

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（総合）研究報告

エストロゲン受容体センシングのモノクローナル抗体の作製

分担研究者および分担研究協力者

坂口和靖 九州大学大学院理学研究院・助教授（現：北海道大学教授）

桑田 治 九州大学大学院理学研究院・リサーチレジデント

研究要旨

ホルモン受容体を介して環境化学物質が及ぼす内分泌攪乱作用の検定が急務となっている。主任研究者らは先にエストロゲン受容体の α ヘリックス 12 (H12) 部位に対して作製されたポリクローナル抗体が、化学物質のホルモン受容体への結合に伴う受容体コンホメーション変化を感知（センシング）することを示した。この「受容体コンホメーション変化センシングアッセイ法」に基づく化学物質のリスク評価をより効率よく実現するため、本分担研究では特異性の高いモノクローナル抗体の創製を目指した。H12 部位のペプチドを抗原としてマウスを免疫し、ミエローマ細胞融合法により得られた多数の抗体産生細胞について、ペプチド抗原および受容体を競合剤として用いる競合 ELISA 法でスクリーニングを実施した。その結果、リガンド濃度依存的に受容体への親和性を変化させるような3つのモノクローナルセンシング抗体を得ることに成功した。3つの抗体はアンタゴニストに対しては異なる応答性を示した。これらのうちアゴニスト感受性のセンシング抗体について、抗体産生細胞のマウスへの腹腔内注射により、腹水として高濃度の抗体溶液を大量に得ることができた。これを用いて実際に各種化学物質のセンシングアッセイを実施した。各化学物質ごとに用量反応曲線を解析した結果、従来のポリクローナル抗体を用いたアッセイ法とも高い相関をもちながら、より効率よく受容体結合能を評価することができ、化学物質の環境リスクの順位予測を行うことに成就した。一方、男性ホルモンであるアンドロゲンの受容体 (AR) についても、同様の原理に基づくセンシング抗体の作製を進めているが、ポリクローナルセンシング抗体は既にえられているものの、単離した抗 AR モノクローナル抗体のうちからセンシング能を示すものはこれまでのところ得られていない。

A. 研究目的

内分泌かく乱性が懸念される多数の化学物質について、それらのホルモン受容体に対する影響を効率よく検定することが急務となっているが、これまでのところそのためには化学物質の受容体への結合性、ホルモン活性、抗ホルモン活性と

いう3つの活性についてそれぞれ別途に試験されねばならず、その操作および解析はきわめて煩雑である。こうしたなか主任研究者らは先に、化学物質の結合により受容体の構造（コンホメーション）が変化することを、抗体を用いて感知（センシング）するという新しい発想に基づ

き、受容体結合能および活性化能を同時に評価できることをウサギのポリクローナル抗体を用いて示した。本分担研究では、この「受容体コンホメーション変化センシング法」の効率良い実現のために、新たにマウスのモノクローナル抗体を創製することを目指した。

ウサギを免疫して得られた抗血清を用いることで、女性ホルモンであるエストロゲンの受容体に対するホルモン様物質の結合性とホルモン活性の両者を同時に評価測定すること、また、活性域値について大きく5つのグループに分画化することに成功している。しかし、血清がポリクローナル抗体であることから、その中には特異性の異なる抗体が混在している可能性がある。そこで、より特異性の高いモノクローナル抗体を得ることであれば、各種のリガンドのうち、エストロゲンのようなアゴニストのみならずアンタゴニストによる構造変化を検知するような抗体が得られる可能性が考えられる。これによりホルモン作用の検定に加えて抗ホルモン作用との区別もつけられるような系の確立が期待できる。加えてモノクローナル抗体の特異性の高さからアッセイの感度や定量性などの向上も期待され、測定の効率を高めることが可能になる。そこで本分担研究では、このような「センシングモノクローナル抗体」を創製し、各種の化学物質の活性の判定と内分泌かく乱作用の順位付けを効率よく行うことを目的とした。

B. 研究方法

(1) 抗原の調製とマウスへの免疫

エストロゲン受容体(ER)のうちリガンドの結合により構造変化を起こすことが見い出されている α ヘリックス 12 (H12) 部位付近の配列をもつペプチドを合成し、ポリクローナル抗体を作製した時と同様

にキャリアタンパク質 KLH と結合させて免疫源とした。これを Balb/c マウスの足蹠に局所免疫し、9 日目に後肢大腿部より肥大したリンパ節を摘出した。リンパ細胞とマウス由来ミエローマ細胞とをポリエチレングリコールにより融合させて 96 ウェル培養プレート播き込んで培養した。ウェル中のハイブリドーマ細胞を順次 DMEM 培地に移して継代培養し、その培養上清を回収してスクリーニングに用いた。

(2) 抗体産生細胞のスクリーニング

培養上清に含まれる抗体を以下の2段階のスクリーニングで検定した。まず、ペプチドまたは ER を抗原とする間接 ELISA 法を一次スクリーニングとして実施し、これらの抗原に実際に結合する抗体の産生細胞を選別した。続いてペプチド抗原を固定化し ER を競合剤として用いた競合 ELISA 法による二次スクリーニングを実施した。ここでは各抗体ごとにあらかじめ競合反応が最大になるよう実験条件の最適化を行い、その後、女性ホルモンである 17β -エストラジオール (E_2) をリガンドとして ER へ添加することによって抗体反応が変化するような抗体を探索した。

抗体はいずれも、抗体産生細胞の培養上清を回収して、カートリッジ式遠心フィルターユニット(分画分子量 100,000)による限外濾過で高分子量成分を粗精製したものを使用した。また、イムノグロブリンアイソタイプ特異抗体を二次抗体として用いた間接 ELISA により、各抗体のアイソタイプを決定した。

(3) センシングアッセイ法の確立

二次スクリーニングにおいてリガンドの有無に応じて異なる免疫反応性を示した抗体について、リガンド濃度を変化さ

せて競合の程度が変化するかどうかを調べた。さらに競合 ELISA における抗体濃度、抗原量、受容体濃度などについての至適実験条件を詳細に検討した。その結果、 E_2 を基準アゴニスト物質として用いるコンホメーション変化センシングアッセイ法を確立した。さらにアンタゴニストの一つとして 4-ヒドロキシタモキシフェン (OHT) を同様に用いて試験し、得られたセンシング抗体のリガンド感受性を調べた。

(4) クローン化と腹水調製

センシング能を有するモノクローナル抗体の産生が確かめられたハイブリドーマは、それぞれ限界希釈法でクローン化を進めた。さらにそのうちの一つについては、ハイブリドーマをマウスの腹腔内へ注射して飼育後に腹水を回収することにより、高濃度の抗体溶液を得た。

(5) 抗原認識部位の解析

センシング抗体の ER に対する認識部位を調べるため、免疫源および固相化抗原として用いたペプチドに加えて、配列が一部重複して N 端寄りの配列を持つペプチドを併用した間接 ELISA を行って、抗体の反応性を比較した。

(6) センシングアッセイによる化学物質の内分泌攪乱作用の順位付け

アゴニスト感受性であったモノクローナルセンシング抗体 mAb1 を用いて、ポリクローナル抗体を用いた実験により受容体結合性が疑われていた約 60 の化学物質についてセンシングアッセイを実施した。各試験物質に対して、抗体応答の用量反応曲線を求め、それぞれ 50%有効濃度 (EC_{50}) および相対抗体応答性 (RIR) の値を算出した。この結果をもとに化学物質のリスク評価を行った。

