

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19年度
総括・分担研究報告書

平成20（2008）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-----	41
2. フェ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・岡田浩幸-----	47
3. モノクローナル抗体の設計作製および試験 下東美樹・徳永隆俊-----	55
4. 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 徳永隆俊-----	61
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-----	67
6. エストロゲン関連受容体 γ に対するビスフェノールA誘導体 の結合特性の解析 下東康幸・岡田浩幸-----	73
7. エストロゲン関連受容体 γ のビスフェノールA結合体のX線 結晶構造解析 松島綾美-----	83
8. エストロゲン関連受容体 γ の変異受容体による化学物質結合 部位解析 下東康幸・劉 暁輝-----	89
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	97
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	99

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18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、36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み込んだ。本年度までに全48種のヒト核内受容体のうち46種のセンシング抗体の作製・精製を完了し、27種についてセンシング抗体アッセイ法を確立した。そして、内分泌攪乱作用が危惧されている化学物質6種を含む化合物群について試験したが、エストロゲン関連受容体 γ 型（ERR γ ）に対するビスフェノールA以外には強活性を示す組合せは見出されなかった。ビスフェノールAは『低用量効果』問題の渦中にあり、現在、胎児・乳幼児に対するポリカーボネート製品からの暴露が大きく懸念されている。本研究課題において、このビスフェノールAが自発活性化型ヒト核内受容体・ERR γ に非常に強く結合することを世界で初めて発見した。さらに、その結合の分子メカニズムの詳細を明らかとすることに成功した。これらは、48種すべての核内受容体をターゲットとする研究、試験の重要性を示す重要な発見であり、現在国内外のERR γ を起点とする新たな研究展開の端緒となった。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・准教授）

松島綾美 （九州大学大学院理学研究院
化学部門・助教）

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）

金木敦史 （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。

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かく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。

センシング抗体法は、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である。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。

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抗活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括的なリスク評価法として非常に優れた方法である。

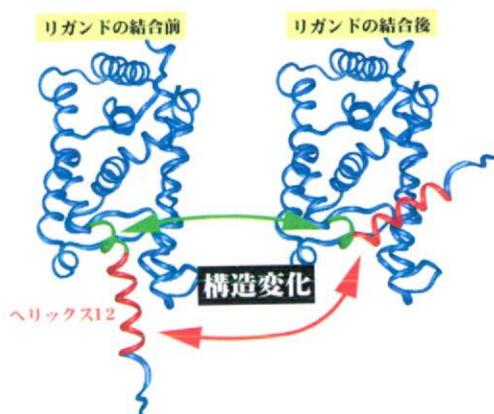


図 1. 核内受容体のリガンド結合前（アポ型）および結合後（ホロ型）の構造
リガンドがアゴニストとアンタゴニストでは、ホロ型コンホメーションのヘリックス 12 の位置取りが異なる。

ヒト核内受容体においては、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自発活性化型核内受容体が 48 種類のうち 10 数種類も存在する（図 3）。これら自発活性化型受容体はリガンド無しに 100%フルに活性化されており、レポーター遺伝子アッセイ法および酵母 Two-hybrid アッセイ法では非常に高い基盤活性を示す。このような状態をさらに高活性にする機構は無く、これらのアッセイで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。昨年度には、「自発活性化型核内受容体に対して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し、エストロゲン関連受容体 γ 型（ERR γ ）に対するビスフェノール A のインバースアンタゴニスト活性の測定に成功した。

本研究課題では、高感度のポリクローナル抗体、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モノクローナル抗体を取得し、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 β 、ERR α 、ERR β 、ERR γ ）、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。本年度は受容体

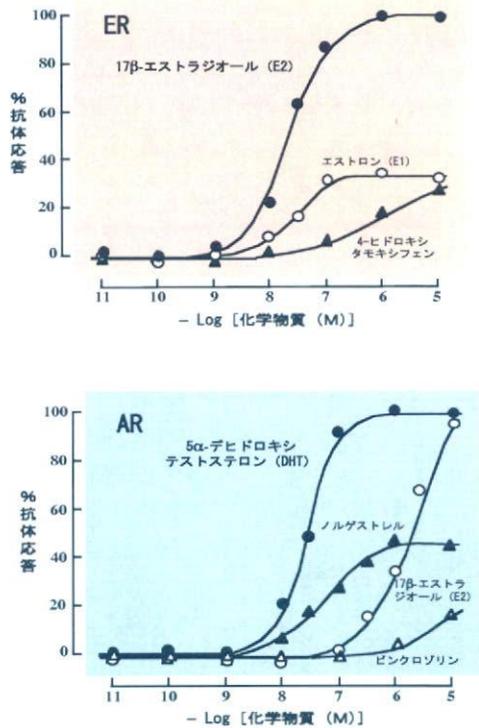


図2. 核内受容体コンホメーション変化センシング抗体法によるエストロゲン受容体 (ER) およびアンドロゲン受容体 (AR) での抗体応答活性

タンパク質が現時点で入手可能な 27 種についてセンシング抗体アッセイ法を確立することとした。また、これらの約半数については、10 数種類の基準セット化学物質群について試験を実施した。

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 γ 型・ERR γ 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成功した。そして、自発活性化型核内受容体である ERR γ に対してセンシング抗体アッセイ法を確立することに成就した。本年度は、この方法を用いてインバーサゴニストおよびインバーサアンタゴニストを区別して、25 化学物質について試験することにした。

