

を最大抗体応答性 (Rmax (%)) として評価するアッセイ系が確立された。さらに、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、甲状腺ホルモン受容体、グルココルチコイド受容体についても全く同様なアッセイ系の確立に成功したことから、この受容体センシング抗体法を核内受容体の全てに適用可能な方法論としての確立に成就した。

平成 17 年度には当初計画を前倒して、発現受容体タンパク質が市販され、購入可能な 17 種の核内受容体についてセンシング抗体の作製に取り組んだ。現在までに、抗血清より抗体画分を調製して、アフィニティ精製している。すべての抗体において、抗原ペプチドに対して抗体力価の上昇が、逐次にセンシングアッセイ系構築のための受容体応答の解析を進めている。次年度以降は受容体タンパク質が市販されていない核内受容体群 25 種類についても抗体作製を実施する。これらについては並行して受容体タンパク質発現の実験が必要であるが、これはどの試験系でも必須であり、効率的な発現系の構築が必要である。また、化学合成した抗原ペプチドもどの抗体作製にも必要であり、量的な調製が必要である。こうしたことを考慮したうえで実験を進めて行くことが肝要である。

#### 内分泌かく乱作用性についての順位予測

本研究においては、核内受容体を介した化学物質の内分泌かく乱作用性について、受容体コンホメーション変化センシング抗体法による予測とその順位付けすることをめざしている。昨年度までにエストロゲン受容体  $\alpha$  型 (ER $\alpha$ ) について予備的に完成した。すなわち、EC<sub>50</sub> (M) によるグループ化、次いで Rmax (%) の序列化という手順・スキームによって、ER を介した内分泌かく乱作用性の順位予測について受容体結合能とホルモン活性を同時に測定評価する基本的解析法が確立された。

抗体応答有効濃度を横軸に、最大抗体応答性を縦軸にして、ホルモン受容体の抗体応答性を各化学物質について解析した結果を例示すると、図 23 のようになる。抗体応答有効濃度 (横軸) を指標として見たとき、活性の強弱について第 1-第 3 グループに分けられる。503 化学物質を試験し、EC<sub>50</sub> (M) を指標として分類したとき、62 種類の化学物質について抗体応答活性が非常に強い第 1 グループ、ある程度の強い活性の第 2 グループ、活性はかなり弱いとその活性が明確である第 3 グループに類別された。

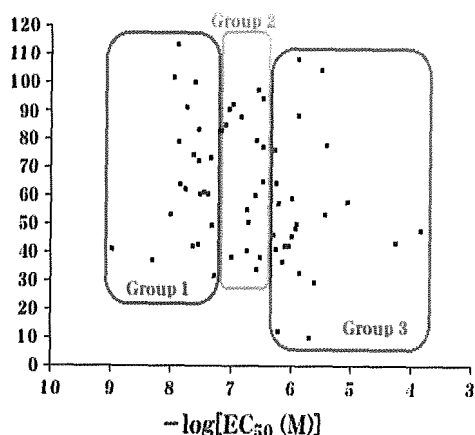


図 23. 化学物質のエストロゲン受容体コンホメーション変化センシング作用性解析

受容体への結合能がきわめて弱く、したがって、抗体応答有効濃度がきわめて小さく、最大濃度での最大抗体応答性が非常に小さい化学物質群 (第 4 グループ) 51 種類は、抗体応答有効濃度が算定できず、図 23 にはプロットされない (表 2)。また、エストロゲン受容体に全く結合しない 390 種類の化学物質群 (第 5 グループ) も図にはプロットされない。

#### エストロゲン関連受容体 $\gamma$ 型 (ERR $\gamma$ ) の異常なポリクローナル抗体応答性とビスフェノール A の受容体応答高活性

エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) について、最初に調製したポリクローナル抗体が抗原ペプチドには非常に良く応答するものの、受容体タンパク質には全くに感応しないという異常な応答性を示した。この結果は、ERR $\gamma$  のタンパク質構造において  $\alpha$  ヘリックス 12 が抗原ペプチドのように自由にエピトープ呈示されるような構造になっておらず、ある特定の構造を取っていることを強く示唆する。X 線結晶構造解析からは ERR $\gamma$  H12 が既に結合リガンドにフタをしたような活性型立体構造を取っている。こうした堅固な立体構造中の H12 を抗体が認識できないと思われた。