(7) アンドロゲン受容体コンホメーションセンシング抗体の作製

ここまで ER に対して実施してきたのと同様に、男性ホルモン (アンドロゲン) 受容体 (AR) についても、同様のコンホメーション変化センシング抗体の作製に取り組んだ。AR の場合にも、ER と同様のヘリックス 12 部位付近の構造変化が重要であることが示されているので、ここが抗原部位として有効であると考えた。そこでこの部位を含むようなペプチドを合成してマウスに免疫し、上記と同様の方法で抗体産生細胞をスクリーニングした。そして AR を競合剤とした ELISA 法によるスクリーニングによってコンホメーションセンシング抗体の単離を試みた。

C. 研究結果

(1) 抗体スクリーニング

マウス 2 匹を局所免疫して得られた 325 個のハイブリドーマについて、段階的なスクリーニングを実施した。まず、一次スクリーニングとして固相化ペプチド抗原との反応性を間接 ELISA で調べて、39 の抗体産生細胞を選択した。一方、固相化した受容体での間接 ELISA では 29 個しか有意な反応性をもっていないことが分かった。一部の細胞は漸次抗体価を喪失した。

続いて、二次スクリーニングとして ER 構造変化識別試験、すなわちリガンド非結合型 ER または E_2 結合型 ER を競合剤として用いた競合 ELISA を行うことによって、モノクローナル抗体 mAb3 が E_2 添加によって ER への親和性の低下を示すことが見いだされた。さらに OHT もリガンドとして併用した再度のスクリーニングにより、新たに mAb1 および mAb2 が選

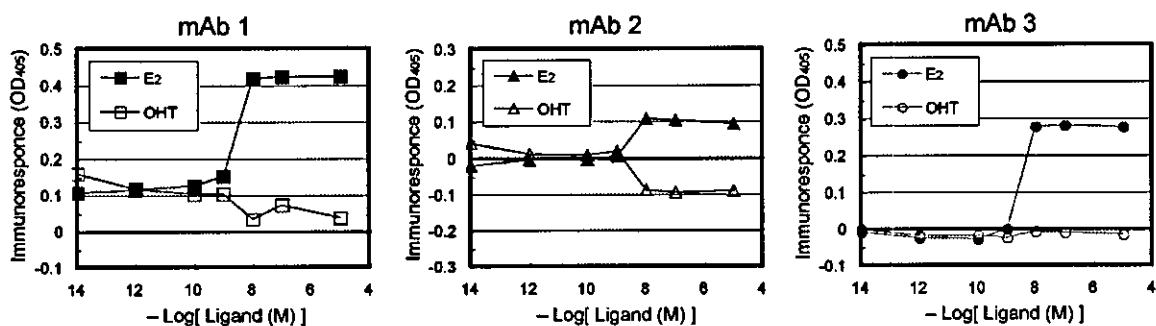


図1 モノクローナル抗体を用いたセンシングアッセイの結果の一例。3種類の抗体は、リガンドとしてアゴニスト (E₂) またはアンタゴニスト (OHT) を用いたときにはそれぞれ異なる濃度依存性を示した。縦軸は 405nm における吸光度の変化値をあらわし、大きいほど受容体への親和性がより低下することを意味する。

出された。このうち mAb2 は、他とは異なり OHT が ER に結合することによって親和性の増大を示した。これら3つの抗体について、受容体への親和性などの性質を表1にまとめた。

表1 モノクローナル抗体の受容体への親和性のリガンド依存的な変化などの性質

抗体	受容体への親和性	アゴニストによる応答	アンタゴニストによる応答	アイソタイプ
mAb1	大	親和性低下	変化なし	IgG _{2b}
mAb2	大	親和性低下	親和性上昇	IgM
mAb3	中	親和性低下	変化なし	IgM

(2) コンホメーション変化センシングアッセイの条件検討

競合 ELISA 法の原理に基づくアッセイの実験条件を検討した結果、固相化抗原として用いるペプチドの量を、ポリクローナル抗体の場合より少ない 25 pmol/well に、また競合剤として用いる ER についても 10 nM というより低い濃度

に設定することができた。リガンドとして E₂ および OHT の濃度を 1 nM から 10 μM まで変化させて ER に添加し、そこへそれぞれの抗体を加えて競合 ELISA を実施した (図1)。3つの抗体ともポリクローナル抗体と同様に E₂ に対しては濃度依存的に親和性の低下を示した。他方 OHT に対しては mAb1 と mAb3 は変化しなかった。それに対して mAb2 だけはアンタゴニスト濃度の増大に伴って逆に親和性を上昇させた。

(3) リガンド感受性とエピトープの関係

mAb2 が他とは異なるリガンド感受性を示したことから、3つの抗体の受容体への結合様式が互いに異なることが考えられた。そこで、これらの抗原ペプチドに対する認識部位の解析を試みた。その結果、mAb2 のみが H12 部位そのものをエピトープとしていることが分かり (図2)、3つの抗体のリガンド感受性の違いと認識部位の違いが対応していた。このことから、H12 部位付近が結合するリガンドの種類によって異なる構造変化を起こすという従来 of 結晶構造解析法による知見が、抗体を利用することによって実際に評価し得ることが初めて示された。

(4)モノクローナル抗体によるセンシングアッセイの特徴

モノクローナル抗体を用いた試験法を従来のポリクローナル抗体の場合と比べると次のようであった。

- ▶ リガンドの抗体応答有効濃度の値がより低く、受容体結合試験の結果に近かった。すなわち、より高感度である。
- ▶ アッセイに用いる受容体とリガンドの量が少なくて済んだ。すなわち、より効率的な試験法である。
- ▶ リガンド感受性が異なる複数の抗体が得られ、ER の E₂ 結合型と OHT 結合型とで親和性が逆転するものもあった。従って、アンタゴニストも識別できる。

(5)センシング抗体アッセイによる順位予測の実施

アゴニスト感受性のモノクローナルセンシング抗体 mAb1 について、抗体産生細胞をマウスに腹腔内注射することにより、腹水として高濃度の抗体溶液を大量に得ることができた。これを用いて、実際に各種化学物質のコンホメーションセ

ンシングアッセイを実施した。先に報告したポリクローナル抗体を用いたアッセイとの相関を確認するため、試験物質としては、以前のポリクローナル抗体を用いた試験法によって ER との結合性が疑われていた約 60 の化学物質を対象とした。これまで全ての物質に対して mAb1 を用いて行った2度のアッセイの結果を平均し、50%有効濃度 (EC₅₀) および相対抗体応答性 (RIR) のそれぞれの値につき、ポリクローナル抗体によって得られた値に対する相関分布図をプロットして、回帰直線を求めた (図3)。

その結果、まず EC₅₀ は両者の間で正の相関があり、相関の度合いも全体的に高かった (図3A)。相関係数は1よりは小さかったが、回帰直線の定数項が負であることから、モノクローナル抗体のほうが受容体親和性を検出する感度が高いといえる。一方、RIR も互いに正の相関をもっていたが、相関の度合いはそれほど大きくなかった (図3B)。

