

200736011B

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17~19年度
総合研究報告書

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. 総合研究報告 (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
(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. ファージディスプレイ法によるヒト核内受容体 48種センシング抗体の作製 松島綾美・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 に対するセンシング 抗体アッセイ解析 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
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	97
III. 研究成果の刊行物・別刷-----	101

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（総合）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、ヒト核内受容体 48 種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とし、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めざす。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。これまでに、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確立に成就し、化合物群について順位付けに成功した。そして、この平成 19 年度までに残り 46 種のヒト核内受容体のうち 44 種のセンシング抗体の作製・精製を完了し、受容体タンパク質が入手できる核内受容体についてセンシング抗体法の確立に成就した。こうしたなか、ビスフェノール A が自発活性化型ヒト核内受容体・エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) に非常に強く結合することを世界で初めて発見し、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。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、国際的な議論の的になっている。内分泌かく乱作用が危惧されている化学物質 6 種（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）を含む化合物群についてセンシング抗体法により試験したが、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現在まで見出されていない。このように、全 48 種すべての核内受容体を試験するセンシング抗体法は、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「センシング抗体法」を用いて、まずエストロゲン・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。そして、化学物質約 500 種についてアッセイし、その活性の強い順に順位付けに成就した。こうして、受容

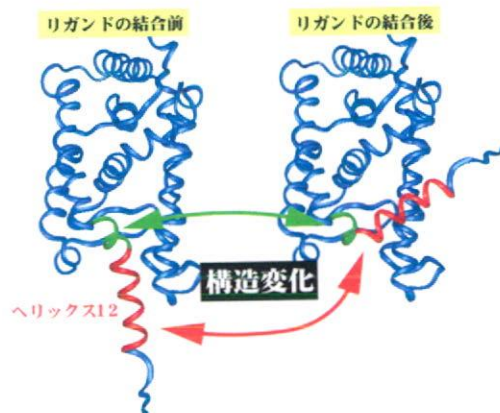


図 1. 核内受容体のリガンド結合前（アポ型）および結合後（ホロ型）の構造
リガンドがアゴニストとアンタゴニストでは、ホロ型コンホメーションのヘリックス 12 の位置取りが異なる。

体センシング抗体法は化学物質のホルモン受容体に対する統合的なリスク評価法として非常に優れた方法である。

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

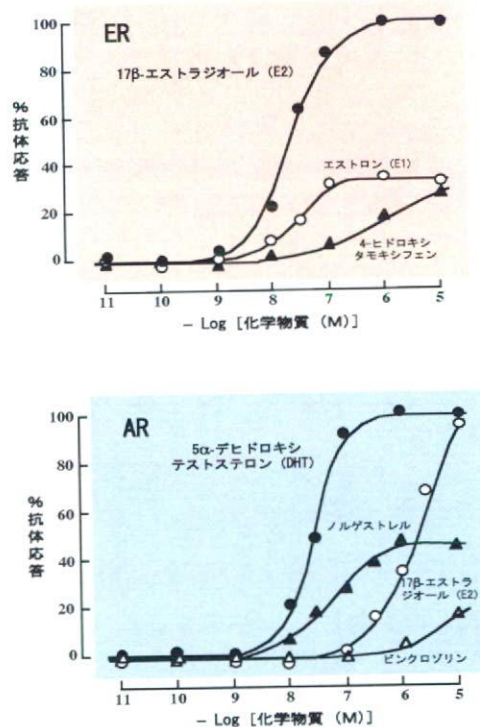


図 2. 核内受容体コンホメーション変化センシング抗体法によるエストロゲン受容体 (ER) およびアンドロゲン受容体 (AR) での抗体応答活性

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。平成18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(ER γ)に対するビスフェノールAのインバースア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、ERR)、グルコルチコイド受容体(GR)、あるいは甲状腺ホルモン受容体(TR)等についてリスク評価として内分泌かく乱性の順位付けを実施することを目的とする。まずは受容体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。

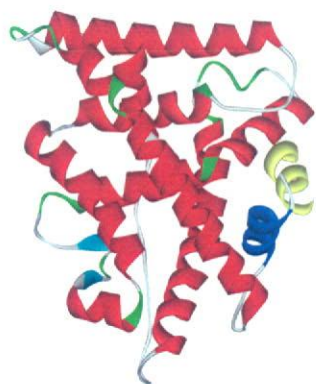


図3. 自発活性化型核内受容体 ER γ の生理活性コンホメーション
ヘリックス12が当初よりフタをした構造。

また、内分泌かく乱作用が強く懸念されている化学物質群についてスクリーニングすることにした。

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・ER 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ER γ に対してセンシング抗体法を確立することに成就した。これはインバースアゴニストおよびインバースアンタゴニストを区別してアッセイできるアッセイ法であり、19年度にはこの方法を用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 μl) および 0.2 M Na_2HPO_4 (115 μl) を加え、室温で 3 時間攪拌した。遠心後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

(4) ウサギへの免疫

(3) で調製した抗原溶液をフロイントのアジュバントとペプチド 0.1 mg/匹となるように混合してエマルジョンとし、ウサギ (ニュージージーランドホホワイト) (2 匹) に免疫した。約 3 ヶ月後、耳静脈から採血し、十分な抗体価が得られていることを ELISA により確認した。なお、17 種類の核内受容体に対する抗体 (11 種) について、作製を外注した。

(5) 抗体の精製

ウサギより採血した血液 30 ml を 37°C で 1 時間、その後、4°C で終夜インキュベートした。遠心分離により血清と血餅を分画し、血清画分を抗血清とした。得られた抗血清を次に示す 2 段階で精製した。すなわち、まず、キャリアタンパク質 KLH に対する抗体を免疫沈降により除去し、次いで合成ペプチドを用いてアフィニティ精製した。

