

川畑俊一郎、木村 誠、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ におけるビスフェノール A の π 系結合様式の解析、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

67. 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。

68. 劉 曉輝、徳永隆俊、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、部位特異的アミノ酸変異による内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A のエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) 結合部位の同定、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

69. 岡田浩幸、徳永隆俊、高 明香、劉 曉輝、松島綾美、下東康幸、エストロゲン関連受容体 γ 型と環境ホルモンビスフェノール A の構造活性相関研究、平成 19 年度日本生化学会九州支部例会、2007. 5. 19-20。

70. 磯野裕章、岡田浩幸、徳永隆俊、松島綾美、下東康幸、自発活性型核内受容体 ERR 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 44 回化学関連支部合同九州大会、2007. 7. 7。

71. 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。

72. 武田行正、劉曉輝、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノール A 受容体 ERR γ および dERR の発現解析、比較生理生化学会第 29 回大会、2007. 7. 6-8。

73. 武田行正、発現解析からのビスフェノール A 受容体 ERR γ を介した BPA の影響考察、第 7 回泉屋コロキウム、2007. 8. 5-6。

74. 徳永隆俊、自発活性化型エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) におけるコンホメーション変化センシング抗体アッセイ法の開発、第 7 回泉屋コロキウム、2007. 8. 5-6。

75. 劉 曉輝、変異による内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A のエストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) 結合の構造要因の解析、第 7 回泉屋コロキウム、2007. 8. 5-6。

76. 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. 5-6。

77. 錦織充広、レチノイド関連オーファン受容体 ROR α 、 β および γ のコンホメーション変化センシング抗体の作製、第 7 回泉屋コロキウム、2007. 8. 5-6。

78. 下東康幸、A strategy to explore the Target Receptor of Endocrine Disruptors、Estrogen-related Receptor γ (ERR γ) as a Genuine Acceptor of Bisphenol A、6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences、2007. 8. 21-25。

79. Matsushima, A., Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada, H., and Shimohigashi, Y., Estrogen-related receptor γ (ERR γ) as a special receptor for endocrine disruptor bisphenol A、The 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants - DIOXIN 2007、2007. 9. 2-7。

80. 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. 79。

81. 武田行正、劉曉輝、松島綾美、下東美樹、下東康幸、ビスフェノール A 受容体 ERR γ とそのアイソフォームのヒト脳および生殖器官における発現分布、第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007. 12. 11-15。

82. 松島綾美、角田佳充、寺本岳大、小柴琢己、川畑俊一郎、木村 誠、下東康幸、内分泌攪乱物質に結合するエストロゲン関連受容体 γ 型の活性化構造の解析、第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007. 12. 11-15。

83. 劉 曉輝、松島綾美、徳永隆俊、岡田浩幸、下東康幸、Chief and corroborative hydrogen bonds of endocrine disruptor bisphenol A phenol-hydroxy group to the human estrogen-related receptor γ with Arg316 and Glu275 residues、第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007. 12. 11-15。

84. 岡田浩幸、徳永隆俊、劉 曉輝、高柳明香、松島綾美、下東康幸、ビスフェノール A 誘導体によるエストロゲン関連受容体 γ 型の構造活性相関研究、第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会 合同大会、2007. 12. 11-15。

85. 徳永隆俊、劉 曉輝、岡田浩幸、松島綾美、下東康幸、ビスフェノール A はステロイドホルモン核内受容体 9 種うち ERR γ にのみ結合する、第 10 回環境ホルモン学会研究発表会、

2007. 12-10-11。

86. 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。

87. 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。

88. 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。

89. 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。

90. 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。

91. 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。

92. 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。

93. 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。

G. 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、核内受容体はリガンド結合ドメインにリガンドが結合することにより活性化される。そのリガンド結合ドメインは、12個の α -ヘリックス構造からなり、内分泌攪乱作用を有する化学物質もこのドメインに結合し攪乱作用を引き起こすと考えられている。これまでの研究で、代表的な核内受容体であるステロイドホルモン受容体においては、リガンド非結合（アポ型）、アゴニスト結合（ホロ型）、アンタゴニスト結合（ホロ型）の3つの状態において、それぞれ立体構造・コンホメーションが異なることが知られていた。ヒトゲノム解析により、ヒトには48種類の核内受容体の存在が明らかにされた。それら48種類の核内受容体それぞれにおいても、リガンドの結合した立体構造は、3つの異なるコンホメーションが存在すると想定されている。これまでの我々の研究において、受容体のアポ型からホロ型へのコンホメーション変化を抗体で感知・センシングする方法、センシング抗体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された。このセンシング抗体法の最も重要な分子ツールは、受容体のコンホメーション変化を高感度で感知するセンシング抗体である。このため、本分担研究において、このセンシング法の48種類の核内受容体への適用を図るために、センシング抗体をポリクローナル抗体として迅速に作製した。その結果、合計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調製した。また、立体構造未知の核内受容体の抗体エピトープのデザイン法を確立した。立体構造未知の核内受容体に対する抗体エピトープのデザインにあたっては、ホモロジーモデリングを実施し、核内受容体ヘリックス12に相当する部位を同定することにより行った。

