

25. 野瀬 健、徳永隆俊、錦織充広、下東康幸、女性ホルモン受容体 ER α に対するアルキルフェノール類の結合性の予測、第 10 回環境ホルモン学会研究発表会、2007. 12-10-11。
26. 松島綾美、寺本岳大、岡田浩幸、劉 暁輝、角田佳充、下東康幸、結晶構造から明らかになったビスフェノール A 受容体の結合構造要因、第 10 回環境ホルモン学会研究発表会、2007. 12-10-11。
27. 徳永隆俊、野瀬 健、劉 暁輝、岡田浩幸、岩崎 茜、金森史花、磯野裕章、錦織充広、松島綾美、下東美樹、下東康幸、化学物質の内分泌かく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アッセイ法、ヒト核内受容体全 48 種への展開、第 10 回環境ホルモン学会研究発表会、2007. 12-10-11。
28. 武田行正、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノール A の低用量効果が疑われるヒト生殖組織および脳におけるエストロゲン関連受容体 ERR γ の発現解析、第 10 回環境ホルモン学会研究発表会、2007. 12-10-11。
29. 劉 暁輝、松島綾美、岡田浩幸、徳永隆俊、下東康幸、ERR γ へのビスフェノール A 結合における Arg316 および Glu275 との水素結合機構、第 10 回環境ホルモン学会研究発表会、2007. 12-10-11。
30. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 暁輝、松島綾美、下東康幸、アルキルフェノール類とエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) の結合における構造活性相関解析、第 10 回環境ホルモン学会研究発表会、2007. 12-10-11。
31. 下東美樹、堤 俊博、劉 暁輝、徳永隆俊、Ian A. Meinertzhagen、下東康幸、環境ホルモン、ビスフェノール A のショウジョウバエ *in vivo* 継代試験、第 10 回環境ホルモン学会研究発表会、2007. 12-10-11。
32. 松島綾美、環境ホルモン・ビスフェノール A とエストロゲン関連受容体 γ 型の結合要因、化学材料セミナー-分子科学の基礎と応用-、2008. 3. 23。

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准教授

研究要旨

一般に天然リガンドや内分泌攪乱物質は、核内受容体のリガンド結合部位と結合して様々な作用を引き起こす。ほとんどすべての核内受容体のリガンド結合部位は、12 個の α -ヘリックス構造からなる。これまでの研究より多くの核内受容体においては、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おり、特に、第12ヘリックスの位置取りに大きな差違が見られる。ヒトゲノム解析により明らかにされた48種類の核内受容体それぞれにおいても、それらの3つの異なるコンホメーションは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、特に第12ヘリックスの構造変化を抗体で感知・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、本分担研究では、このセンシング法を48種類の核内受容体すべてに適応させるため、センシング抗体をポリクローナル抗体として作製してきた。今年度は、残り全ての核内受容体に対するセンシング抗体作製を完了するため、残りの12種類の受容体に対応した10種類のポリクローナル抗体の作製を行い、コンホメーション変化センシングアッセイ系の構築を行った。

A. 研究目的

一般に、生体内に存在している生理活性を持つホルモンや化学物質など様々なリガンドは、特異的に核内受容体と結合することにより多様な作用を引き起こす。核内受容体は、このようにリガンドによって活性調節を受ける転写因子の一つのグループである。この核内受容体には、女性ホルモン受容体、男性ホルモン受容体などの性ホルモン受容体、ステロイドホルモン受容体が含まれている。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。今日においては、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されている。

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環境化学物質の影響評価を行うこととした。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。しかし、本研究班の下東らの研究において報告された、別の核内受容体・エストロゲン関連受容体 γ （ERR γ ）に対してビスフェノールAが非常に強く結合するという事実より、ER α 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った。そのため、性ホルモン受容体を含む全ての核内受容体の化学物質結合性評価を行うことを目的とする本分担研究の重要性が増大した。核内受容体タンパク質のアミノ酸配列は、この核内受容体ファミリーに属する受容体タンパク質同士において高いアミノ酸配列相同性を示すことが判明している。また、核内受容体は共通構造として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、一般には、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)

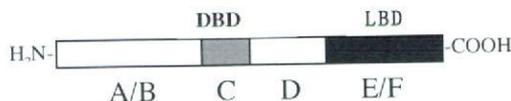


図1. 一般的な核内受容体のドメイン構造
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

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、遺伝子転写の制御を行っている。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して、LBDの立体構造を変化させたり、その変化を阻害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、活性化にリガンドを必要とする受容体のLBDにおいては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。一方、核内受容体には、常に活性化構造を取っている構成活性受容体も存在するが、これにおいても、活性構造を乱すように構造変化を引

き起こすように結合する化学物質の存在が知られている。これらの構造変化を検知することの可能な、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、昨年度に引き続き12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、LBD(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10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 (Accelrys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 固相法による自動固相合成機・ABI433A によって合成した。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, $\phi = 1.8$ cm, $l = 75$ cm) および逆相 HPLC (Lichrospher RP-18(e), $\phi = 25$ 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/ 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。

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 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、先に調製した KLH-MBS 複合体溶液 (230 μ l) および 0.2 M Na_2HPO_4 (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。

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°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。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°C で終夜インキュベートした。沈殿してくる抗 KLH 抗体複合体を遠心分離で除去した。この操作は、KLH 水溶液を加えても沈殿が析出してこなくなるまで繰り返し行った。

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、スクラパ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

コンホメーション変化センシングアッセイに用いる抗体は、受容体 LBD へのリガンド結合に伴う構造変化を感知する抗体である。そのセンシング抗体は、リガンド結合に伴い構造変化する核内受容体 LBD のヘリックス 1 2 部分を主なエピトープとする。それゆえ、ヘリックス 1 2 部分の同定が、センシング抗体作製に重要な作業となる。エピトープの決定作業は昨年までと同様に行った。エピトープの決定にあたり、X線立体構造解析により立体構造が解析済みのものについては、PBD より直接 LBD の 3 次元座標を取得し、分子モデリングによりヘリックス 1 2 を直接同定したうえ、その前後 1-8 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については、報告されたサブタイプ間のアミノ酸配列の相同性を用い、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、それを基にヘリックス 1 2 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。NR1D1 (Rev-erb- α) および NR1D2 (Rev-erb- β) においては、H12 部分が欠落しているが、立体構造解析より LBD の C 末端部分が H12 と同様の構造変化を行うと推定されたため、その C 末端部分をエピトープとした。今回設定したエピトープを表 1 に示す。