① 免疫沈降：最終濃度 0.5 mg/ml となるように 5 mg/ml の KLH 水溶液を粗血清に加えて、4°C で終夜インキュベートした。沈殿してくる抗 KLH 抗体複合体を遠心分離で除去した。この操作は、KLH 水溶液を加えても沈殿が析出してこなくなるまで繰り返し行った。

② アフィニティ精製

アガロース担体にヨードアセチルが架橋したゲル (SulfoLink Coupling Gel : Pierce 社) に Cys(SH)-ペプチドを反応させ、抗原ペプチドを架橋したゲル担体を調製した。これをアフィニティ担体としたアフィニティクロマトグラフィーにより抗体を精製した。

③ プロテイン A アフィニティ精製

Protein A を共有結合させたアガロースビーズ担体のカラム (Protein A AffinityPak™ Columns : Pierce 社) を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより、抗体の IgG 成分を精製した。

(6) 調製した抗体の核内受容体に対する応答の解析

調製した抗体の核内受容体に対する応答

を ELISA により調べた。核内受容体 (10^{-7} ~ 10^{-12} M, 90 μl) を天然リガンド (10^{-6} ~ 10^{-10} M もしくは 0 M ; 10 μl) 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 μl) 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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 50 $\mu\text{l}/\text{well}$) 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、405nm の吸光度を測定した。基質は、ABTS Peroxidase Substrate と Peroxidase Solution B を使用直前に当量体積ずつ混合して調製し、添加量は 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ とした。

(7) センシングアッセイ

核内受容体 (40 nM, 90 μl) に対して化学物質 (10^{-11} ~ 10^{-5} M, 10 μl) を室温で 1 時間反応させ、リガンド-受容体複合体を調製した。この溶液をあらかじめ調製した抗原ペプチドをコートした 96 穴イムノプレートに移した。プレートの調製はウシサイログロブリンに結合した抗原ペプチドをプレートに吸着 (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 50 $\mu\text{l}/\text{well}$) させ、室温 1.5 時間インキュベート後、洗浄し、ELISA キット (ELISAmate, KPL 社) 付属の BSA Diluent/Blocking Solution Concentrate を 10 倍に希釈したものによるブロッキングにより行った。リガンド受容体複合体溶液を移した 96 穴イムノプレートにセンシング抗体溶液 (10 $\mu\text{l}/\text{well}$) 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 μl) を加えて室温で 1 時間反応させた。溶液を捨て、プレートを洗浄後、過酸化水素/ABTS を基質とした酵素反応により溶液を発色させた。基質は、ELISA キット付属の ABTS Peroxidase 基質と Peroxidase Solution B を使用直前に当量体積ずつ混合して調製し、

添加量は 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ とした。405 nm の吸光度を測定してプレート上のペプチドに結合した抗体量を定量した。

(8) センシングアッセイの解析法

受容体のコンホメーション変化量（抗体応答）は、基準のリガンドに対する相対値として、プレートに残存する 2 次抗体の酵素活性値の測定値から、次式により算出できる。

$$D(\%) = (A - B) \times 100 / (C - B)$$

- D: コンホメーション変化量（抗体応答）
 A: 受容体および試験化学物質を添加したときの測定値
 B: 受容体のみ添加したときの測定値
 C: 受容体および過剰量の女性ホルモンを添加したときの測定値

EC_{50} 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 (EC_{50}) 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、 EC_{50} 値は化学物質と受容体との結合の強さの指標となる。

(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、

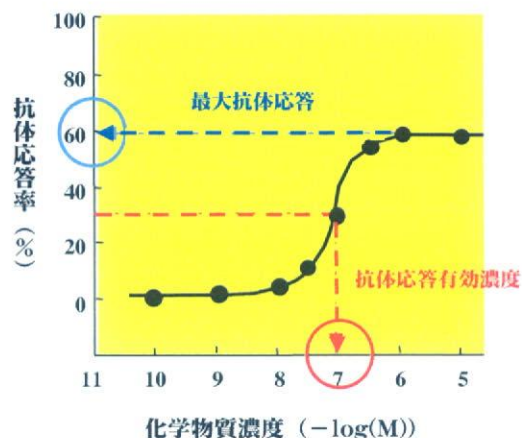


図 4. 受容体コンホメーション変化センシングアッセイの解析

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 μl に対して化学物質溶液 10 μl 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) のようなインバースア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スア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、17 β -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須な要件である。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)。

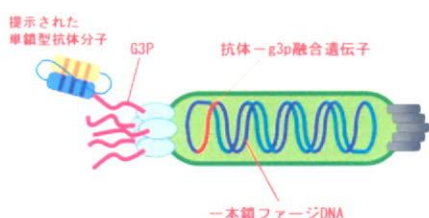


図 5. ファージ抗体の構造

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

抗原ペプチドをイムノチューブに加えて固定化した。洗浄後、2%スキムミルク-PBS (MPBS) にてブロッキングを行った。図 6 に従い 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 ライブラリーを加え、2 時間反応させた。洗浄後、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、2×TY 培地に植菌して対数増殖期にまで 37°C で震盪培養した。遠心により培地を除いた後、2×TY で再度菌体を懸濁させ、KM13 ヘルパーファージを添加した。遠心して上清を除去した後、2×TY 培地で菌体を懸濁させ培養した。パッケージ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 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