感応性の抗体を得るために同じ抗原ペプチドを再度免疫する、少し抗原部位をずらしたペプチドを免疫するなどの工夫を施し、現在までにセンシング抗体を得ている。48 種類の核内受容体のなかには、こうした ERR $\gamma$  のように当初から活性型構造にあり、H12 が堅固な構造に固定されているが数種類あると想定される。これらに対するセンシングアッセイについては、抗体作製での注意、工夫、

試験法構築での注意、工夫が必要と思われる。

一方、ERR $\gamma$ については *in vitro* の試験系で精査した。まず、トリチウム標識した 4-ヒドロキシタモキシフェンを用いた通常受容体結合試験系の構築に成就した。競合結合試験の結果、ビスフェノール A が ERR $\gamma$  に非常に強く結合する、という予想外の事実が判明した。これについては、試験者を 4 名確保し、再現性と活性閾値について入念に確認を重ねた。さらに、レポーター遺伝子アッセイにおいて *inverse* アンタゴニスト活性を示す事実が判明した。これについても入念に確認を重ねた。

ビスフェノール A は現在、「低用量問題」の渦中にある化学物質である。本研究でのこの結果は、この問題の本質がエストロゲン受容体以外の核内受容体を介して発現される内分泌かく乱作用である可能性を強く示唆する。これについては詳細に検討する必要がある。現在、多方面からのアプローチで解析を進めている。いずれの結果もビスフェノール A の効果を支持するものであり、さらに鋭意に分析を進めたい。今後も、このような化学物質、核内受容体が発現する可能性が大きく、48 種すべての核内受容体をターゲットとする研究、試験の重要性が強調される。

#### 細胞融合法によるモノクローナル抗体の作製

ポリクローナル抗体は、それぞれのコンホメーション変化構造に特異的な抗体の集合体と考えられる。したがって、もしこれらをモノクローナル抗体として別途に調製することができれば、アゴニストとアンタゴニストを区別ながら特異的に定量・測定できるアッセイ系の構築が可能になる。まず、リンパ節細胞を摘出し、ミエローマ細胞と融合させて得たハイブリドーマを培養する実験「細胞融合法」によるモノクローナル抗体作製を ER について平成 14 年度より開始した。その結果、センシングアッセイが可能なモノクローナル抗体が 3 種類（アゴニスト感応性のもの 2 種類、アゴニスト・アンタゴニスト両方に感応性のもの 1 種類）得られた。

アゴニスト感応性モノクローナル抗体 mAB1 (図 7) を用いたセンシングアッセイをエストロゲン様化学物質 62 種について実施し、ポリクローナル抗体の場合と比較した。その結果、両者の結果の間に強い正の相関が見られた (図 8)。一方、モノクローナル抗体 mAB1 の方が低い EC<sub>50</sub> (M) を示し、感度が

より高く (約 8 倍)、受容体結合試験の結果と良く一致することが判明した。また、モノクローナル抗体を使用した場合、必要な抗体量も少なく済むことが分かった。また、抗体応答有効濃度 EC<sub>50</sub> (M) と受容体結合試験の受容体結合能 IC<sub>50</sub> (M) との間に良い正の相関性が確認された (図 9)。

本年度は、まず 3 種の核内受容体 GR、AR、TR に対して、モノクローナル抗体の作製を実施した。GR に関しては 384 well 中 42 well で、AR では 34 well に、TR では 28 well に細胞の増殖が見られた。これらを 1 つずつスクリーニングしたところ、H12 ペプチドに特異性の高い抗体クローンが、GR では 3 種、AR では 2 種、TR では 1 種を見出した。現在これらについて有効な抗体クローンを得るために、スクリーニングを実施している。スクリーニングするクローンの数を増やすことも大切であり、さらに細胞融合の操作を繰り返す必要がある。

#### ファージディスプレイ法によるモノクローナル抗体の作製

細胞融合法によりモノクローナル抗体を作製する問題点の一つは、300~500 クローンのスクリーニングを個々別々に実施してようやく 1~3 個が入手できるという、抗体作製上の困難性である。もう一つは、抗体の安定継代、量的な取得がかなり困難であることである。こうした問題点を解決する単クローン抗体法として、抗体ファージディスプレイ法がある。この方法は、試験管内でファージウイルスに抗体タンパク質を産生させる手法で、合目的な抗体作製を可能にするものである。