続いて、mAb1 を用いたセンシングアッセイによって得られた結果を、従来の関連する試験法によって得られていた値と比較した。すなわち、EC₅₀ を受容体競争

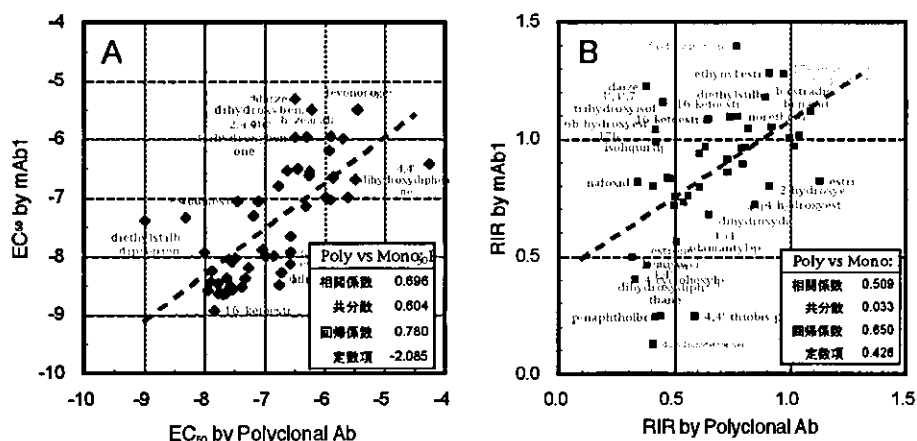


図3 モノクローナル抗体 mAb1 を用いたセンシングアッセイの結果のポリクローナル抗体との相関図。50%有効濃度 (EC₅₀, A) および相対抗体応答性 (RIR, B) のそれぞれについて、横軸にポリクローナル抗体による値、縦軸にmAb1による値をプロットした。

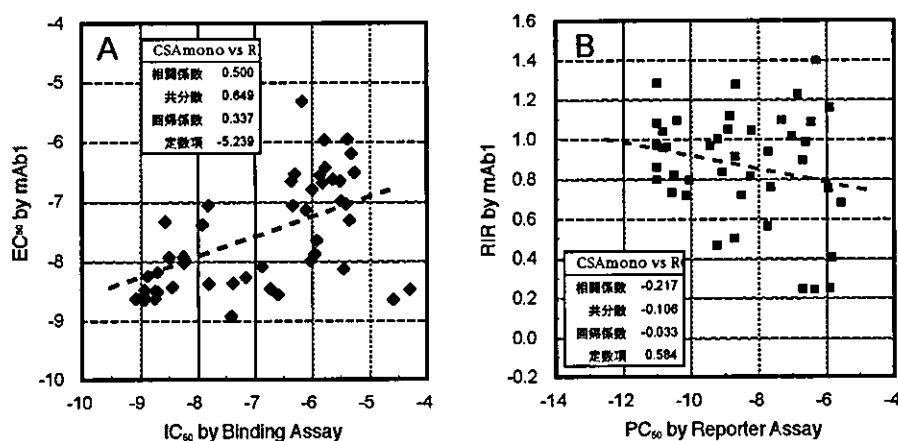


図4 モノクローナル抗体 mAb1 によるセンシングアッセイの結果を、受容体結合試験 (A) およびレポーター遺伝子アッセイ (B) と比較した。二つの試験法による結果を横軸に取り、それぞれと対応していると考えられる mAb1 による EC₅₀ または相対抗体応答の値を縦軸にプロットした。

結合試験の IC₅₀ と、また抗体応答性をレポーター遺伝子アッセイによる PC₅₀ の値とに対してそれぞれ相関性を調べた (図

4)。その結果、mAb1 によるセンシングアッセイは、結合試験との間には正の相関が

表1 mAb1 によるセンシングアッセイで得られた各化学物質の有効濃度と抗体応答性。

#	化合物名	有効濃度 (log[EC ₅₀])	抗体応答性	#	化合物名	有効濃度 (log[EC ₅₀])	抗体応答性
1	16-ketoestradiol	-8.93	1.08	24	diethylstilbestrol dipropionate	-7.39	0.80
2	Ethynyl estradiol	-8.63	1.28	25	Estrone	-7.34	0.46
3	Diethylstilbestrol	-8.63	1.09	26	2-methoxy-β-estradiol	-7.31	0.96
4	17-epiestriol	-8.58	0.97	27	Norethindrone	-7.15	1.10
5	α-zearalenol	-8.57	0.79	28	4-hydroxyestradiol	-7.07	0.72
6	17β-estradiol	-8.55	1.00	29	Coumestrol	-7.07	0.94
7	6α-hydroxyestradiol	-8.52	0.91	30	β-estradiol-3-benzoate	-7.04	1.18
8	6-ketoestradiol	-8.50	0.86	31	3',4',7-trihydroxyiso-flavone	-7.00	1.16
9	Dihydroxytetraphenyl-methane	-8.49	0.13	32	Genistein	-6.81	0.76
10	17α-estradiol	-8.48	1.00	33	6-ketoestradiol-6-carboxymethyl)oxime	-6.70	1.01
11	16α-hydroxyestrone	-8.47	0.96	34	Norethynodrel	-6.66	1.12
12	Estriol	-8.44	0.82	35	4-cyclohexylphenol	-6.66	0.40
13	6β-hydroxyestradiol-17β	-8.39	1.04	36	isoliqirtigenin	-6.63	0.98
14	Equilin	-8.38	0.72	37	4,4'-dihydroxydiphenyl	-6.56	0.68
15	4-(1-adamantyl)phenol	-8.28	0.56	38	4,4'-thiobis-phenol	-6.54	0.24
16	Diethylstilbestrol	-8.25	0.96	39	5α-dihydrotestosterone	-6.52	1.40
17	Estrone 3-hemisuccinate	-8.20	0.50	40	4,4'-dihydroxydiphenyl-methane	-6.43	0.25
18	estriol 3-methyl ether	-8.13	0.89	41	2,3,4,4'-tetrahydroxy-benzophenone	-6.20	0.83
19	Mestranol	-8.10	1.04	42	2,4,4'-trihydroxybenzo-phenone	-5.98	1.08
20	Dehydrostilbestrol	-8.04	0.79	43	β-zearalenol	-5.97	0.83
21	5α-androstane-3β,17β-diol	-7.99	1.05	44	kaempferol	-5.96	0.75
22	2-hydroxyestriol	-7.89	0.80	45	daizein	-5.32	1.22
23	17α-ethynylestradiol-3-cyclopenta ether	-7.66	1.27				

ある（図4A）一方、レポーターアッセイとは明瞭な相関は見られなかった（図4B）。EC₅₀については回帰直線の近くに集まった相関性の高い物質が多数ある一方で、それらから外れた物質もかなりあった。またRIRについては一部の化合物は値が小さくて判定不能（図には現れない）となった。

以上を踏まえて、mAb1によるセンシングアッセイにより評価した各種化学物質のEC₅₀およびRIRの値をEC₅₀の大きさの順に並べた（表2）。

その結果、これまでのポリクローナル抗体によるアッセイと全体的には同様の順位付けが得られた。これにより、モノクローナル抗体を用いた化学物質の環境リスクの順位予測が実現した。

(6) アンドロゲン受容体コンホメーションセンシング抗体の作製の試み

ARについても同様のセンシング抗体作

製を試みたが、これまでのところ、センシング能をもつ抗体のクローンを得るには至っていない。約300の抗体産生細胞の一次スクリーニングから単離した22クローンに対して、アンドロゲン受容体を競合剤とする二次スクリーニングを行ったところ、9クローンが競合反応を示した（図5）。しかしいずれも、男性ホルモンであるジヒドロテストステロンに依存した抗体応答の変化は示さなかった。

二次スクリーニングを実施する際には競合ELISA法の反応条件の最適化なども注意深く行ったので、これらのクローンのセンシング能を見逃してしまったとは考えにくい。一方、別途作製したポリクローナル抗体については、センシング能をもつ抗体が得られている。従って、今後はさらに免疫からスクリーニングまでの操作をさらに繰り返すことでセンシングモノクローナル抗体の単離を目指すことが必要である。