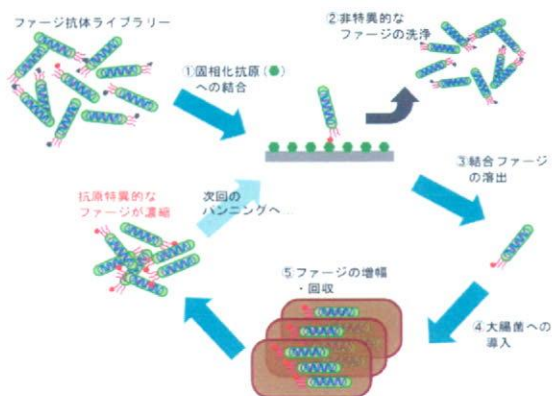


図 6. バイオパンニング

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

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 $\mu\text{g/ml}$ を固定化抗原とした scFv-ELISA を行った。まず、各 100 μl の 2×TY 培地にモノクローナル化したシングルコロニーを植菌し、培養した。培養液を各 100 μl の 2×TY 培地に植菌し、培養後、2×TY 培地 (含 0.3 mM IPTG) を添加して培養後、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、希釈率を下げて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) 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 7 に抗体応答有効濃度 EC_{50} (M) と受容体結合試験から評定

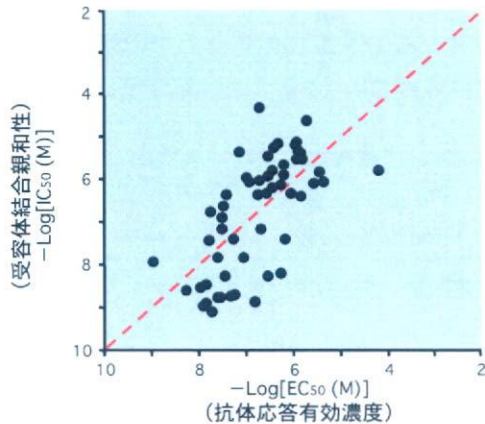


図7. 抗体応答有効濃度と受容体結合能

される受容体結合能 IC_{50} (M) の良い正の相関性を示す。

当初に受容体センシング抗体法によって、ER について分析された 503 化学物質のうち 390 種は、抗体に全く感応しなかった。感応した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(約20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(約20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(約30種)、そして、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、大部分の不活性な化学物質 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はすべて、第4グループ、あるいは第5グループに属した。現時点での順位付けを合計62種類について表1に示す。

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、もし最も特異的な抗体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と思われる。この進化改良法をERについて実施した。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な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9)。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。

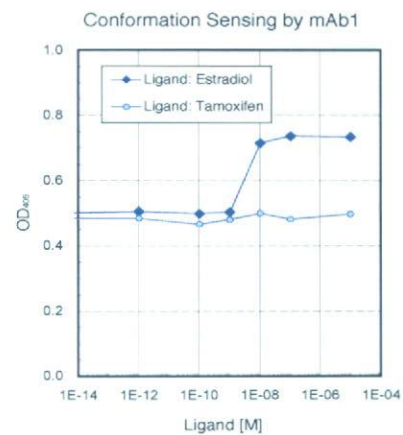


図8. 17β -エストラジオール(E2)特異的センシングモノクローナル抗体mAb1

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10)。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ように、主に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

表 1. ポリクローナル抗体によるエストロゲン受容体センシング抗体アッセイの結果
抗体応答有効濃度および最大抗体応答性

順位	化合物名	抗体応答有効濃度 (nM)	最大抗体応答性 (%)	順位	化合物名	抗体応答有効濃度 (nM)	最大抗体応答性 (%)
1	Diethylstilbestrol Dipropionate	1.03	41.0	33	Estriol 3-methylether	269	79.7
2	Estrone	4.88	38.0	34	Nafoxidine	273	34.0
3	Hexestrol	10.1	54.0	35	17 α -Ethynelestrodiol-3-cyclopentaether	274	97.3
4	17-Epiestriol	11.6	102	36	Daidzein	324	38.0
5	Estriol	13.0	113	37	2,4,4'-Trihydroxybenzophenone	329	64.9
6	Diethylstilbestrol	13.5	79.0	38	5 α -Dihydrotestosterone	363	77.0
7	16-Ketoestradiol	14.9	64.4	39	Norethindrone	490	77.7
8	16 α -Hydroxyestrone	16.9	63.6	40	β -Zearalenol	506	47.0
9	Ethynyl estradiol	17.1	91.0	41	Isoliquiritigenin	555	42.1
10	Diethylstilbestrol	22.9	74.1	42	4,4-Dihydroxydiphenyl	565	65.1
11	17 β -Estradiol	23.1	100	43	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-n-pentane	608	12.0
12	6 β -Hydroxyestradiol-17	23.3	42.0	44	4,4'-Dihydroxybenzophenone	610	56.9
13	6-Ketoestradiol	27.2	73.0	45	6-hydroxy-2-naphthylidene	716	37.0
14	β -Zearalenol	28.3	43.0	46	<i>p</i> -naphtholbenzein	833	42.0
15	Mestranol	29.2	82.0	47	6-hydroxyflavanone	969	43.0
16	α -Zearalenol	30.1	61.0	48	3',4',7-Trihydroxyisoflavone	1040	45.3
17	17 α -Estradiol	10.1	54.0	49	2,3,4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	1190	48.2
18	Dehydrostilbestrol	32.9	61.0	50	β -Estradiol-3-benzoate	1250	89.4
19	Coumestrol	35.8	61.0	51	Kaempferol	1280	50.6
20	6 α -Hydroxyestradiol	42.3	73.0	52	Norethynodrel	1360	109
21	Equilin	48.3	50.1	53	4-Cyclohexylphenol	1420	33.0
22	Estrone 3-hemisuccinate	54.6	31.9	54	6-Benzoyl-2-naphthol	2050	10.6
23	2-Methoxy- β -estradiol	67.4	80.7	55	Nonylphenol	2470	30.0
24	4-Hydroxyestradiol	81.0	85.0	56	6-Ketoestradiol-6-(<i>o</i> -carboxymethyl)oxime	3310	104
25	2-Hydroxyestriol	94.3	91.0	57	Levonorgestrel	3610	52.9
26	Estrone acetate	106	38.2	58	2,2-Bis(4-hydroxy-3-methylphenyl)propane	4080	78.0
27	5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	107	92.0	59	Benzyl-4-hydroxybenzoate	7660	112
28	2-Hydroxyestradiol	144	88.0	60	Triphenylethylene	8090	58.0
29	Genistein	175	56.0	61	4,4'-Dihydroxydiphenylmethane	55400	44.0
30	4,4'-Dihydroxytetraphenylmethane	177	41.0	62	4-Octylphenol	133000	48.0
31	4-(1-Adamantyl)phenol	194	51.0				
32	4,4'-Thiobis-phenol	241	58.9				

