

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2003/075013

発行日 平成17年6月30日(2005.6.30)

(43) 国際公開日 平成15年9月12日(2003.9.12)

(51) Int. Cl. ⁷	F I		
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	Z N A D	
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566		
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

出願番号	特願2003-573421 (P2003-573421)	(71) 出願人	800000057 財団法人新産業創造研究機構 兵庫県神戸市中央区港島南町1丁目5-2
(21) 国際出願番号	PCT/JP2003/002407	(74) 代理人	100065248 弁理士 野河 信太郎
(22) 国際出願日	平成15年3月3日(2003.3.3)	(72) 発明者	芦田 均 日本国兵庫県神戸市東灘区住吉山手7-3-8-202
(31) 優先権主張番号	特願2002-57516 (P2002-57516)	(72) 発明者	畑中 豊 日本国滋賀県大津市朝日が丘1-19-12-401
(32) 優先日	平成14年3月4日(2002.3.4)	(72) 発明者	福田 伊津子 日本国奈良県奈良市百楽園2-7-2
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(81) 指定国	AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, B A, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, M W, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA結合性タンパク質の活性測定方法

(57) 【要約】

本発明によれば、1) タンパク質含有試料をタンパク質活性化物質で処理してDNA結合能を有する活性化タンパク質含有試料を得て、2) 担体に抗ハプテン抗体を固相化し、3) ハプテン化DNAプローブを抗ハプテン抗体に結合させ、4) 1)の活性化タンパク質含有試料を3)のハプテン化DNAプローブと反応させて、活性化タンパク質/ハプテン化DNAプローブの複合体を形成し、5) 特異抗体を加えて、複合体を特異的に認識させ、6) 発色用酵素標識二次抗体を加え、7) 発色試薬を加えて発色反応を生じさせ、発色の度合いを吸光度により測定し、8) 非活性化タンパク質含有試料について測定される吸光度との比較から、タンパク質の活性レベルを測定することからなる、DNA結合性タンパク質の活性測定方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の工程：

- 1) タンパク質含有試料をタンパク質活性化物質で処理してDNA結合能を有する活性化タンパク質含有試料を得て、
 - 2) 担体に抗ハプテン抗体を固相化し、
 - 3) ハプテン化DNAプローブを抗ハプテン抗体に結合させ、
 - 4) 1)の活性化タンパク質含有試料を3)のハプテン化DNAプローブと反応させて、活性化タンパク質/ハプテン化DNAプローブの複合体を形成し、
 - 5) 特異抗体を加えて、複合体を特異的に認識させ、
 - 6) 発色用酵素標識二次抗体を加え、
 - 7) 発色試薬を加えて発色反応を生じさせ、発色の度合いを吸光度により測定し、
 - 8) 非活性化タンパク質含有試料について測定される吸光度との比較から、タンパク質の活性レベルを測定すること
- からなる、DNA結合性タンパク質の活性測定方法。

10

【請求項 2】

6)の工程で、ビオチンおよびストレプトアビジンが二段階に分けて用いられる請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

タンパク質含有試料がダイオキシン類の毒性発現に關与するタンパク質を含み、タンパク質活性化物質がダイオキシン類または多環性芳香族炭化水素である請求項1または2に記載の方法。

20

【請求項 4】

タンパク質活性化物質が、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、3-メチルコランスレン、インディゴ、インディルピン及びイソインディゴからなる群から選択される請求項1~3のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 5】

タンパク質含有試料がAhR-Arntを含み、ハプテン化DNAプローブがTNGCGTG(Nは任意の塩基)の7塩基を含み、かつ特異抗体がArntタンパク質のC末端部分またはAhRタンパク質のN末端部分を構成するペプチドを合成し免疫感作にて得られる抗体である請求項1~4のいずれか1つに記載の方法。

30

【請求項 6】

活性化タンパク質含有試料中のタンパク質濃度が4~30mg/mlである請求項3~5のいずれか1つに記載の方法。

【請求項 7】

請求項1に記載される1)の工程で、タンパク質含有試料が、タンパク質活性化物質での処理の前もしくは後に、タンパク質活性化物質とは異なる被験化学物質を用いて処理されるか、または被験化学物質とタンパク質活性化物質を同時に用いて処理されることにより、被験化学物質の活性化抑制作用を検定することからなる、タンパク質の活性化抑制剤のスクリーニング方法。

40

【請求項 8】

請求項1に記載される1)の工程で、タンパク質含有試料が、タンパク質活性化物質および該物質とは異なる被験化学物質それぞれを用いて個別に処理され、両者を比較することにより、被験化学物質の活性化作用を検定することからなる、タンパク質の活性化剤のスクリーニング方法。

【請求項 9】

抗ハプテン抗体を固相化した担体、ハプテン化DNAプローブ、プローブと活性化タンパク質との複合体を特異的に認識する特異抗体、検出用試薬および発色試薬からなる、DNA結合性タンパク質の活性測定用キット。

【請求項 10】

50

担体が、抗ハプテン抗体にハプテン化DNAプローブを結合してなる、請求項9に記載のキット。

【請求項11】

検出用試薬として、ビオチン化二次抗体含有試薬およびストレプトアビジン含有試薬が含まれる請求項9または10に記載のキット。

【請求項12】

活性化タンパク質がダイオキシン類または多環性芳香族炭化水素を用いて得られる、ダイオキシン毒性の発現に關与するタンパク質の活性を測定するための請求項9～11のいずれか1つに記載のキット。

【請求項13】

活性化タンパク質が、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン、3-メチルコランスレン、インディゴ、インディルピン及びイソインディゴからなる群から選択される少なくとも1つを用いて得られる、請求項9～12のいずれか1つに記載のキット。

【請求項14】

TNGCGTG(Nは任意の塩基)の7塩基を含むハプテン化DNAプローブおよびArntタンパク質のC末端部分またはAhRタンパク質のN末端部分を構成するペプチドを合成し免疫感作にて得られる特異抗体が用いられる、AhR-Arntの活性を測定するための請求項9～13のいずれか1つに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、DNA結合性タンパク質の活性測定方法に関する。詳しくは、本発明は、サウスウエスタン・ケミストリーと称される生化学的手法にELISA法を組合せた方法をさらに改変することにより開発された、DNA結合性タンパク質の活性測定方法に關し、該タンパク質の活性化剤および活性化抑制剤のスクリーニング方法ならびにDNA結合性タンパク質の活性測定用キットに関する。

背景技術

生物には、化学物質との反応によって活性化され、特定のDNA配列(コンセンサス配列)に対する結合能を生じて該配列に結合することにより、種々の作用を発揮するDNA結合性タンパク質の介在する機序が多く存在する。

例えば、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン(TCDD)および3-メチルコランスレン(3-MC)などの多環性芳香族炭化水素化合物(アリール炭化水素化合物)は、DNA結合性タンパク質であるアリール炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor、以下AhRと称する、分子量約100kD)と結合し、これがさらにArnt(AhR Nuclear Translocator、分子量約90kD)と結合することで、これらのタンパク質のコンフォメーションを変化させてダイオキシン-AhR-Arntの複合体を形成し、TNGCGTG(Nは任意の塩基)の7塩基からなるDRE(Dioxins Response Element)配列を含むDNAに対する結合能を生じて、前記複合体をこのDNA配列に結合させることで毒性を発現することが知られている。

従来、ダイオキシン類の分析には、ガスクロマトグラフィー・質量分析法(GCMS法)が公定法として定められている。この方法によれば、ダイオキシン類が試料中に低濃度で存在する場合でも、その分析結果が感度および精度の両面において満足できる。

しかしながら、この方法では、既知物質のみが分析の対象となり、ダイオキシン様の生理活性、すなわちダイオキシンに似た毒性を有する新規な化学物質を分析できない。また、この方法では、試料に対して非常に複雑な化学的前処理が必要であり、しかも分析機器が高価であるという難点がある。

DNA結合性タンパク質AhR-Arntの性質を利用する分析方法としては、ゲルシフトアッセイ法があり、ダイオキシン-AhR-Arnt複合体を、予め³²P-ATPで放射性同位元素標識したDRE配列を含むDNAプローブと反応させて、ダイオキシン-

10

20

30

40

50

A h R - A r n t と D N A プローブとの複合体を形成させ、この複合体を電気泳動で分離し解析する。

しかし、この方法によるダイオキシンの解析は、バンドの移動度および濃度を指標とするため定量性に劣り、その結果は、一般的に定性もしくは半定量解析に留まる。また、正確に定量を行うためにはバンドの放射性同位元素量を測定するための高価な機器が必要となるのみならず、G C M S 法と同様に多種類の被験物質を一度に処理、解析することが困難である。