A. 研究目的

核内受容体は、生体内において特異的なリガンド・ホルモンと特異的に結合することにより活性調節を受ける転写因子の一つのグループである。性ホルモン受容体である女性ホルモン受容体や男性ホルモン受容体などがこのグループに含まれている。従来の環境ホルモン問題においては、環境化学物質の暴露によって最も顕著に影響を受ける核内受容体として、女性ホルモン（エストロゲン）受容体 α （ER α ）が注目されてきた。これは、ER α は主に生殖に関与し、野生生物において多くの生殖異常が発見された事実から、人類においてもER α を介したかく乱作用は子孫、特に個体数の減少に直結

すると考えられていたからである。しかしながら、ヒトゲノム解析研究の結果から、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ている。現在、それらの核内受容体すべてに対する天然および合成リガンドは判明してはいないが、核内受容体タンパク質の立体構造およびアミノ酸配列解析の結果は、すべての核内受容体においてリガンド既知の性ホルモン受容体を含むステロイド受容体の活性化機構と類似の活性化機構が存在することを示唆した。特に、本研究班の下東らが明らかにした、女性ホルモン関連受容体 ERR γ へのビスフェノール A の結合性が判明するなど、これらすべての核内受容体に対する環境化学物

質・環境ホルモンの影響が懸念され、それらの影響を検討する必要性が生じた。本研究においてはヒトの核内受容体 48 種類すべてを対象に研究を行うこととした。

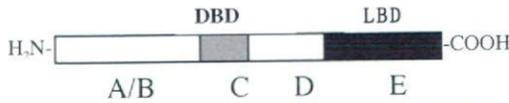
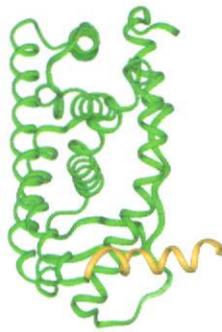
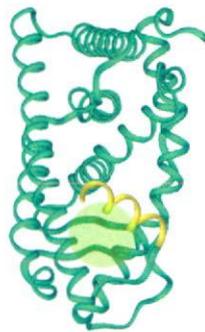


図 1. 一般的な核内受容体のドメイン構造
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

1) リガンド無し
(アポ型)



2) アゴニスト結合
(ホロ型)



3) アンタゴニスト結合 (ホロ型)

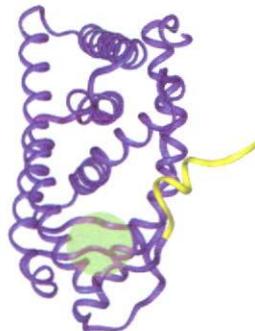


図 2. X線結晶構造解析結果に基づく一般的な核内受容体 LBD の構造変化

この核内受容体ファミリーに属する受容

体タンパク質は互いに高いアミノ酸配列相同性を示し、共通のドメイン構造を持つ。そのドメイン構造は A-E 領域に分けて考えられており、内分泌かく乱作用は特異的なリガンド・ホルモンの結合に関与する E の領域・リガンド結合ドメイン (Ligand Binding Domain: LBD) で主に生じると考えられている。(図 1)

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

これまでに X 線結晶構造解析の結果が報告された核内受容体の立体構造から次のような立体構造の変化が推定されている。リガンドが LBD に結合することに伴い、ヘリックス 1 2 部分構造を大きく変化させる (図 2)。リガンド無し (アポ型) の LBD にアゴニストが結合したり (ホロ型 2)、アンタゴニストが結合 (ホロ型 3) することによって、LBD の C 末端に存在するヘリックス 1 2 が大きく位置取りを変化させる。このヘリックス 1 2 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。本分担研究においては、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。

本研究では、合計 40 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 1 2 相当部分のアミノ酸配列解析を実施し、同定したヘリックス 1 2 部分を含む抗原作製用ペプチドをデザイン・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O2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・Modelerを用いて、構造未知の受容体LBDに対してアミノ酸配列の相同性が高く、かつ立体構造既知の核内受容体をPSI-BLASTで探索し、その中から相同性高い3種類の立体構造を鋳型構造として用い、立体構造を構築した。

⑤ 抗原ペプチドの合成

構造解析により同定した受容体の第12ヘリックスを含むC端部分に相当する断片ペプチドをエピトープとして設定し、このペプチドをFmoc固相法により合成した。タンパク質担体との結合のために、抗原配列中にシステインを持たないペプチドのN末端にシステインを加えたペプチドとした。合成粗生成物をゲルろ過 (Sephadex G-25, $\phi = 1.8$ 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、HPR 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) 発色させることにより 405 nm の吸光度をプレートリーダー検出した。

⑬ 受容体タンパク質の調製

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

(倫理面への配慮)

本研究課題では、抗体を作成するに当たり、ウサギを実験動物として使用する。こうした実験動物はきちんと管理された環境下で飼育され、また、飼料、飲料水、さらには清浄空気を供するなど、十分な動物愛護の配慮のもとで実験に用いられている。また、採血等に際しても麻酔をするなど痛みの無いように配慮するなど、倫理面の問題が生じない状況で行っている。所属部局・理学研究院においては「動物実験審査」システムが確立されており、本研究は審査を承認の上許可された。