〔注〕上記の順位は抗体応答有効濃度 EC₅₀ (M) に基づいて付けられている。現在までに総計 800 種類を超える化学物質を調べているが、当初のランキングを変えるものは現れていない。

表 2. モノクローナル抗体 mAB1 によるエストロゲン受容体センシング抗体アッセイの結果：抗体応答有効濃度および最大抗体応答性

化合物名	抗体有効濃度 (log[EC ₅₀])	最大抗体 応答性	化合物名	抗体有効濃度 (log[EC ₅₀])	最大抗体 応答性
16-ketoestradiol	-8.93	1.08	17 α -ethynylestradiol- 3-cyclopenta ether	-7.66	1.27
17 β -estradiol	-8.65	1.00	diethylstilbestrol dipropionate	-7.39	0.80
ethynyl estradiol	-8.63	1.28	estrone	-7.34	0.46
diethylstilbestrol	-8.63	1.09	2-methoxy- β -estradiol	-7.31	0.96
17-epiestriol	-8.58	0.97	norethindrone	-7.15	1.10
α -zearalenol	-8.57	0.79	4-hydroxyestradiol	-7.07	0.72
6 α -hydroxyestradiol	-8.52	0.91	coumestrol	-7.07	0.94
6-ketoestradiol	-8.50	0.86	β -estradiol-3-benzoate	-7.04	1.18
dihydroxytetraphenylmethane	-8.49	0.13	3',4',7-trihydroxyisoflavone	-7.00	1.16
17 β -estradiol	-8.48	1.00	genistein	-6.81	0.76
17 α -estradiol	-8.48	1.00	6-ketoestradiol-6- (o-carboxymethyl)oxime	-6.70	1.01
16 α -hydroxyestrone	-8.47	0.96	norethynodrel	-6.66	1.12
estriol	-8.44	0.82	4-cyclohexylphenol	-6.66	0.40
6 β -hydroxyestradiol-17 β equilin	-8.39	1.04	isoliquirtigenin	-6.63	0.98
4-(1-adamantyl)phenol	-8.38	0.72	4,4'-dihydroxydiphenyl	-6.56	0.68
diethylstilbestrol	-8.25	0.96	4,4'-thiobis-phenol	-6.54	0.24
estrone 3-hemisuccinate	-8.20	0.50	5 α -dihydrotestosterone	-6.52	1.40
estriol 3-methyl ether	-8.13	0.89	4,4'-dihydroxydiphenyl- methane	-6.43	0.25
mestranol	-8.10	1.04	2,3,4,4'-tetrahydroxy- benzophenone	-6.20	0.83
dehydrostilbestrol	-8.04	0.79	2,4,4'-trihydroxybenzo- phenone	-5.98	1.08
5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	-7.99	1.05	β -zearalanol	-5.97	0.83
2-hydroxyestriol	-7.89	0.80	kaempferol	-5.96	0.75
			daizein	-5.32	1.22

モノクローナル抗体 mAB1 でのアッセイ結果であり、順位を示す番号付けはしていない。抗体応答有効濃度 EC₅₀ (M) の小さい順番、すなわち、受容体結合性の強い順番に、左上から右下まで並べている。

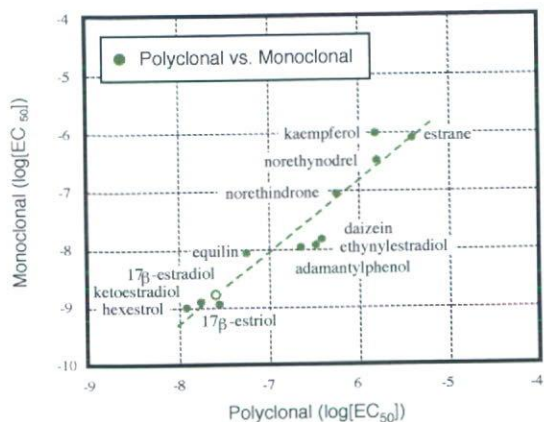


図9. ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いた時のセンシング抗体法における抗体応答有効濃度の相関性

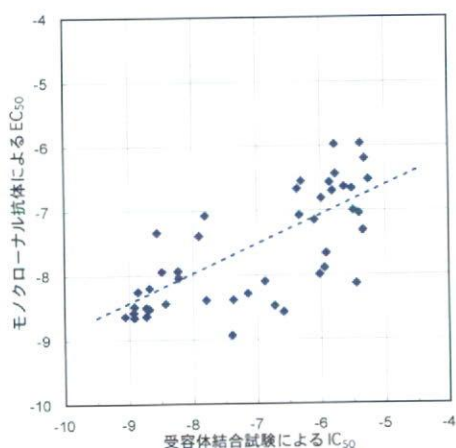


図10. 抗体応答有効濃度と受容体結合能との間の正の相関性

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に示した。

(2) 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（2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。