表 1 推定核内受容体 LBD・ヘリックス 1 2 領域と設定したエピトープペプチド

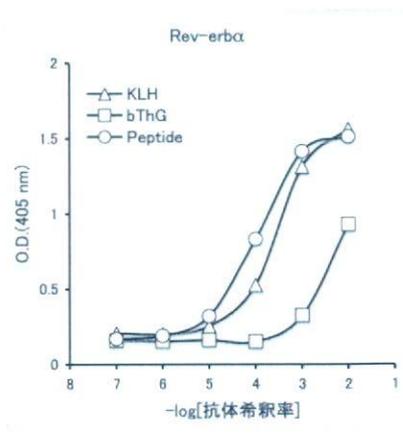
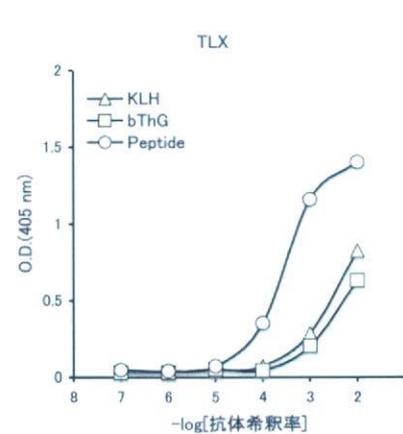
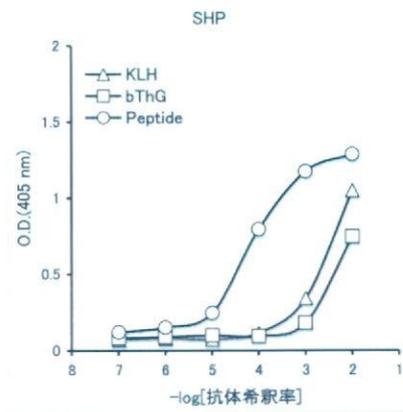
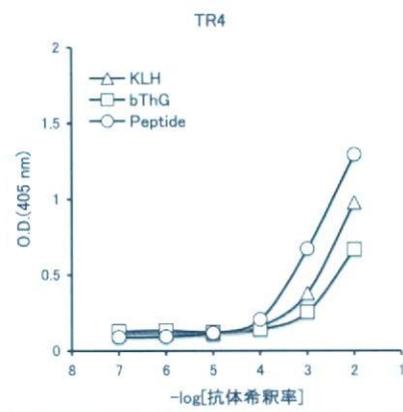
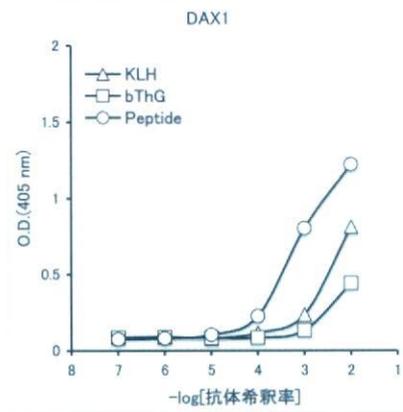
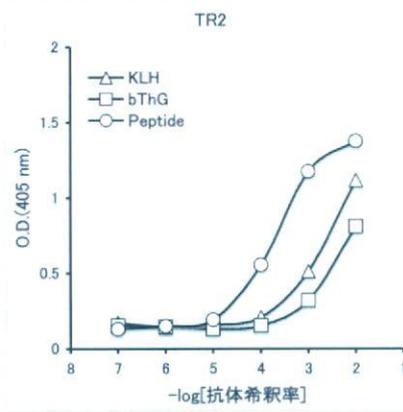
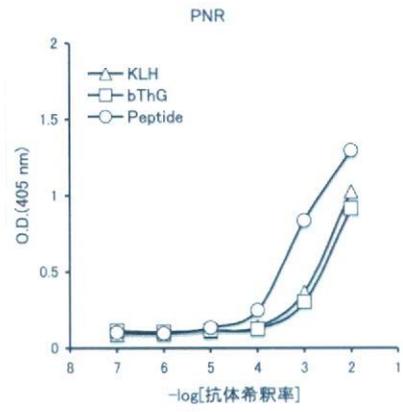
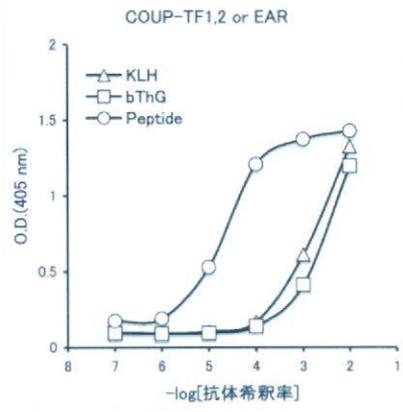
下線部分はヘリックス 1 2 相当部分

Name	AMINO ACID SEQUENCE
NR2F1_COUPTFI	CRLVGKTP <u>PIETL</u> IRDML
NR2F2_COUPTFII	CRLVGKTP <u>PIETL</u> IRDML
NR2F6_EAR2	CRLVGKTP <u>PIETL</u> IRDML
NR2C1_TR2	CKGLIGNIRIDS <u>VIPHILK</u>
NR2C2_TR4	CGLIGNVSDIS <u>IPIYILK</u>
NR2E1_TLX	CKTIGNVPITR <u>LLSDMYK</u>
NR2E3_PNR	KTIGNTPME <u>KLLCDMFK</u>
NR0B1_DAX1	CRPIIGTVSMDD <u>MLEML</u>
NR0B2_SHP	CRPIIGDVDIAG <u>LLGDMLLLR</u>
NR6A1_GCNF1	QLPLLFKVV <u>LHSCKTSV</u> GK
NR1D1_Rev-erb- α	CKLPDLRTLNNMHSEKLLSFRVDAQ
NR1D2_Rev-erb- β	CAAFPLYKELFSTET