一方、内分泌かく乱性の可能性のある化学物質を多種取り扱うが、量的には極めて微量であり、しかも、スクラバー付属のドラフトチャンバーが設備されており、特に危険性は無い。また、揮発性試薬に対応するドラム式換気装置を実験室に備えている。

C. 研究結果

本研究で用いるセンシング抗体は、受容体のリガンド結合に伴う構造変化を感知する。そのセンシング抗体は核内受容体 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、本研究において重要な部分を占めるが、現在のところ全ての核内受容体 LBD の立体構造は決定されていない。しかし、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は (HNF4 α と HNF4 γ など)、サブタイプ間のアミノ酸配列相同性に基づき、ヘリックス 1 2 部分を同定した。

一方、立体構造が判明していない受容体については、アミノ酸配列相同性解析によりアミノ酸配列の類似性が最も高く、立体構造が判明している受容体 3 種類を鋳型構造として、ホモロジーモデリングソフトウェア「Modeler」により立体構造を構築した。それを基に、ヘリックス 12 領域を同定し、その前後の構造から抗体作製に有用な延長部分を決定して、エピトープとした。

抗原ペプチドの合成は、自動固相合成機による Fmoc アミノ酸を用いた HBTU-HOBt 法で行った。今回合成した数種類のヘリックス 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。

本分担研究においては、ポリクローナル抗体をウサギに免疫して作製した。得られた抗血清より抗体画分を調製して、抗体力価を検討した。現在までに力価の検討が終了したものは 38 種類の抗体である (表 1)。

SF-1 および 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。それらについては、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

本分担研究で作製したセンシング抗体は、核内受容体の LBD に存在するヘリックス 1 2 に対する抗体である。しかしながら、現在のところ核内受容体の立体構造は全てが解明されていないため、立体構造を予測することが必要となる。このため、本研究ではホモロジーモデリングを用いた。単純にアミノ酸配列のアラインメントからヘリックス 12 部位をおおまかに同定することは可能であるが、ヘリックス 1 2 のどの分子

面が溶液にさらされているか、もしくは、LBD との結合に用いられているかを推定することは、エピトープペプチドのデザインに有用な情報を与えた。

表1 ウサギポリクローナルとして作製されたセンシング抗体

TR α	LXR α	TR2	GR
TR β	LXR β	TR4	MR
PPAR α	Rev-erb α	TLX	PR
PPAR β	Rev-erb β	PNR	AR
PPAR γ	CAR	Coup-TF1	NGF1 β
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	GCNF-1
ROR β	RXR β	ERR β	DAX1
ROR γ	RXR γ	ERR γ	SHIP

白抜き：本分担研究で作製した 38 種
 黒文字：作成済みの 8 種
 灰色網かけ：再作製中

ウサギを用いたポリクローナル抗体の作製においては、ほとんどの受容体において抗体の作製に成功した。抗体が作製されなかったものについては、ウサギ自身の持つタンパク質とのアミノ酸配列の相同性が問題になっていることも考えられるため、エピトープの配列を大きく変更したり、ヘリックス 1 2 からエピトープ部位をずらすなどの対策が必要であると考えられた。

E. 結論

本分担研究により、38 種類の核内受容体 LBD 抗ヘリックス 1 2 ポリクローナル抗体が作製された。これまでに、作製されたものと合わせて、合計 46 種類の受容体に対するセンシング抗体が作製された。

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

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

3. Conformation Change of α -Helix Peptide for Sensing of Deactivation of Nuclear Receptor: Immunoassay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal α -Helix 12 of Estrogen-related Receptor γ (ERR γ) Takatoshi Tokunaga, Xiaohui Liu, Hiroyuki Okada, Ayami Mastushima, Takeru Nose, Miki Shimohigashi, and Yasuyuki Shimohigashi *Peptide Science* 2006, 176 (2006).

4. 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).

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

学会発表

1. 下東康幸、徳永隆俊、岡田浩幸、野瀬 健、中井 誠、矢加部芳州
 受容体コンホメーション変化センシング抗体法による受容体結合能およびホルモン活性の同時評価：黄体ホルモン・プロゲステロン受容体に対する化学物質の応答解析
 第8回環境ホルモン学会， 2005， 8.24～29

2. 徳永隆俊、渋谷あゆみ、浅井大輔、野瀬 健、中井 誠、矢加部芳州、毛利資郎、小泉 修、下東康幸
 高感度センシング抗体によるエストロゲン受容体-化学物質系のリスク評価
 徳永隆俊、渋谷あゆみ、浅井大輔、野瀬 健、中井 誠、矢加部芳州、毛利資郎、小泉 修、下東康幸

第8回環境ホルモン学会, 2005, 8.24-29。

3. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸
糖質コルチコイド受容体に対する内分泌攪乱作用性のコンホメーション変化センシング抗体法による評価

第8回環境ホルモン学会, 2005, 8.24-29。

4. 徳永隆俊、岡田浩幸、劉 曉輝、松島綾美、野瀬 健、下東康幸
男性ホルモン・アンドロゲン受容体と黄体ホルモン・プロゲステロン受容体におけるコンホメーションセンシングアッセイ