³²P - A T P での標識に代えて、ビオチン等を用いてハプテン標識を行う方法もあるが、放射性同位元素を用いる方法と同様に多種類の被験物質を一度に処理、解析することが困難であることは変わりがない。また、このような方法では、最終的に酵素発色を用いるため、感度が低くなる面において問題がある。

最近では、A h イムノアッセイ法と呼ばれる新たな分析方法が実用化されている（産業と環境、平成12年4月号（29巻4号））。

この方法は、D N A プローブを予めマイクロタイタープレートに固定化することにより A h R - A r n t を介してダイオキシソ類を結合させ、A h R - A r n t に特異的に反応する一次抗体、発色反応を生じる二次抗体および発色試薬を順次添加して、発色の度合いを吸光度で測定することにより、A h R - A r n t に結合したダイオキシソ類を定量分析するものである。

この方法では、ストレプトアビジン - ビオチンが D N A プローブと担体との固定化に用いられていると考えられることから、最終的な発色段階でストレプトアビジン - ビオチンを感度向上（増感）に用いることができないため、この方法によってダイオキシソ様の活性を有する化学物質が検出されたとしても、その感度は満足できるものではない。さらに、肝臓、腎臓、脳など内在性ビオチンを多く含む組織、あるいはこれら組織に由来する培養細胞や株化細胞などよりタンパク質含有試料を作製し、これらを、ストレプトアビジン - ビオチン反応を D N A プローブの固定化に利用した測定系に添加した場合、試料中に含まれるビオチンによる影響が懸念される。

発明の開示

このような状況下、本発明者らは、従来は放射性同位元素を使用しないサザンブロットィング法などのハプテン化分子の生化学的および組織化学的検出法に適用されている抗ハプテン抗体を D N A の担体への固定化に用いることにより良好な検出感度が得られ、特にストレプトアビジン - ビオチンによる増感が可能になることから、目的の D N A 結合性タンパク質に特有のタンパク質活性化物質および結合 D N A 配列を用いることにより、いずれの D N A 結合性タンパク質の活性も簡便、迅速かつ高精度に多検体を同時に測定できること、また、当該タンパク質のみならず、その活性化剤および活性化抑制剤のスクリーニングも可能であることを見出し、この発明を完成した。

したがって、この発明によれば、次の工程：

- 1) タンパク質含有試料をタンパク質活性化物質で処理して D N A 結合能を有する活性化タンパク質含有試料を得て、
- 2) 担体に抗ハプテン抗体を固相化し、
- 3) ハプテン化 D N A プローブを抗ハプテン抗体に結合させ、
- 4) 1) の活性化タンパク質含有試料を 3) のハプテン化 D N A プローブと反応させて、活性化タンパク質 / ハプテン化 D N A プローブの複合体を形成し、
- 5) 特異抗体を加えて、複合体を特異的に認識させ、
- 6) 発色用酵素標識二次抗体を加え、
- 7) 発色試薬を加えて発色反応を生じさせ、発色の度合いを吸光度により測定し、
- 8) 非活性化タンパク質含有試料について測定される吸光度との比較から、タンパク質の活性レベルを測定すること

からなる、D N A 結合性タンパク質の活性測定方法（以降、S W - E L I S A 法と称する）、該タンパク質の活性化剤ならびに活性化抑制剤のスクリーニング方法および D N A 結合性タンパク質の活性測定用キットが提供される。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法は、DNA結合性タンパク質を含むものであれば、動物もしくは植物の組織、細胞もしくはそれらの抽出物、または水もしくは土壌などの自然環境中に見出されるあらゆるタンパク質含有試料、さらには該DNA結合性タンパク質を含む食品などの人為的操作が加わった試料について適用することができる。

そのようなタンパク質としては、ダイオキシン類の毒性発現に關与するタンパク質、具体的にはAhR - Arnt、内分泌攪乱作用に關するタンパク質、具体例としてエストロゲン受容体(ER)、免疫機能に關する転写因子、具体例としてNuclear factor - kappa B (NF - B)、発がんに關する転写因子、具体例としてActivator protein - 1 (AP - 1)などが挙げられ、それぞれに適当なタンパク質活性化物質で該タンパク質、または該タンパク質を含む細胞、組織、動物個体などを処理することにより、コンセンサス配列に対するDNA結合能を生じさせることができる。

例えば、AhR - Arnt含有試料は、様々な哺乳動物およびそれらに由来する培養細胞や株化細胞などから調製される組織および細胞溶解液の細胞質画分を調製して得ることができ、その活性化物質としてTCDDなどのダイオキシン類、またはAhRのリガンドとなりえる、3 - MC、インディゴ、インディルピン及びその構造類縁体であるイソインディゴなどの多環性芳香族炭化水素を用いることによりDNA結合能を有する活性型となる。

具体例としては、断頭屠殺したラットから摘出した肝臓を試料として用い、これを予め氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で灌流して脱血し、次いでこの肝臓を2倍量の組織破碎用緩衝液(25mM HEPES、pH7.4、1.5mM EDTA、1.0mMジチオスレイトール、10%グリセロール;以下HEDG緩衝液と記す)で破碎処理した後、105,000xg、70分間、4で遠心分離し、上清(細胞質画分)を得ることにより、AhR - Arntが得られる。これは、必要に応じて-85で保存することができる。

次に、AhR - Arntを4~30mg/ml、好ましくは20mg/mlのタンパク質濃度に調製し、これに0~10nM(終濃度)のTCDD、0~50nM(終濃度)の3 - MCあるいは0~50nM(終濃度)のインディゴなどのジメチルスルホキシド(DMSO)溶液を加え、20で2時間暗所にて反応させることにより、in vitroで活性化AhR - Arntを得ることができる。

また、上記の活性化と同時に、対照となる非活性化タンパク質含有試料、AhR - Arntの場合には溶媒のDMSOのみで処理したAhR - Arntを調製し、以降の処理を活性化AhR - Arntと同様に行う。

TCDDなどのAhR - Arnt活性化物質の溶液をコーンオイルなどの溶媒で作製して任意の動物に投与することにより、in vivoで活性化したAhR - Arntを、動物組織の核タンパク質画分を調製して得ることも可能である。この場合、コーンオイルなどの溶媒を任意の動物に投与して対照となるAhR - Arntを得ることができる。

具体例としては、TCDDのコーンオイル溶液を1µg/Kg体重となるように腹腔内投与したモルモット、あるいは3 - MCのコーンオイル溶液を10mg/Kg体重となるように腹腔内投与したラットから摘出した肝臓を試料として用い、これを予め氷冷したリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で灌流して脱血する。次いで、この肝臓を10倍量の組織破碎用緩衝液(10mM HEPES、pH7.9、0.5mMジチオスレイトール、10mM KCl、1.5mM MgCl₂、5µg/mlアプロチニン、0.5mMフッ化フェニルメチルスルホニル、20µg/mlロイペプチン)で破碎処理した後、1,500xg、10分間、4で遠心分離し、得られた沈殿の2倍量の核抽出用緩衝液(20mM HEPES、pH7.9、0.2mM EDTA、0.5mMジチオスレイトール、25%グリセロール、0.42M NaCl、1.5mM MgCl₂、5µg/mlアプロチニン、0.5mMフッ化フェニルメチルスルホニル、20µg/mlロイペプチン)で懸濁する。さらに、得られた溶液を1時間回転攪拌した後、18,000xg、2

10

20

30

40

50

0分間、4 で遠心分離し、上清（核タンパク質画分）を得ることにより、*in vivo*で活性化したAhR-Arntが得られる。これは、必要に応じて-85 で保存することができる。

SW-ELISA法で使用される抗ハプテン抗体は、一般的な免疫学的手法に用いられるハプテン分子、例えばビオチン、ジゴキシゲニン(DIG)、フルオレセイン・イソチオシアネート(FITC)、ジニトロフェノール(DNP)を、通常の方法(A. Kambegawa, Nippon Rinsho, Vol. 53(9), p2160-p2167(1995))に従って処理して得られる抗体であり、ポリクローナルまたはモノクローナルのいずれであってもよい。

例えば、ポリクローナル抗体は、ウシ血清アルブミン(BSA;分子量66kD)、ヒト血清アルブミン(HAS;分子量58kD)、ウサギ血清アルブミン(RSA;分子量68kD)、ヤギ血清アルブミン(GSA;分子量68kD)などの哺乳動物の血清アルブミン、ニワトリ卵白アルブミン(OVA;分子量45kD)、キーホール・リンペット・ヘモシアニン(KLH;分子量約1000kD)などのキャリア・プロテインにハプテン分子を化学結合させた結合体を免疫原(抗原)として、通常の方法(W.H. Newsomeら, J. Assoc. Off. Anal. Chem., Vol. 70, p1025-p1027(1987))に従って得ることができる。

