

ホルモン受容体コンホメーションセンシング抗体による 内分泌かく乱化学物質の統合的評価

浅井大輔¹、小泉 修²、毛利資朗³、中井 誠⁴、矢可部芳州⁴、高月峰夫⁴、野瀬 健¹、坂口和靖¹、下東康幸¹

¹九州大学・院理・化学、²福岡女子大学・人間環境、³九州大学・院医・実験動物学、⁴化学物質評価研究機構・評価研

我々は、ヒトエストロゲン受容体 α の第12ヘリックス(H12)を抗原として調製した抗ウサギポリクローナル抗体を用いて新規な *in vitro* アッセイ法を開発した。H12はリガンド結合ドメインにあり、リガンド結合の後、結合ポケットの蓋(フタ)として機能する。本抗体はリガンド結合・非結合型の受容体を識別する。このコンホメーションセンシング抗体を用いると、ホルモンおよび化学物質の受容体結合能およびホルモン活性を同時に評価できることができた。

エストロゲン受容体(40nM)と化学物質(10^{-10} ~ 10^{-5} M)とを反応させた後、リガンド非結合型の受容体分子を捕らえるためにセンシング抗体を加えた。この溶液をあらかじめ抗原ペプチドH12をコートしたプレートへ移し、プレートに固定された抗原ペプチドに結合する抗体量を定量することにより、リガンド結合・非結合型の受容体量を見積もることができた。 10^{-5} Mの17 β -エストラジオール(E2)が引き起こす受容体の構造変化率を100%とすると、ノニルフェノールはE2よりも数百倍高い濃度($EC_{50}=7\mu M$)で約30%の受容体を活性構造に転化できることがわかった。この結果は受容体結合試験およびホルモン活性試験より得られた結果とよく相関した。こうしたアッセイ系により一連の内分泌かく乱候補物質を統合的に評価した。

Total evaluation of endocrine disruptors by the antibody specific for hormone receptor conformation change

Daisuke Asai¹, Osamu Koizumi², Shirou Mohri³, Makoto Nakai⁴, Yoshikuni Yakabe⁴, Mineo Takatsuki⁴, Takeru Nose¹, Kazuyasu Sakaguchi¹, and Yasuyuki Shimohigashi¹

¹Department of Chemistry, Faculty and Graduate School of Sciences, Kyushu University, Japan, ²Faculty of Human Environmental Science, Fukuoka Women's University, Japan, ³Department of Laboratory Animal Science, Faculty of Medical Sciences, Kyushu University, Japan, and ⁴Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan.

We have established a novel *in vitro* assay system using an antibody specific for the H12 peptide fragment of estrogen receptor. H12 is present in the ligand binding domain, and function as a lid for firm recognition of the ligand. The antibody discriminates the receptor conformations of ligand-free and ligand-bound forms. Using this conformation-sensing antibody, we could evaluate simultaneously the receptor binding ability and hormonal activity of hormones and chemicals.

In this marvelous assay system, estrogen receptor (40 nM) was first incubated with various concentrations of ligands (10^{-10} – 10^{-5} M). Then, the antibody was added to capture ligand-free receptor molecules. The assay solution was transferred into the well in which antigen H12 peptide is loaded on the plastic surface. By the estimation of antibody molecules caught by anchored antigen peptide, we can assess the amount of ligand-bound or ligand-free estrogen receptors. Since 10^{-5} M 17 β -estradiol induces a full conformation change, we calculated a relative amount of receptor. When nonylphenol was assayed in this ELISA-based system, it was found that the compound induced about 30% antibody response with the EC_{50} value of about 7 μ M. This result is compatible with those from receptor binding assay and biological assay. Thus, we assessed a series of chemicals to evaluate their latent potentials as endocrine disruptors.