長年の課題をクリア！革新的な PPZ0506 抗体で ERβ研究の新境地を拓く
～　ペルセウスプロテオミクス PPZ0506 抗体 導入事例インタビュー　～

日本医科大学 大学院医学研究科 解剖学・神経生物学分野
石井 寛高　大学院教授



ペルセウスプロテオミクスが提供する PPZ0506 抗体。その卓越した特異性と信頼性が、長年にわたりエストロゲン受容体ベータ（ERβ）研究に携わる石井 寛高 大学院教授（以下、石井教授とお呼びします）の研究に新たな光を当て、革新的な知見をもたらしています。過去の困難を乗り越え、PPZ0506 抗体の導入によって確立された免疫組織化学染色法、そしてそこから見えてきた ERβ発現の新たな真実とは。石井教授に、PPZ0506 抗体の活用事例と研究の未来についてお話を伺いました。

インタビュアー（ペルセウスプロテオミクス社員）： 本日はお忙しい中、貴重なお時間をいただきありがとうございます。まずは、PPZ0506 抗体との出会い、そして今回の研究でご使用に至った経緯をお聞かせいただけますでしょうか。

石井教授： 実は、ペルセウスさんとは大変長いご縁があります。私が大学院生だった今から約 25 年前、ERβ抗体を探していたのですが、当時良いものがなく、ERβを標的とした共同研究が中断してしまった苦い経験がありました。その時に相談していたのが、抗体作製から抗体試薬販売を始めて間もない頃のペルセウスさんだったんです。

その後時が経ち、ネイチャーコミュニケーションズに掲載されたある論文に出会いました。その論文では、研究用試薬として販売されている ERβ抗体の中で、ペルセウスさんの PPZ0506 抗体がヒト ERβに対して世界で市販される 13 種の抗体の中で唯一の特異性を持つと報告されていました[*1]。これを見て、「かつてはうまくいかなかったが、この抗体ならもう一度挑戦できるかもしれない」と、再挑戦を決意しました。

インタビュアー： まさに運命的な再会だったのですね。PPZ0506 抗体を用いて ERβの免疫組織化学染色法を樹立するにあたり、特に工夫された点や、苦労された点はございますか？

石井教授： はい、いくつか重要なポイントがありました。特に初期の失敗経験から、いくつかの条件を徹底的に最適化しました*2。

まず、**抗原賦活化**です。以前、抗体がうまく機能しなかった大きな要因の一つは、この抗原賦活化が不十分だったことです。私たちの研究室では、熱による賦活化法が最も効果的であると考え、オートクレーブを用いて 10〜15 分間の加熱処理を最適条件としました。電子レンジによる賦活化も試しましたが、非特異的な染色が出てしまうため、最適な選択ではありませんでした。

次に、**抗体希釈濃度**の検討です。適切な濃度でタイトレーションを行うことが、特異的なシグナルを得る上で非常に重要です。ヒト組織では数百倍から 1500 倍の希釈で用いることが多いですが、ラット組織では 4000 倍希釈が最適であることを見出しました。

そして、**マウス組織におけるバックグラウンドの抑制**も課題でした。PPZ0506 抗体はマウスモノクローナル抗体であるため、マウス組織に適用する際、内因性の IgG による非特異的なバックグラウンドが問題となることがあります。これに対しては、灌流固定を徹底し、血液を十分に除去することが重要でした。また、市販の「マウスオンマウス」ブロッキング剤を使用することで、効果的にバックグラウンドを抑制できることが分かりました。驚くべきことに、組織によってはブロッキングなしでも特異的に染まるケースもありました。



最後に、**検出系**の選択です。初期は LSAB 法を用いていましたが、内因性ビオチンによるバックグラウンドが問題でした。そこで、シグナル対ノイズ比（SN 比）が優れた HRP ポリマー法に切り替えたところ、非常にクリアな染色像が得られるようになりました。これは特に、ERβのような発現量が少ない分子の検出において、非常に有効な改善でした。

インタビュアー： これらの詳細な最適化によって、PPZ0506 抗体のポテンシャルを最大限に引き出されたのですね。そこから、ERβに関してどのような新たな知見が得られましたか？

石井教授： PPZ0506 抗体を用いた研究から得られた最も重要な知見は、ERβの発現がこれまでの一般的な認識よりも「**非常に限局的**」であること、そして「**明確な種差がある**」ということです。