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

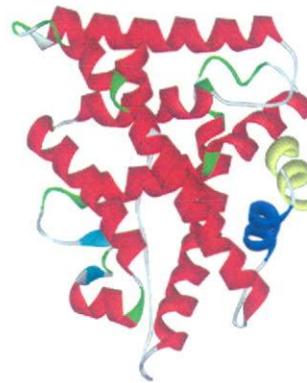


図3. 自発活性化型核内受容体 ERR γ の生理活性コンホメーション
ヘリックス 12 が当初よりフタをした構造。

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*-マレイミドベンズイル-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/ μ l) に、MBS の DMF 溶液 (3.6 mg/12 μ l) を 9.3 μ 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 μ 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 μ 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 μ l) および 0.2 M Na₂HPO₄ (115 μ 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 μ l) を天然リガンド (10^{-6} ~ 10^{-10} M もしくは 0 M; 10 μ 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 μ l) を加えて 4°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 μ g/ μ l, 50 μ 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 μ l/well とした。

(7) センシングアッセイ

核内受容体 (40 nM, 90 μ l) に対して化学物質 (10^{-11} ~ 10^{-5} M, 10 μ 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 μ g/ μ l, 50 μ 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 μ l/well) を加えて 4°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 μ 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 μ 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

EC₅₀ 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_{max}(%) として、これをグラフより算出した。さらに、得られたシグモイド様曲線を解析プログラム ALLFIT で数理解析し、R_{max}(%) 値の 50% に対応する化学物質濃度を抗体応答有効濃度 (EC₅₀) として、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 R_{max}(%) 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、EC₅₀ 値は化学物質と受容体との結合の強さの指標となる。

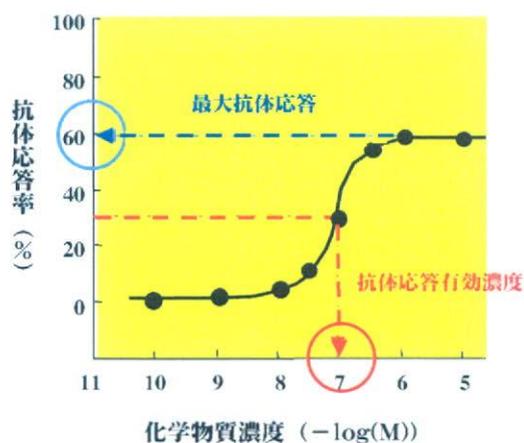


図 4. 受容体コンホメーション変化センシングアッセイの解析

(9) コンホメーション変化センシング抗体によるリガンド活性化型核内受容体のアッセイ法の確立

(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方法として確立された。これをさらに、一般法として確立するために、一連の核内受容体について、まず標準化合物を用いてアッセイした。

(7)に記載の方法により、PPAR α をはじめとする 25 種類 (上記の ER と AR を除く) の核内受容体についてアッセイを実施した。用いた核内受容体の濃度は 40 nM であり、化学物質 (10⁻¹¹~10⁻⁵ M) を室温で 1 時間反応させてリガンド-受容体複合体を調製した。反応スケールは、受容体溶液 90 μ l に対して化学物質溶液 10 μ l として、抗原ペプチドをコートしたイムノプレートで反応させた。以下のアッセイについては(7)に準じた。また、解析については(8)に準じて実施した。

(10) リガンド活性化型核内受容体のセンシング抗体法による化学物質のアッセイ

(9)で取り上げたセンシング抗体法が確立した核内受容体について、一連の化学物質を試験した。内分泌かく乱物質候補の化学物質として、ビスフェノール A、ノニルフェノール、*tert*-オクチルフェノール、トリブチルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシルの 6 種類、天然ホルモンとしてエストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、そして、4-OHT を取り上げた。さらに、各受容体の特異的リガンドをアッセイした。

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

昨年度までに、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) についてセンシング抗体アッセイ法を構築した。本年度はアッセイ法このアッセイ法を用いて各種化学物質の試験に取組んだ。すなわち、直接的な抗体応答を観察することにより、4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) のようなインバーサゴニスト活性を測定した。一方、10 μ M 4-OHT に対する阻害活性によりインバーサアンタゴニスト活性を測定した。

【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出されている α 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、 17β -エストラジオール(E_2)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、分担報告書に記載した。

【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

標的の核内受容体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。本年度、RAR α 、RAR β 、PPAR γ 、FXR、VDR、ER α について実施した。

(2) ファージ抗体ライブラリー

ファージ抗体ライブラリーには、英国医学会(MRC)より入手したTomlinson IおよびTomlinson Jライブラリーを使用した。このライブラリーに含まれるファージは、「単鎖型抗体(scFv)遺伝子」と「G3Pコートタンパク質遺伝子」と「G3Pコートタンパク質遺伝子」とが融合されたプラスミド(ファージミド)をもつため、対応する単鎖型抗体scFvがファージ表面に提示される(図5)。

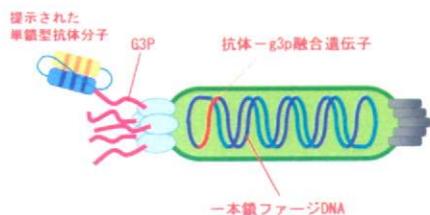


図5. ファージ抗体の構造

今回使用する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、重複のない独立したライブラリーである。これらは、ファージミドを大腸菌 (TG1 株) にトランスフェクションした状態で MRC から分与されている。したがって、これを大量培養後に「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変換した。

(3) バイオパンニング

抗原ペプチド (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 \times TY 培地 (含 1% グルコース) に植菌して対数増殖期にまで 37 $^{\circ}\text{C}$ で震盪培養した。遠心により培地を除いた後、10 ml の 2 \times TY で再度菌体を懸濁させ、 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 \times TY 培地 (含 0.1% グルコース) で菌体を懸濁させ、30 $^{\circ}\text{C}$ で終夜培養した。パッケージングされたファージ粒子は培養上清に含まれるため、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