D. 考察

モノクローナル抗体の利点の1つとして予想された感度の高さが実証され、得られた抗体応答有効濃度（EC₅₀）の値はポリクローナル抗体の場合に比べて化学物質の受容体結合親和性によりよく相応していた。これは、モノクローナル抗体を用いた場合の方が、受容体の実際の構造変化をよりよく反映しているためだと考えられる。

第2年度までに示すことのできたモノクローナル抗体によるコンホメーション変化センシングアッセイ法の有効性を受けて、第3年度には実際に得られたセンシングモノクローナル抗体を用いて化学物質の環境影響評価を実施した。その結果は、全体として既報のポリクローナル抗体による結果と同様であったが、一部の物質については順位付けが異なってい

#	dilution range										
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	
8							1.01	0.94	0.89		
10	1.43	0.64	0.40								
16		0.90			0.77	0.59					
21	-0.0	-0.0									
26				0.82	0.83	0.80					
27	0.77	0.75	0.79								
30				0.90	0.97	0.83					
46		0.74		0.35	0.09						
47	1.12	0.83	1.03								
51	1.05	0.95	0.92								
55	1.03	0.72	-0.0								
58				1.02	1.05	1.01					
64				0.93	0.84	0.96					
66		1.00	0.91	0.88							
69		0.68	0.84	0.56							
89	0.99	1.09	1.13								
90		1.30		0.95	0.95						
96		1.19		1.03	1.00						
100		1.03	0.74	0.76							
111		1.20	0.86	0.89							
115	1.15	1.14	1.02								
117		1.03		0.81	0.73						

図5 抗ARモノクローナル抗体の二次スクリーニングにおける競合ELISAの最適化の結果。クローンごとに、競合反応(1に対する相対値)を示した希釈倍率(横軸)の範囲を下線で示した。

た。

この差について考察する際に重要なことがモノクローナル抗体のもう一つの特徴である。すなわちポリクローナル抗体の特異性の異なる抗体が混在していると考えられるのに対して、モノクローナル抗体はその名が示すとおり性質が均一である。今回用いた mAb1 という抗体は、アゴニストリガンドである 17β -エストラジオールに感受性であることが分かっているから、この mAb1 を用いた順位予測の結果は、化学物質の受容体に及ぼす影響のうちから、女性ホルモン様のアゴニスト活性を特異的に取り出して評価の指標としていると言える。

一方、同時に得られたセンシング抗体 mAb2 の方は、アンタゴニストであるヒドロキシタモキシフェン(OHT)に対して逆位相の感受性を示す、すなわち OHT 非結合型より OHT 結合型への応答性が低下することが分かったので、mAb2 を用いてセンシングによる順位付けを行えば、その結果はアンタゴニスト活性をも併せたような異なったものとなることが予想される。

このように、今後はモノクローナル抗体の特性をさらに活かして、リガンド感受性の異なるような複数の抗体を探索し、それらの抗体のセットを組み合わせて用いることで、実際の多種多様な化学物質の環境リスクを総合的に評価する本試験法の有用性が実証されたものと考えられる。

E. 結論

1) 初年度に導入・整備した実験環境を利用し、局所免疫による迅速な抗体作成法の採用と併せて、受容体構造変化の識別能を効率良く評価できる抗体スクリーニング法を第2年度に確立できた。

2) このスクリーニングを実際に実施して、高い力価を示す多数の抗体産生細胞が得られた。そのなかから、リガンド依存的な構造変化を検知するセンシングアッセイ能を有するような3つの抗体を得ることができた。

3) 従来のポリクローナル抗体を用いたアッセイ法との比較から、モノクローナル抗体を用いた場合の方がより効率のよいアッセイが可能であることが実証された。

4) リガンド感受性の異なる複数の抗体が得られたことで、ポリクローナル抗体では不可能であった化学物質のアゴニスト活性とアンタゴニスト活性との識別もできる可能性のあることが示された。

5) 抗体のリガンド依存性の差異と抗原認識部位の違いに相関があったことから、エストロゲン受容体の H12 部位付近の構造と活性の相関についての新しい知見が得られた。

6) アゴニスト感受性のモノクローナル抗体を大量に得て、実際に各種化学物質のコンホメーションセンシングアッセイを実施した結果、従来のポリクローナル抗体によるアッセイ法とも高い相関をもちながら、より効率よく多数の化合物の受容体結合能を評価することができた。これにより化学物質の環境リスクの順位予測を行うことに成功した。

F. 健康危険情報

現在のところ特に該当する情報はない。

G. 研究発表

論文発表

1. Nuclear eceptor Binding Assay by Sensing Changes in Receptor Conformation. Y. Shimohigashi, D. Asai, M. Nakai, Y. Yakabe, M. Takatsuki, T. Nose, K. Sakaguchi, S.

Mohri, and O. Koizumi: *Environ. Sci.*, 8, 141-142 (2001).

2. Biochemical evaluation of hormonal activity of endocrine disruptors by sensing the estrogen receptor conformation changes, D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Tokunaga, T. Nose and Y. Shimohigashi, *Peptide Science* 2002, 127-130 (2003).

3. Highly Sensitive Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor. O. Kuwata, T. Honda, D. Asai, T. Tokunaga, A. Shibuya, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2004, in press.

学会発表

1. 徳永隆俊、浅井大輔、桑田 治、中井誠、矢可部芳州、野瀬 健、小泉 修、下東康幸、アンドロゲン受容体コンホメーション変化センシング抗体の作製、平成 15 年度日本生化学会九州支部例会、2003. 6. 1。

2. 桑田 治、本田 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、白須直人、野瀬 健、下東康幸、モノクローナル抗体を用いた高感度なエストロゲン受容体コンホメーション変化センシングアッセイ法、平成 15 年度日本内分泌攪乱化学物質学会、2003. 12. 2 ~3。

3. 桑田 治、本田 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、白須直人、野瀬 健、下東康幸、化学物質のエストロゲン受容体結合に伴うコンホメーション変化とモノクローナル抗体を用いる高感度センシングアッセイ法、平成 15 年度内分泌攪乱物質の

環境リスク研究成果発表会、2004. 1. 23~24。

4. 桑田 治、本田 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、白須直人、野瀬 健、下東康幸、Highly Sensitibe Monoclonal Antibodies to Distinguish Conformational Changes Induced by Endocrine Disrupting Chemicals in the Estrogen Receptor、1st Asia-Pacific International Peptide Symposium / 41st Japanese Peptide Symposium (APIPS-JPS 2004)、2004. 11. 1~3。

5. 徳永隆俊、桑田 治、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、毛利資郎、小泉 修、下東康幸、男性ホルモン・アンドロゲン受容体コンホメーション変化センシングアッセイの確立、平成 16 年度環境ホルモン学会、2004. 12. 14-15。

6. 徳永隆俊、桑田 治、渋谷あゆみ、浅井大輔、毛利資郎、小泉 修、野瀬 健、中井 誠、矢可部芳州、下東康幸、The ELISA-based Conformation Change Sensing Assay: Simultaneous Evaluation of Receptor Binding and Hormonal Activity of Endocrine Disruptors、International Symposium: The Environmental Risk of Endocrine Disrupter -Fruits of Research and Future Perspectives-、2005. 1. 22~23。

H. 知的財産権の出願・登録状況

本研究によって初めて実現したモノクローナル抗体を用いるコンホメーション変化センシングアッセイ法について、今後さらに有用な抗体を得たうえで特許を出願することを検討している。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告