第78回日本生化学会, 2005, 10.19-22。

5. 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、松島綾美、野瀬 健、下東康幸
 α ヘリックス認識抗体による糖質コルチコイド受容体におけるリガンド依存的コンホメーション変化の識別

第78回日本生化学会, 2005, 10.19-22。

6. 徳永隆俊、岡田浩幸、野瀬 健、下東康幸
糖質コルチコイド受容体と黄体ホルモン受容体におけるC端 α -Helix 認識抗体を用いたコンホメーションセンシングアッセイ

第42回日本ペプチド学会, 2005, 10/27-29。

7. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイ法による核内受容体コンホメーション変化センシング抗体調製のための α -ヘリクスペプチド、第42回ペプチド討論会、2005.10.27-29。

8. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、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による糖質コルチコイド受容体における化学物質の内分泌攪乱作用性評価
第52回日本臨床検査医学会・第45回日本臨床化学会合同大会, 2005, 11/17-20。

9. 金森史花、岡田浩幸、野瀬 健、下東康幸
鉱質コルチコイド受容体を介した内分泌攪乱作用性評価のためのコンホメーション変化センシング抗体の作製
化学関連支部合同九州大会, 2006, 7.8

10. 徳永隆俊・劉 曉輝・岡田浩幸・松島綾美・野瀬 健・下東康幸

エストロゲン関連受容体 γ 型 (ERR γ) のコンホメーション変化センシング抗体アッセイ:ビスフェノール A の受容体応答活性第9回環境ホルモン学会, 2006, 11.11-12

11. 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。

12. 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。

13. 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。

14. 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。

15. 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。

16. 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・博士課程

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。平成 17 年度には、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。平成 18 年度には、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なかった。こうした問題点を解決するために、平成 19 年度には、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、BPA の標的受容体である ERR γ の機能解明に有効なツールとして期待される「抗 BPA 抗体」の作製を行い、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。このように、3 年間の研究によって、ファージディスプレイによるセンシング抗体作製の基盤が完成し、抗 BPA 抗体の作製に成功するなど、ファージディスプレイの特徴を生かした研究成果を得ることができた。

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年度より取り組んだ。

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

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、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

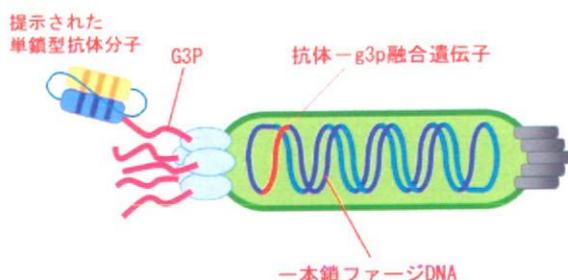


図1. ファージ抗体の構造

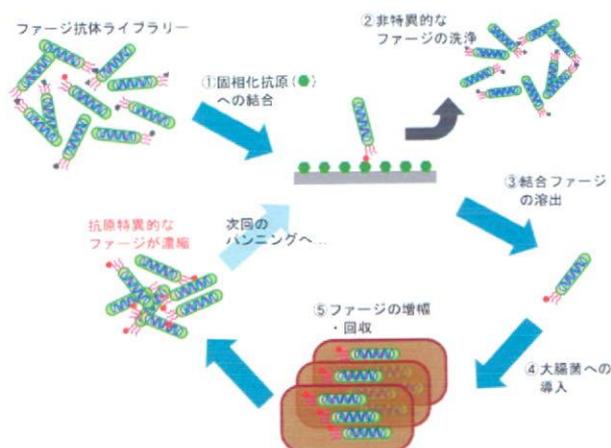


図2. バイオパンニング

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。ERαにおいては、より効率的に抗体を得るために、特異的なファージ粒子をさらに濃縮することを目的として4回繰り返したが、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 μg/ml in PBS) をイムノチューブ (Maxisorp, Nunc 社) に加え、終夜インキュベートして固定化した。洗浄後、2% スキムミルク-PBS (MPBS) にて2時間ブロッキングを行った。4 ml の MPBS 中に 5×

10¹² 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、トリプシン溶液 (1 mg/ml) を加えて、抗原に結合したファージを溶出させた。

溶出ファージを宿主菌 TG-1 に感染させ、培養プレートに播種した。育成したコロニー群を液体培地によって懸濁させ、50 ml の 2×TY 培地 (含 1% グルコース) に植菌して対数増殖期にまで 37°C で震盪培養した。遠心により培地を除いた後、10 ml の 2×TY で再度菌体を懸濁させ、5×10¹⁰ 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 PBS にて懸濁させた。得られたファージ液のうち 1 ml を次回のパンニングに使用した。2 回目のバイオパンニングについては、より高親和性の抗体を回収するために固定化抗原の濃度を 25 µg/ml とし、3 回目には 10 µg/ml と希釈した。さらに、ライブラリー反応後の洗浄操作を 2 回目以降は TPBS、PBS 共に 20 回と厳しく変更した。また、固定化抗原には、BthG 架橋体と KLH 架橋体を交互に使用することによって、ペプチドを特異的に認識するファージ抗体の選別・回収を行なった。