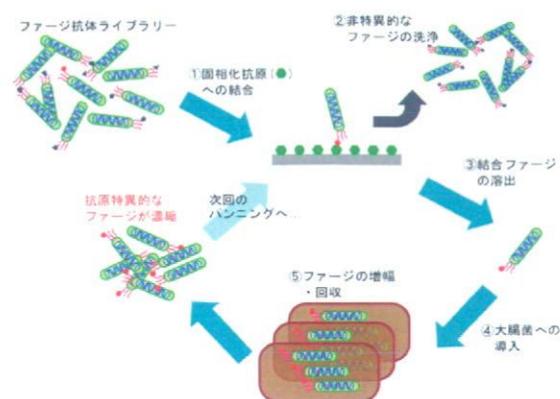


図6. バイオパンニング

に固定化抗原の濃度を 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とし、3回目には 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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。

(4) scFv でのスクリーニング

回収したファージは、過剰量の scFv 発現用の宿主菌 HB2151 (非サプレッサー株) 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。

得られたファージクローンの中から、ペプチドを特異的に認識する scFv を発現可能なクローンを同定するため、抗原ペプチド 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を固定化抗原とした scFv-ELISA を行った。まず、各 100 μl の 2 \times TY 培地 (含 1% グルコース) にモノクローナル化したシングルコロニーを植菌し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 rpm で終夜培養した。培養液 2 μl を各 100 μl の 2 \times TY 培地 (グルコースなし) に植菌し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、300 rpm で2時間培養後、50 μl の 2 \times TY 培地 (含 0.3 mM IPTG) を添加した。30 $^{\circ}\text{C}$ 、300 rpm で24時間培養後、遠心により菌体を除いた上清を一次抗体として使用した。一次抗体を添加して1時間後、二次抗体 (Anti-c-myc-peroxidase) を添加した。さらに1時間後、ABTS/ H_2O_2 によって発色させ、405 nm の吸光度測定により検出を行った。

(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、内因性アゴニストや外因性アゴニスト、あるいはアンタゴニスト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 μ 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

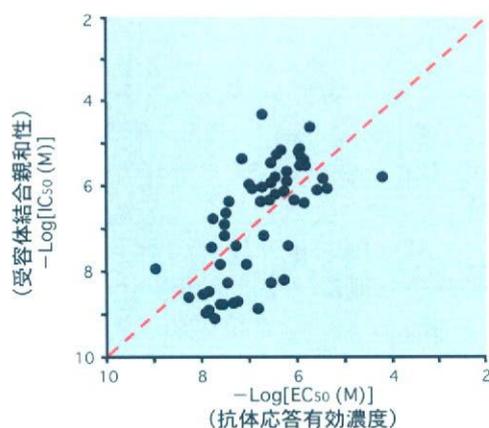


図7. 抗体応答有効濃度と受容体結合能

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 活性は弱いとそ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・ 17β -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。

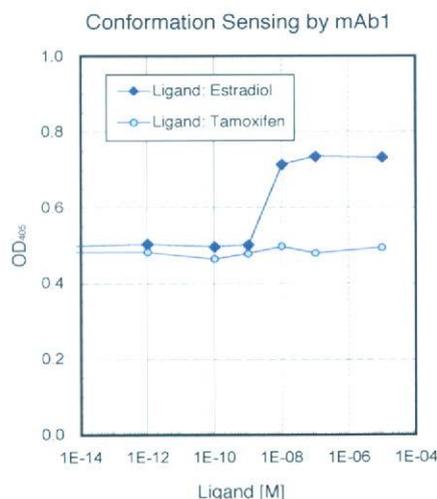


図8. 17β -エストラジオール(E2)特異的センシングモノクローナル抗体mAb1

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

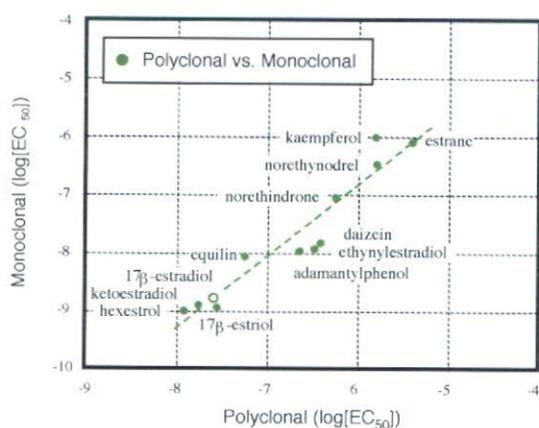


図9. ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いた時のセンシング抗体法における抗体応答有効濃度の相関性

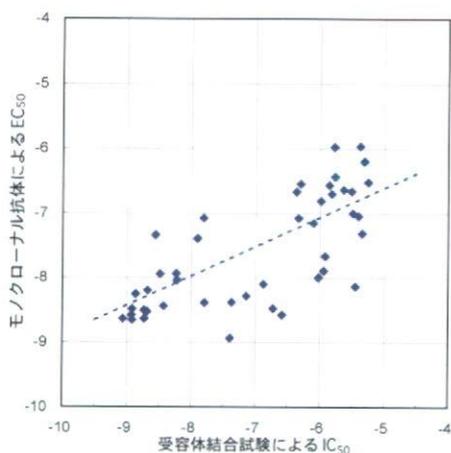


図10. 抗体応答有効濃度と受容体結合能との間の正の相関性

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。

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など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 5α -デヒドロキシテストステロン (DHT) を標準化学物質とし、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 (3頁) に示した。