(3) 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ERα、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、18年度には12種、19年度にも21種、合計44種類の核内受容体について取組んだ。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、LBDにおける第12ヘリックス相当部分を含む抗原ペプチドを設計し（図11）、これらを合成した。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。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。

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。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。

(4) 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。

最初の段階で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。

この標準的なセンシング抗体アッセイによって改めて分かったことは、ビスフェノール A の ERR γ に対する結合性が強く、特異的であるかということである。ただし、ビスフェノール A の ERR γ に対する応答性はインバーサントゴニストとして測定したものであり、自発活性化型核内受容体における活性である。

既実施した ER α に対するセンシング抗体アッセイにおいて、ノニルフェノールと *tert*-オクチルフェノールは順位付けでそれぞれ 55 位、62 位である (表 1)。これらより強い化合物がいくつも存在するが、いずれもその応答性は天然のホルモンに比べるとかなり弱い。代表的なイソフラボンであるゲニステインはポリクローナル抗体を用いたアッセイ、モノクローナル抗体を用いたアッセイで、最大抗体応答性は 60~70%あるものの、受容体結合性に対応する抗体有効濃度では E2 に比較して約 100 倍弱い。ビスフェノール A は ER α に対するセンシング抗体法ではまったく不活性である。

NR3A1_ER α _	YSMKCKNVPLYD <u>LLLEMLDAHRLHAP</u> TSRG 490
NR3A2_ER β _	LNMKCKNV <u>PVYD</u> LLLEMLNAHVL <u>RGCK</u> SSI 490
NR3B2_ERR β _	YSVKLQGVPMHKLFLEMLEAKAWARADSLQ 490
NR3B3_ERR γ _	YNIKLEGKVPMHKLFLEMLEAKV----- 482
NR3B1_ERR α _	YGVKLEGKVPMHKLFLEMLEAMMD----- 483
NR3C1_GR_	FQTFDLD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 489
NR3C2_MR_	FYTFRESHALKVEFPAMLVEIISDQLPKVES 490
NR3C3_PR_	LNTFIQRALSVEFPEMMEVIAAQLPKILA 490
NR3C4_AR_	FDLLIKSHMVSDFPEMMAEIIISVQVPKILS 490
NR2A1_HNF4 α _	QFKLFGMAKIDNLLQEMLLGGSPSDAPHAH 490
NR2A2_HNF4 γ _	QFVKLFGMVKIDNLLQEMLLGGASNDGSHLH 490
NR2B1_RXR α _	FFFKLIQDTPIDTFLMEMLEA----- 480
NR2B2_RXR β _	FFFKLIQDTPIDTFLMEMLEA----- 480
NR2B3_RXR γ _	FFFKLIQDTPIDTFLMEMLET----- 480
NR2C1_TR2_	FFKGLIGNIRIDSVIPHILKMEPADYNSQII 490
NR2C2_TR4_	FFTGILGNVSIDSIIPIYLKMETAEYNGQIT 490
NR2E1_TLX_	FFKKTIGNVPIRLLSDMYKSSDI----- 483
NR2E3_PNR_	FFRKTIGNTPMEKLLCDMFKN----- 480
NR2F1_COUPTFI_	FFVRLVGKTPIETLIRDMLLSGSSFNWPYMS 490
NR2F2_COUPTFI_	FFVRLVGKTPIETLIRDMLLSGSSFNWPYMA 490
NR2F6_EAR2_	FFMRLVGKTPIETLIRDMLLSGSTFNWPYGS 490
NR0B1_DAX1_	FFRPIIGTVSMDMMLEMLCTKI----- 482
NR0B2_SHP_	FFRPIIGDVIDIAGLLGDMLLLR----- 481
NR5A1_SF1_	YHKHLGNEMPRNLLIEMLQAKQT----- 483
NR5A2_LRH1_	YYKHLNGDVPYNNLLTEMLHAKRA----- 483
NR1A1_TR α _	LHMKVECP-----ELFPPLFLEVFEDQEV--- 484
NR1A2_TR β _	LHMKVECP-----ELFPPLFLEVFED----- 481
NR1B1_RAR α _	ITLKMEIP-----GSMPLLIQEMLENSEGLDT 486
NR1B2_RAR β _	ITLKMEIP-----GSMPLLIQEMLENSEGHPEP 486
NR1B3_RAR γ _	ITLKMEIP-----GMPPLIREMLENPEMFED 486
NR1C1_PPAR α _	QIKKTETDAA-----LHPLLQEIYRDMY----- 483
NR1C2_PPAR β _	QRIKKTETETS-----LHPLLQEIYKDMY----- 483
NR1C3_PPAR γ _	QVIKKTETDMS-----LHPLLQEIYKDLY----- 483
NR1D1_Reverb α _	LSFRVDAQ----- 467
NR1D2_Reverb β _	LAFKVHP----- 466
NR1F1_ROR α _	MAFKAIYVDIVRLHFPPLYKELFTSEFEPAM 490
NR1F2_ROR β _	QVFKQSHPEIVNTLFPPLYKELFNPDCAATGC 490
NR1F3_ROR γ _	QIFQHLHPIVVQAAFPPLYKELFSTETESPV 490
NR1H2_LXR β _	FALRLQ-----DKKLPLLSEIWDVHE----- 481
NR1H3_LXR α _	FALRLQ-----DKKLPLLSEIWDVHE----- 481
NR1H4_FXR_	MSWRVN-----DHKFTPLLCEIWDVQ----- 480
NR1I2_PXR_	RLLRIQ-----DIHPFATPLMQELFGITGS----- 484
NR1I3_CAR_	QIQHTQ-----GLS-AMMPLLQEICS----- 479
NR1I1_VDR_	RCLSFQP-----ECSMKLTPLVLEVFEGNEIS----- 485
NR4A2_NURR1_	FYLKLEDLVPPPAAIDKFLDLTLPF----- 484
NR4A3_NOR1_	FYLKLEDLVSPSSIIDKFLDLTLPF----- 484
NR4A1_NGFIB_	FYLKLEDLVPPPPIIDKIFMDTLPF----- 484
NR6A1_GCNF_	LEQLPLLFKVVHLHSCKTSVGKE----- 481