免疫感作に用いられる動物としては、ウサギ、マウス、ラット、ヤギ、イヌ等の哺乳動物が挙げられ、動物から採取した血液を、遠心分離;硫酸アンモニウムまたはポリエチレングリコールを用いる沈殿法;ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィーのようなクロマトグラフィーなどの通常の方法による分離・精製を経てポリクローナル抗体とすることができる。

高度の特異性および親和性を有するモノクローナルの抗ハプテン抗体は、上記の免疫感作を受けた哺乳動物から、免疫原に対する抗体の産生能を獲得したB細胞を複数分離し、該細胞を連続的かつ無限的に細胞分裂・増殖し得るミエロマ細胞のような腫瘍細胞とそれぞれ融合させたのち、生成する複数の融合細胞(ハイブリドーマ細胞)の中から所望の抗体を効率的に産生するハイブリドーマ細胞を単離・クローン化し、試験管内または動物生体内で培養することにより製造することができる。

上記のようにして得られる抗ハプテン抗体のなかでも、ハプテン分子にFITCを用いて得られるポリクローナル抗ハプテン抗体が好ましく、ウサギ由来のポリクローナル抗ハプテン抗体が特に好ましい。

抗ハプテン抗体の固相化に使用される担体としては、ELISA法において通常用いられる担体を使用することができ、たとえば、マイクロタイタープレート、試験管のプラスチック表面、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ガラスもしくはプラスチック等からなるビーズ表面、デキストラン、セルロース、ニトロセルロースもしくはその他タンパク質結合性素材の細片の表面等が挙げられる。これらの担体は、意図された目的に応じて種々の形状を有していてもよく、例えば、皿状、球状、穴状、プレート状、小型ロッド状、セル状、小型チューブ状、小型ボトル状、ファイバー状、ネット状などの形状であってもよい。

担体の具体的な例としては、透明プラスチック材料、例えばポリ塩化ビニルまたはポリスチレンからなるマイクロタイタープレート、ポリスチレンおよびポリスチレンラテックスからなる小球、チューブまたはロッド等が挙げられる。これらのうち、ポリスチレンの96穴マイクロタイタープレートは、取り扱いが容易であり、特に好ましい。

抗ハプテン抗体の担体への固相化は、ELISA法において通常用いられるグルタルアルデヒドまたは臭化シアンなどにより担体表面を活性化し、これに抗ハプテン抗体を含有する溶液を添加し、反応させることにより行うことができるが、この方法に限定されるものではない。

例えば、担体としてポリ塩化ビニルまたはポリスチレンからなるマイクロタイタープレートを使用する場合は、抗ハプテン抗体を50mM炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH9.6)とともに担体に添加するのが最適であり、担体に対する抗体の吸着は1~10μg/m

10

20

30

40

50

Lの濃度範囲で平衡化することから、抗ハプテン抗体の最終濃度を0.1~10 µg/mLの範囲内にするのが望ましい。こうして得られる抗ハプテン抗体含有溶液は、例えば穴状のマイクロタイタープレートでは約0.1 mL/穴の容量で用いることができ、約4

で約6~24時間反応させた後、洗浄用緩衝液(例えば0.05% Tween(商標)20を含むリン酸緩衝化生理食塩水;以下PBSTと記す)を用いて未反応の抗ハプテン抗体を除去することにより、担体に抗ハプテン抗体を固相化することができる。

固相化後の担体表面にタンパク質等に対する吸着能が残存している場合は非特異的結合の生じる恐れがあるため、本発明の方法で使用されるいずれの抗体とも反応性を示さないタンパク質の高濃度溶液、例えば1%BSA溶液、3%スキムミルク溶液、市販のブロッキング専用試薬を非特異結合のブロッキング試薬として用い、ブロッキング操作終了後は、

PBSTにより担体を洗浄するのが望ましい。得られた抗ハプテン化抗体固相化担体は、必要に応じて冷蔵または冷凍での保存が可能である。

抗ハプテン抗体固相化担体には、次いで、コンセンサス配列を有し、ハプテン化されたDNAプローブを添加する。

かかるDNAプローブは、コンセンサス配列を1~数ヶ所含む2本鎖DNAであればよく、その製造法等は限定されず、その5'や3'末端を化学的あるいは酵素的にハプテン標識してハプテン化DNAプローブとすることができる。

例えば、AhR-Arntのコンセンサス配列は前記のとおり7塩基のDRE配列からなるため、当該配列を含む26塩基からなるセンス鎖一本鎖オリゴDNA(5'-GATCCG GAG TTG CGT GAG AAG AGC CA-3')、およびその

相補配列であるアンチセンス鎖一本鎖オリゴDNA(5'-GAT CTG GCT CTT CTC ACG CAA CTC CG-3')を合成した後、それぞれを化学的にFITC標識し、精製し、次いで一本鎖オリゴDNAをアニーリングし、二本鎖DNAプローブを作製することにより、AhR-Arnt用のハプテン化DNAプローブを得ることができる。こうして得たハプテン化DNAプローブは、担体に結合させた状態で、必要に応じて冷蔵または冷凍での保存が可能である。

上記のようにして得られるハプテン化DNAプローブは、そのコンセンサス配列を介して、タンパク質活性化物質で処理されることによりDNA結合能を生じた活性化タンパク質と結合し、活性化タンパク質/ハプテン化DNAプローブの複合体を形成する。

例えば、AhR-Arntの場合、予め調製された活性化AhR-Arntを含むタンパク質試料40 µLを、150 mM塩化カリウム(終濃度)を含むHEDG緩衝液10 µLと混合させ、この混合液を抗ハプテン化抗体とハプテン化DNAプローブを固相化したマイクロタイタープレートに添加し、約4

で2時間反応させることにより、活性化AhR-Arnt/ハプテン化DNAプローブの複合体が担体上で形成される。

次いで、活性化タンパク質/ハプテン化DNAプローブの複合体に対し、複合体を特異的に認識する特異抗体をさらに加える。

特異抗体は、活性化タンパク質の構成分子に対する特異抗体であればよく、その範囲等は限定されない。例えば、AhR-Arntの場合は、AhRタンパク質の全体やその部分ペプチド、またはArntタンパク質の全体やその部分ペプチドのいずれかに対する抗体であること、さらにはそれがAhR-Arntの二量体を認識することのできる抗体でも

あることが要件となり、これら構成分子を利用する以外は抗ハプテン抗体と同様にして特異抗体を得ることができる。具体的には、Arntタンパク質のC末端部分またはAhRタンパク質のN末端部分を構成するペプチドを合成し、免疫感作にて得られる特異抗体が好ましく、なかでもヒトまたはマウス由来の該タンパク質に対する抗体が好ましい。

なお、抗ハプテン抗体を産生する免疫動物種と特異抗体を産生する免疫動物種とが同種であることは望ましくない。

次に、特異抗体を発色用酵素標識二次抗体により検出する。したがって、二次抗体は、抗ハプテン抗体に反応性を示さず特異抗体のみに反応性を示すものでなければならず、抗ハプテン抗体の由来動物と同種の動物種を用いて、抗ハプテン抗体と同様にして調製することが望ましい。

10

20

30

40

50

また、増感のため検出工程を二段階に分けて行うことにより、良好な検出感度を得ることができる。この場合、特にビオチン - ストレプトアビジン反応を二段階に分けて用いるのが好ましく、例えば、ビオチン化二次抗体含有溶液および酵素標識ストレプトアビジン含有溶液を組み合わせる使用するか、あるいはビオチン化二次抗体およびストレプトアビジンと発色用酵素が共に分子内に多数結合した構造をもつポリマー試薬を各段階で利用することができる。

発色用の酵素としては、パーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、炭酸アンヒドラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、マレートデヒドロゲナーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼなどが挙げられる。

10

二次抗体と反応させた特異抗体は、一般的な方法、例えば、発色用酵素にパーオキシダーゼを用いる場合には基質として過酸化水素とo-フェニレンジアミン(OPD)あるいは3,3',5,5'-テトラメチルベンチジン(TMB)との組み合わせを最終容量100 μ Lになるように添加し、室温で約20~30分間反応させることによって発色させることができ、その度合いは、450~490nm、好ましくは450nmの波長で、マルチプレートリーダーのような測定装置を用いて吸光度として測定することができる。吸光度の測定は、1N硫酸水溶液を添加するなどして、発色反応を停止させてから行った方が好ましい。

DNA結合性タンパク質の活性レベルは、上記のようにして測定した吸光度を、非活性化タンパク質含有試料について得られる吸光度と比較することにより判定することができる。また、既知のタンパク質活性化物質を用いて、得られた吸光度値から標準曲線を作成し、試料中の未知のタンパク質の活性化物質濃度を既知の活性化物質相当濃度として定量することができる。さらに、タンパク質活性化物質を種々の濃度で使用してSW-ELISA法を実施することにより、当該物質のSW-ELISA法における定量範囲を明らかにすることができる。