本研究では、昨年度よりこの高効率にセンシング抗体を得ることが期待されるファージディスプレイによる抗体作製法を導入した。本年度より新たにセンシング抗体法の 48 種への展開を見据えた抗体作製系の確立を目的として、生体内のほぼ全ての細胞で発現する一般的な核内受容体である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実験を開始した。その結果、バイオパニングに適切な抗原ペプチドを用いることで目的の結合特異性を持つ抗体を選別することが可能であることが示された。

パニング回数を増やす、1 次スクリーニングをペプチド抗原のみで行なうなどの操作は、高効率な抗体作製のために有効である。今回、ER $\alpha$  についてこうした改良を実施

し、現在までに 163 クローンもの特異的ファージ抗体を得るに至った。こうして、特異的なファージ抗体作製法の基盤が確立されたので、次年度以降、本格的な取り組みを開始する予定である。

### エストロゲン関連受容体 (ERR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) の解析

最近、レチノイン酸X受容体 RXR に、トリブチルスズ (TBT) などの有機スズ化合物が非常に強く結合することが明らかにされた。このことは、化学物質の内分泌かく乱作用はエストロゲン受容体のみならず、すべての核内受容体を標的とした広領域な問題として考えるべき問題であることを端的に示している。

こうしたなか、本研究においてエストロゲン関連受容体 (ERR) の解析が緊要の課題であることが判明した。ERR には  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 種類が存在する。特に、ERR  $\gamma$  は脳内での発現が顕著であり、しかも胎児期では相当な量的発現が知られており、この核内受容体について精査することは脳神経系への影響調査との関係で非常に重要である。

核内受容体へのさまざまな化学物質の影響は、特定の受容体系に集約して起こるよりも、どれもが暴露される可能性があり、その際の分子遭遇がお互いの分子どうしの結合性の有無、核内受容体側のコンホメーション変化の有無、など分子間の相互作用性に基づいて起こる要因が無視できないと思われる。

ところで本年度、ERR  $\gamma$  については、「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」という方法原理を同じくしながら、内容的に異なる核内受容体であることが判明した。すなわち、ERR  $\gamma$  は化学物質が結合していない状態で活性化コンホメーションを取り、非常に高い構成的基盤活性をもつ核内受容体があることが明らかとなった。この ERR  $\gamma$  に、例えば、4-OHT が結合すると、 $\alpha$  ヘリックス 12 を動かし、基盤活性が抑制される、いわゆる *inverse* アゴニスト活性が見られることになる。この ERR  $\gamma$  に対するセンシング抗体として調製したとき、活性化コンホメーションにある受容体タンパク質では抗体の感応性が著しく低下、もしくは消滅し、抗原ペプチドには感応するものの、受容体に感応しないことが判明した。*inverse* アゴニスト活性を示す化学物質では受容体コンホメーションが変化すると思われるので、この

観点でスクリーニングしたところ、わずかに識別性を示す抗体成分が他のウサギに免疫して得られた。したがって、こうした高い構成的基盤活性をもつ核内受容体に対してもコンホメーション変化センシング抗体法は成り立つことが確認された。

上述のように、化学物質の内分泌かく乱作用は、エストロゲンのみならず、すべての核内受容体を標的とした広領域な問題と認識すべきである、と思われる。本研究課題で方法論として確立した受容体コンホメーション変化センシング抗体法は、すべての核内受容体に適用可能な方法である。コンホメーション変化センシング抗体法を、核内受容体を介する全般的な、化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法として確立することは緊要の課題と思われる。

### E. 結論

化学物質の内分泌かく乱作用は、化学物質のホルモン受容体応答性に密接に関連している。こうしたなか、内分泌かく乱作用が懸念される非常に多数の既存の化学物質を、迅速に精度高くスクリーニングする方法が必要とされている。我々は、「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」という着想に基づく「ホルモンの受容体結合性およびホルモン活性の同時測定評価法」を開発した。本研究課題では、このホルモン受容体コンホメーション変化センシング抗体法を核内受容体一般の評価法として確立することが第一の目的である。そしてこれまでに、エストロゲン受容体およびアンドロゲン受容体を始め、合計 7 種の核内受容体においてセンシング抗体法の確立に成功した。また、他の核内受容体 (合計 17 種類) でも抗体の調製に成就し、一般的に適用可能な方法として確立した。