図 11. 核内受容体 LBD $\cdot\alpha$ ヘリックス 12 領域のアミノ酸配列アラインメント
下線部分がヘリックス 12 相当部分。

表 3. ヒト核内受容体 48 種の一覧リスト

TR α	LXR α	TR2	GR
TR β	LXR β	TR4	MR
PPAR α	Rev-erb α	hTLL	PR
PPAR β	Rev-erb β	PNR	AR
PPAR γ	CAR	Coup-TF1	TR3
VDR	PXR	Coup-TF2	Nurr1
RAR α	FXR	EAR2	NOR1
RAR β	HNF4 α	ER α	SF1
RAR γ	HNF4 γ	ER β	LRH1
ROR α	RXR α	ERR α	GCNFI
ROR β	RXR β	ERR β	DAX1
ROR γ	RXR γ	ERR γ	SHP

* グレーの 2 種は抗体調製も抗体価が得られない核内受容体。

表 4. ヒト核内受容体に対する内分泌かく乱化学物質のセンシング抗体法による応答性

	BPA	NP	tOP	TBT	FDE	FDC
ER α	-	+	+	-	-	-
ER β	-	+	+	-	-	-
AR	-	-	-	-	-	-
PR	-	-	-	-	-	-
GR	-	-	-	-	-	-
MR	-	-	-	-	-	-
ERR γ	++	-	-	-	-	-
TR α	-	-	-	-	-	-
TR β	-	-	-	-	-	-
RXR α	-	-	-	+	-	-
RXR β	-	-	-	+	-	-
PPAR α	-	-	-	-	-	-
FXR	-	-	-	-	-	-

BPA: ビスフェノール A、NP: ノニルフェノール、tOP: *tert*-オクチルフェノール、TBT: トリブチルスズ、FDE: フタル酸ジエチル、FDC: フタル酸ジシクロヘキシル。++: 内在性リガンドと同等か 1/10 程度の強い活性、+: 内在性リガンドと同等か 1/10~1/100 程度の活性、-: 不活性。

(5) 受容体タンパク質発現のための cDNA クローニング

核内受容体のセンシング抗体法アッセイには、それぞれの受容体タンパク質が必要である。現在市販されている核内受容体は 25 種類ほどあり、ほぼ半数でしかない。48 種すべてに対するセンシング抗体法を完成させるためには、残りの核内受容体についてタンパク質を供給できる必要がある。このため、cDNA クローニングで全長を発現できる系を構築するとともに、センシング抗体法アッセイ用にリガンド結合ドメイン (LBD) を GST に融合させたタンパク質を発現できる系を構築した。

市販されている核内受容体 25 種類についても大量に受容体タンパク質が必要となるので、これらについても同様に cDNA クローニングし、タンパク質発現系を構築することにした。現時点で 37 種類について cDNA クローニングが完了し、残り 11 種類についてもクローニング中である。

(6) 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。本課題では、ファージ抗体によるセンシング抗体法の 48 種核内受容体への展開を視野に入れ、まず、安定な抗体作製系の確立を目的として、生体内のほぼすべ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

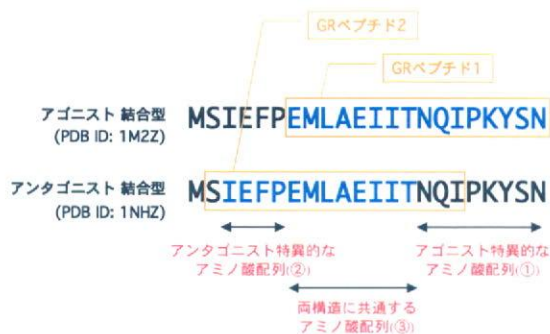


図 12. GR 抗原ペプチドの配列
青で示す配列が H12 を形成。2 つのペプチドにより③を認識する抗体を選別。

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。これらをモノクローン化した後、得られた 120 クローンについて GR-LBD による 1 次スクリーニングを実施した。1 次スクリーニングでは 3/120 クローンに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。

scFv ϕA 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。

この手法を他の受容体に展開するには、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が必要である。このため、平成 18 年度までに、GR を除いたステロイドホルモン受容体 8 種 (ER α 、ER β 、ERR α 、ERR β 、ERR γ 、AR、PR、MR) に対してバイオパンニングを展開した。

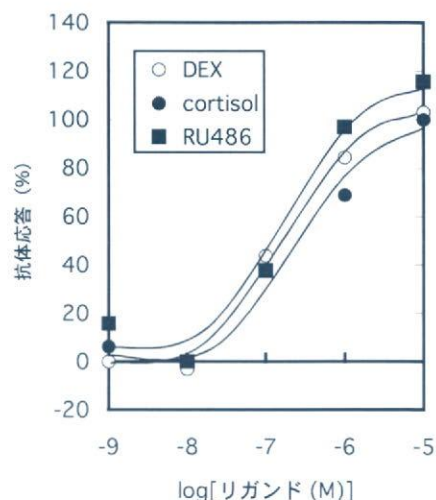


図 13. scFv ϕA によるコンホメーション変化センシングアッセイの結果

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。このため、ファージ抗体から scFv の作製を試みたが、18 年度までに scFv として機能するクローンは 1 つも得られていなかった。そこで、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ることにした。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った。19 年度に準備が進んでいた RAR α 、RAR β 、PPAR γ 、FXR、VDR、ER α を対象に scFv の取得を試みた。