AR に対するセンシング抗体法により、これまでに一連の化学物質約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せず、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ためか、LBD のみでは解析が不良である。

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 α -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、後に説明するが、本年度・平成19年までに、48種類の核内受容体のうち46種類について抗原ペプチドを認識する抗体の作製に成就した。

(2) 平成 17 および 18 年度の研究成果

平成 17 および 18 の過年度の研究成果については総合報告書に詳細に記述することにし、ここでは 2 年間の成果の要点を簡潔に説明する。

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 LBD の α ヘリックス 12 (H12) 部分を主なエピトープとする。48 種類の核内受容体についてアミノ酸配列アラインメント、ホモロジーモデリング、H12 の同定、そして、エピトープ解析から抗原ペプチドの設計、化学合成を実施した。

平成 16 年度までに ER α 、AR、PR、GR の 4 種の核内受容体についてセンシング抗体を作製し、センシングアッセイを確立することができた (図 11)。平成 17 年度には 11 種、平成 18 年度には 12 種、合計 23 種類の核内受容体について抗原ペプチドを合成して抗体を作製した。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。抗体については、得られた抗血清を免疫沈降、アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

こうして得られた抗体については抗原ペプチドを用いて力価を測定した。十分な力価が得られたものについては、センシング抗体アッセイ法の確立のため、それぞれに対応した核内受容体を用いた試験系の構築に取り組んだ。

センシング抗体法では、核内受容体の全長、あるいはリガンド結合部位 (LBD) のタンパク質が必要である。ER α や ERR γ については自前のタンパク質発現系を持っているが、他は購入しなくてはならない。現時点で 25 種類のものが購入可能であり、本研究ではまず、これらについて試験系を確立することにし、平成 18 年度までに 15 種類の核内受容体についての確立に成就した。

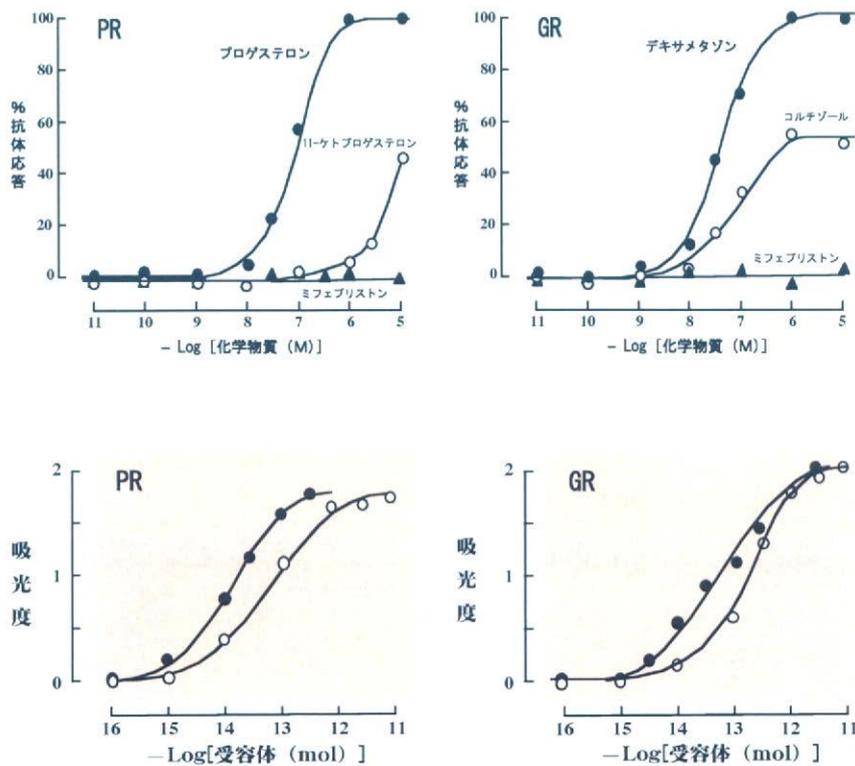


図 11. ポリクローナル抗体による核内受容体 2 種類のセンシング抗体法の解析結果
PR: プロゲステロン受容体、GR: グルココルチコイド受容体。
上段はセンシングアッセイ、下段はタイターチェック。

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

ファージディスプレイによる抗体法は、ファージに抗体タンパク質を産生させる手法で、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12)。

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、 6.7×10^5 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

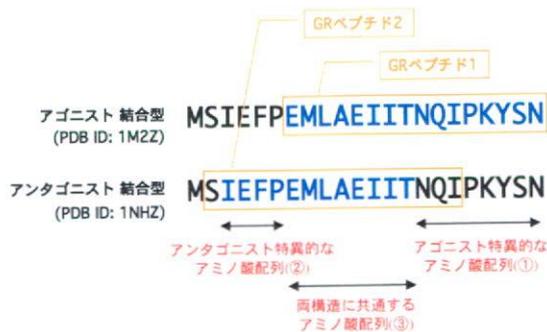


図12. GR 抗原ペプチドの配列
青で示す配列が H12 を形成。2つのペプチドにより③を認識する抗体を選別。

した。1次スクリーニングでは3/120クローンに特異的な結合が認められた。

2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ので、これらについて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 mg/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 (scFvA) を得ることに成功した。

scFvA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13)。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。