ポリクローナル抗体の設計作製、エピトープ解析および試験

分担研究者 野瀬 健 九州大学大学院理学研究院助教授

研究要旨

核内受容体は、リガンド非結合状態、アゴニスト結合状態、アンタゴニスト結合状態の3つの異なる状態で、それぞれで立体構造・コンホメーションが異なる。我々は、これらの受容体コンホメーション変化を抗体で感知・センシングする方法を用いることにより、化学物質が核内受容体・エストロゲン受容体を介して示す内分泌かく乱作用のリスクを評価することができることを見出した。この方法の最も重要な分子ツールは高感度な抗体であり、すべての核内受容体に対して高効率的にセンシング抗体を作製できる一般的な方法論の開発は、化学物質のリスク評価に必要である。本研究の目的は、このセンシング抗体法の原理を解析し、最適なセンシング抗体作製方法を確立することである。本研究課題において、エストロゲン受容体の立体構造を分子モデリングを用いて解析し、高効率的にコンホメーションをセンシングする抗体を作製する一般的な方法論の開発を行った。その汎用性の確認のためアンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、グルココルチコイド受容体、エストロゲン受容体関連受容体に対するセンシング抗体をデザインし、抗体を作製した。核内受容体のリガンド結合部位において第12ヘリックスは高く保存されており、この第12ヘリックスを標的とする抗体デザイン法は核内受容体全般に広く適用できることが示された。

A. 研究目的

今日まで、環境ホルモンの影響を最も顕著に受ける核内受容体として、女性ホルモン（エストロゲン）受容体（ER）が注目されてきた。それは、ERが主に生殖に関与し、人類の子孫、特に個体数の減少に直結するとの考えから重要視されたものである。ヒトゲノム解析研究が終了した結果、48種類の核内受容体が存在することが判明し、それら全般に対する化学物質・環境ホルモンの影響が懸念されるようになった。一般に、核内受容体は特異的なリガンド・ホルモンの結合により調節を受ける転写因子の1グループである。こうした核内受容体ファミリ

ーは互いに高い構造相同性を示し、その類似な立体構造はA～E領域に分けて考えられている（図1）。受容体に特異的なリガンド・ホルモンの結合に関与する部位はEの領域で、リガンド結合ドメイン（Ligand Binding Domain:LBD）と呼ばれる。

このLBDが主に内分泌かく乱化学物質の作用・結合部位と考えられ、LBDに対してリガンドと同様に、もしくはリガンドの結合を遮断するように内分泌かく乱化学物質が結合すると考えられている。このLBDは部分タンパク質として、遺伝子工学的に発現され、受容体結合試験等に用いられている、一方、本研究において

も受容体アッセイに使用している。核内受容体の立体構造を解析するために、LBD 部分タンパク質を遺伝子工学的に発現させ、それを用いてX線結晶構造解析を行う研究が進展してきている。特に、同じ受容体について異なるリガンド（化学物質）が結合した立体構造が明らかとなっており、このように解析された立体構造を精査することで、より精密な化学物質結合要因が解析される可能性が高い。本研究の目的の一つは、まさにこうしたホモロジーから結合構造を解析することである。一方、我々の開発したアッセイ法・センシング抗体法の原理であるアポ型構造からホロ型構造への転換において最も基本的な構造変化・コンホメーション変化の部位を解析し、種々の核内受容体においてこの変化の同定を試みた。このリガンド結合時に構造変化を起こす受容体部分ペプチドをエピトープとして抗体作製すれば、コンホメーション変化を高効率で感知・センシングする抗体となる。そこで、コンホメーション変化部位の解析、この変化部位、あるいは変化誘導部位の核内受容体での共通性の解析、エピトープの解析の一般的な方法論を開拓することを目標に、リガンド結合により構造変化を起こす核内受容体 LBD のヘリックス 1 2 を中心に見据えた抗体のデザイン法を確立することを最終の目的とする。そのため、女性ホルモン・エストロゲン受容体 α に引き続き、男性ホルモン・アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、糖質コルチコイド・グルコルチコイド受容体についてセンシング抗体の作製についての検討を行うことにした。

このようななか、オーファン受容体に分類される ERR (Estrogen Related Receptor) は、ER に相同性の高い遺伝子として実際にクローニングされた。そ

の後、ERR は ER と標的遺伝子や転写に関わるコファクター、さらには結合するリガンドまでもを共有する事例が報告されている。48 種類の核内受容体全般に対する内分泌かく乱作用性の解析の必要性が指摘されている昨今、ER と ERR の例に見るような相同な受容体、しかも複合体を形成する系は真っ先に検討する必要がある。こうした研究の緊急性のため、ER と同様に生殖系に関与する可能性がきわめて高い ERR に対する環境ホルモン・化学物質の影響評価系を構築する目的で、センシング抗体の作製を実施した。

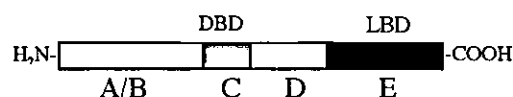


図 1. 一般的な核内受容体のドメイン構造
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

化学物質の核内受容体 LBD への結合性を解析するためには、LBD の立体構造をX線結晶構造解析法で解析する必要がある。しかしながら、立体構造の解析は簡便に行える実験操作ではなく、今日においても高度な専門的技量と高額な装置を必要とする。一方、本研究課題はコンピュータを用いてアミノ酸配列のホモロジーから立体構造をコンピュータ計算により構築し、さらにはセンシング抗体の抗原部位を決定するという計算化学を基盤とするものであり、比較的短時間でアミノ酸配列のみの情報から受容体や LBD の立体構造を構築することができる。

本研究では、以上のような目的を達成するため、センシング抗体デザインの方法論の構築と抗体作製を行った。

B. 研究方法

① 立体構造データの検索と入手

核内ホルモン受容体のリガンド結合状態（アゴニストが結合、もしくはアンタゴニストが結合したもの）の立体構造は、PDB (Protein Data Bank) に登録されている。これらは全て LBD 部分の X 結晶構造解析データであり、インターネットを通じて直接に入手した。

② 受容体構造の解析

PDB より入手した立体構造データは、分子モデリングプログラム InsightII/Discover (Accelrys 社製) で解析した。コンピュータは SGI 社製、グラフィックワークステーション 02 を使用した。

③ 受容体立体構造の分子モデリング

構造未知の ERR-LBD の立体構造はホモロジーモデリング法で作製した。ホモロジーモデルの作製には、Accelrys 社製モデリングプログラム一式、Homology, Modeler, DiscoverII を使用した。

④ 抗原ペプチドの合成

分子モデリングにより同定した受容体の第 12 ヘルックスを含む C 端部分に相当する断片ペプチドを抗原として設定し、このペプチドを Fmoc 固相法により合成した。タンパク質担体との結合のために、ペプチドの N 末端にシステインを加えたペプチドとした。合成粗生成物をゲルろ過 (Sephadex G-25, $\phi = 1.8$ cm, $l = 75$ cm) および逆相 HPLC (Lichrospher RP-18(e), $\phi = 25$ cm x 250 mm) により精製し、純粋な目的ペプチドを得た。目的物の確認は質量分析により行った。

⑤ 架橋試薬のキャリアタンパク質 KLH への結合

担体タンパク質として、キーホールリ

ンペットヘモシアニン (KLH)、架橋試薬として 2 価性の *m*-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS) を用いた。

KLH の 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.2) (16 mg/ μ l) に、MBS の DMF 溶液 (3.6 mg/12 μ l) を 9.3 μ l 添加し、室温で 30 分攪拌した。反応液を遠心分離後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