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合計 3 回行った。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 14)。その結果、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ていることが判明した。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有意に濃縮されたことが示された。

scFv スクリーニングのために、バイオパンニングによって回収されたファージを

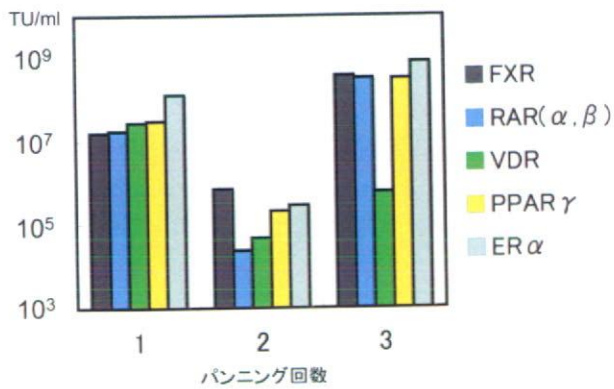


図 14. バイオパンニングによるファージ個体数の変化 (ファージのタイターチェック)

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力価を測定した。その結果、RAR α 、RAR 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 15)。一方、VDR、ER α 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。

(7) 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ーマを培養した。

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

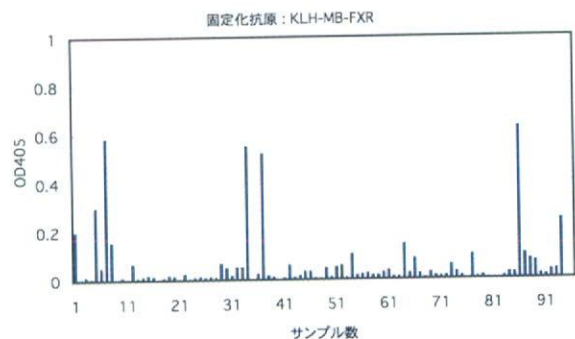
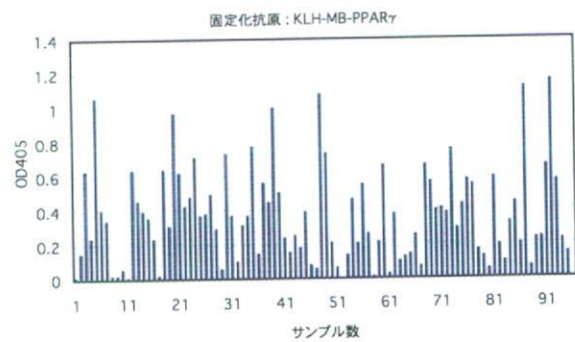
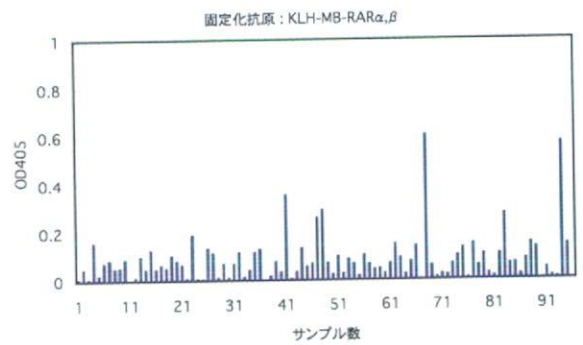


図 15. scFv スクリーニングの結果
上から RAR(α, β)、PPARγ、FXR

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 16) のクローンを得た。

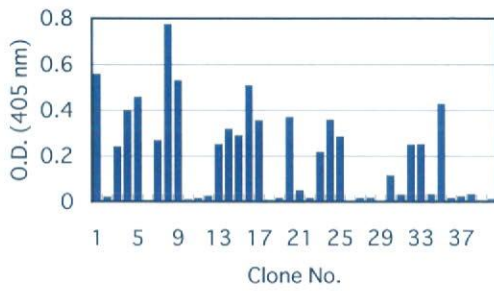


図 16. TR モノクローン化抗体の力価

得られたクローンについて、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17)。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(図17)。

このモノクローナル抗体は感度が高く(EC₅₀値 0.8 nM)、ポリクローナル抗体(EC₅₀値 7.6 nM)より約10倍も高かった(図18)。様々な化合物に対しての試験の結果は、ポリクローナル抗体と高い相関を示した(表5)。なお、内在性リガンドT3以外には受容体応答は見られなかった。