(3) ファージクローンのスクリーニング

3.1. 1 次スクリーニング

抗原ペプチドによるバイオパンニングに引き続き、受容体を用いた ELISA 法による 1 次スクリーニングを実施した。受容体 (100 µg/ml in PBS) を 96 穴プレート (Maxisorp, Nunc 社) に固定化し、洗浄後、MPBS にて 2 時間ブロッキングした。洗浄後、パンニング後のファージモノクローナル抗体を各ウェルに加え、1 時間反応させた。未結合の抗体を洗浄後、M13 ファージ認識二次抗体 (Pharmacia 社) により結合ファージ抗体を検出することにより受容体に特異的な結合能を持つファージクローンを探索した。得られたファージクローンに対して DNA シークエンス解析を実施し、提示された抗体分子のアミノ酸配列を確認した。

3.2. 2 次スクリーニング

抗原ペプチドを固定化し、受容体を競合剤として用いた競合 ELISA 法による 2 次スクリーニングを実施した。受容体のみを競合剤として用いた場合とアゴニストを結合させた受容体を用いた場合との間で抗体応答に差異のあるファージクローンを検定した。

(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、各種化合物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。

(5) scFv (単鎖型抗体) の発現検討

スクリーニングによってセンシング抗体として選定されたクローンからファージ抗体を作製し、対数増殖期の大腸菌 HB2151 株 (非サプレッサー株) に感染させた。これを大量培養し、IPTG で発現誘導後、菌体を回収した。得られた菌体を超音波処理によって破碎し、ここから Ni キレートカラムにより scFv のアフィニティ精製を行った。

(6) scFv でのスクリーニング

バイオパンニングによって回収したファージすべて (ポリクローナル状態) を、HB2151 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 µg/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/H₂O₂ 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。

(7) 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。

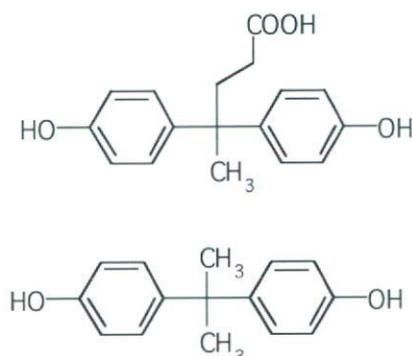


図3. ジフェノール酸 (上) とビスフェノールA (下) の構造

(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) グルコルチコイド受容体 (GR) センシング抗体の作製

3回目のバイオパンニングにおける溶出ファージの力価を調べた結果、 6.7×10^5 のファージが回収されたことが分かり、それらをモノクローナル化した後、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つのクローンにおいて有意に高い吸光度が検出され、特異的な結合が認められた。(図4)、それらクローンの DNA シーケンス解析を実施したところ、2つが同じクローンであることが判明し、得られたクローンが2つであった。この2クローンについて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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、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ファージ抗体を得ることに成就した (図5)。

得られたファージ抗体を用いて、センシング抗体法による化学物質評価を実施した。リガンドは、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 を使用した。その結果、

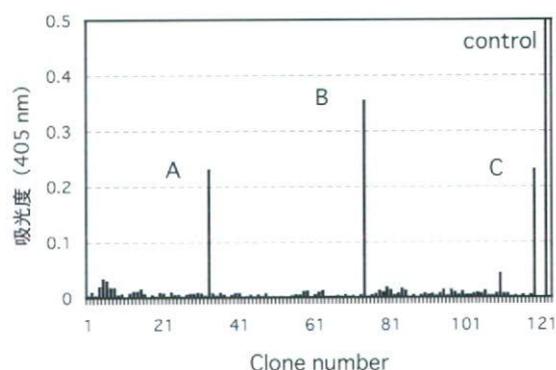


図4. 1次スクリーニングの結果 (GR)

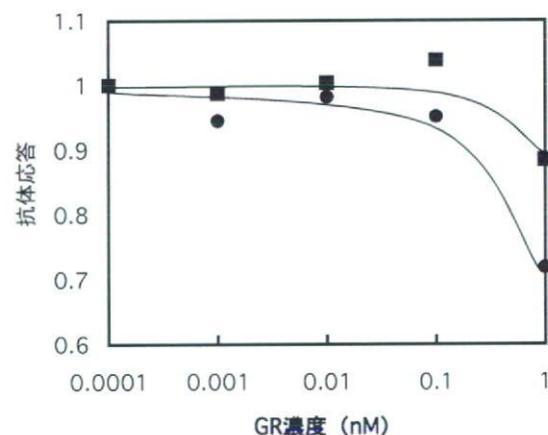


図5. 2次スクリーニング (GR) の結果

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 6)。本結果は、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。