NR2F1, NR2F2 および NR2F6 は同一配列のエピトープを使用。NR1D1 および NR1D2 は、LBD の C 末端領域をエピトープとした。

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。合成した数種類のヘリックス 1 2 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ーでの精製が困難で収率が低下した（データは省略）が目的物が合成されていることは質量分析等で確認された。

本分担研究においては、ポリクローナル抗体の調製をおこなったが、それらはウサギにエピトープを免疫することにより作製した。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 2)。



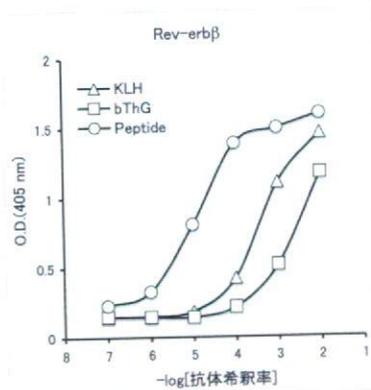


図2 ウサギ由来抗ヘリックス12ポリクローナル抗体の力価の検討

GCNF-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。GCNF-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。

D. 考察

本分担研究では、センシング抗体アッセイ法に用いるセンシング抗体をポリクローナル抗体として調製した。センシング抗体作製に使用するエピトープは、核内受容体のLBDに存在するヘリックス12を含む合成ペプチドを用いた。現在までに計46種類の核内受容体に対するセンシング抗体をポリクローナル抗体として作製した。一方で、GCNF-1 と SF-1 では、有為な認識能を示すポリクローナル抗体が得られなかった。その原因としては、実験動物（ウサギ）に抗原のアミノ酸配列が相応しくない、または免疫個体の特性の2つが考えられるが、今のところ明確ではない。現在も、この問題を解決すべく抗体を再度調製している。しかしながら、ヘリックス12近傍をエピトープとして作製したセンシング抗体は全般的に充分構造変化認識プローブとして機能しており、本調製法の有用性が確認された。

E. 結論

今年度の本分担研究により、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、合計46種類の核内受容体に対するコンホメーションセンシング抗体が作製された。これらにより、ヒトにおけるほとんどの核内受容体に対しての構築が可能となった。

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. The Conformation Change-Sensing Antibodies for Retinoid-Related Orphan Receptor Family
Mitsuhiro Nishigori, Takeru Nose, Xiaohui Liu, Takatoshi Tokunaga, and Yasuyuki Shimohigashi
Peptide Science 2007, 491-492, (2008).

2. A docking modelling rationally predicts strong binding of bisphenol A to estrogen-related receptor γ , Takeru Nose, Yasuyuki Shimohigashi, *Protein and Peptide Letter*, 2008 in press.

学会発表

1. 野瀬 健、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) とビスフェノールAの結合構造解析、平成19年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

2. 徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、コンホメーション変化センシング抗体アッセイ法によるエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) への化学物質の影響評価、平成19年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

3. 錦織充広、徳永隆俊、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、レチノイド関連オーファン核内受容体RORを介した内分泌攪乱作用評価試験系の構築、第44回化学関連支部合同九州大会、2007. 7. 7。

4. 錦織充広、野瀬健、劉曉輝、徳永隆俊、下東康幸、レチノイド関連オーファン受容体ファミリーのコンホメーション変化センシング抗体、第44回ペプチド討論会、2007. 11. 7-9。

5. 徳永隆俊、野瀬 健、劉 曉輝、岡田浩幸、岩崎 茜、金森史花、磯野裕章、錦織充広、松島綾美、下東美樹、下東康幸、化学物質の内分泌かく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アッセイ法：ヒト核内受容体全48種への展開、環境ホルモン学会第10回研究発表会、2007. 12. 10-11。

6. 野瀬 健、徳永隆俊、錦織充広、下東康幸、女性ホルモン受容体 ER α に対するアルキルフェノール類の結合性の予測：環境ホルモン学会第10回研究発表会、2007. 12. 10-11。

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
分担協力研究者 岡田浩幸 九州大学大学院理学府学術振興会特別研究員

研究要旨

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非常に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た。その後、6 種の受容体においてセンシングファージ抗体を得ることに成功したが、scFv (単鎖型抗体) として機能する抗体は得られていない。こうした問題点を解決するために scFv スクリーニング法を構築し、RAR α 、RAR β 、PPAR γ 、FXR について機能性 scFv を獲得することに成功した。また、我々の最近の研究により、BPA の標的受容体が ERR γ であることが明らかとなった。現在では、ERR γ の機能解明が BPA のかく乱作用の本質を解明する事例の 1 つになると考えられており、その有効なツールとして抗 BPA 抗体が挙げられる。本年度においては、作製することが難しい抗 BPA 抗体の作製を試み、ファージディスプレイ法によって BPA を特異的に認識する抗体 (クローン) の取得に成功した。

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 (ER α 、 β) の他にエストロゲン関連受容体 3 種 (ERR α 、 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関連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。したがって、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。したがって、本研究の目的は、48種のヒト核内受容体に対してコンホメーションセンシング能を有するモノクローナル抗体を効率よく作製し、さらに、化学物質の評価（センシングアッセイ）に必要な抗体を大量に供給することである。こうした「モノクローナル抗体産生システム」の構築に平成16年度より取り組んできた。

本研究では、これまで、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、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。さらに、本手法を ER α に展開する際には、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行った。これにより、昨年度までに、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。

しかしながら、センシング抗体法によるアッセイのためには、ファージ抗体 (ファージに scFv が結合した状態) ではなく、scFv (単鎖可変抗体) に変換して行わなければならない。その理由は、ファージそのものが非常に大きいため、抗体の機能としては物理的に不安定な状態となるからである。scFv への変換は、大腸菌を使ったタンパク質発現の要領で行うことができる。つまり、得られたクローン由来の scFv を大腸菌内で発現すれば良い。そこで、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。しかしながら、昨年度までに scFv として機能するクローンは1つも得られていない。一般的に、得られた scFv がファージとの融合タンパク質として機能を発揮し

