング
(A) mab-ERRγ-#1、(B) mab-ERRγ-#2、(C) mab-ERRγ-#3、それぞれについて10 μM 4-OHTを反応させた場合の抗体応答変化を調べた。

て二次スクリーニングを行った結果、4-OHT 結合型 ERRγと 4-OHT 非結合型 ERRγで抗体応答に差が見られるクローンが1種得られた（図 5C）。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。

C. 考察

一次スクリーニングから得られた各抗体産生細胞群について二次スクリーニングを行ったが、モノクローンが得られなかった。明確な理由は不明であるが、細胞融合法では頻々と起こることである。そこで、可能な理由を詳細に考察することにした。

二次スクリーニングは受容体の構造変化を抗体応答で調べるため、抗体濃度やELISAにおけるペプチドの coating 量の影響を考慮し、様々な条件検討を行う。このため、大量の培養上清が必要となる。未だモノクローン化を行っていない段階では、ペプチド認識抗体産生細胞とペプチド非認識抗体産生細胞が混合されている。これを長時間培養する場合には、例えば、ペプチド非認識抗体産生クローンのみが増殖し、目的とする抗体産生細胞が育たない可能性が考えられる。この場合、早い段階で認識抗体が検出されても、この経過のなかで、ほとんど埋没量でしか存在しないようになり、結局はモノクローンが得られない結果となるのでは？　と考えられる。

以上の考察より、スクリーニングの早い段階でいち早くモノクローン化させることにした。したがって、実験の順番を変化させ、一次スクリーニング後、直ぐ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。その結果、今まで上手く行ってい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。

さらに、この方法で新しく調製した ERRγモノクローナル抗体はリガンドの有無により抗体応答に差のあるクローンとして得られた。現在、これらを用いてセンシングアッセイの条件検討を進めている。

D. 結論

AR、GR、TR に対するモノクローナル抗体作製に着手し、方法の改善の結果、これら 3 種の核内受容体全てにおいて、最終的に H12 ペプチドに特異性の高い抗体モノクローンを得ることが出来た。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。また、ERRγについてはリガンド有無により抗体応答に差のあるクローンが得られた。今後は、さらにモノクローン化を行い、様々な構造変化を識別するモノクローナル抗体を得ると共に試験法を確立し、様々な化学物質を評価する予定である。

一方、細胞融合法を用いたモノクローナル抗体の作製は時間と労力を必要とするが、ファージディスプレイ法ではファージ抗体ライブラリーから抗原を違えるだけで多様なモノクローナル抗体が得られる。48 種全ての核内受容体におけるモノクローナル抗体作製にあたり、ファージディスプレイ法の優位性が明確となってきた。そのため、今後は核内受容体について、① アッセイの精度を必要とする場合、② コンホメーション自体を認識する必要のある場合、③ ファージディスプレイ法で抗体が調製しがたい場合に細胞融合法によりモノクローナル抗体作製を進めることとしたい。ERRγについては①に該当し、その重要性から鋭意に取組む必要がある。

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

論文発表

1. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor (ERR) with high constitutive activity. S. Takayanagi, T. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Toxicology Letters*, **176**, 95-105 (2006).

2. 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 (ERRγ). T. Tokunaga, X. Liu, H. Okada, A. Mastushima, T. Nose, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2006*, 176 (2006).

学会発表

1. 徳永隆俊、劉　暁輝、岡田浩幸、松島綾美、野瀬　健、下東康幸、核内受容体の不活性化におけるαヘリックスペプチドの構造変化：エストロゲン関連受容体γ型（ERRγ）C 末端αヘリックスに特異的なポリクローナル抗体法、第 43 回ペプチド討論会、2006. 11. 5-8。

2. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉　暁輝、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（ERRγ）への高親和性結合：ビスフェノール A の必須構造要因、日本内分泌撹乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

3. 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、Ian 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、日本内分泌撹乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

4. 下東康幸、徳永隆俊、劉　曉輝、岡田浩幸、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(ERRγ)である、日本内分泌撹乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

5. 徳永隆俊、劉　暁輝、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（ERRγ）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、日本内分泌撹乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

6. 劉　暁輝、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（ERRγ）の部位特異的アミノ酸変異による内分泌撹乱化学物質ビスフェノール A の受容体結合部位の同定、日本内分泌撹乱化学物質学会第 9 回研究発表会、2006. 11. 11-12。

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

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

前年度までの研究から内分泌かく乱物質と考えられているビスフェノールＡ（BPA）がエストロゲン関連受容体γ型（estrogen-related receptor γ; ERRγ）に強く結合することが、世界で初めて発見された。これまで、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た。しかしながら、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。一方で 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なされている。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。したがって、BPA が ERRγと結合することによって ER をも含めた系で内分泌かく乱作用を示す可能性も考えられ、今、ERRγの機能解析や効率的な試験系の確立が早急に求められている。本研究では、詳細な結合試験により BPA が ERRγに結合することを直接に証明し、さらに、BPA が ERRγ以外の他のステロイドホルモン受容体と結合する可能性について調べた。その結果、放射標識された［^{3}H]BPA が ERRγに結合すること、また、BPA は ERαや ERβに弱く結合するものの、アンドロゲン受容体（AR）や糖質コルチコイド受容体（GR）、プロゲステロン受容体（PR）等は全く結合せず、ERRγに特異的に強く結合することが明らかとなった。そこで、ERRγのコンホメーション変化センシングアッセイ系の構築を試みた。BPA が結合した ERRγは自発活性化型構造にあるため、予想通り ERRγ自身では抗体応答がなかった。一方、4-OHT を共存させると、4-OHT 濃度依存的な抗体応答が見られた。そこで、BPA を 4-OHT 共存下で反応させたところ、BPA 濃度依存的に 4-OHT による抗体応答が減少した。今回こうして、ERRγに対して結合する化合物を 4-OHT の存在、非存在下で間接的、あるいは直接的にその受容体応答を評価できる新規なアッセイ法を開発することに成功した。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質、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、内分泌かく乱作用が懸念されている。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、活性はエストロゲンに比べると1/1000～1/10,000と非常に弱い。一方、最近になって、BPAが規制値（2.5～3.0 ppm）よりはるかに濃度が低い「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。このような低用量作用が実際にERを介しているのか？「低用量問題」として議論になっている。こうしたなか、我々は「BPAは、ERではなくて、エストロゲン関連受容体γ型（estrogen-related receptor γ; ERRγ）に強く結合する」ことを発見した。

BPAは、1891年にロシアのDianinによって初めてフェノール誘導体として合成され、1905年にドイツのZinkeによる合成法の改良で、アセトンとフェノールから簡単に合成できるようになった化学物質である。また、BPAは高分子ポリカーボネートプラスチックと