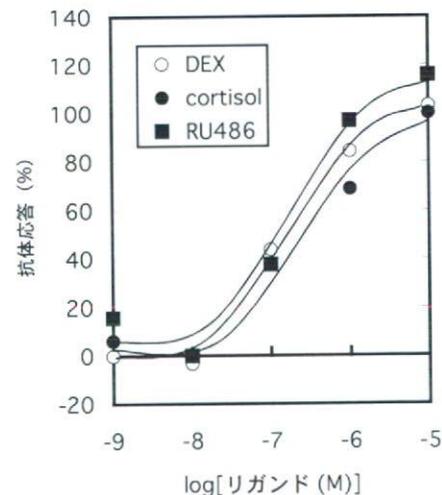


図13. scFvAによるコンホメーション変化センシングアッセイの結果

ステロイドホルモン受容体に対するセンシング抗体の作製

ヒト核内受容体48種のうち、GR、ER α 、ER β 、ERR α 、ERR β 、ERR γ 、AR、PR、MRの合計9種はグループ3に分類され、ステロイドホルモン受容体と呼ばれる。上述のGR以外の8種について抗原ペプチドを合成し、キャリアタンパク質 (KLH, BthG) に架橋した。

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、あるいはTomlinson Jライブラリーを使用した。例えば ER α については、Tomlinson Jライブラリーからのバイオパンニング3回の結果、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。これらのDNAシーケンス解析を実施し、異なる抗体を提示しているクローンについて、センシング抗体法によるアッセイを実施した。

しかしながら、ファージ抗体（ファージに scFv が結合した状態）ではセンシング能力がほとんどなく、scFv（単鎖可変抗体）に変換して行わなければならない。ER α のバイオパンニングによって選別されたファージ抗体から scFv の作製を試みたが、平成18年度までに scFv として機能するクローンは1つも得られなかった。これは他の核内受容体についても同様であった。

③ モノクローナルセンシング抗体の作製

ERについては先述のように、平成16年度までに細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製に成就し、センシング抗体法の確立に成功した。これに次いで平成17年度には、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試みた。抗原には、ポリクローナル抗体作製において高い抗原性を示した同じ合成ペプチドを用いた。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マを培養した。

平成18年度にはこれらから、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ン化に取り組み、成功した。これは、一次スクリーニングを実施した後、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。融合後

の段階では、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種が得られた。モノクローン化ののちは、GR では2種、AR では4種、TR では20種（図14）のクローンを得た。これら一つずつ、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の選別を実施した。

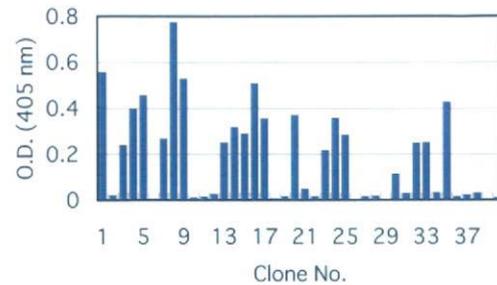


図14. TRモノクローン化抗体の力価

④ エストロゲン関連受容体 γ (ERR γ) 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、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) では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全く感応しないという異常な応答性を示した。平成17年度および18年度において、センシング抗体法の確立に取り組んだ。また、この過程で非常に強く結合する化学物質としてビスフェノールAの発見につながった *in vitro* の試験系についても、さらにさまざまに精査した。

① ポリクローナル抗体によるセンシングアッセイ

ERR γ に対するポリクローナル抗体を調製するために、図15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。

得られた抗体を用いて試験した結果、図15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。

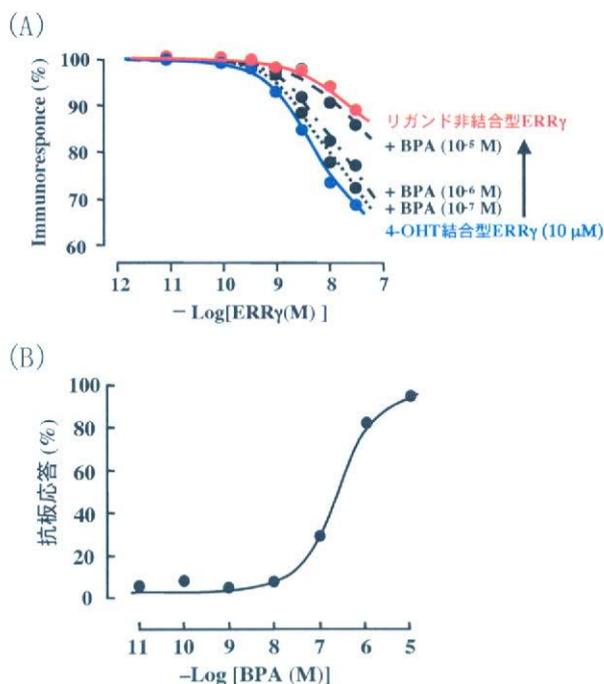


図 17. 4-OHT を基盤としたセンシング抗体アッセイ

4-OHTと共存させることによりBPA濃度依存性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

③ 飽和結合試験

ヒト腎臓の cDNA より ERR γ 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 γ と結合が報告されている 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) の ³H-標識体をトレーサーとして反応温度、時間、緩衝溶液の組成、B/F 分離の条件を詳細に検討した。その結果、³H-4-OHT の特異的結合を十分量与える要件の設定に成就した (図 19)。