⑥ 抗原ペプチドの KLH への結合

上記で得られたペプチド 1 mg を添加した水溶液 500 μ l に、トリス- (2-シアノエチル) ホスフィン水溶液 (5 mg/ml) を 200 μ l 加えてシステインの SH 基を完全に遊離させた。これに、先に調製した KLH-MBS 複合体溶液 (230 μ l) および 0.2 M Na₂HPO₄ (115 μ l) を加え、室温で 3 時間攪拌した。遠心後、上清を Sephadex G-25 を用いたゲルろ過により精製し、目的物を得た。

⑦ ウサギへの免疫

先に調製したペプチド-KLH 抗原溶液をフロイントのアジュバントとペプチド 0.1 mg/匹となるように混合してエマルジョンとした後、2 匹のウサギ (ニュージーランドホワイト) に対して免疫した。約 3 ヶ月後、耳静脈から採血し、十分な抗体価が得られていることを ELISA 法により確認した。

⑧ 抗体の精製

まず、採血した血液 30 ml を 37°C で 1 時間、その後、4°C で終夜インキュベートした。遠心分離により血清と血餅を分離し血清画分を抗血清とした。得られた抗血清を次に示す 2 段階で精製した。まず、キャリアタンパク質 KLH に対する抗体を免疫沈降により除去し、次いで合成

ペプチドを用いてアフィニティ精製した。

⑨ 免疫沈降

終濃度 0.5 mg/ml となるように 5 mg/ml の KLH 水溶液を粗血清に加え、4℃で終夜インキュベートした。沈殿した抗 KLH 抗体複合体を遠心分離で除去した。この操作は、KLH 水溶液を加えても沈殿が析出してなくなるまで繰り返し行った。

⑩ アフィニティ精製

アガロース担体にヨードアセチルが架橋したゲル (SulfoLink Coupling Gel : Pierce 社) に Cys(SH)-ペプチドを反応させ、抗原ペプチドを架橋したゲル担体を調製した。これをアフィニティ担体としたアフィニティクロマトグラフィーにより抗体を精製した。

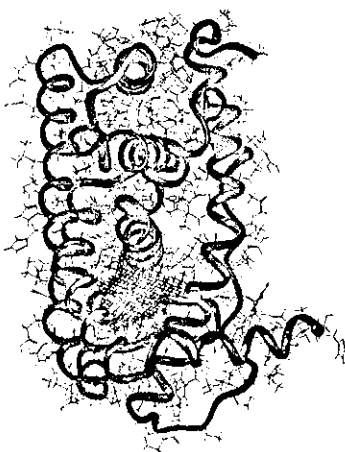


図2. 分子モデリングで作成したエストロゲン受容体 LBD アポ型構造 +で示すのは推定リガンド結合部位、濃色で示すのがヘリックス 12。

C. 研究結果

エストロゲン受容体のリガンド結合による構造変化を解析するため、リガンド非結合型 (アポ型) 受容体の立体構造が必要である。しかし、アポ型構造は現在まで解析されていないため、コンピュータ上で構築しなければならない (図 2)。一方、種々の異なるリガンドを結合したエストロゲン受容体の LBD の立体構造を図 3 に示した。図 3 に示すように、アゴニストである 17 β -エストラジオールや ジエチル スチル ベストール (diethylstilbestrol, DES) を結合した LBD のヘリックス 12 は、右から左上方に向いているが、アンタゴニストである ラロキシフェン や 4-ヒドロキシタモキシフェンを結合している場合、左から右上に向いている。そこで、ヘリックス 12 を含むポリペプチド断片を化学合成し、これを抗原としたポリクローナル抗体を作製したところ、コンホメーション変化のセンシングアッセイに成功した。このヘリックス 12 を含むポリペプチド断片にエピトープが存在することが判明したが、正確にどこがエピトープとなっているのか、その部位を解析するため、ヘリックス 12 近傍の立体構造を詳細に解析した (図 4)。その結果、ヘリックス 12 が非常に明瞭な両親媒性の α -ヘリックス構造をしていること、リガンドが結合したときこのヘリックス 12 は疎水性面のアミノ酸側鎖で受容体 LBD 本体へ結合すること、そして、疎水性面のアミノ酸側鎖の結合はヘリックスアゴニストが結合した場合とアンタゴニストが結合した場合は異なることが判明した。

ヘリックス 12 を含むペプチドを抗原とした抗体は、リガンドが結合していないときには、ヘリックス 12 と結合できる。しかし、リガンドが結合したときはヘリックス 12 の疎水面が露出しないの

で、疎水面部分を認識していた抗体はヘリックスと結合できなくなる。したがって、こうしたリガンド結合・非結合に対する抗体の応答差により、抗体がリガンド結合をセンシングしているものと考えられた。

こうしたヘリックス 12 を含むペプチドを抗原とした抗体の、異なる受容体構造を識別する能力は、ヘリックス 12 の構造特性に基づくと考えられる。この考え方が正しいか検証するため、エストロゲン受容体ヘリックス 12 以後の、C 端全部で検討することにした。すなわち、全体を 4 つに分割し、それぞれのペプチド断片を抗原として抗ラットポリクローナル抗体を作製して調べた。その結果、各抗体の抗原ペプチドに対する特異性・

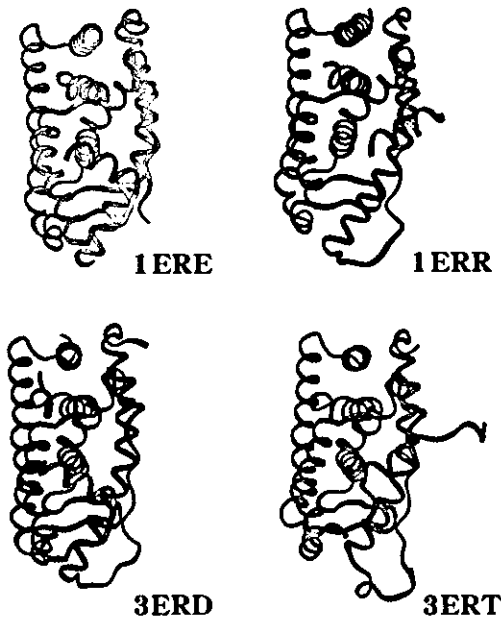


図 3. 異なるリガンドを結合したエストロゲン受容体 LBD の立体構造 X 線結晶構造解析された結晶構造の座標データは PDB より入手した。1ERE, 1ERR, 3ERD, 3ERT は PDB のコード番号を示す。