また、GRの2種、ARの4種のモノクローンについては、反応条件をいろいろと試みたが、受容体の構造変化を識別する条件を得ることはできなかった。

表 5. 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	—	—

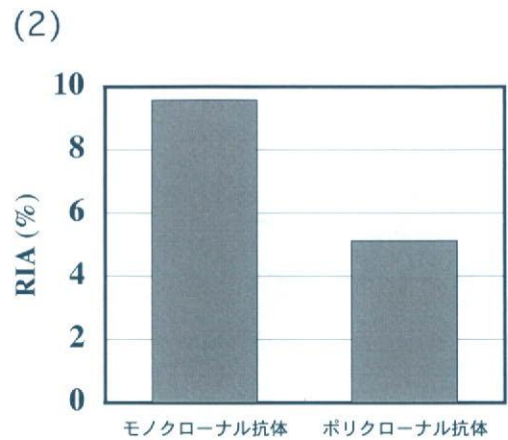
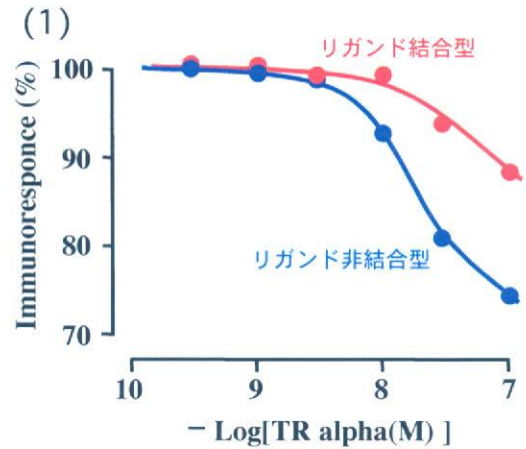


図 17 TR α モノクローナル抗体センシング試験

(1)受容体濃度変化、(2)TR α 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

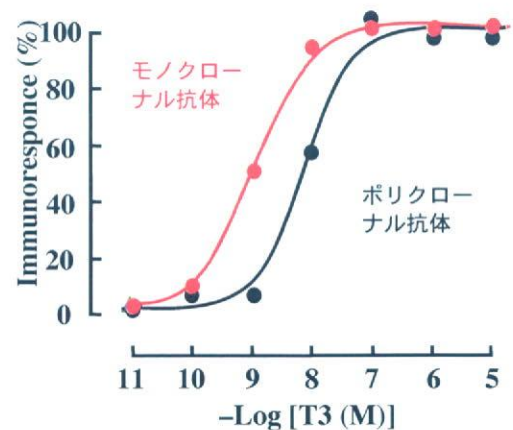


図 18 モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体の T3 濃度依存的な抗体応答

(8) エストロゲン関連受容体 γ (ERR γ) に対するセンシング抗体アッセイ

ポリクローナル抗体によるセンシング抗体アッセイにおいて、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、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、同時に受容体結合試験の確立にも取り組んだ。そして、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 (BPA) を発見するに至った。

ERR γ に対するポリクローナル抗体を調製するために、抗原を 2 つ設定し、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、抗#1 ペプチド抗体は抗原ペプチドを認識するものの、受容体を認識しなかった。一方、抗#2 ペプチド抗体は抗原ペプチドと受容体の両方を認識した。したがって、抗#2 ペプチド抗体をセンシング抗体候補として以後に実験に用いた。

ERR γ は自発活性化型核内受容体であり、インバースアゴニストである 4-OHT が結合して始めてコンホメーション変化する。そこで、本研究では 4-OHT を基準化合物として用い、4-OHT が引き起こす ERR γ のコンホメーション変化を抗体で感知・センシングする抗体アッセイ法として確立することにした。

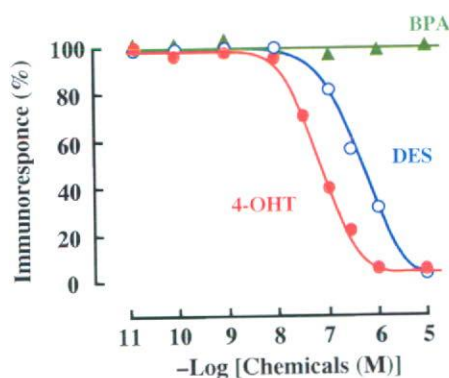


図 19 ERR γ センシング試験 (インバースアゴニスト活性)

4-OHT が ERR γ に結合するとき、4-OHT の濃度依存的な抗体応答が見られた (EC₅₀ 値は 62 nM) (図 19)。この応答は明らかに 4-OHT のインバースアゴニスト活性が引き起こすコンホメーション変化に抗体が感応していることを示すものである。一方、BPA が結合した ERR γ は活性コンホメーションにあるため、ERR γ 自身同様に抗体応答に変化がなかった (図 19)。

★ ERR γ に対するセンシング抗体アッセイ：インバースアゴニスト活性の評価

既に ERR γ に対するインバースアゴニストとして報告されている 4-OHT および Diethylstilbestrol (DES) は、図 26 で示されるように、センシング抗体法による試験においても基盤構成活性を濃度依存的に阻害する活性、インバースアゴニスト活性を示した。その活性は EC₅₀ 値で 4-OHT が約 20 nM、DES が約 150 nM であり、その受容体結合活性にほぼ匹敵することが分かった。

内分泌かく乱化学物質として懸念されている BPA とその類縁化合物 BPE や BPF を始めとして、代表的なフェノール色素、真性環境ホルモン、そして、ステロイドホルモンや植物エストロゲン等を含む 25 物質について ERR γ に対するセンシング抗体法によりインバースアゴニスト活性を調べた。その結果、表 6 に示されるように ERR γ のインバースアゴニスト活性は 4-OHT と DES にしか認められず、他の化合物はすべて不活性であった。4-OHT と DES はインバースアゴニストとして特有の機能構造を持っていることが分かった。また、BPA とそのアナログ・BPE (BPA の中央にある 2 個のメチル基のうち 1 個しかない誘導体) および BPF (BPA の中央にある 2 個のメチル基が両方ともない誘導体) は ERR γ に対する結合性を示す (BPE と BPA は共に非常に強いが、BPE が少し優れる。BPF は若干弱い)、インバースアゴニスト活性は見られなかった。

★ ERR γ センシングアッセイ (インバースアゴニスト活性)

ERR γ は自発活性化型核内受容体であり、ビスフェノール A (BPA) が結合しても何の構造変化も起こさない。同じ自発活性化に必要な生理活性コンホメーションになっている。