20

本発明者らの実験によれば、タンパク質がAhR-Arntである場合、本発明によるSW-ELISA法は、タンパク質濃度が低い値、例えば4mg/mlの場合にはゲルシフトアッセイ法と同程度の定量範囲および検出限界値を示すが、濃度が高い値、例えば20mg/mlの場合には、検出限界値を維持する一方で、定量範囲を拡大する。

したがって、本発明によるSW-ELISA法は、従来法と比較して、簡便、迅速かつ高精度にDNA結合性タンパク質の活性を多検体について同時に測定することができ、さらには当該タンパク質の活性化剤および活性化抑制剤をスクリーニングすることも可能である。

30

活性化抑制剤のスクリーニングの場合には、タンパク質の活性化の際に、比較検討の対象となる、既知タンパク質活性化物質とは異なる被験化学物質で処理した後に、既知のタンパク質活性化物質を用いて活性化処理を行うか、または被験化学物質をタンパク質活性化物質と同時に用いて活性化処理することにより、被験化学物質の活性化抑制作用を検定することができる。さらには、既知のタンパク質活性化物質を用いて活性化処理した後に、被験化学物質を処理することで活性化抑制効果を評価することも可能である。

また、活性化剤のスクリーニングの場合には、被験化学物質を、既知のタンパク質活性化物質による活性化処理と同様にしてタンパク質の処理に用い、これを、既知のタンパク質活性化物質を用いて行った活性化処理と比較することにより、被験化学物質の活性化作用を検定することができる。

40

被験化学物質は、目的となるタンパク質に対する作用を検討したい化学物質が含まれているものであれば、精製化合物を溶解した溶液；液状食品、固形食品や土壌からの抽出液；あるいは水質調査用試料などに代表される多成分・多化学物質を含む未精製溶液などのいずれであってもよい。

例えば、AhR-Arntに対する活性化抑制作用の有無を液状食品について検討する際には、AhR-Arnt含有試料を液状食品自体で予め処理するか、あるいは試料をTCDDなどのAhR-Arnt活性化物質と液状食品の双方で同時に処理し、得られる吸光

50

度を該 AhR - Arnt 活性化物質単独で処理することで得られる吸光度と比較することによって、AhR - Arnt 活性化に拮抗する化合物、すなわち AhR - Arnt の活性化抑制剤が液状食品中に含まれているかどうかを検定することができる。

さらに、AhR - Arnt に対する活性化抑制作用の有無を固形食品について検討する際には、予め固形食品をエタノールなどの溶媒を用いて抽出し得られた抽出液を濃縮乾燥後、水などの溶媒にて溶解もしくは懸濁し AhR - Arnt 含有試料に対して上記と同様に処理することにより、AhR - Arnt の活性化抑制剤が固形食品中に含まれているかどうかを検定することができる。

また、本発明によれば、前記のようにして得られる抗ハプテン抗体を固相化した担体、ハプテン化 DNA プローブ、プローブと活性化タンパク質との複合体を特異的に認識する特異抗体、検出用試薬および発色試薬からなる、DNA 結合性タンパク質の活性測定用キットが提供される。

担体は、抗ハプテン抗体にハプテン化 DNA プローブを結合させていてもよい。また、検出用試薬とは、特異抗体に対する二次抗体反応、および所望の場合には、酵素標識反応に関わる試薬を意味し、ビオチン化二次抗体含有試薬、例えばビオチン化二次抗体自体、およびストレプトアビジンが分子内に多数結合したポリマー試薬のようなストレプトアビジン含有試薬が含まれていてもよい。

このようなキットは、タンパク質活性化物質が TCDD のようなダイオキシン類または 3-MC、インディゴ、インディルピン、イソインディゴのような多環性芳香族炭化水素である場合に、ダイオキシン毒性の発現に關与するタンパク質の活性測定に用いることができる。

具体的には、TNGCGTG (N は任意の塩基) の 7 塩基を含むハプテン化 DNA プローブ、および Arnt タンパク質の C 末端部分または AhR タンパク質の N 末端部分を構成するペプチドを合成し免疫感作にて得られる特異抗体を備えるキットにより、DNA 結合性タンパク質 AhR - Arnt の活性レベルを測定することができる。

実施例

以下、AhR - Arnt に関する予備試験および実施例によって本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例のみに限定されるものではなく、当該技術分野における通常の変更を加えたものも本発明の範囲に含まれる。

予備試験：抗ハプテン抗体の特異性確認

96 穴マイクロタイタープレート (ナルジェヌンクインターナショナル社製) に抗ハプテン抗体である抗 FITC ウサギポリクローナル抗体 (ダコ社製) の固相化を行った。

すなわち、抗 FITC 抗体を 50 mM 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) で 0.46 μg/mL (1:5000, v/v) に希釈したのち、プレート内の各穴へ 100 μL ずつ分注し、4 で 8 時間反応させた。該抗 FITC 希釈液を除去し、100 μL の PBST で各穴を 3 回洗浄した。ブロッキング溶液 (ナカライテスク製) を PBST で 5 倍に希釈し、プレート内の各穴に 100 μL ずつ加えて室温で 2 時間ブロッキングを行った。

100 μL の PBST で各穴を 3 回洗浄した後、ブロッキング溶液を PBST で 10 倍に希釈した緩衝液 (抗体希釈用緩衝液) で 0.01 ~ 1000 ng/mL の濃度に FITC 標識ヤギイムノグロブリン G (IgG) タンパク質を希釈し、各穴に 100 μL ずつ加えて室温で 2 時間反応させた。100 μL の PBST で各穴を 3 回洗浄した後、次いで西洋わさび由来パーオキシダーゼ (HRP) を標識した抗ヤギ IgG 抗体 (CAPPEL 社製) を抗体希釈用緩衝液で 1.5 μg/mL (1:1000, v/v) の濃度に希釈し、各穴へ 100 μL ずつ添加し、室温で 2 時間反応させた。プレート内の各穴をそれぞれ 4 回ずつ洗浄した後、各穴に TMB 発色試薬 (ダコ社製) を 100 μL ずつ加えて発色反応を開始し、30 分後に 1N 硫酸を 50 μL 加えることで発色を停止させた。

プレートを攪拌後、マルチプレートリーダー (ワラック社製) を用いて 450 nm の吸光度を測定し、抗 FITC 抗体の特異性と ELISA 法における固相化用抗体としての適用性を確認した (図 1)。

実施例 1：SW - ELISA 法における特異抗体の適用性確認

活性化 AhR - Arnt は、終濃度として 1.61 ng/mL (5 nM) の TCDD の DMSO 溶液を、タンパク質量として 15 mg/mL に調製したラット肝細胞質画分に添加した後、 20°C で 2 時間暗所にて反応させることにより予め調製した。また、コントロールとして、同量の DMSO のみを添加したラット肝細胞質画分を同様に 20°C で 2 時間暗所にて反応させた。

96 穴マイクロタイタープレートへの抗 FITC ウサギポリクローナル抗体の固相化およびブロッキングは、予備試験に記載のように行った。

$100 \mu\text{L}$ の PBST で各穴を 3 回洗浄した後、あらかじめ合成した FITC 標識 DRE 配列を含む DNA プロブ (以下、DRE プロブとする。センス鎖; $5' - \text{GAT CCG GAG TTG CGT GAG AAG AGC CA} - 3'$ 、アンチセンス鎖; $5' - \text{GAT CTG GCT CTT CTC ACG CAA CTC CG} - 3'$) を PBST で 25 fmol/L / $100 \mu\text{L}$ に希釈し、各穴に $100 \mu\text{L}$ ずつ加えて室温で 2 時間反応させ、 $100 \mu\text{L}$ の PBST で各穴を 3 回洗浄した。さらに上述の活性化 AhR - Arnt $40 \mu\text{l}$ と 150 mM 塩化カリウム (終濃度) 含有 HEDG 緩衝液 $10 \mu\text{l}$ との混合液を各穴あたり $50 \mu\text{L}$ ずつ添加 (タンパク質量として $120 \mu\text{g}$) し、室温で 2 時間反応させた。