これまでの非特異的な抗体を用いた研究では、ERβが幅広い臓器に発現しているとされてきましたが、私たちの結果は、ごく特定の臓器や細胞に限定して発現していることを示し

ました。例えば、ヒトでは精巣、ラットでは卵巣と特定の領域の前立腺、マウスでは卵巣といったように、種によって発現プロファイルが大きく異なることがタンパク質レベルで確認できました。

これらの発見は、過去の非特異的抗体によって生じていたERβの発現パターンに関する誤解を修正し、mRNAの発現データとも一致する、より信頼性の高いERβの機能解明に繋がるものだと考えています。

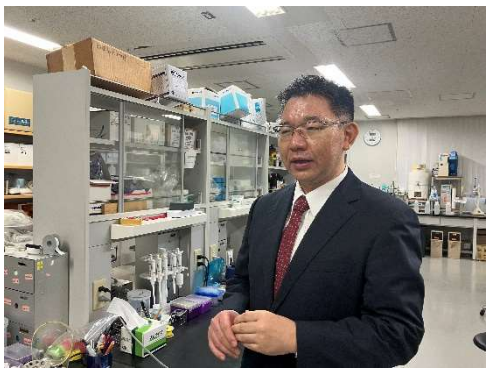
インタビュアー：先生の研究が、ERβ研究の常識を塗り替える可能性を秘めていることに、私たちも大変期待しております。今後のERβ研究におけるPPZ0506抗体への期待、そして先生の研究室の展望についてお聞かせください。

石井教授：今後、私たちは特に脳の**神経内分泌**におけるERβの役割解明に注力していきたいと考えています。PPZ0506抗体を用いることで、性差を持つ特定の神経核領域や、キスペプチンニューロン、ドーパミンニューロン、バソプレッシンニューロンなど、ホルモン分泌に関わる重要な神経細胞におけるERβの発現と、その生理的な意義を詳細に解析できると期待しています。

さらに、私たちは医学部の解剖学教室に所属しているため、**ヒトの試料**を用いた研究も進めています。倫理委員会の許可を得て、ラットやマウスで得られた知見をヒトの脳にフィードバックし、種を超えたERβの発現様式や機能を比較解析していくことで、より高次な生命現象の理解に貢献できると信じています。

インタビュアー：大変興味深いお話、ありがとうございます。最後に、先生が日頃、抗体試薬を選定される際の基準についてお聞かせいただけますか？

石井教授：私たちが抗体を選ぶ際に最も重視しているのは、「**実績と信頼性**」です。新規の抗体を使用するのは、条件検討に多くの時間と労力がかかるため、リスクが高いと考えています。そのため、まずは論文で多数の発表実績がある、あるいは他の研究室からの評判が良い抗体を優先して試します。



市販の抗体の中には、「特異性が保証されている」と謳われているものでも、実際に使用してみると期待通りの結果が得られないことも少なくありません。特に、発現量の少ないターゲットや、これまであまり注目されてこなかった臓器での発現を調べたい場合、その抗体の真の特異性が問われます。ですので、私たちは常に口コミや過去の使用実績を参考にしながら、本当に「特異性が

高い」と確信できる抗体を選び続けるよう心がけています。PPZ0506 抗体は、まさにそのような基準を満たしており、今後の研究においてもなくてはならない存在です。

まとめ

石井教授のインタビューを通じて、ペルセウスプロテオミクス製の PPZ0506 抗体が、ERβの免疫組織化学染色法における長年の課題を解決し、その発現パターンに関する新たな知見をもたらしたことが明らかになりました。抗原賦活化の最適化、適切な抗体希釈、特異的な検出系の選択といった地道な努力と、PPZ0506 抗体の持つ優れた特異性が融合することで、ERβ研究は新たな局面を迎えています。

今後、石井教授の研究室では、PPZ0506 抗体を用いて脳神経科学における ERβの役割や、ヒトの脳での発現解析へと研究の幅を広げていくとのこと。ペルセウスプロテオミクスは、これからも研究者の皆様の課題解決と、生命科学の発展に貢献する信頼性の高い抗体試薬品を提供してまいります。

＊1：Andersson, S., Sundberg, M., Pristovsek, N. *et al.* Insufficient antibody validation challenges oestrogen receptor beta research. *Nat Commun* **8**, 15840 (2017)