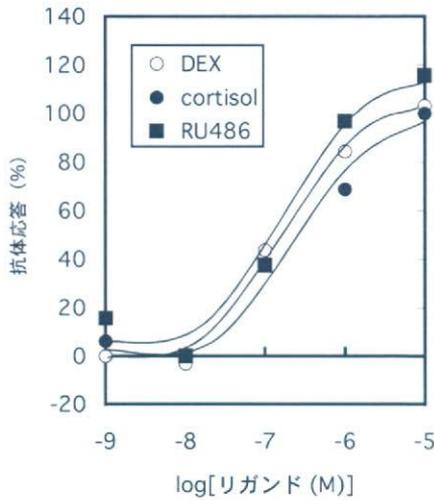


図 6. GR におけるコンホメーション変化センシングアッセイの結果

(2) エストロゲン受容体 (ER α) センシング抗体の作製

GR に続き、ER α のセンシング抗体の作製に着手した。その際、48 種の核内受容体を対象とした高効率な抗体作製系の構築のために、ER α ではパンニング回数を 4 回に増やし、特異的なファージ粒子をさらに濃縮することを試みた。4 回目のバイオパンニングにおける溶出ファージの力価を調べた結果、個体数 1.3×10^9 のファージが回収されたことが確認された。すなわち、GR でのバイオパンニングの結果と比較して、ER α では目的抗体を提示したファージ粒子がかなり濃縮された。実際に、1 次スクリーニングを実施した結果、実に 163/180 クローンが抗原ペプチドを特異的に認識した。

得られたファージクロンの DNA シークエンス解析を行なったところ、異なる単鎖型抗体を提示しているファージを 4 種同定することができた。これら 4 種のファージクローンからファージ抗体を調製し、力価の検討を行なった結果、いずれのファージ抗体も明瞭に抗原ペプチドを認識した (図 7)。しかしながら、GR で得られたファージ抗体の力価と同程度であり、バイオパンニングを 4 回繰り返すことの有効性は見られなかった。

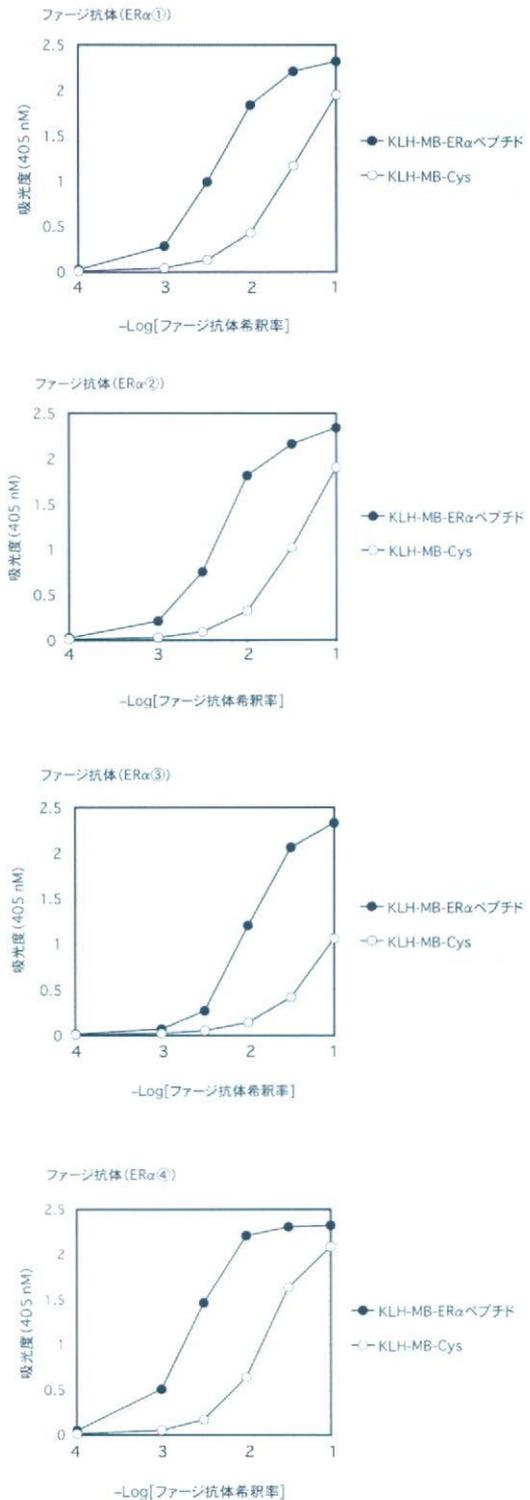


図 7. ER α のセンシングファージ抗体 4 種についての抗体力価の検討

バイオパンニングの回数を増やすことによって高親和性抗体を提示したファージを濃縮することを期待したが、結果として、回収されるファージに提示された抗体のパラエ

ティが単一成分に近づくだけであった。つまり、バイオパンニング後に回収されるファージクローンの個体数は増加したが、ほとんどが同一のクローンであった。

同様のバイオパンニングを、MR、ERR(α , β , γ)、PR、AR、RAR(α , β)、PPAR γ 、FXR、VDRについて実施し、それぞれ抗原ペプチドに特異的なファージクローンを得た。

(3) scFv (単鎖型抗体) の作製

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 (単鎖型抗体) 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。そこで、GR、ER α 、ERR(α , β , γ) 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、scFv として機能するクローンは1つも得られなかった。

(4) scFv での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力価を測定した。その結果、RAR(α , β)、PPAR γ 、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 8)。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。

(5) 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。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「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