ていたとしても、それらが単独で機能するとは限らないと報告されている。特に scFv の発現においては、封入体 (不溶性タンパク質) を形成したり、発現しても scFv 単独で安定な構造をとることができず、重合体を形成するなどの問題に遭遇することが多い。

そこで、本年度の研究においては、確実に scFv を得ることを目的に、スクリーニング手法の改良を行った。具体的には、スクリーニングによって得られたクローンから scFv を発現するのではなく、単独で発現することが可能な scFv を提示したクローンをスクリーニングすれば良いと考えた。すなわち、バイオパンニングによって得られたすべてのクローンを発現用の大腸菌に組み込み、scFv の状態でスクリーニングを行うことにした。

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アッセイ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。つまり、ポリクローナル抗体での結果と並列して抗体の作製と抗体機能の評価を行う必要がある。この点において、本研究では今回、ポリクローナル抗体の作製を終えている RAR α 、RAR β 、PPAR γ 、FXR、VDR、ER α を対象に scFv の取得を試みた。また、これら受容体は、リガンド依存的に活性化する核内受容体であり、創薬を目的とした幾つかの合成リガンドも報告さ

表1. センシング抗体 (scFv) 作製のためのエピトープ

	名称	受容体	配列
1	NR1B1	RAR α	CKMEIPGSMPLIQEMLEN
2	NR1B2	RAR β	CKMEIPGSMPLIQEMLEN
3	NR1C3	PPAR γ	CSLHPLLQEIYKDLY
4	NR1H4	FXR	HKFTPLLCEIWDVQ
5	NR1I1	VDR	CSMKLTPLVLEVFNEIS
6	NR3A1	ER α	CLYDLLLEMLDAHRLHA

青字で示すのは、X線結晶構造解析から同定された、ヘリックス12部位

れている。したがって、得られる scFv の機能およびセンシングアッセイの結果を評価するに適した受容体である。

ところで、我々の研究により、ビスフェノール A がエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) に強く結合することが明らかとなり、その影響が懸念されている。特に ERR γ のリガンドおよび機能の解明が急がれるなか、BPA 認識抗体の必要性が高くなった。なぜなら、BPA と ERR γ の結合定数が K_D 値で 5.5 nM であることが判明し、生体内のホルモンとその受容体の結合親和性に匹敵するほど強いものであることから、ERR γ の内因性リガンドが存在するのであれば類似した構造を持つと思われるからである。そこで、本年度は、ファージディスプレイを利用して抗 BPA 抗体の作製に着手した。こうした「低分子化合物に対する抗体」の作製を動物免疫法で行うのは非常に難しく、ファージディスプレイ法は最適な手法である。

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

RAR α 、RAR β 、PPAR γ 、FXR、VDR、ER α 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 番目のヘリックス (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。

ファージ抗体ライブラリーには、これまでと同様に、英国医学会議 (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。これら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」が融合されたプラスミド (ファージミド) を

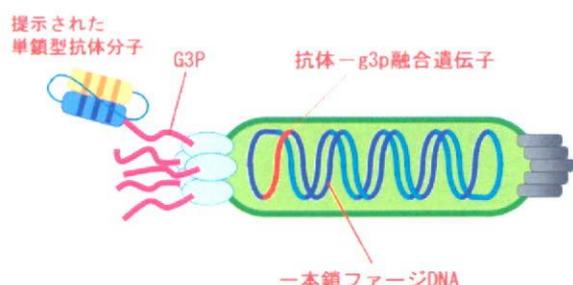


図 1. ファージ抗体の構造

持っており、対応する scFv 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 scFv 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、ファージミドを大腸菌 (TG1 株) にトランスフェクションされた状態で MRC より分与されている。したがって、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。ER α 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、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 (種類) の抗体しか得られなくなる。

抗原ペプチド (50 μ g/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 μ l 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 $^{\circ}$ C で震盪培養した。遠心

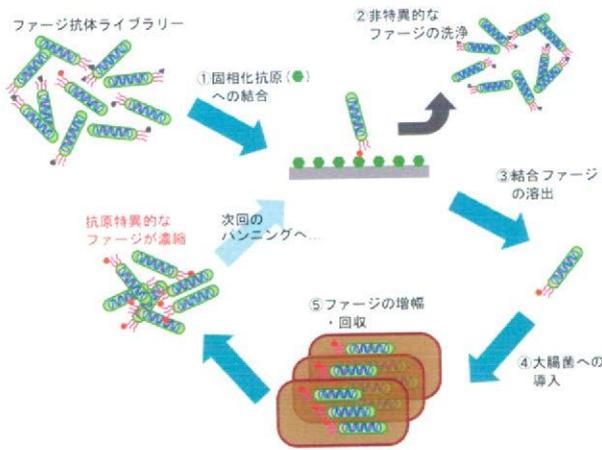


図2. バイオパンニング

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°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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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。

(3) 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（非サブレッサー株）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×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°C、300 rpm で終夜培養した。培養液 2 μl を各 100 μl の 2×TY 培地（グルコースなし）に植菌し、37°C、300 rpm で 2 時間培養後、50 μl の 2×TY 培地（含 0.3 mM IPTG）を添加した。30°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) 抗 BPA 抗体の作製

BPA と同じ部分構造を持つ化合物である 4, 4-Bis(4-hydroxyphenyl)valeric Acid（通称ジフェノール酸：図 3）のカルボキシル基とキャリアタンパク質を架橋試薬 TFCS によって結合させ、抗原として使用した。センシング抗体の作製と同様に、合計 3 回のバイオパンニングを行った。ただし、固定化抗原に結合したファージの回収は、トリプシン消化ではなく、1 mM の BPA と競合させることで回収した。