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

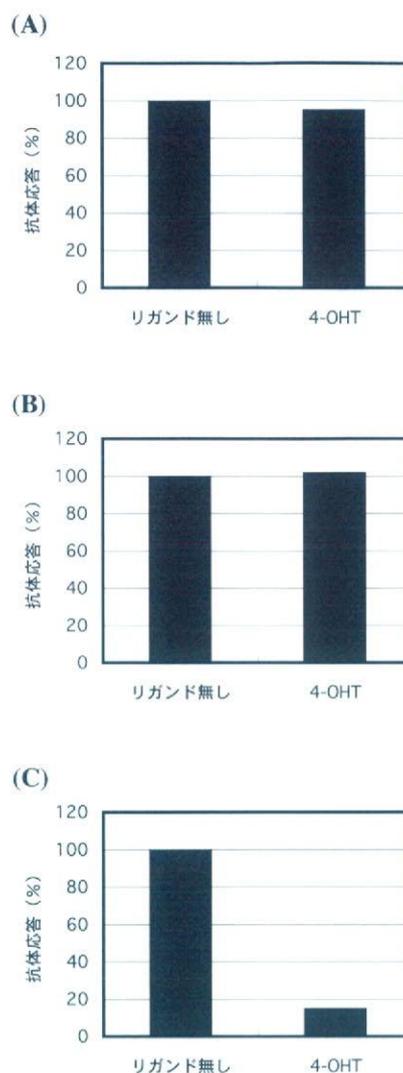


図 18. ERR γ モノクローナル抗体の二次スクリーニング

(A) mab-ERR γ -#1、(B) mab-ERR γ -#2、(C) mab-ERR γ -#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。

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などの原因が考えられた。

ビスフェノールA (BPA) が結合することが判明したため、平成 18 年度には、³H-BPA を用いた飽和結合試験を試みた。その結果、非常に容易に³H-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 20)。Scatchard プロット解析の結果、 K_d 値は 5.5 nM であり、非常に強く結合することが分かった。³H-4-OHT に比べ、³H-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判断された。

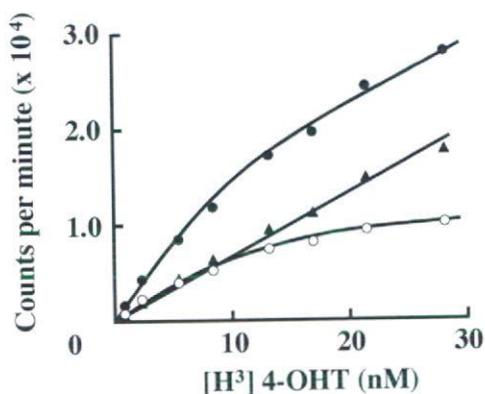


図 19. $ERR\gamma$ 飽和結合試験
 $ERR\gamma$ に対する $[^3H]4-OHT$ の全結合(●)と非特異的結合(▲)、特異的結合(○)を示す。

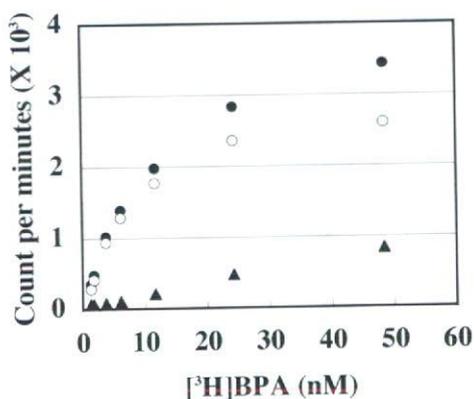


図 20. $ERR\gamma$ の飽和結合試験
 $ERR\gamma$ に対する $[^3H]BPA$ の全結合(●)と非特異的結合(▲)、特異的結合(○)を示す。

④ 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)。

平成 17 年度には、 $[^3H]4-OHT$ をトレーサーとして試験し、自身が非常に強く結合すること、また、diethylstilbestrol (DES) や tamoxifen (TAM) も強く結合することが分かった。

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

表 1. 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 α -estradiol	+
equilin	+
methylene blue	-
methyl orange	-
phenol phthalein	-
phenol red	-
gossypol	-
zearalanone	-
diadzein	-
genistein	-
biochanin A	-
5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	-
corticosterone	-
deoxycorticosterone	-
cortisol	-
cortisone	-
dexamethasone (DEX)	-
progesterone	-
testosterone	-
dihydrotestosterone (DHT)	-
ethynylestradiol	-
estriol (E3)	-
17 β -estradiol (E2)	-

(++) 強い活性、(+) 弱い活性、(-) 結合能無し

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、内分泌かく乱化学物質候補であるビスフェノール A (BPA) が $ERR\gamma$ に対して強い結合能を示した (13.1 nM)。平成 18 年度には、 $[^3H]BPA$ を用いて調べたところ、 IC_{50} 値 9.8 nM で実際非常に強く結合することが確認された。

⑤ 化学物質の $ERR\gamma$ 受容体活性

$ERR\gamma$ はリガンド無しに 100%フルに活性化されているので、レポーター遺伝子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 21 に示すように、4-OHT は基盤活性を抑制し、10 μ 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。

一方、BPA は $ERR\gamma$ 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

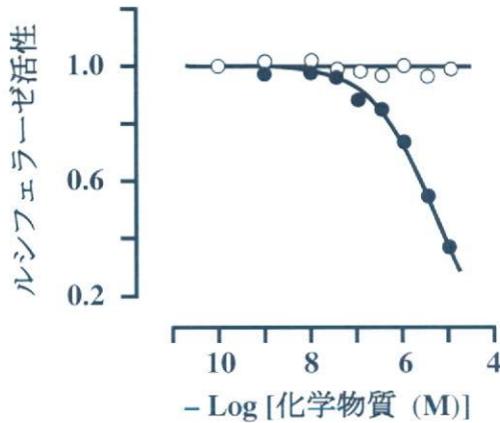


図 21. 4-OHT と BPA の ERR γ 転写活性
4-OHT (●) および BPA (○) のレポーター
遺伝子アッセイ

・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

⑥ 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 β のそれぞれについて、表 2 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 α 、ER β 、ERR γ に強く結合することが確認された。一方、BPA は ERR γ に最も強く結合し、ER α と ER β 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 17 β -エストラジオール (E2) は ER α と ER β に対して強く結合し、ERR γ には全く結合しなかった。