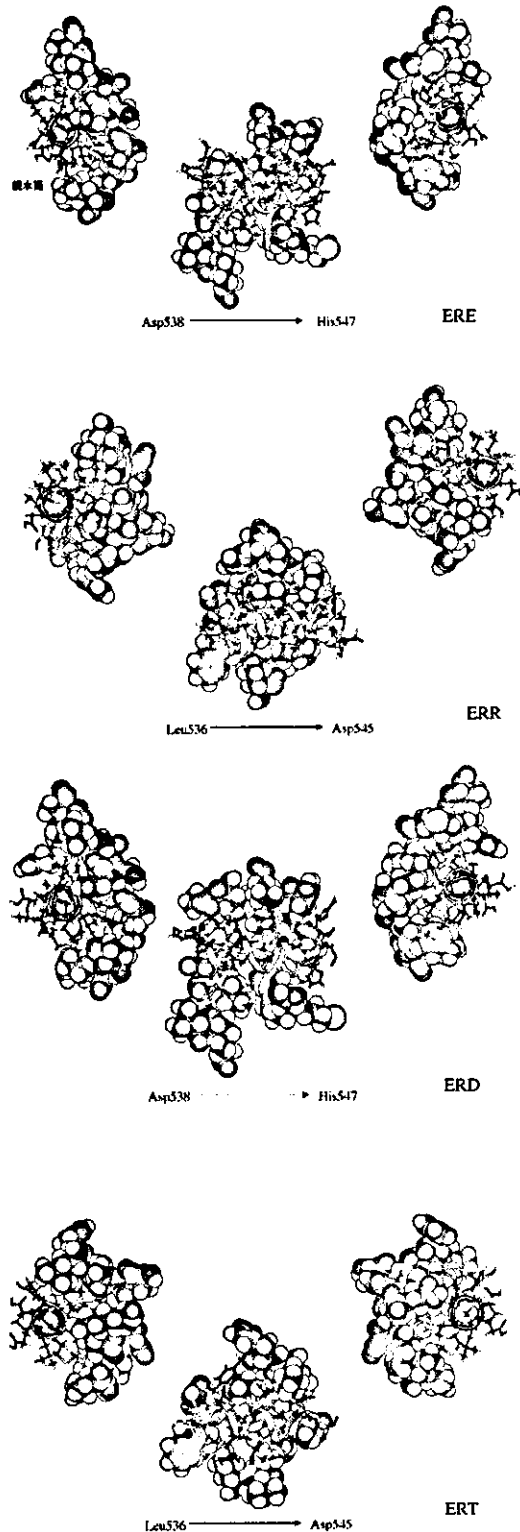


図 4. ヘリックス 12 近傍と相互作用する受容体構造の解析

選択性はどれも同等であったが、リガンド E2 の結合によるコンホメーション変化センシング能を有するものは唯一、最もN端部分のヘリックス 12 を含むペプチドのみであった。したがって、より有効なセンシング抗体を得るためには、ヘリックス 12 を含むことが必須な要因であることが判明した。

これまでに、エストロゲン受容体を用いて核内受容体に対するヘリックス 12 を含むペプチド断片を抗原とする抗体作製のデザイン法の有用性を実証した。そこで、エストロゲン受容体以外の核内受容体として、まず、アンドロゲン受容体におけるセンシング抗体のデザインについて検討した。

エストロゲン受容体とアンドロゲン受容体のリガンド結合部位の立体構造は既に解明されている。このため、それらの構造情報を入手し、分子モデリング上で比較すると、ヘリックス構造など分子構造を構築する 2 次構造が互いに非常に良く似ていることが明らかとなった (図 5)。図 5 に示す 2 つの立体構造は互いにアゴニストが結合している構造である。このため、核内受容体へのリガンド結合に伴う受容体の活性化構造は核内受容体間で共通の分子基盤もつことが推定された。

そこで、このアンドロゲン受容体におけるヘリックス 12 部分のアミノ酸配列を、既にセンシング抗体を得ることに成功しているエストロゲン受容体の例と比較したのが図 6 である。エストロゲン受容体に関しては、ヘリックス 12 より C 末端部分をエピトープとして作製した抗体においてもセンシング活性が確認されている。

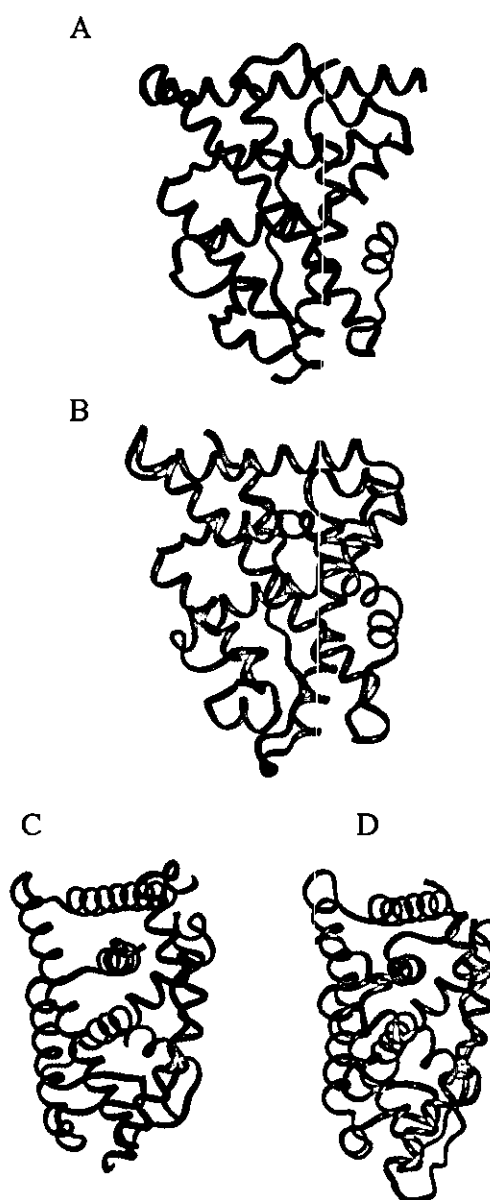


図 5. 分子モデリングで解析したエストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体 LBD 構造

A および C : エストロゲン受容体 (1ERE)
B および D : アンドロゲン受容体 (1E3G)
緑色で示すのがヘリックス 12。

ER-LBD KCKNVVPLYDLLLEMLDAHRLHAPTSR
 AR-LBD LIKSHMVSVDPEMMAEIIISVQVPKIL

#1

ER-LBD GGASVEETDQSH
 AR-LBD SGKVKPIYFHTQ

#2

図6. エストロゲン受容体 (ER) およびアンドロゲン受容体 (AR) のヘリックス 12 付近のアミノ酸配列

青色で示すのが昨年使用したエストロゲン受容体抗ヘリックス 12 センシング抗体の抗原部位。赤色で示すのは今回抗アンドロゲン受容体抗体エピトープとしてデザインした#1 および#2。

そこで、アンドロゲン受容体ヘリックス 12 に相当する部分ペプチドを AR#1、AR#1 より C 末端側のエピトープを AR#2、さらにはその 2 つを連結した AR#1&2 をアンドロゲン受容体センシング抗体用エピトープとすることとした。これらのペプチドは Fmoc 固相法で化学合成した。AR#1 は溶解性が悪く、収量が少なかったが、免疫操作には充分であった。他のペプチドもそれぞれに抗原作製、動物免疫し、得られた抗血清およびアフィニティー精製抗体をセンシングアッセイに供した。さらに、核内受容体全般にこのセンシング抗体デザイン法が適用可能か検討した。別の核内受容体 2 種類、プロゲステロン受容体 (PR) およびグルココルチコイド受容体 (GR) について、センシング抗体作製のためのエピトープデザインを実施した。これらの受容体も X 線結晶構造解析が終了しているため、まず分子モデリングプログラムで分子の立体構造を精査した。その結果、図 7 に示す様

に PR および GR は、エストロゲン受容体と非常に良く似た立体構造をしており、ヘリックス 12 に相当する部分の 2 次構造が共通していることが判明した。

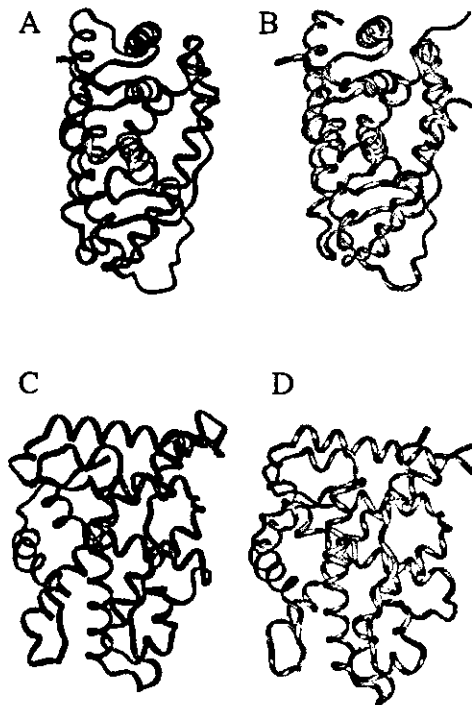


図7. 分子モデリングで解析したプロゲステロン受容体およびグルココルチコイド受容体 LBD 構造
 A および C : PR (1E3K)
 B および D : GR (1NHZ)
 緑色で示すのがヘリックス 12