3 回のバイオパンニングの後、回収したファージは、過剰量の宿主菌 TG-1（サブレッサー株）に感染させ、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、BPA を特異的に認識する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ファージ抗体 ELISA を行った。これにより、BPA を特異的に認識するクローンを同定した。

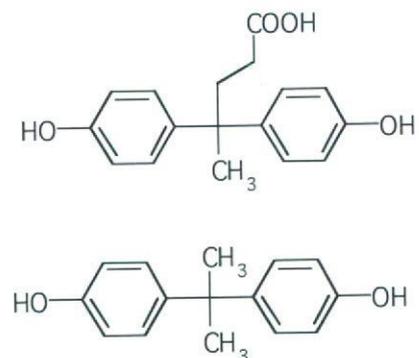


図3. ジフェノール酸（上）とビスフェノールA（下）の構造

(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) バイオパンニング

各受容体に対して、Tomlinson I ライブラリーよりバイオパンニングを行った。合計3回のバイオパンニングを行い、各パンニングを終えるごとに回収されたファージの個体数を算出した (図 4)。この結果、それぞれの受容体の3回目のバイオパンニングにおいて、回収されるファージ個体の数が増加に転じた。これにより、目的の抗原を認識する抗体を提示したファージが濃縮されたことが示唆された。

(2) scFv スクリーニングの結果

バイオパンニングによって回収されたファージを TG-1 (サプレッサー株) から HB2151 (非サプレッサー株) に組み換えた。さらに、これらをモノクローン化し、96 穴プレートにて scFv の発現を行った。得られた scFv (培養上清) を用いて抗原に対する抗体価を測定した。その結果、RAR (α , β)、PPAR、FXR、については、抗原を特異的に認識する scFv の同定に成功した (図 5)。一方、VDR、ER α

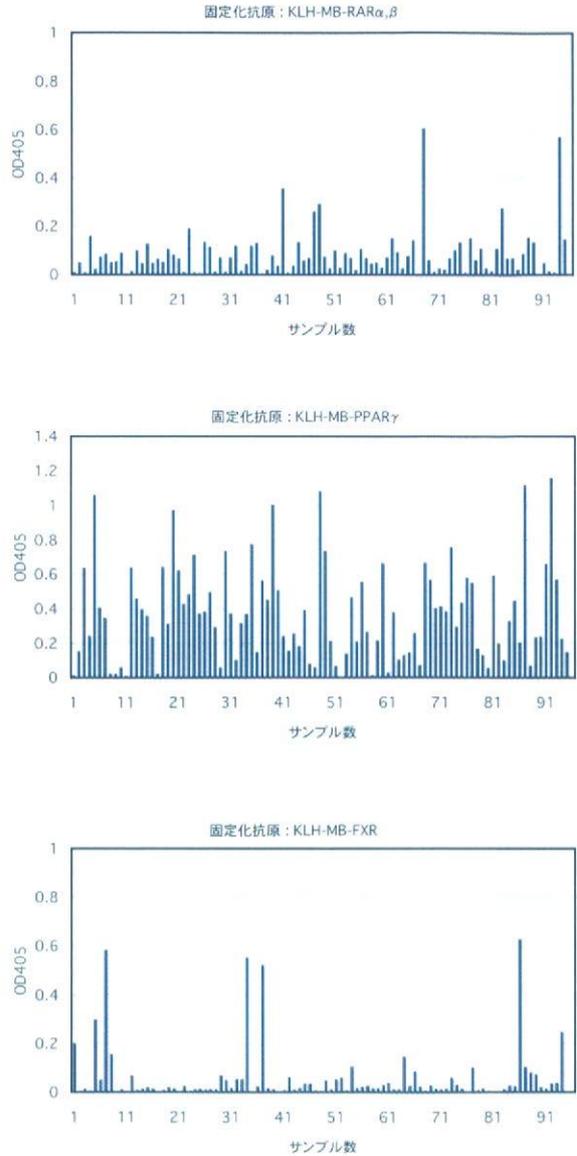


図 5. scFv スクリーニングの結果
上から RAR (α , β)、PPAR γ 、FXR

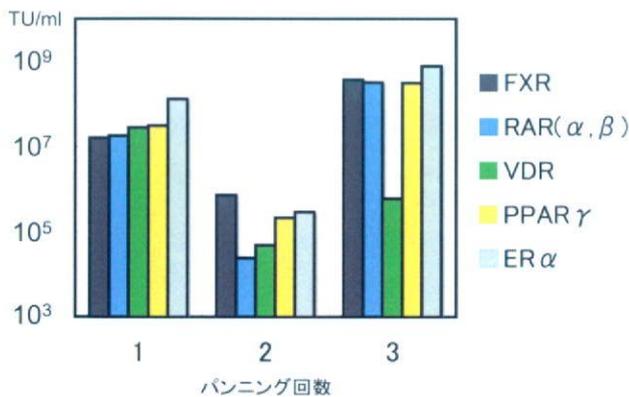


図 4. バイオパンニングによるファージ個体数の変化 (ファージのタイターチェック)

については、機能性 scFv を発現するクローンが得られなかった。

(3) 抗 BPA 抗体の作製

まず始めに、通常のスキームであるトリプシン消化によってファージを回収する方法にて3回のバイオパンニングを行った。ライブラリーは、Tomlinson I と Tomlinson J の2つのライブラリーを使用した。その後、得られたファージクローンをモノクローン化し、ファージ抗体 ELISA によるスクリーニングを 188 クローンについて行った。その結果、「キャリアタンパク質およびジフェノール酸とのリンカー部分」を認識するクローンは

見られたものの、BPA の構造を特異的に認識するクローンは得られなかった。

そこで、バイオパンニングにおけるファージの回収方法を「トリプシン消化」でなく「BPA との競合」に変更した。これによって、キャリアタンパク質やリンカー部分を認識するクローンは回収されなくなると考えられる。実際に、改めて3回のバイオパンニングを実施した結果、 1×10^9 TU/ml 回収されていたファージ個体が 1×10^5 TU/ml に減少した。さらに、得られたファージをモノクローン化し、ファージ抗体 ELISA によるスクリーニングを実施した。94 クローンについてスクリーニングを行った結果、7つのクローンにおいて BPA に対する特異的な認識力が確認された (図6)。