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

表 2. 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 (³ H-標識リガンド)	Receptor binding affinities shown by IC ₅₀ (nM)		
	E2	4-OHT	BPA
ERR γ (³ H]4-OHT)	NB ¹⁾	10.3 \pm 0.80	13.1 \pm 2.34
ER α (³ H]E2)	0.98 \pm 0.15	0.55 \pm 0.11	1.040 \pm 180
ER β (³ H]E2)	1.27 \pm 0.31	0.88 \pm 0.14	1,320 \pm 287
AR ²⁾ (³ H]DHT)	248 \pm 52	NB	NB
GR ²⁾ (³ H]cortisol)	465 \pm 125	1,130 \pm 24	ND ²⁾
PR ²⁾ (³ H]progesterone)	527 \pm 128	ND	NB

ND: 10⁻⁶ 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

類似しており、共通する分子機構が推定される。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。17 年度には、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。

dERR は、ヒトのエストロゲン関連受容体 ERR にも良く似ている。ERR γ に BPA が強く結合するが判明したが、この dERR にも BPA が結合することが判明した。このため、18 年度よりは受容体を介した BPA の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にした。これ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、BPA の影響について調べた。

18 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。

(3) 平成 19 年度の研究成果

平成 19 年度には、基本的には平成 17 および 18 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

平成 16 年度までに ER α 、AR、PR、GR の 4 種の核内受容体についてセンシング抗体法を確立した。そして、平成 17 年度には 11 種、平成 18 年度には 12 種、合計 27 種類の核内受容体についてセンシング抗体を調製・精製した。本年度は、48 種類のうち残りの 21 種類についてポリクローナル抗体を作製した。分子モデリング法、アミノ酸配列情報および立体構造情報から、LDB における第 12 ヘルックス相当部分を含む抗原ペプチドを設計し (図 22)、これらを化学合成した。抗原ペプチドはキャリアタンパク質 KLH に架橋し、ウサギに免疫した。このポリクローナル抗体作製は外注して行った。

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、十分に高い力価が得られたものは 21 種類中、19 種類の抗体である。しかしながら、残り 2 種 (SF-1 および GCNF1) については、抗原ペプチドの認識が十分でなく、ほとんど力価が得られなかった (図 23)。このため、別個体のウサギを用いて免疫を行った。しかしながら、これでもまた抗原ペプチドの認識が十分でなく、ほとんど力価が得られなかった。現在、抗原ペプチドを設計し直す、動物をモルモットなど他の種に代えるなどの対策を取っている。

② ポリクローナルセンシング抗体法による核内受容体応答の解析

平成 18 年度までにセンシング抗体法として確立に成功した 15 種類に加えて、合計 27 種類の試験法を確立した。この 27 種は現在市販されていて受容体タンパク質が入手可能な 25 種類に加えて、我々の研究室でタンパク質発現ができる核内受容体である。

