

ELISA 法をベースとした、蛋白レベルでのアロマターゼ阻害アッセイ法の構築

松井一裕*、西井重明、石橋卓也、岡 正則
東洋紡績株式会社 敦賀バイオ研究所

【目的】アロマターゼは、医薬品やある種の化学物質のターゲット蛋白として知られている。貝類などの環境生物の有機スズ等による生殖器異常は、この P450 ファミリーの 1 種であるアロマターゼを阻害されることで、生体内のエストロゲン・アンドロジェンのバランスが崩れるために生じると考えられている。アロマターゼ阻害アッセイとして³H遊離アッセイ法などの方法がこれまでに知られているが、我々は多数の化学物質をより効率よく通常実験室で評価できる測定系として、酵素免疫測定法(ELISA)を基盤とした系の構築を試みた。

【実験方法】ヒトアロマターゼと、内在性アンドロジェンであるテストステロン及び NADPH を基質として用い、評価対象試料を共存させてアロマターゼ反応を行ない、生成エストラジオール(E2)を含む反応混液を、ペルオキシダーゼ(HRP)標識 E2 と、マイクロプレート上に固定化した抗 E2 抗体にて、競合的 ELISA 法を実施した。評価対象試料群は、代表的なアロマターゼ阻害陽性化学物質及び陰性化学物質を含む。反応時間は暫定的に、アロマターゼ反応 37°C・20 分、競合免疫反応 4°C・1 時間、発色反応 37°C・20 分と設定して検討した。

【結果】アロマターゼ阻害剤として知られる、検討した既知の陽性化学物質は全て明確な用量曲線を示した。これらの用量曲線から、阻害指標を算出することができる。これまで阻害剤として報告のない化学物質は、いずれも本系にて有意なシグナルを示さなかった。なお陽性化学物質の阻害作用の強さは、 α -ナフトフラボン>アミノグルテミド、クリシン>ケトコナゾール>>トリフェニルスズ>トリブチルスズであった。

【考察】本系で得た阻害指標を、さらに α -ナフトフラボンを基準として相対値に変換した値は、他法で報告されている、IC50 値から算出される相対値と、ほぼ同様の傾向を示した。本方法は評価する化学物質の自家蛍光に影響されることなく、短時間で多数のサンプルを処理できるため、HTS に適した方法と考えられる。また競合 ELISA 法において影響すると考えられる交差反応性については、本測定系は E2 の 3 位の位置を利用した HRP 標識体と対応した抗体の組合せを使用しているが、E2 の 6 位の位置を利用した標識体と対応した抗体の組合せを別途使用することなどで、回避が可能である。

Development of Aromatase Inhibition Assay based on ELISA at a protein level

Kazuhiro Matsui, Shigeaki Nishii, Takuya Ishibashi, Masanori Oka
Tsuruga Institute of Biotechnology, TOYOBO Co., LTD.

P450 aromatase is known as a target protein by therapeutic drugs and some chemicals. Researchers consider that some abnormalities in sexual organs of wild lives are caused via this enzyme. Aromatase inhibition is evaluated, for example, by a radioisotope assay using specially designed substrate.

We tried to develop an ELISA based inhibition assay that is not limited in special areas and can be more efficient. The assay system consists of two steps. The first step uses human P450 aromatase, testosterone, NADPH under co-existence with test chemicals. The second step is competitive ELISA using specific monoclonal antibody against 17 β -estradiol (E2) & peroxidase (HRP) labeled E2. The assay temporary designed to be finished with in one hour and a half. Positive chemicals showed good dose response curves. Inhibition order was α -naphtoflavone > aminoglutemide, chrysin > ketoconazole >> TPT > TBT. Negative ones showed little signals. Our method is not interfered with auto fluorescence from some chemicals, also can treat a large number of samples. Cross reactivities on ELISA can be overcome by using other combinations of different HRP conjugate and antibodies.