さらに、「化学物質の内分泌かく乱作用性の順位予測法」として確立するために、化学物質についてエストロゲン受容体に対してセンシング抗体法を実施し、ポリクローナル抗体を用いたアッセイを完了した。その結果、抗体応答性の観測された化学物質について、受容体結合性と抗体応答有効濃度  $EC_{50}$  (M) および受容体結合試験の受容体結合能  $IC_{50}$  (M) との間、また、最大抗体応答性  $R_{max}$  およびレポーター遺伝子アッセイの結果との間にも、正の相関性が確認された。これらの結果

を総合的に評価し、順位付けすることが可能なことが示された。

一方で、エストロゲン受容体 ER $\alpha$  に対してアゴニスト特異的なモノクローナル抗体を用いた詳細な検討を実施し、受容体結合性のある化学物質について、受容体結合性と抗体応答有効濃度に良い正の相関性があり、感度はポリクローナル抗体よりも8倍良好であることを明らかとした。ER $\alpha$  以外の核内受容体 (GR、AR、TR) についても抗原ペプチド特異的な抗体クローンを得て、今後、センシング抗体法を構築の予定である。さらには、アゴニスト、アンタゴニストへの受容体応答を効率的に識別するモノクローナル抗体を得るために、ファージディスプレイ抗体作製法を導入したが、グルココルチコイド受容体 (GR) について、非常に効率的なセンシング抗体の調製に成功した。今後、このファージディスプレイ法を基盤として、他の一連の核内受容体について、より高効率のモノクローナル抗体を調製する予定である。

本年度、センシング抗体への異常な応答を契機として、エストロゲン関連受容体  $\gamma$  型 (ERR $\gamma$ ) におけるビスフェノール A の高活性応答が初めて明らかとなった。約 3 ppb の低用量で核内受容体に強く結合し、4-ヒドロキシタモキシフェンの *inverse* アゴニスト活性を解除する活性を示すことが判明した。これはこれまでにない新発見であり、この ERR $\gamma$  について調査する必要がある。こうした緊要の課題、化学物質、核内受容体の発見は、ヒト核内受容体 48 種すべてを視野に入れた本研究課題では当然に予想されたことであり、現在、種々の解析に取り組んでいる。また、今後も出現する可能性が高く、これらについても鋭意に解析することは緊要の課題である。

受容体コンホメーション変化センシング抗体法は、化学物質の内分泌かく乱作用性を高精度に予測する方法論であり、すべての核内受容体に適用可能なスクリーニング法である。本研究課題では既に基盤技術の導入に成功した。今後、ヒト、あるいは関連する動物種の核内受容体全般について特異な化学物質をスクリーニングする方法として確立することは緊要の課題と思われる。

## 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. Structural Characteristics of *Drosophila* Estrogen-related Receptor Ligand Binding Domain to Capture the Peptide and Nonpeptide Ligands. X.H. Liu, A. Matsushima, N. Shirasu, Y. Tominaga, M. Shimohigashi, Y. Shimohigashi, and T. Nose: *Peptide Science* 2004, 303-304 (2005).

2. 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, 333-334 (2005).

3. Ligand-inducing Conformation Changes in the Estrogen Receptor C-Terminal Tail Moiety and Their Sensing by Polyclonal Antibodies. A. Shibuya, T. Tokunaga, D. Asai, O. Koizumi, S. Mohri, M. Nakai, Y. Yakabe, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2004, 351-354 (2005).

4. Conformation Sensing Assay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal  $\alpha$ -helix of Glucocorticoid Receptor and Progesterone Receptor. T. Tokunaga, H. Okada, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2005, 291-294 (2006).

5. Monoclonal antibody sensing assay for conformation change induced by metal binding to prion protein N-terminal octarepeat domain. S. Yokotani, T. Honda, M. Kawano, A. Matsushima, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2005, 455-456 (2006).

6.  $\alpha$ -Helix peptides for bio-panning in the phage display method to obtain the antibodies specific for conformation-change in nuclear receptors. H. Okada, T. Tokunaga, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2005, 475-478 (2006).