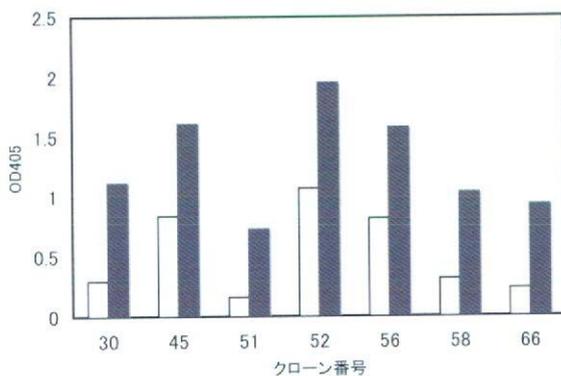


図6. BPA 構造を特異的に認識するファージ抗体 (□) キャリアタンパク質およびリンカーに対する抗体価、(■) 抗原に対する抗体価。

D. 考察

前年度までに、①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、②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、③複数のライブラリーを使うことの有効性、などを明らかにしてきた。実際に GR、ER α 、および ERR α 、 β 、 γ 、においてセンシングファージ抗体を取得することに成功した。しかしながら、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「scFv (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、ファージ抗体では精密な解析ができない可能性があるからである。

そこで、得られたセンシング抗体について、scFv の作製を行ったが、GR および ER α において機能性 scFv の獲得には至っていない。特に ER α については、多くの異なるファージ抗体が得られたにもかかわらず、scFv として機能するクローンを獲得することが出来なかった。

「バイオパンニング→ファージ抗体によるスクリーニング→シークエンス解析による同一クローンの廃棄」という長い手順を経て、獲得した数少ないクローンが scFv を発現しないという問題が浮き彫りになった。そのため、こうしたスキームでは 48 種への展開において効率よく scFv を得ることが難しいと判断された。

そこで、バイオパンニングによって得られたクローン (ポリクローナルの状態) をまとめて HB2151 (非サブレッサー株) に感染させ、その後にモノクローナル化を行うことにした。これにより、ファージ抗体の作製ができなくなるため、ファージ抗体 ELISA によるスクリーニングが出来なくなるが、直接的に scFv の状態でスクリーニングができると考えた。本来、scFv の発現は、通常の大腸菌を用いたタンパク質発現と同じ手順で行われるため、細胞の破碎などの手順が必要である。そのため、96 穴プレートを用いて多サンプルを同時に発現させることが難しい。しかしながら、今回使用している Tomlinson I および J ライブラリーを構築するファージミド (プラスミド) には、scFv 遺伝子の upstream に pel B reader と呼ばれるシグナル配列がコードされている。このシグナル配列により、scFv が大腸菌のペリプラズムに分泌される。そのため、細胞の破碎を行わずとも、発現誘導を施した長期培養後の上清に scFv が得られると考えた。実際に、発現誘導を行い、長期培養を行った培養上清に対して SDS-PAGE を行ったところ、scFv が得られることが確認された。

多クローンの scFv を同時に発現することが可能であると判断されたので、実際に、RAR(α , β)、PPAR γ 、FXR、VDR、ER α について scFv スクリーニングを行った。その結果、RAR(α , β)、PPAR γ 、FXR について抗原を認識する機能的 scFv が検出され、有効なクローンを同定することに成功した。しかしながら、VDR と ER α については機能性 scFv が得

られなかった。VDRについては、バイオパンニングによるファージタイターの変化(図4)を見る限り、3回目のバイオパンニング後のファージ個体数の増加が小さいことが原因かもしれない。すなわち、抗原に特異的なファージの濃縮が十分に行われていない可能性が考えられる。一方、ER α については大きな原因が見られないことから、本ライブラリーからはセンシング抗体の取得が困難である可能性が考えられる。こうした受容体については、当該受容体と相同性の高いH12部位をもつ受容体(ER α の場合 ER β)にて得られた抗体を改変することで対応する予定である。また、scFvの取得に成功したRAR(α , β)、PPAR γ 、FXRについては、現在scFvの大量調製に成功しており、早急にセンシングアッセイに取りかかる予定である。

抗BPA抗体の作製については、バイオパンニング手法の確立に多くの時間を費やした。BPAを認識する抗体とは、いわゆる「低分子化合物を認識する抗体」であるため、タンパク質やペプチドのように大きな分子を認識する抗体に比べて、きわめて作製が困難である。実際に、通常のスキームでバイオパンニングを行った結果では、キャリアタンパク質およびリンカー部分の構造を認識するクローンしか得ることができず、BPAを特異的に認識する抗体を得ることができなかった。

そこで、バイオパンニングにおけるファージ回収方法を「トリプシン消化法」から「1 mM BPA との競合法」に変更した。トリプシン消化法の場合、キャリアタンパク質およびリンカー部分に結合しているクローンについても回収されるが、BPA との競合法ではBPA に特異的なクローンのみが回収されることが予想される。ただし、1 mM のBPA (in PBS) 条件下でファージの感染能が維持されるかどうかの問題である。本年度は、こうした条件検討についても予備的な実験を行い、ファージの感染能に対して影響がないことを確認済みである(詳細は省略)。これらの改善により、BPA を認識するクローンを得ることに成功した。

現在は、抗BPA抗体の作製においてもセンシング抗体の作製スキームと同様に、scFvスクリーニングを行っている。また、今回の実験においてバイオパンニングを行った結果、リンカー部分を認識するクローンが多数選別されていた。したがって、リンカーを使用しない抗原の方がバイオパンニングに適している可能性が考えられた。そこで、実際

に、キャリアタンパク質とジフェノール酸を直接結合させることを試み、既に成功している。この抗原を使用してのバイオパンニングにも現在着手しており、従来法よりもBPAを認識する抗体が数多く得られることが期待される。こうして得られたクローンについても今後 scFv スクリーニングを行う予定である。