$100 \mu\text{L}$ の PBST で各穴を 4 回洗浄した後、抗体希釈用緩衝液で特異抗体 4 種; すなわち (a) ヒト Arnt タンパク質の C 末端部分を構成するペプチドを合成し免疫感作にて得られる抗体 (抗 - Arnt C - 19)、(b) マウス Arnt タンパク質の C 末端部分を構成するペプチドを合成し免疫感作にて得られる抗体 (抗 - Arnt M - 20) (いずれもサンタクルーズ・バイオテクノロジー社製)、(c) マウス AhR タンパク質の N 末端部分を構成するペプチドを合成し免疫感作にて得られる抗体 (抗 - AhR MA 1 - 514) (アフィニティー・バイオリジェント社製) 及び (d) マウス AhR タンパク質の N 末端部分を構成するペプチドを合成し免疫感作にて得られる抗体 (抗 - AhR NB 100 - 128) (ノーバス・バイオリジカル社製) を、(a) 及び (b) は 1 : 10000、(c) は 1 : 1500、(d) は 1 : 2000 に希釈し、 $100 \mu\text{L}$ ずつを各穴に加えて室温で 1 時間反応させた。

$100 \mu\text{L}$ の PBST で各穴を 3 回洗浄した後、次いで二次抗体としてビオチン標識した抗ヤギ IgG 抗体 (ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリー社製) あるいは抗マウス IgG 抗体 (ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリー社製) を抗体希釈用緩衝液でそれぞれ $0.34 \mu\text{g/mL}$ (1 : 5000)、 $0.33 \mu\text{g/mL}$ (1 : 4000) の濃度に希釈し、各穴へ $100 \mu\text{L}$ ずつ添加し、室温で 1 時間反応させた。

$100 \mu\text{L}$ の PBST で各穴を 3 回洗浄した後、さらに PBST で HRP とストレプトアビジンの両方を結合した標識ポリマー試薬 (ダコ社製) を $0.33 \mu\text{g/mL}$ (1 : 2000) の濃度に希釈し、各穴へ $100 \mu\text{L}$ ずつ添加し、室温で 30 分間反応させた。

プレート内の各穴をそれぞれ 4 回ずつ洗浄した後、各穴に TMB 発色試薬 (ダコ社製) を $100 \mu\text{L}$ ずつ加えて発色反応を開始し、30 分後に 1 N 硫酸を $50 \mu\text{L}$ 加えることで発色を停止させた。

プレートを攪拌後、マルチプレートリーダー (ワラック社製) を用いて 450 nm の吸光度を測定し、図 2 に示す結果を得た。

この結果、Arnt タンパク質では C 末端部分、AhR タンパク質では N 末端部分を構成するペプチドに対して調製された抗体が AhR - Arnt の活性化を良好に捉えることが確認された。

実施例 2 : 検出工程の違いによる検出の感度差の確認

ビオチン標識した抗ヤギ IgG 抗体と HRP・ストレプトアビジン標識ポリマー試薬とを用いる実施例 1 の二段階検出を、抗体希釈用緩衝液で $1.5 \mu\text{g/mL}$ (1 : 1000) の濃度に希釈した HRP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (CAPPEL 社製) のみを使用する一段階検出と比較した。

特異抗体として抗 - Arnt C - 19 抗体のみを用いる以外は実施例 1 に準じて行い、一段階検出よりもビオチン・ストレプトアビジンによる二段階増感検出の感度が良好であ

10

20

30

40

50

ることを確認した(図3)。

実施例3: SW-ELISA法とゲルシフトアッセイ法との相関性の確認

ゲルシフトアッセイ法は、活性化AhR-Arntを含む細胞質画分を150mM塩化カリウム(終濃度)を含むHEDG緩衝液と混合し、これまでに報告した方法(H. Ashidaら、FEBS Lett., Vol. 476, p 213-217(2000))に従って行った。なお、DNAプローブには、実施例1に記載するDREプローブと同一のDNA配列を用い、未標識(FITC標識していないもの)DREプローブを³²P-ATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端を³²Pラベルし、一反応液量(12μL)あたり0.5μLのDREプローブ溶液を添加した。AhR-Arnt/DRE複合体は、X線フィルムに露光させた(図4A)。

10

一方、0~75fmolのTCDDのDMSO溶液を、タンパク質量として4mg/mLに調製したラット肝細胞質画分に添加した後、20°Cで2時間暗所にて反応させることにより活性化AhR-Arntを調製し、特異抗体として抗-Arnt C-19抗体を用いて、実施例1のSW-ELISA法を行った(図4B)。

この結果、ゲルシフトアッセイ法では、活性化AhR-Arntのバンドの濃さが25fmolまで濃度依存的に増加し、TCDDの定量範囲が0.25~25fmolであることが示された(矢印)。また、SW-ELISA法では、AhR-Arntの活性化がTCDDの濃度に依存して増し、定量範囲が0.3~75fmol(約0.1~20pg)であった。SW-ELISA法による検出限界値(0.3fmol)は非常に高感度であり、本方法は、ゲルシフトアッセイ法と同程度の検出感度を有することが確認された。

20

実施例4: AhR-Arntの活性化を抑制する化合物のスクリーニングにおけるSW-ELISA法とゲルシフトアッセイ法との相関性の確認

1nMのTCDDによって誘導されるAhR-Arntの活性化に対し抑制効果を有する化合物のスクリーニングを目的として、SW-ELISA法(実施例1)およびゲルシフトアッセイ法(実施例3)をそれぞれ行った。

被験物質には、フラボノイドであるアピゲニン、ヘスペレチン、ミリセチン(シグマ社製)、ガランジン、ケンフェロール、タンゲレチン(共にEXTRASYNTHESIS社製)、ケルセチン、ルチン(共に和光純薬工業社製)、ナリングニン(ナカライテスク社製)を用い、AhR-Arntにおける各化合物含有溶液の終濃度が0.1~50μMとなるように添加し、20°Cで10分間作用させ、次いで、該反応混液に1nM TCDDを20°Cで2時間処理した。

30

SW-ELISA法の測定結果は、TCDDのみで処理したAhR-Arntの吸光度を100%、DMSOのみの時のそれを0%として算出した。一方、ゲルシフトアッセイ法の結果はX線フィルムに露光させ、イメージング・アナライザーでAhR-Arntのバンド密度を測定した後、同様に、TCDDのみで処理した細胞質のバンド密度を100%、DMSOのみの時のそれを0%として算出した。いずれの方法においても被験物質の各濃度における%から1nM TCDDのAhR-Arntの活性化に対する半阻害濃度(IC₅₀値)を算出した(図5A)。

その結果、SW-ELISA法の測定結果は、ゲルシフトアッセイ法の結果とよく一致し、両法で得られた半阻害濃度の間に正の相関(r=0.950)が得られた(図5B)。これらの結果から、SW-ELISA法は、被験化学物質のAhR-Arnt活性化抑制効果の評価に適用できることが確認できた。

40

実施例5: AhR-Arntの活性化に対し抑制活性を有する液状食品のスクリーニング
1nMのTCDDによって誘導されるAhR-Arntの活性化に対し、抑制活性を示す液状食品のスクリーニングを目的として、SW-ELISA法(実施例1)およびゲルシフトアッセイ法(実施例3)をそれぞれ行った。

被験食品には、市販飲料16種(緑茶3種、中国茶、烏龍茶、紅茶2種、オレンジジュース、リンゴジュース、野菜ジュース、アロエジュース、コーヒー、ミルクココア、牛乳、豆乳、ワイン)を用い、AhR-Arntの体積に対し5%の濃度となるよう、1nMの

50

T C D Dと同時に添加した。

S W - E L I S A法およびゲルシフトアッセイ法の結果は、実施例4と同様にして得た(図6)。

その結果、S W - E L I S A法で得られた市販飲料16種のA h R - A r n t活性化に対する抑制効果は、ゲルシフトアッセイ法で得られた結果と良い相関を示した。すなわち、中国茶、烏龍茶、紅茶2種、コーヒー、ミルクココア、牛乳、ワインはT C D DによるA h R - A r n t活性化をほぼ完全に抑制し、オレンジジュース、リンゴジュース、野菜ジュース、アロエジュース、豆乳は、抑制効果が弱く、緑茶の抑制効果は製品間のばらつきが大きいことがわかった。

これらのことから、S W - E L I S A法は、実施例4で示した被験化学物質の抑制効果のみならず、液状食品のような未精製溶液の抑制効果の評価にも適用できることが確認できた。

10

実施例6：活性化タンパク質濃度の増加による定量範囲の拡大

活性化A h R - A r n tは、終濃度1 n MのT C D DのD M S O溶液を、タンパク質量として20 m g / m Lに調製したラット肝細胞質画分に添加した後、20℃で2時間暗所にて反応させることにより予め調製した。

活性化A h R - A r n t 40 μ Lに150 m M塩化カリウム(終濃度)を含むH E D G緩衝液10 μ Lをそれぞれ混合し、これを各穴あたり50 μ Lずつ添加(タンパク質量として800 μ g)し、室温で2時間反応させた。以降の操作は実施例1に準じて行い、図7の結果を得た。