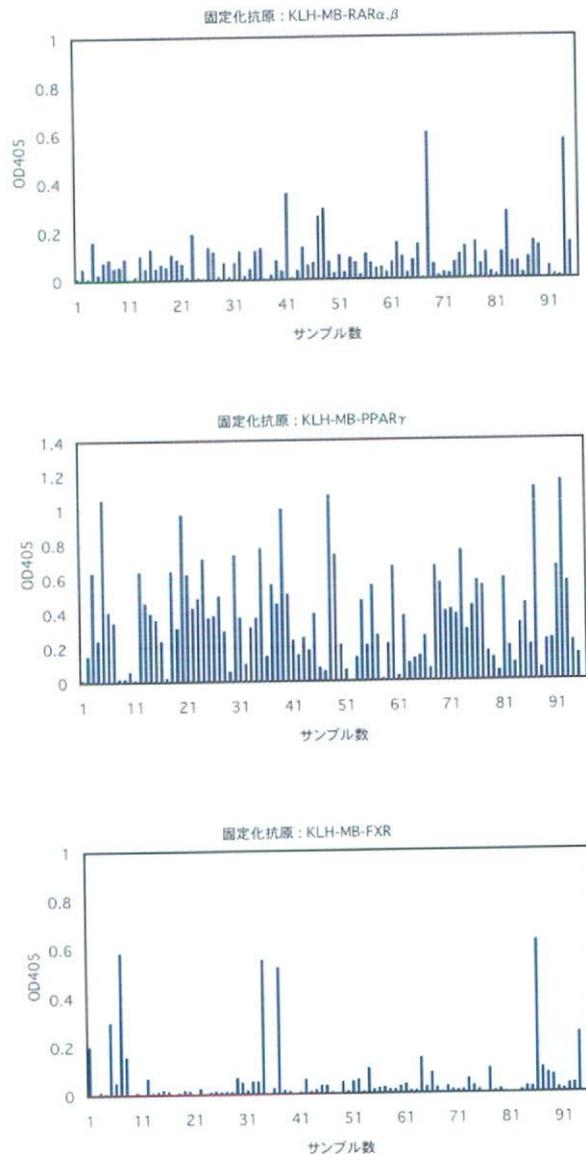


図 8. scFv スクリーニングの結果
上から RAR(α , β)、PPAR γ 、FXR

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、ファージ抗体 ELISA によるスクリーニングを実施した結果、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)。

D. 考察

平成 17 年度では、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

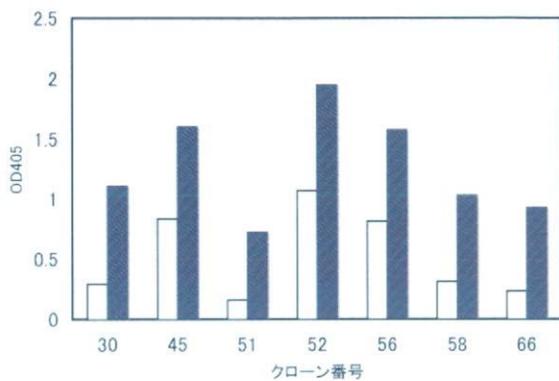


図6. BPA 構造を特異的に認識するファージ抗体 (□) キャリアタンパク質およびリンカーに対する抗体価、(■) 抗原に対する抗体価。

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、平成 18 年度には、本手法を ER α に展開した。その際、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、平成 18 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 (単鎖型抗体) 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。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。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。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とされ、本研究においても大きな問題となった。

そこで、平成 19 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クローン (ポリクローナルの状態) をまとめて HB2151 (非サプレッサー株) に感染させ、scFv の状態でスクリーニングを行うことにした。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。

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、平成 19 年度では、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「低分子化合物を認識する抗体」は、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。特に、動物免疫法で行うのは非常に難しく、この場合、ファージディスプレイ法は最適手法である。こうした抗体についても、バイオパンニングにおけるファージ回収方法を改良することで、BPA に特異的なクローンの選別に成功した。

E. 結論

平成 19 年度までに、全ての核内受容体を対象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 GR および 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、scFv によるスクリーニングの手法を確立し、RAR(α , β)、PPAR γ 、FXR、について機能性 scFv を得ることに成功した。これにより、ファージディスプレイによるセンシング抗体 (scFv) 作製法を確立することができ、残りの核内受容体について scFv を作製するのみである。また、抗 BPA 抗体の作製に成功するなど、ファージディスプレイの特色を活かした研究を展開することに成功した。この

ように、ファージディスプレイによる抗体作製系は、十分に機能する状態にまで成熟しており、これは3年間の研究による知識と技術の積み重ねによるものである。今後、得られたセンシング抗体および抗 BPA 抗体により、化学物質評価や ERR γ の機能解析の研究が大きく進展す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