E. 結論

本年度は、全ての核内受容体を対象に、一挙にバイオパンニングを実施する予定であったが、パイロット実験として進めていたER α において機能的 scFv が得られないという重大な問題に直面した。そこで、96 穴プレートにて複数の scFv を同時に発現する手法と scFv によるスクリーニングの手法を確立することにした。その際、昨年度までに未着手であった核内受容体のうち、優先的に抗体を取得することが求められる、RAR(α , β)、PPAR γ 、FXR、VDR および ER α について検討した。結果として、scFv スクリーニングの確立に成功し、実際にRAR(α , β)、PPAR γ 、FXR について scFv を獲得することができた。この scFv スクリーニングの実施には、追加でバイオパンニングを行う必要がないため、昨年度までに、バイオパンニングを終えているステロイドホルモン受容体については早急に着手する予定である。

抗BPA抗体の作製については、バイオパンニングの改良により BPA を特異的に認識する抗体の取得に成功した。これについても scFv スクリーニングを行い、scFv の獲得を予定している。得られた抗BPA抗体は、免疫染色および内因性の類似化学物質(ER γ の内因性リガンドであることが期待される)の探索等に利用する見込みであり、今後の研究展開の有効なツールとなることが期待される。

F. 健康危険情報

該当する情報は無い。

G. 研究発表 学会発表

1. 磯野裕章、岡田浩幸、徳永隆俊、松島綾美、下東康幸、自発活性化型核内受容体 ER β のコンホメーション変化センシングアッ

セイのためのファージディスプレイ・モノクローナル抗体の作製、第43回化学関連支部合同九州大会、2007.7.7。

2. 岡田浩幸、ペプチドを利用したタンパク質コンホメーション変化の解析、第40回若手ペプチド夏の勉強会、2007.8.5-7。

3. 磯野裕章、ファージディスプレイ単鎖可

変抗体 (scFv) による自発活性化型核内受容体のためのコンホメーション変化センシングアッセイ法の確立、第7回泉屋コロキウム、2007.8.6。

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

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（ERR γ ）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。こうしたなか、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め、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ことが判明した。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）、ERR γ について特異性の高いモノクローンを得ることに成功し、今年度はそれぞれのモノクローナル抗体を用いた試験系の構築に取り組んだ。その結果、まず、TRについてコンホメーション変化を識別するモノクローナル抗体の調製に成功した。このモノクローナル抗体はポリクローナル抗体に比べて感度が良く、内在性ホルモンの試験ではEC₅₀値も従来の受容体結合試験の値と同等の値を示し、モノクローナル抗体の有用性が示された。

研究目的

本研究の目的は、センシング抗体アッセイ法において、高い特異性をもつモノクローナル抗体を得て、受容体応答・活性に相応するコンホメーション変化のセンシング感度を高め、より高精度なアッセイ法を確立することである。

近年、「環境化学物質の内分泌かく乱作用の本質は、受容体を介したシグナル毒性」であるという理解進むなか、内分泌かく乱性が懸念される多数の化学物質について、まず、それらが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。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。さらに最近では、自発活性化型核内受容体に対してインバースアゴニストとして作用するのか、インバースアンタゴニストとして作用するのかも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、これらの活性を

別々に試験するため煩雑であり、非効率的である。したがって、こうした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、核内受容体が 48 種存在することが明らかにされた。こうした核内受容体は複合的に関与する複雑な制御機構を形成していることが多いことが分かっている。内分泌かく乱作用はこのような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 (ERR γ) 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 ERR γ 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、ERR γ 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 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。ERR γ 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、ERR γ 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。ERR γ 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 ERR γ 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場合と異なり、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。

一方、細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製は、目的のクローン獲得の効率が非常に悪いという欠点が明らかとなり、モノクローナル抗体調製法としてはあまり効率的ではない。このため、48 種の核内受容体に対して網羅的に作製する不合理を避け、ポリクローナル抗体で成就したものを優先的に施工することとした。また、この際、ファージディスプレイ法と並行して実施する。

今年度、本研究では、ER の他に、ER と同じステロイドホルモングループである GR と ERR γ だけでなく、TR についてもコンホメーション変化を高い選択性で識別認識できる

抗体を作製すべく、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、超音波破碎装置を用いて乳濁液エマルジョンにした。

(4) 皮下への注射

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

(5) 細胞融合

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

(6) マウスのリンパ節の摘出

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

(7) 細胞培養と選択培養

リンパ細胞とミエローマ細胞を 5:1 の割合になるように混合して遠心した後、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 H₂O₂ 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

前年度までに得られた各受容体に対するクローンについて、リガンド結合型とリガンド非結合型を識別するかどうか調べた。その結果、TR α において 20 種類のクローン中 1

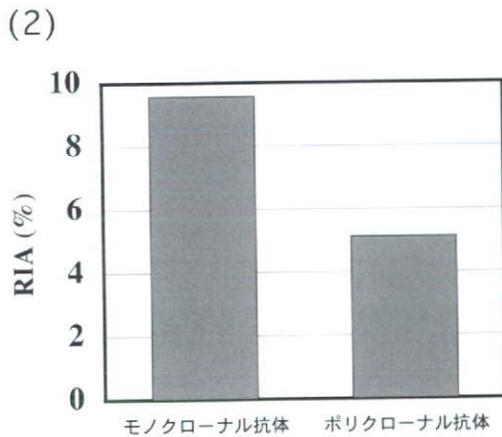
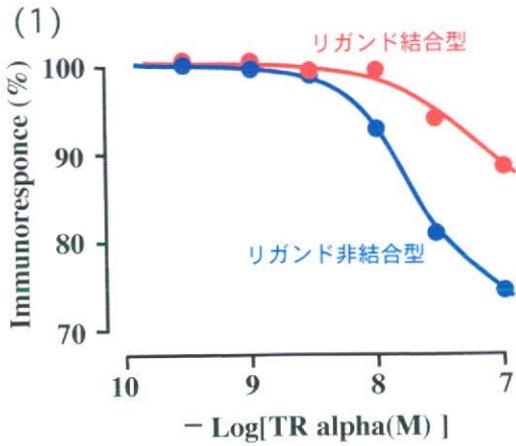


