

NBD 標識蛍光リガンドを用いたエストロゲン受容体競争結合試験法の開発

○近藤 薫^a、川口 勉^b、浅井大輔^b、中井 誠^a、高月峰夫^a、矢可部芳州^a、下東康幸^b
^a(財)化学物質評価研究機構・安全性評価技術研究所、^b九大院・理・分子科学

従来、化学物質のホルモン受容体への競争結合試験には放射リガンドが用いられていたが、近年、放射リガンドに代わり蛍光標識リガンドなどの非放射リガンドを用いた結合試験法が複数報告されている。昨年度、我々は植物エストロゲンであるクメストロール及びフルオレセイン標識エチニルエストラジオールをリガンドとして用いて、それらのリガンドが受容体へ結合したときに生じる蛍光強度の変化を測定する簡便な結合試験法を報告した。本研究では、同様の試験法により最適な蛍光リガンドを開発するために、新たにアルキル鎖長数が 2, 4, 6, 8, 10, 12 の 6 種の NBD (7-ニトロベンズ-21-オキサ-1, 3-ジアゾール)標識蛍光リガンドを合成し、エストロゲン受容体への結合性及び受容体結合時の蛍光強度の変化を調べた。その結果、これらのリガンドの中でエストロゲン受容体への結合度及びエストロゲン受容体結合時の蛍光強度変化の増大はそれぞれアルキル鎖長数が 4 及び 2 で最大となった。次に、アルキル鎖長数 2, 4 の NBD 標識蛍光リガンドを用いて、いくつかの内分泌擾乱候補化学物質について競争結合試験を行い、放射リガンド及び昨年度で開発した蛍光リガンドを用いた結合試験結果と比較したところ対応関係にあった。

Development of fluorometric competitive binding assay for estrogen receptors using NBD-labeled estrogen

○Kaoru Kondo^a, Tsutomu Kawaguchi^b, Daisuke Asai^b, Makoto Nakai^a, Mineo Takatsuki^a, Yoshikuni, Yakabe^a and Yasuyuki Shimohigashi^b

^aChemicals Assessment Center, Chemicals Evaluation and Research Institute, ^bDepartment of Molecular Chemistry, Graduate School of Science, Kyushu University

The competitive binding assay using radiolabelled ligand is widely used as a standard method for assessing the binding affinities of chemicals to hormone receptor. Last year, we reported the method of the binding assay to estrogen receptor using two fluorescent ligands, coumestrol and fluorescein-labeled ethynylestradiol. In this study, we developed new fluorescent ligands, NBD-labeled ethynylestradiol with alkyl linkers of various lengths, and measured the binding affinities to estrogen receptor and increment of fluorescence intensity caused by its binding to the receptor. The binding affinity and fluorescence increment are maximum with the ligand with alkyl linker of four and two methylenes, respectively. The binding affinities of some chemicals measured using these two ligands are parallel to those measured using radiolabelled ligand and other fluorescent ligands.