＊2：補足資料 - 石井教授が開発された PPZ0506 抗体を用いたラットおよびマウス切片の免疫組織化学染色の最適化プロトコールを以下に示します。

1） 日本医科大学　解剖学 神経生物学分野　石井 寛高　大学院教授
https://www.nms.ac.jp/college/pickup_contents/pickup25_ishi.html
2） ペルセウスプロテオミクス社　抗体製品一覧
https://www.ppmx.com/business/products/antibody.html

Supplementary Material

Optimized protocols for immunohistochemical staining of rat and mouse sections using PPZ0506 antibody, with some modifications

Tissue preparation

1. Euthanize animals by intraperitoneal injection of mixed anesthesia (medetomidine, midazolam, and butorphanol).
2. Perfuse transcardially with 0.9% (w/v) saline and 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB; pH, 7.4).
3. Post-fix organs with the same fixative overnight at 4°C.

Preparation of paraffin-embedded sections of peripheral organs

1. Immerse fixed organs in PB and dehydrate in an ethanol series (70%, 80%, 90%, 95%, 99%, and 100%) and xylene.
2. Embed the fixed organs in paraffin.
3. Slice paraffin-embedded organs at 5-μm thickness on a microtome (RM2235; Leica Biosystems, Nußloch, Germany).
4. Mount sections on Frontier-coated glass slides (Matsunami Glass, Osaka, Japan).
5. Deparaffinize with xylene and hydrate in an ethanol series (100%, 99%, 95%, 90%, 80%, and 70%).
6. Rinse with distilled water (DW) for 5 min.

Preparation of frozen sections of brains

1. Imm$_2$erse fixed organs in 0.1 M PB containing 20% (w/v) sucrose for 2–3 days at 4°C.
2. Freeze the fixed organs in n-hexane at -80°C.
3. Slice frozen organs at a thickness of 30 μm (for mouse brain) or 40 μm (for rat brain) on a cryostat (CM3050S; Leica Biosystems).
4. Rinse three times with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS; pH, 7.4) for 5 min each time.
5. Mount sections on Frontier-coated glass slides.
6. Dry the slides on a slide warmer (PS-53; Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan) at 60°C for 1 h.
7. Rinse with DW for 5 min.

Immunohistochemical staining of rat and mouse sections with PPZ0506

1. Place sections mounted on glass slides in methanol containing 0.3% (v/v) H_2O for 5 min.
2. Rinse with DW and PBS for 5 min each.

3. Autoclave at 121°C for 10 min in citrate-based antigen unmasking solution (H 3300; Vector Laboratories, Newark, CA, USA) for antigen retrieval.
4. Rinse three times with PBS (5 min for each rinse).
5. Blocking Rat: Block with 5% normal goat serum (NGS) in 0.1 M PBS containing 0.1% Triton X-100 (PBST; pH, 7.4) for 30 min. Mouse: Block with blocking reagent (component of Mouse-on-Mouse Polymer IHC Kit; ab269452; Abcam, Cambridge, UK) for 30 min.
6. Primary antibody reaction* Rat: React with PPZ0506 antibody (1:2000 for brain tissues, 1:4000 for peripheral tissues; Perseus Proteomics, Tokyo, Japan) in PBST containing 5% NGS at 4°C overnight. Mouse: React with PPZ0506 antibody (1:2000 for brain tissues, 1:4000 for peripheral tissues) in PBST at 4°C overnight. *To obtain negative controls, prepare sections subjected to solvent without primary antibody.
7. Rinse three times with PBST (5 min for each rinse).
8. Secondary antibody reaction Rat: React with 50% (v/v) goat anti-mouse immunoglobulin G conjugated to a horseradish peroxidase (HRP)-labeled polymer (ab214879; Abcam) in PBST for 2 h. Mouse: React with HRP polymer detector reagent (component of Mouse-on Mouse Polymer IHC Kit; ab269452; Abcam) for 15 min.
9. Rinse three times with PBS (5 min for each rinse).
10. Rinse with 0.05 M Tris-HCl (pH, 7.5) for 5 min.
11. Visualize immunoreactive signals with 200 μg/mL of 3,3′ -diaminobenzidine tetrahydrochloride (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and 0.01% (v/v) H_2O_2 in 0.05 M Tris-HCl (pH, 7.5).
12. Counterstain with hematoxylin for peripheral tissues.
13. Rinse with DW, dehydrate in ethanol series (70%, 80%, 90%, 95%, 99%, and 100%), and clear in xylene.
14. Coverslip with Permount Mounting Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)