図1 TR alphaモノクローナル抗体センシング試験

(1)受容体濃度変化、(2)TR alpha 10 nMにおけるポリクローナル抗体とモノクローナル抗体の抗体応答変化の比較

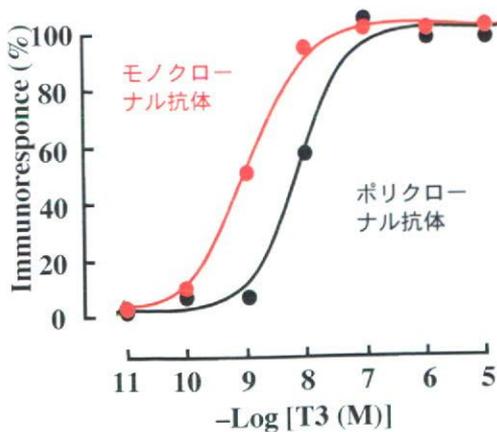


図2 モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体のT3濃度依存的な抗体応答

種類に内在性リガンド 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3) 結合型と非結合型で抗体応答に差が見られた (図1)。また、ポリクローナル抗体と比べて、モノクローナル抗体では TR α (10 nM) に対して約2倍の大きな抗体応答が見られた。T3濃度依存的な抗体応答においてもモノクローナル抗体 (EC₅₀ 値 0.8 nM) とポリクローナル抗体 (EC₅₀ 値 7.6 nM) で約10倍も感度が良かった。様々な化合物に対しての試験結果は、表1に示されるようにポリクローナル抗体とモノクローナル抗体で相関の良い結果が得られた。

表1 TR α に対する化学物質の抗体応答

化合物名	ポリクローナル抗体	モノクローナル抗体
T3	++	++
E2	-	-
DHT	-	-
4OHT	-	-
progesterone	-	-
Nonylphenol	-	-
Octylphenol	-	-
Tributyltin	-	-
フタル酸ジエチル	-	-
フタル酸ジシクロヘキシル	-	-

++: 強い、-: 不活性

前年度得られたGRの2種のモノクローン、ARの4種のモノクローンでは受容体の構造変化を識別することができなかった。

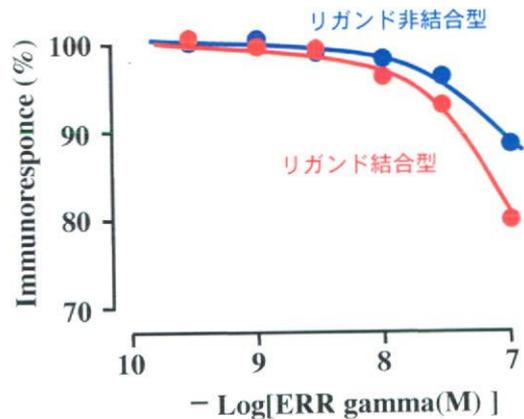


図3 ERR gammaに対するモノクローナル抗体のリガンド結合型と非結合型受容体の識別

一方、最近ビスフェノールAが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影響が注目されているエストロゲン関連受容体 (ERR γ) はリガンド非結合でも活性化型構造を保ち、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。前年度までに 4-OHT 結合型を識別するクローンが得られていたが、図 3 に示されるように感度が非常に悪く、試験系を構築するに至らなかった。

C. 考察

TR の構造変化を認識するモノクローナル抗体の調製に成功した。ポリクローナル抗体に比べ、モノクローナル抗体では少ない受容体量で構造変化を識別出来るため感度が良く、EC₅₀ 値の面では放射性トレーサーを用いる受容体結合試験の IC₅₀ 値と同程度を示すため精度の良い試験系の構築に成功した。ポリクローナル抗体に比べモノクローナル抗体の方が感度良く、効率的な試験系が構築可能であり、モノクローナル抗体の有用性が示された。

一方、前年度の検討によりモノクローン化の効率は上昇したが、受容体の構造変化識別クローンの得られる割合は低かった。受容体の構造変化を識別するポリクローナルにおいて、その抗体中に含まれる構造変化識別抗体の割合がその他の抗体 (リガンド結合型、非結合型両方を認識する抗体) に比べ低いと考えられる。これは、女性ホルモン受容体のポリクローナル抗体について、ペプチド固定化アフィニティカラムを用いた抗体成分の分画を行ったところ、受容体構造変化を認識する抗体画分の量が全体に比べ小さいことから分かる。今後は、調製するマウスの数を増やし、得られるモノクローンの数を増やしてスクリーニングする必要があると考えられる。

D. 結論

TR についてポリクローナル抗体よりも感度が良いモノクローナル抗体の調製に成功し、ポリクローナル抗体よりも受容体結合試

験に近い EC₅₀ 値を示す試験系も構築し、モノクローナル抗体法が確立された。

一方、AR、GR、ERR γ については、モノクローンは得られるが、受容体の構造変化を識別するモノクローンは得られなかった。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、目的のものを直に得ることは非常に困難である。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達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は明らかである。しかし、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い。そのため、今後とも、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。

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. Direct Evidence Revealing Structural Elements Essential for the High Binding Ability of Bisphenol A to Human Estrogen-Related Receptor- γ . H. Okada, T. Tokunaga, X. Liu, S. Takayanagi, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Environ Health Perspect*, **116**, 32-38 (2008).
2. Receptor binding characteristics of the endocrine disruptor bisphenol A for the human nuclear estrogen-related receptor- γ . Chief and corroborative hydrogen bonds of the bisphenol A phenol-hydroxyl group with Arg316 and Glu275 residues. X. Liu, A. Matsushima, H. Okada, T. Tokunaga, K. Isozaki, and Y. *FEBS J.*, **274**, 6340-51 (2007).
3. The Conformation Change-Sensing Antibodies for Retinoid-Related Orphan Receptor Family. M. Nishigori, T. Nose, X. Liu, T. Tokunaga, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science 2007*, impress (2007).