20

これによると、T C D Dの定量範囲は、タンパク質として4 m g / m L濃度で活性化A h R - A r n tを用いた実施例3(0.3 ~ 75 f m o l s (約0.1 ~ 20 p g))と比較して、0.4 ~ 400 f m o l s (約0.13 ~ 130 p g)に拡大した。

つまり、活性化タンパク質濃度を増加させると、検出限界値は0.4 f m o l sで実施例3の場合とほとんど変わらない高感度を保つ一方、定量範囲が拡大されることが示された。

実施例7：特異性抗体の検出限界の比較

実施例1で良好な検出感度を有した3種の抗体(抗-A r n t C - 19抗体、抗-A h R M A 1 - 514抗体及び抗-A h R N B 100 - 128抗体)を用いて、T C D D濃度に依存したA h R - A r n t活性化の検出限界を比較した。

30

ラット肝臓の細胞質画分にさまざまな濃度のT C D Dを添加して20℃で2時間作用させた後、活性化A h R - A r n tを検出した(図8)。

T C D Dの濃度依存性は、抗-A r n t C - 19抗体と抗-A h R M A 1 - 514抗体を用いた場合に特によく確認でき、また、これらの抗体はベースラインが低い点で優れていた。

このため、以降の実験では、抗-A r n t C - 19抗体(以降、抗A r n t抗体とする)または抗-A h R M A 1 - 514抗体(以降、抗A h R抗体とする)を用いた。

実施例8：細胞系におけるS W - E L I S A法の適用

本発明のS W - E L I S A法が細胞を用いた試験にも適用できるか否かを検討した。

まず、用いる細胞を選択するため、肝臓由来の3種の株細胞(マウス肝腫瘍由来H e p a - 1 c 1 c 7細胞、ラット正常肝由来R L - 34細胞およびヒト肝腫瘍由来H e p G 2細胞(それぞれ、武田食品工業株式会社より分与、J C R B C e l l B a n kより購入、京都工芸繊維大学伊倉教授より分与)に陰性コントロールとしてD M S Oまたは陽性コントロールとして1 n M T C D Dを37℃で2または24時間作用させ、各細胞に対するT C D Dの感受性を調べた。

40

活性化A h R - A r n tは核内に移行するため、それぞれの細胞から核タンパク質を抽出し、活性化A h R - A r n tを、抗A r n t抗体を用いて検出し、陰性コントロールの450 n mにおける吸光度に対する陽性コントロールの吸光度の比を算出し、平均値±標準偏差(n = 3)であらわした(図9)。

2時間、24時間ともに、H e p a - 1 c 1 c 7細胞において活性化A h R - A r n tが

50

最も顕著に検出された。

そこで、TCDDでの処理時間を0、1、2、4、8、24時間とする以外は上記と同様にしてHepa-1c1c7細胞中でのAhR-Arnt活性化の時間依存性を抗Arnt抗体または抗AhR抗体を用いて検出し、450nmにおける吸光度を求め、平均値±標準偏差(n=3)を算出した。

その結果、どちらの抗体を用いた場合でも1~2時間においてAhR-Arntの活性化は最大となり、4時間以降は最大値の半分程度に低下して横ばいとなった(図10)。

また、AhR-Arnt活性化の濃度依存性を確認するため、Hepa-1c1c7細胞に0、0.001、0.01、0.1、0.2、0.5、1、5nM TCDDを処理して37で2時間作用させ、上記と同様に核抽出液に含まれる活性化AhR-Arntを検出したところ、どちらの抗体を用いた場合でも0.01~0.5nMにおいて直線性が確認でき、抗AhR抗体を用いた場合の検出限界は1pM TCDDであった(図11)。

以上のことから、細胞を用いた試験でも本発明のSW-ELISA法はTCDDを検出できることが確認できた。

実施例9：AhRリガンド化合物によるAhR-Arnt活性化検出

AhRのリガンド化合物であるインディゴ、インディルピンおよびイソインディゴがAhR-Arntの活性化を検出できるか否かを検討した。

Hepa-1c1c7細胞に陰性コントロールとしてDMSO、陽性コントロールとして1nM TCDD、各10μMのインディゴ、インディルピンおよびイソインディゴを処理して37で2時間作用させ、核抽出液中の活性化AhR-Arntを抗Arnt抗体を用いて検出し、450nmにおける吸光度を求め、平均値±標準偏差(n=3)を算出した。

その結果、これらの化合物は高濃度(10μM)においてAhR-Arntの活性化を誘導した(図12)。

したがって、本発明のSW-ELISA法では、ダイオキシン類によるAhR-Arntの活性化のみならず、AhRのリガンド化合物についても、そのAhR-Arnt活性化能を評価できることが確認できた。

実施例10：細胞系における野菜抽出物のAhR-Arnt活性化抑制効果の検討

細胞系でのSW-ELISA法の使用例として、野菜抽出物のAhR-Arnt活性化に対する抑制効果の評価を行った。

0.05%酢酸の存在下で90%エタノールを用いるアルコール抽出により得たモロヘイヤ抽出物1または2mg/mlをHepa-1c1c7細胞に20分、2時間および24時間含浸させて前処理し、次いでこれに500pM TCDDを2時間作用させて、核抽出液中の活性化AhR-Arntを抗Arnt抗体により検出した。

500pM TCDDの吸光度を100%、DMSO(陰性コントロール)を0%として、それぞれの吸光度から活性化AhR-Arntを%表示(平均値±標準偏差(n=3))したところ、モロヘイヤ抽出物は、2または24時間前処理を行うことにより、500pM TCDDが誘導するAhR-Arnt活性化を30~50%抑制することがわかった(図13)。

次に、カボチャ、ニンジンおよびパセリについても同様に試験した。

各野菜抽出物は2mg/mlを用い、前処理は20分あるいは2時間(モロヘイヤについては、さらに24時間)行った。

カボチャ、ニンジン、パセリの抽出物が500pM TCDDによるAhR-Arnt活性化を20%程度しか抑制できなかったのに対して、モロヘイヤ抽出物は2時間前処理することで約50%、24時間前処理では約75%抑制し、4種の野菜の中では最も抑制効果が強いことがわかった(図14)。

実施例11：動物におけるSW-ELISA法の適用

本発明の方法の適用性をヒトの体内により近い環境で評価するために、実験動物を用いてSW-ELISA法を行った。

10

20

30

40

50

S D系雄性ラット（7週齢）に、コーンオイルに懸濁した3-MCを10mg/kg体重となるように腹腔内投与し、AhR-Arntの活性化を誘導した。0時間処理としては、溶媒であるコーンオイルのみを投与した。

3-MC投与1、3、6、12時間後に肝臓を摘出し、核抽出物に含まれるAhR-Arntの活性化の程度を抗AhR抗体および抗Arnt抗体を用いたSW-ELISA法とゲルシフトアッセイ法により検出した（図15）。

SW-ELISA法とゲルシフトアッセイ法の結果はほぼ一致したものであり、実験動物を用いた試験でもSW-ELISA法が適用できることが確認できた。

次に、雄性モルモット（7週齢）にTCDD（1μg/kg体重）またはコーンオイル（陰性コントロール）を腹腔内投与し、1および3週間後の肝臓の核抽出物に含まれる活性化AhR-Arntを、抗AhR抗体を用いるSW-ELISA法とゲルシフトアッセイ法により検出した。この際、SW-ELISA法では、陰性コントロールに対するTCDDの吸光度の比を平均値±標準誤差（n=3）で評価した（図16）。

その結果、SW-ELISA法とゲルシフトアッセイ法ともに、1週間および3週間後にTCDD投与動物で活性化AhR-Arntを検出することができた。

実施例12：動物における液状食品のAhR-Arnt活性化抑制効果の検討

動物を用いた場合のAhR-Arnt活性化抑制効果の評価について検討した。

S D系雄性ラット（5週齢）に水、市販の緑茶または紅茶を1週間自由摂取させた後、3-MCを実施例11と同様に投与し、投与から24時間後の肝臓の核抽出物に含まれる活性化AhR-Arntを、抗Arnt抗体を用いたSW-ELISA法とゲルシフトアッセイ法により検出した（図17）。

水摂取群で3-MCによりAhR-Arnt活性化が誘導されたのに対して、緑茶および紅茶摂取群では活性化が低下していた。

また、SW-ELISA法とゲルシフトアッセイ法の結果は、ほぼ一致したものであり、実験動物を用いた抑制効果の試験においても、本発明のSW-ELISA法が適用できることがわかった。

本発明によれば、従来法の実施に必要とされていた特殊な実験設備および煩雑な処理を要しない、簡便、迅速かつ高精度に多検体を同時に評価できる、DNA結合性タンパク質の活性測定方法、該タンパク質の活性化剤ならびに活性化抑制剤のスクリーニング方法およびDNA結合性タンパク質の活性測定用キットが提供される。

