PB-28

ウズラエストロゲン受容体の *in vitro* 結合試験法の開発

○前川　しのぶ[1]、西塚　誠[1,2]、西川　淳一[2]、市川　耕平[3]、島田　清司[3]、今川　正良[1]
（1 名市大院・薬、2 阪大院・薬、3 名大院・農）

【目的】環境中に放出された化学物質がホルモン様作用を示すことにより、ヒトや野生生物の内分泌系に対して影響を与えていると注目されている。これまで、ヒトや魚類のエストロゲン受容体に対する内分泌撹乱物質の作用について評価されてきたが、鳥類における結合性を指標とした検討はなされていない。そこで、鳥類に対する内分泌撹乱作用を検出するスクリーニング法として、簡便かつ迅速な試験が可能である酵素免疫競合法および蛍光偏光法を用いて、鳥類におけるレセプター結合試験法を確立することを目的とした。
【方法】ニワトリ ERαの塩基配列をもとにプライマーを作製し、RT-PCR 法によりウズラ ERαの ORF 全長を単離した。また、ウズラ ERβはベルギー・リーベ大学 Jacqes Balthazart 博士より御供与頂いた。ウズラ ERα及び ERβのリガンド結合領域をグルタチオン S-トランスフェラーゼとの融合蛋白質として大腸菌で発現させた後、グルタチオンセファロースを用いて精製した。これらの精製蛋白質を用いて、酵素免疫競合法(Toyobo のキットを改変)及び蛍光偏光法(Takara のキットを改変)について種々の条件検討を行った。さらに、化学物質のウズラ ER 受容体に対する競合結合試験を行いスクリーニング法としての有用性について検討した。
【結果・考察】鳥類に対する受容体結合試験法として、酵素免疫競合法、蛍光偏光法を確立した。
これら二つの方法を用いて競合結合試験を行った結果、両者で同様の阻害曲線が得られた。さらに、環境省の指定する化学物質について、両方法を用いて競合結合試験を行った。蛍光偏光法は non-RI の系であり、簡便かつ迅速な試験が可能であるが、特殊な装置を必要とする難点がある。それに対して酵素免疫競合法は、簡便かつ安全でありさらに多検体処理も実施できるという利点があるため、酵素免疫競合法は受容体結合試験のスクリーニング法として極めて優れた方法であると思われた。

この研究は、環境省「鳥類を用いた内分泌撹乱化学物質のスクリーニング手法の確立および新規試験法の研究開発」の一環として行ったものである。

Development of *in vitro* competitive binding assay for quail estrogen receptors

○Shinobu Maekawa[1], Makoto Nishizuka[1,2], Jun-ichi Nishikawa[2], Kouhei Ichikawa[3], Kiyoshi Shimada[3], Masayoshi Imagawa[1]
[1]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University, [2]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, [3]Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University

Recently, it is pointed out that a number of chemicals in the environment may modify natural endocrine functions and affects human health and wildlife. Although the receptor binding assay is known to be useful method as a first screening method, that for bird estrogen receptors has not been established. In this paper, we newly isolated quail ERα by RT-PCR, and using the ligand binding domain of ERα and ERβ (kind gift from Dr. Balthazart), we developed the *in vitro* binding assay, the competitive enzyme immunoassay and the fluorescence polarization assay for quail ERα and ERβ. By using these two established methods, the binding affinities of several chemicals to ERs were elucidated. While the fluorescence polarization assay needs the special equipment, the microtiter plate reader is only needed in the competitive enzyme immunoassay. Therefore, the latter seems to be a useful tool for evaluating the binding affinity for the first screening of the endocrine disrupting chemicals.

We acknowledge Ministry of the Environment, Japan for their financial support of this work.