このヘリックス 12 近傍の立体構造の類似性から、エストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体と同じ様に図 8 に示すようなヘリックス 12 センシング抗体のエピトープ部位を決定した。

ホモロジーモデリングのためのアミノ酸配列のアラインメントは CLUSTAL W プログラムを用いて行った (図 9)。ERR-LBD の立体構造は、Modeller プログラムを用いたホモロジーモデリング法により構築した (図 10)。その結果、ERR-LBD の立体構造においても C 端のヘリックス構造は保持されていることが判明した。昨年度までの研究において、センシング抗体のエピトープ部位は、LBD の C 端側でヘリックス 12 を含む部分が有効であることが明らかとなっている。また、ERR サブファミリー間においてはヘリックス 1 2 近傍のアミノ酸配列は相同であるため、この部分について前後に 4 残基移動させた 2 種類の部分ペプチドを抗体作製のエピトープとして用いた (図 11)。

```
#1 GKVPMHKLFLFLEMLEA
#2      MHKLFLFLEMLEA
```

図 11. ERR センシング抗体作製のためのエピトープ部位

2つの抗原ペプチドは C 末端に Cys 残基を付加した形で、Fmoc 自動固相合成機により合成した。その後、ポリクローナル抗体作製のために KLH との複合体とし、ウサギに免疫を行った。約 2 ヶ月後に採血を行い、抗体価を合成ペプチドについて検討したところ、有為な特異的結合性が確認された。よって、抗原ペプチドを認識する抗体が作製されたことが明らかとなった。

D. 考察

ヒトの核内受容体ファミリーに属する全ての転写因子のリガンド結合ドメイン・LBD の立体構造は、きわめて高い相同性を示すことが知られている。しかし

ながら、ヘリックス 12 に相当するペプチド部分のアミノ酸構造はそれぞれの核内受容体で特徴があり、単なる両親媒性という構造特性で理解するだけでは不十分かも知れない。今後、こうした核内受容体ごとの構造特性を解析することで、もっと一般的な抗原ペプチド部位の決定、あるいはエピトープ解析が可能になると思われる。こうした解析に、X線結晶構造やホモロジーモデリングによる立体構造のアミノ酸残基解析や、モチーフ構造解析を統合すると、より効率的で確度の高いエピトープのデザインが実施できると思われる。

コンホメーション変化のセンシング抗体は、リガンド結合・非結合に対する応答差により識別能力を発揮していると思われる。したがって、抗体はリガンドの受容体への結合により、変化する受容体構造に対応できるか、できないかによってセンシングしているものと考えられる。こうしたセンシングについては、2種類の抗体成分で対応している可能性がある。一つはヘリックス 12 全体を認識できる抗体成分であり、リガンドの結合によりこの成分は認識できる受容体構造が大きく減少することになる。一方、両親媒性のヘリックス 12 の疎水性面を特異的に認識する抗体成分も同様にリガンドの結合によりこの成分は認識できる受容体構造が大きく減少することになる。

今回検討したエストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、グルココルチコイド受容体、エストロゲン関連受容体のヘリックス 12 付近の立体構造は、非常に似ていた。こうした類似性のため、X線結晶構造解析が完了していない他の核内受容体 LBD においても、少なくともヘリックス 12 付近においては同じ立体構造構築が期待できる。したがって、このヘリックス 12 近傍を

エピトープとするセンシング抗体デザインは、構造未知の核内受容体においても適応可能と思われる。一方、立体構造が解析されていない核内受容体においては、コンピュータ計算でのホモロジーモデリングでヘリックス 12 を推定し、これを含む抗原部位ペプチドの決定を実行することで抗体エピトープのデザインが達成されると考えられる。また、完全な立体構造はこのセンシング抗体のデザイン法には必須ではなく、部分的な 2 次構造の同定によりエピトープデザインが可能となると考えられた。

E. 結論

本研究により核内受容体に対するヘリックス 12 を含むペプチド断片を抗原とする抗体作製のデザイン法の有用性が実証された。

立体構造が解析されていない核内受容体のリスク評価においては、コンピュータ計算でのホモロジーモデリングで、ヘリックス 12 を推定し、これを含む抗原部位ペプチドの決定を実行する必要がある。本方法論はこれを実現するものであることが証明された。今後は、この方法論を用いてさらに多くの核内受容体に対するセンシング抗体の作製を行い、その能力を確認することおよび、結合競争試験やレポーター遺伝子アッセイとの比較が必要である。

F. 健康危険情報

該当する情報はない。

G. 研究発表

論文発表

1. Biochemical evaluation of hormonal activity of endocrine disruptors by sensing

the estrogen receptor conformation changes, D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Tokunaga, T. Nose and Y. Shimohigashi, *Peptide Science* 2002, 127-130 (2003).

2. The effect of the peptide corresponding to the No. 12 α -helix on the conformation change in the estrogen receptor activation, H. Ishimori, D. Asai, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose and Y. Shimohigashi, *Peptide Science* 2002, 437-438 (2003).

学会発表

1. 野瀬 健、中井 誠、浅井大輔、河野道昭、矢可部芳州、下東康幸、エストロゲン・女性ホルモン受容体のホモロジーモデリング、平成 14 年度日本生化学会九州支部例会、2002. 5. 18~19。

2. 浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、エストロゲ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物質のホルモン応答の生化学的評価、第 39 回ペプチド討論会、2002. 10. 16~18。

3. 石盛英樹、浅井大輔、中井 誠、矢可部芳洲、野瀬 健、下東康幸、エストロゲン受容体コンホメーション変化における第 12 α -ヘリックス相当ペプチドの受容体活性化への効果、第 39 回ペプチド討論会、2002. 10. 16~18。

4. 浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、坂口和靖、下東康幸、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、日本内分泌攪乱物質学会第 5 回研究発表会、2002. 11. 25~26。

5. 野瀬 健、浅井大輔、徳永隆俊、渋谷あゆみ、本田 健、桑田 治、白須直人、下東康幸、核内受容体コンホメーション変化センシング抗体を用いる内分泌かく乱物質リスク評価法における抗体設計法、日本内分泌攪乱物質学会第 6 回研究発表会、2003. 12. 2~3。

6. 中垣雅之、山本典史、野瀬 健、下東康幸、関谷 博、環境ホルモン関連分子塩化ビフェニル類に関する幾何構造と電子構造、第 40 回化学関連支部合同九州大会、2003. 7. 5。

7. 劉 暁輝、松島綾美、白須直人、富永佳也、下東美樹、下東康幸、野瀬 健、
Structural Characteristics of
Drosophila Estrogen-related Receptor

Ligand Binding Domain to Capture the Peptide and Non-peptide Ligands、1st Asia-Pacific International Peptide Symposium、2004. 10. 31~11. 3。

8. 渋谷あゆみ、徳永隆俊、浅井大輔、小泉 修、毛利資郎、中井 誠、矢可部芳州、野瀬 健、下東康幸、Ligand-inducing Conformation Changes in the Estrogen Receptor C-Termina Tail Moiety and Their Sensing by Polyclonal Antibodies、1st Asia-Pacific International Peptide Symposium、2004. 10. 31~11. 3。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ、本件課題によりは出願・登録されていない。