- 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイによる核内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の作製、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。
- 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイ法による核内受容体認識モノクローナル抗体の調製、平成 17 年度日本化学会化学関連支部例会、2005. 7. 2。
- 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、Simultaneous Evaluation of Binding and Hormonal Activities of Human Glucocorticoid Receptor by the Sensing Assay for Receptor Conformation Change、11th International Asian Chemical Congress (11th ACC)、2005. 8. 24-26。
- 岡田浩幸、核内受容体コンホメーション変化センシングアッセイにおけるファージディスプレイ法の導入、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。
- 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、糖質コルチコイド受容体に対する内分泌攪乱作用性のコンホメーション変化センシング抗体法による評価、平成 17 年度環境ホルモン学会、2005. 8. 27-29。
- 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、Discriminative Recognition of Ligand-Dependent Conformation Change in the Human Glucocorticoid Receptor by Using the α -helix-recognizing Antibody、平成 17 年度日本生化学会大会、2005. 10. 19-22。
- 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイ法による核内受容体コンホメーション変化センシング抗体調製のための α -ヘリックスペプチド、平成 17 年度ペプチド討論会、2005. 10. 27-29。
- 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、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による糖質コルチコイド受容体における化学物質の内分泌攪乱作用性評価、第 52 回日本臨床検査医学会・第 45 回日本臨床化学会合同大会、2005. 11. 17-20。
- 金森史花、岡田浩幸、徳永隆俊、松島綾美、下東康幸、核内受容体コンホメーション変化センシングアッセイにおけるファージディスプレイ法の導入、第 6 回泉屋コロキウム、2006. 8. 21-22。
- 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 ERR 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。
- 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。
- 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。この3年の研究期間において、女性ホルモン・エストロゲン受容体（ER）のセンシング抗体アッセイ法を確立した。また、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、まず、TRについてコンホメーション変化を識別する高感度のモノクローナル抗体の調製に成功した。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った。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、詳細試験が必要なものを優先して実施することとした。

A. 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、自発活性化型核に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きている。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）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、自発活性化型核内受容体では始めからフタをした構造になっている。

自発活性化型核内受容体では、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。

ところで、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く、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実施することとした。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。

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、さらには、甲状腺ホルモン受容体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に取り組んだ。

B. 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の後、ポリエチレングリコールを添加して細胞を融合させた。遠心による洗浄後、HAT 選択培地で再懸濁し、これを 96 ウェル培養プレート 4 枚に播き込んで培養した。

(8) 抗体産生細胞のスクリーニング

培養上清を採取するため、培養開始後 10 日頃から生存が認められたウェル中の細胞を順次 DMEM 培地で継代培養し、その培養上清を回収した。培養上清に含まれる抗体を以

下の 2 段階のスクリーニングで検定した。

(9) ELISA 法による一次スクリーニング

抗原として用いたペプチドとキャリアタンパク質を 96 ウェルイムノプレート中に固相化し、ペルオキシダーゼ標識抗マウス二次抗体を用いた間接 ELISA 法を実施した。ペルオキシダーゼは H₂O₂ を基質として 2,2'-azinodi-[3-ethylbenz-thiazolone 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。

(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、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。

C. 研究結果

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 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。

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。ERR γ はリガンド非結合でも活性型構造を保ち、構成的活性を

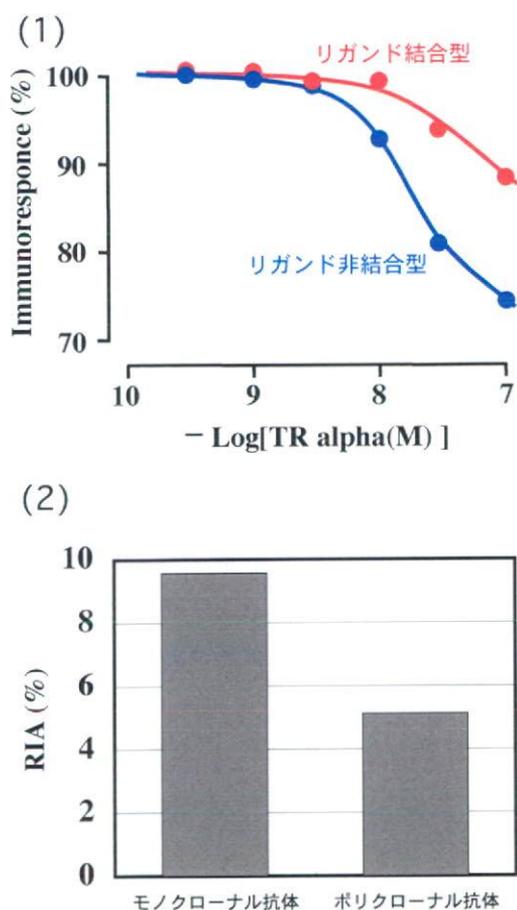


図 1 TR α モノクローナル抗体センシング試験

(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

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	モノクローナル抗
	体	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

示す 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。ERR γ はリガンド非結合でも活性型構造を保ち、構成的活性を示す受容体である。インバーサアゴニストである 4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT) で不活性化される。4-OHT 結合型を識別するクローンが得られたが、感度が非常に悪く、センシング試験系を構築するに至らなかった。

D. 考察

一般に、ポリクローナル抗体に比べて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ほうが有用と思われる。しかし、抗原ペプチドおよび核内受容体の両方とも高く認識するモノクローナル抗体の作製は非常に難しく、500 クローン中 5~10 しか得られないことがほとんどである。しかも、これらのうち対象の核内受容体のコンホメーション変化を認識するものはほとんど無いことが多く、センシングアッセイに使用できるクローンを得ることは非常に困難を伴う。

本研究においては 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、きわめて精度の良い試験系の構築に成功した。今後、この試験系を用いた化合物スクリーニングが必要である。しかし、既に内分泌攪乱作用が懸念され