【図面の簡単な説明】

図1は、抗FITC抗体の特異性とELISA法への適用性の確認結果を示す図である。

図2は、SW-ELISA法におけるAhR-Arntに対する特異抗体の適用性の確認を示す図である。

図3は、一段階検出と二段階検出による検出の感度差を示す図である。

図4は、TCDDによるAhR-Arnt活性化の濃度依存性および定量範囲を、SW-ELISA法とゲルシフトアッセイ法で比較した結果である。A：ゲルシフトアッセイ法、B：SW-ELISA法。Aの矢印は、活性化AhR-ArntとDREの複合体の特異的なバンドを示している。

図5は、AhR-Arntの活性化に対し抑制活性を有する化合物のスクリーニングの結果である。A：1nM TCDDのAhR-Arntの活性化に対する各化合物の半阻害濃度（IC₅₀値）を示す。白い棒はゲルシフトアッセイ法、黒い棒はSW-ELISA法による。B：ゲルシフトアッセイ法とSW-ELISA法それぞれの相関性を示す。

図6は、SW-ELISA法とゲルシフトアッセイ法による、AhR-Arntの活性化に対し抑制活性を有する液状食品のスクリーニング結果を示す図である。

図7は、TCDDによる活性化タンパク質濃度の増加に伴う定量範囲の拡大を示す図である。

図8は、TCDDによるAhR-Arnt活性化に対する特異性抗体の検出限界の比較を示す図である。

図9は、様々な細胞におけるTCDDによるAhR-Arnt活性化の比較を示す図であ

10

20

30

40

50

る。

図10は、Hepa-1c1c7細胞におけるTCDDによるAhR-Arnt活性化の時間依存性を示す図である。Aは抗AhR抗体、Bは抗Arnt抗体を用いて検出している。

図11は、Hepa-1c1c7細胞におけるTCDDによるAhR-Arnt活性化の濃度依存性を示す図である。Aは抗AhR抗体、Bは抗Arnt抗体を用いて検出している。

図12は、Hepa-1c1c7細胞におけるAhRリガンド化合物によるAhR-Arnt活性化を示す図である。

図13は、Hepa-1c1c7細胞におけるモロヘイヤ抽出物のAhR-Arnt活性化抑制効果を示す図である。

図14は、Hepa-1c1c7細胞における野菜抽出物のAhR-Arnt活性化抑制効果を示す図である。

図15は、3-MCを処理したラットの肝臓中におけるAhR-Arnt活性化の時間依存性を示す図である。A: SW-ELISA法、B: ゲルシフトアッセイ法。Bの矢印は、AhR-ArntとDREの複合体の特異的なバンドを示している。

図16は、TCDDを処理したモルモットの肝臓におけるAhR-Arntの活性化を示す図である。A: SW-ELISA法、B: ゲルシフトアッセイ法。Bの矢印は、AhR-ArntとDREの複合体の特異的なバンドを示している。

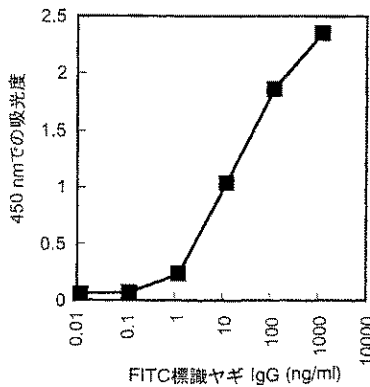
図17は、動物における緑茶と紅茶のAhR-Arnt活性化抑制効果を示す図である。A: SW-ELISA法、B: ゲルシフトアッセイ法。Bの矢印は、AhRとDREの複合体の特異的なバンドを示している。