NR3A1_ER α _	YSMKCKNVVPLYD <u>LLLEMLDA</u> HRLHAPTSRG 490
NR3A2_ER β _	LNMKCKNVV <u>PVYD</u> LLLEMLNAHVLRGCKSSSI 490
NR3B2_ERR β _	YSVKLGKVP <u>MHKL</u> FLEMLEAKAWARADSLQ 490
NR3B3_ERR γ _	YNIKLEGKVP <u>MHKL</u> FLEMLEAKV----- 482
NR3B1_ERR α _	YGVKLEGKVP <u>MHKL</u> FLEMLEAMMD----- 483
NR3C1_GR_	FQTFLD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 489
NR3C2_MR_	FYTFRESHALKVEFP <u>PAM</u> LVETIISDQLPKVES 490
NR3C3_PR_	LNTFIQSRALSVEFP <u>PEM</u> SEVIAAQLPKILA 490
NR3C4_AR_	FDLLIKSHMVSVD <u>PEM</u> MAEITISVQVPKILS 490
NR2A1_HNF4 α _	QFVKLFGMAKIDNLLQ <u>EM</u> LLGGSPSDAPHAH 490
NR2A2_HNF4 γ _	QFVKLFGMVKIDNLLQ <u>EM</u> LLGGASNDGSHLH 490
NR2B1_RXR α _	FFFKLI <u>GD</u> TPIDTFLMEMLEA----- 480
NR2B2_RXR β _	FFFKLI <u>GD</u> TPIDTFLMEMLEA----- 480
NR2B3_RXR γ _	FFFKLI <u>GD</u> TPIDTFLMEMLEA----- 480
NR2C1_TR2_	FFKGLIGNIRIDSVI <u>PHIL</u> KMPEADYNSQII 490
NR2C2_TR4_	FFTGLIGNVSDSIIPYIL <u>KM</u> TAEYNGQIT 490
NR2E1_TLX_	FFKKTIGNVPI <u>TR</u> LLSDMYKSSDI----- 483
NR2E3_PNR_	FFRKTIGNTP <u>MEK</u> LLCDMFKN----- 480
NR2F1_COUP <u>TF</u> 1_	FFVRLVGKTP <u>IE</u> TLIRDMLLSGSSFNWPYMS 490
NR2F2_COUP <u>TF</u> 11_	FFVRLVGKTP <u>IE</u> TLIRDMLLSGSSFNWPYMA 490
NR2F6_EAR2_	FFMRLVGKTP <u>IE</u> TLIRDMLLSGSTFNWPYGS 490
NR0B1_DAX1_	FFRP <u>IIG</u> TVSMDDM <u>LE</u> M <u>LCT</u> KI----- 482
NR0B2_SHP_	FFRP <u>IIG</u> VDIAGLLGD <u>M</u> LL <u>LR</u> ----- 481
NR5A1_SF1_	YHKHLGNEMPRNLL <u>IE</u> MLQAKQT----- 483
NR5A2_LRH1_	YKHLNGDVPYNNLL <u>IE</u> MLHAKRA----- 483
NR1A1_TR α _	LHMV <u>EC</u> PT--EL <u>FP</u> PL <u>F</u> LE <u>V</u> FE <u>D</u> QEV----- 484
NR1A2_TR β _	LHMV <u>EC</u> PT--EL <u>FP</u> PL <u>F</u> LE <u>V</u> FE <u>D</u> ----- 481
NR1B1_RAR α _	ITLK <u>ME</u> IP---GSM <u>P</u> PL <u>I</u> Q <u>EM</u> LE <u>NS</u> E <u>GL</u> DT 486
NR1B2_RAR β _	ITLK <u>ME</u> IP---GSM <u>P</u> PL <u>I</u> Q <u>EM</u> LE <u>NS</u> E <u>G</u> HEP 486
NR1B3_RAR γ _	ITLK <u>ME</u> IP---G <u>MP</u> PL <u>I</u> Q <u>EM</u> LE <u>NS</u> EM <u>F</u> ED 486
NR1C1_PPAR α _	QIIKKT <u>ES</u> DA--L <u>H</u> PL <u>L</u> Q <u>E</u> I <u>Y</u> RD <u>MY</u> ---- 483
NR1C2_PPAR β _	QRIKKT <u>ET</u> ETS--L <u>H</u> PL <u>L</u> Q <u>E</u> I <u>Y</u> K <u>D</u> MY---- 483
NR1C3_PPAR γ _	QVIKKT <u>ET</u> DMS--L <u>H</u> PL <u>L</u> Q <u>E</u> I <u>Y</u> K <u>D</u> LY---- 483
NR1D1_Rever <u>ba</u> _	LSFRVDAQ----- 467
NR1D2_Rever <u>b</u> β _	LAFKVHP----- 466
NR1F1_ROR α _	MAFKAIY <u>PD</u> IVRL <u>HF</u> PP <u>L</u> Y <u>KE</u> L <u>FT</u> SE <u>F</u> EPAM 490
NR1F2_ROR β _	QVFKQSH <u>PE</u> IVNTL <u>FP</u> PL <u>Y</u> KE <u>L</u> FN <u>PD</u> CATGC 490
NR1F3_ROR γ _	QIFQHL <u>HP</u> IVVQA <u>FP</u> PL <u>Y</u> KE <u>L</u> FS <u>T</u> ETES <u>P</u> V 490
NR1H2_LXR β _	FALRLQ----DKKL <u>P</u> PL <u>L</u> SEI <u>W</u> D <u>V</u> HE---- 481
NR1H3_LXR α _	FALRLQ----DKKL <u>P</u> PL <u>L</u> SEI <u>W</u> D <u>V</u> HE---- 481
NR1H4_FXR_	MSWRVN---DHK <u>F</u> T <u>PL</u> <u>L</u> CEI <u>W</u> D <u>V</u> Q---- 480
NR1I2_PXR_	RLRLIQ--DI <u>HP</u> FAT <u>PL</u> Q <u>EL</u> FGI <u>T</u> GS---- 484
NR1I3_CAR_	QIQHIQ--GLS-AM <u>MP</u> LL <u>Q</u> E <u>T</u> CS----- 479
NR1I1_VDR_	RCLSFQP--E <u>CS</u> M <u>K</u> L <u>PL</u> V <u>LE</u> V <u>F</u> GN <u>E</u> IS-- 485
NR4A2_NURR1_	FYLKLE <u>D</u> LV <u>PP</u> PAID <u>K</u> FL <u>D</u> LT <u>LP</u> F----- 484
NR4A3_NOR1_	FYLKLE <u>D</u> LV <u>SP</u> PSI <u>D</u> K <u>FL</u> DT <u>LP</u> F----- 484
NR4A1_NGF <u>B</u> _	FYLKLE <u>D</u> LV <u>PP</u> PI <u>D</u> K <u>I</u> F <u>MD</u> LT <u>LP</u> F----- 484
NR6A1_GC <u>NF</u> _	LEQL <u>PL</u> L <u>FK</u> V <u>L</u> HS <u>CK</u> T <u>SV</u> G <u>KE</u> ----- 481

図 22. 核内受容体 LBD・ α ヘルックス 12 領域のアミノ酸配列アラインメント
下線部分がヘルックス 12 相当部分。

最初にセンシング抗体法が確立に成功した 15 種類については、化学物質 10 種類についてスクリーニングの試験を実施した。内分泌かく乱作用が懸念されている化学物質として、ビスフェノール A、ノニルフェノール、*tert*-オクチルフェノール、トリブチルスズ、フタル酸ジエチル、フタル酸ジシクロヘキシルの 6 種をアッセイした。また、基準化合物として 17 β -エストラジオール E2、アンドロゲン DHT、4-OHT、プロゲステロンを用いた。