10

20

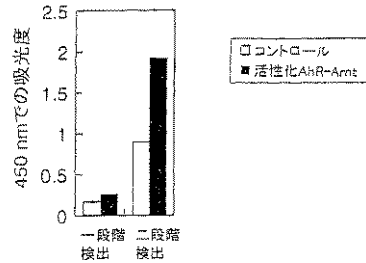
【図1】

図1



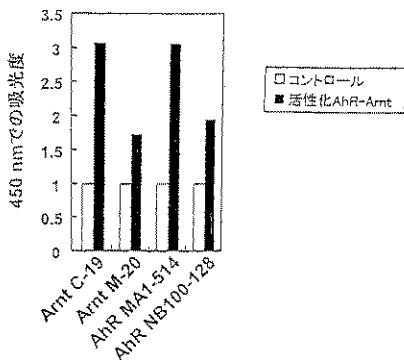
【図3】

図3



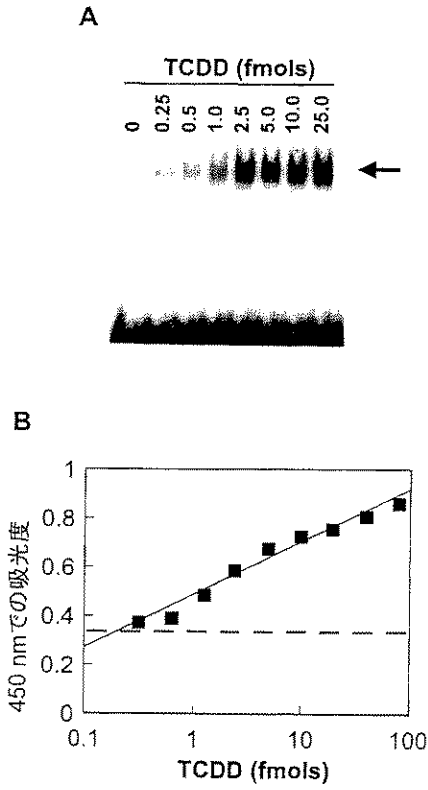
【図2】

図2



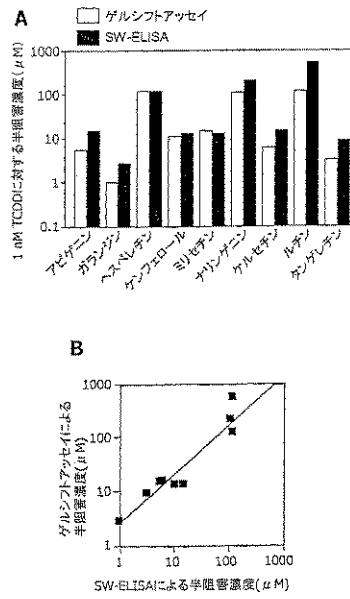
【 図 4 】

図 4



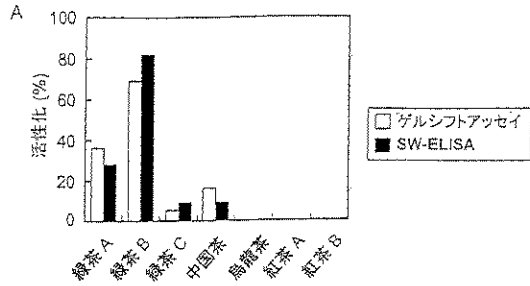
【 図 5 】

図 5



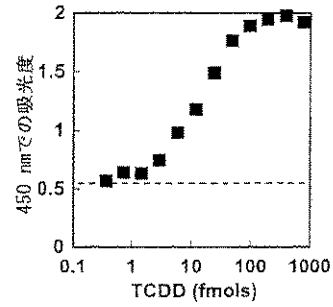
【 図 6 】

図 6



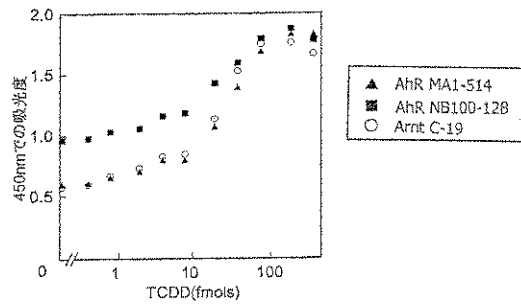
【 図 7 】

図 7



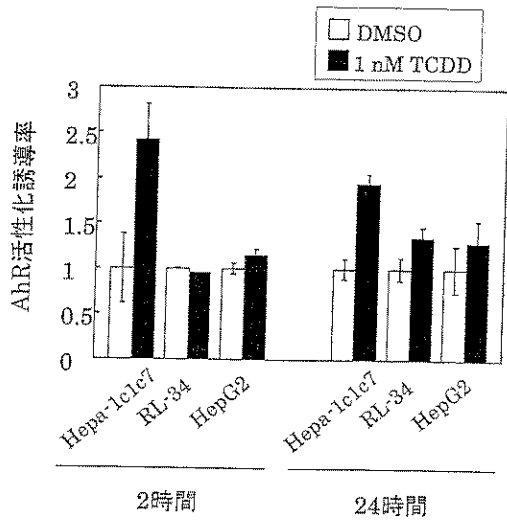
【 図 8 】

図 8



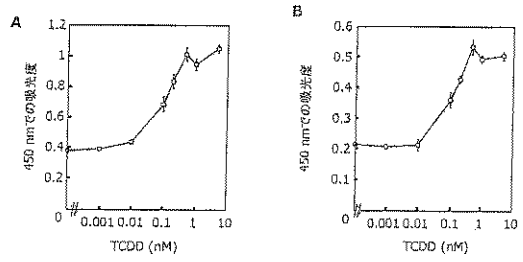
【図 9】

図 9



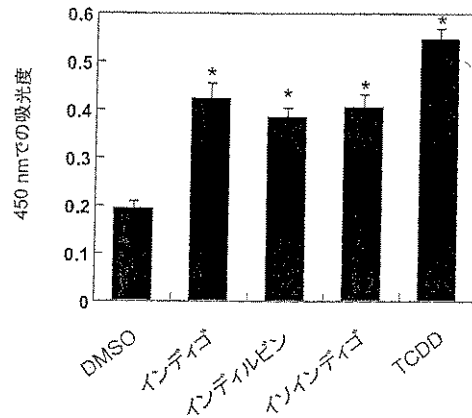
【図 1 1】

図 1 1



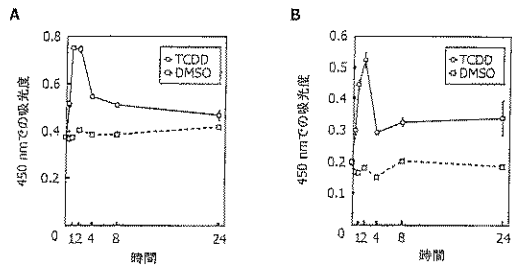
【図 1 2】

図 1 2



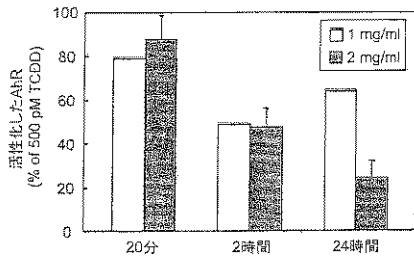
【図 1 0】

図 1 0



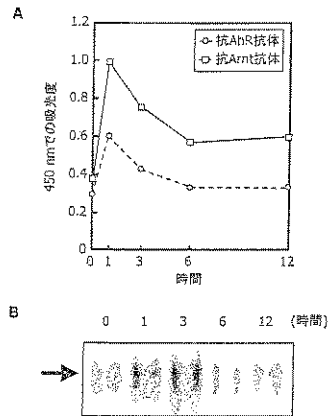
【図 1 3】

図 1 3



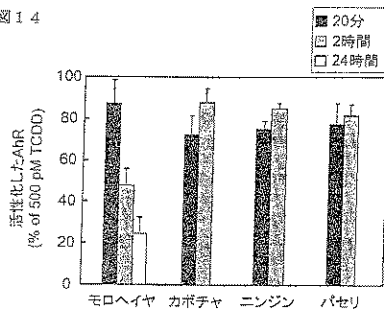
【図 1 5】

図 1 5

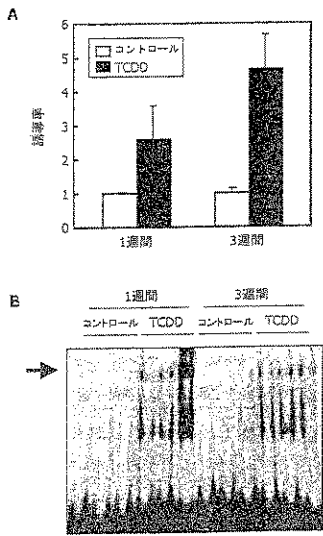


【図 1 4】

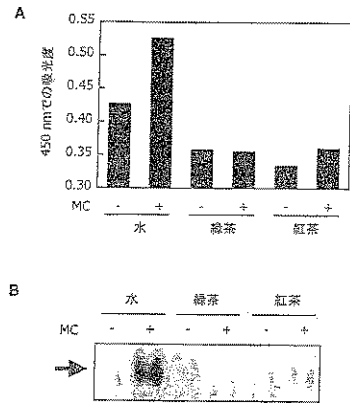
図 1 4



【図 16】
図 16



【図 17】
図 17



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP03/02407
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ G01N33/566, G01N33/53, G01N33/543, G01N33/50, G01N33/15		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ G01N33/48-98		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-503130 A (Paracelsian, Inc.), 06 March, 2001 (06.03.01), Full text & WO 97/30353 A & EP 883810 A & US 6127136 A	1-14
Y	JP 5-186232 A (Sanyo Chemical Industries, Ltd.), 08 July, 1994 (08.07.94), Par. No. [0002] (Family: none)	1-14
Y	JP 8-114590 A (Boehringer Mannheim GmbH.), 07 May, 1996 (07.05.96), Claims & EP 703452 A & US 5935780 A & DE 4434093 A	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 20 March, 2003 (20.03.03)		Date of mailing of the international search report 08 April, 2003 (08.04.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/02407

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 8-89296 A (Toyota Central Research And Development Laboratories, Inc.), 09 April, 1996 (09.04.96), Claims & EP 798387 A & US 5728531 A	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/02407								
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))										
Int. Cl ⁷ G01N33/566, G01N33/53, G01N33/543, G01N33/50, G01N33/15										
B. 調査を行った分野										
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))										
Int. Cl ⁷ G01N33/48-98										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの										
<table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2003年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2003年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2003年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2003年	日本国登録実用新案公報	1994-2003年	日本国実用新案登録公報	1996-2003年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2003年									
日本国登録実用新案公報	1994-2003年									
日本国実用新案登録公報	1996-2003年									
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)										
C. 関連すると認められる文献										
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号								
Y	JP 2001-503130 A (パラセルシヤン・インコーポレイテッド) 2001.03.06, 全文, & WO 97/30353 A & EP 883810 A & US 6127136 A	1-14								
Y	JP 6-186232 A (三洋化成工業株式会社) 1994.07.08 【0002】 (ファミリーなし)	1-14								
Y	JP 8-114590 A (ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー) 1996.05.07, 特許請求の範囲, & EP 703452 A & US 5935780 A & DE 4434093 A	1-14								
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。										
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献										
国際調査を完了した日	20.03.03	国際調査報告の発送日								
		08.04.03								
国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官 (権限のある職員)	2J 9217								
日本国特許庁 (ISA/JP)	山村 祥子									
郵便番号100-8915										
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101 内線 3251									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO3/02407
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 8-89296 A (株式会社豊田中央研究所) 1996.04.09, 特許請求の範囲, & EP 798387 A & US 5728531 A	1-14

フロントページの続き

(72)発明者 藪下 善行

日本国和歌山県橋本市境原 1 0 5

(72)発明者 水野 雅史

日本国神戸市東灘区御影山手 2 - 2 3 - 2 6 - 3 0 1

(72)発明者 小土井 理恵

日本国広島県福山市草戸町 1 6 4 6 番地

(72)発明者 西海 信

日本国兵庫県明石市大久保町高丘 3 丁目 2 3 - 1 0

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	测量DNA结合蛋白活性的方法		
公开(公告)号	JPWO2003075013A1	公开(公告)日	2005-06-30
申请号	JP2003573421	申请日	2003-03-03
申请(专利权)人(译)	新产业研究组织		
[标]发明人	芦田均 畑中豊 福田伊津子 藪下善行 水野雅史 小土井理惠 西海信		
发明人	芦田 均 畑中 豊 福田 伊津子 藪下 善行 水野 雅史 小土井 理惠 西海 信		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/6875		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/566 C12N15/00.A		
优先权	2002057516 2002-03-04 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

根据本发明，1)用蛋白质活化剂处理含蛋白质的样品以获得具有DNA结合能力的活化的含蛋白质的样品，2)将抗半抗原抗体固定在载体上，并且3)进行半抗原化。DNA探针与抗半抗原抗体结合，并且4)1)的含活化蛋白的样品与3)的半抗原化的DNA探针反应，形成5)活化的蛋白质/半抗原化的DNA探针复合物。添加特异性抗体以特异性识别复合物，6)添加用于着色的酶标记的第二抗体，7)添加引起显色反应的着色剂，并通过吸光度测量着色度。)提供了一种测量DNA结合蛋白活性的方法，该方法包括通过将蛋白的活性水平与对含有未活化蛋白的样品测得的吸光度进行比较来测量蛋白的活性水平。