### 学会発表

1. 野瀬 健、徳永隆俊、渋谷あゆみ、浅井大輔、下東康幸、Computational structural analysis of the nuclear receptor conformation changes from the ligand-free apo form to the ligand-bound holo form、International Symposium: The Environmental Risk of Endocrine Disrupter -Fruits of Research and Future Perspectives-、2005. 1. 22-23。

2. 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。
3. 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイによる核内受容体コンホメーション変化センシングモノクローナル抗体の作製、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。
4. 是恒幸恵、松島綾美、金木淳史、磯崎 要、下東美樹、下東康幸、イエバエ FMRamide 受容体のクローニングと発現、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。
5. 徳永隆俊・浅井大輔・横谷 聡・吉田美由紀・野瀬 健・下東康幸、蛍光 7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1,3-ジアゾール (NBD) 誘導体を用いたステロイドホルモン受容体結合試験系の確立、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。
6. 劉 暁輝、松島綾美、徳永隆俊、野瀬 健、富永佳也、下東美樹、下東康幸、フラボンおよびイソフラボン類化合物によるショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体の転写活性化、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。
7. 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイ法による核内受容体認識モノクローナル抗体の調製、第 42 回化学関連支部合同九州大会、2005. 7. 27。
8. 是恒幸恵、松島綾美、金木淳史、磯崎 要、下東美樹、下東康幸、イエバエ FMRamide 受容体のクローニングと発現、第 42 回化学関連支部合同九州大会、2005. 7. 27。
9. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、Simultaneous Evaluation of Binding and Hormonal Activities of Human Glucocorticoid Receptor by the Sensing Assay for Receptor Conformation Change、11th Asian Chemical Congress、2005. 8. 24-26。
10. 松島綾美、是恒幸恵、吉田太一、金木淳史、磯崎 要、下東美樹、下東康幸、Structure-activity studies on the FMRamide-related Peptides and Receptors in the Housefly *Musca domestica*、11th Asian Chemical Congress、2005. 8. 24-26。
11. 岡田浩幸、核内受容体コンホメーション変化センシングアッセイにおけるファージディスプレイ法の導入、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。
12. 高柳明香、ヒト・エストロゲン関連受容体 ERR の受容体結合試験系の確立、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。
13. 徳永隆俊、蛍光トレーサーを用いた高効率的な核内受容体結合試験系の確立、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。
14. 劉 暁輝、フラボンおよびイソフラボン類化合物が結合性を示すショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体 ERR、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。
15. 岩崎 茜、イエバエ *Musca domestica* 時計遺伝子 period における選択的簾プライシングの検索、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。
16. 角田一徳、イエバエの概日リズムペースメーカーホルモン PDF および PAP の脳内局在の免疫組織化学的解析、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。
17. 金木淳史、吉田太一、ショウジョウバエ概日リズムペースメーカーホルモン PDF の受容体探索における GPCR のクローニング、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。
18. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、糖質コルチコイド受容体に対する内分泌攪乱作用性のコンホメーション変化センシング抗体法による評価、日本内分泌攪乱化学物質学会第 8 回研究発表会、2005. 9. 27-29。
19. 下東康幸、徳永隆俊、岡田浩幸、野瀬 健、中井 誠、矢可部芳州、受容体コンホメーション変化センシング抗体法による受容体結合能およびホルモン活性の同時評価: 黄体ホルモン・プロゲステロン受容体に対する化学物質の応答解析、日本内分泌攪乱化学物質学会第 8 回研究発表会、2005. 9. 27-29。
20. 高柳明香、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、下東康幸、エストロゲン関連受容体  $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) の発現および結合試験系構築、日本内分泌攪乱化学物質学会第 8 回研究発表会、2005. 9. 27-29。
21. 徳永隆俊、渋谷あゆみ、浅井大輔、野瀬 健、中井 誠、矢可部芳州、毛利資郎、小泉 修、下東康幸、高感度センシング抗体

によるエストロゲン受容体-化学物質系のリスク評価、日本内分泌攪乱化学物質学会第8回研究発表会、2005. 9. 27-29。

22. 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、 $\alpha$ ヘリックス認識抗体による糖質コルチコイド受容体におけるリガンド依存的コンホメーション変化の識別、第78回日本生化学会大会、2005. 10. 19-22。

23. 徳永隆俊、岡田浩幸、劉 暁輝、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、男性ホルモン受容体と黄体ホルモン受容体におけるコンホメーションセンシングアッセイ、第78回日本生化学会大会、2005. 10. 19-22。

24. 劉 暁輝、松島綾美、徳永隆俊、野瀬健、富永佳也、下東美樹、下東康幸、植物エストロゲン・フラボンおよびイソフラボン類によるショウジョウバエ・エストロゲン関連受容体のアゴニスト活性、第78回日本生化学会大会、2005. 10. 19-22。

25. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイ法による核内受容体コンホメーション変化センシング抗体調製のための $\alpha$ -ヘリックスペプチド、第42回ペプチド討論会、

2005. 10. 27-29。

26. 徳永隆俊、岡田浩幸、野瀬 健、下東康幸、糖質コルチコイド受容体と黄体ホルモン受容体におけるC端 $\alpha$ -Helix認識抗体を用いたコンホメーションセンシングアッセイ、第42回ペプチド討論会、2005. 10. 27-29。

27. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、コンホメーション変化センシング抗体による糖質コルチコイド受容体における化学物質の内分泌攪乱作用性評価、第52回日本臨床検査医学会・第45回日本臨床化学会合同大会、2005. 11. 17-20。

28. 徳永隆俊・浅井大輔・横谷 聡・野瀬健・下東康幸、蛍光トレーサーを用いたB/F分離有・無両系のステロイドホルモン受容体結合試験、第52回日本臨床検査医学会・第45回日本臨床化学会合同大会、2005. 11. 17-20。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

当該年度に該当の出願・登録の実績はなかった。

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

エピトープ解析、ポリクローナル抗体の設計作製および試験

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

グループⅢに属する代表的な核内受容体であるステロイドホルモン受容体においては、リガンド非結合（アポ型）、アゴニスト結合（ホロ型）、アンタゴニスト結合（ホロ型）の3つの状態において、それぞれ立体構造・コンホメーションが異なることが知られている。現在までにヒトゲノム解析により明らかにされた48種類の核内受容体のそれぞれにおいても、遺伝子の転写制御においては3つのコンホメーションが存在すると想定されている。これまでの研究において、我々は受容体アポ型からホロ型への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やアンドロゲン受容体などを介して示す内分泌かく乱作用のリスク評価に資するデータを得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、受容体のコンホメーション変化を高感度で感知するセンシング抗体である。そこで、48種類の核内受容体すべてに対してコンホメーション変化センシング抗体を作製し、統括的な評価系を構築することとした。このため、抗体作製を迅速に実施することとし、今年度は17種類の受容体に対応した11種のポリクローナル抗体の作製を行った。また、抗体作製にあたっては、全核内受容体に対して高効率的にコンホメーションをセンシングするものを得るために、既知の核内受容体に関する構造情報を集め、エピトープペプチドの分子デザイン方法について構造解析の検討を行った。

A. 研究目的

従来、環境化学物質の暴露によって最も顕著に影響を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 $\alpha$ （ER $\alpha$ ）が注目されてきた。これは、ER $\alpha$ は主に生殖に関与し、野性生物において多くの生殖異常が発見された事実から、人類においてもER $\alpha$ を介したかく乱作用は子孫、特に個体数の減少に直結すると考えられていたからである。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た。現在、それらの核内受容体すべてに対するリガンドが判明してはいないが、立体構造およびアミノ酸配列解析の結果は、すべての核内受容体においてリガンド既知のステロイド受容体の活性化機構と類似の活性化機構が存在することを示唆した。そこで、これらすべての核内受容体に対する環境化学物質・環境ホルモ

ンの影響が懸念され、それらの影響を検討する必要性が生じた。そこで、本研究においてはヒトの核内受容体48種類すべてを対象に研究を行うこととした。

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一つのグループである。ヒトゲノム解析の結果より、受容体タンパク質のアミノ酸配列が解析され、アミノ酸配列相同性を基に構造同定された核内受容体様の受容体は、リガンド既知および未知のものを合わせて数十種類（40～80種と解析により異なる）が存在する。これらのうち、当初に報告された48種類の分類が最も妥当な解析として現在では認知されている。この核内受容体ファミリーに属する受容体タンパク質は互いに高いアミノ酸配列相同性を示すが、さらに構造相同性を示し、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)。転写制御を担い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 は、リガンドが結合することにより構造を変化させ転写制御を行っている。それゆえ、この LBD にリガンドではない化学物質が結合し、誤った転写制御を引き起こすことが内分泌かく乱作用の本質であると考えられる。すなわち、

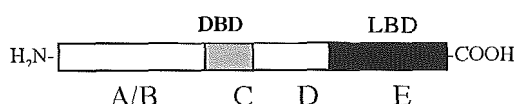
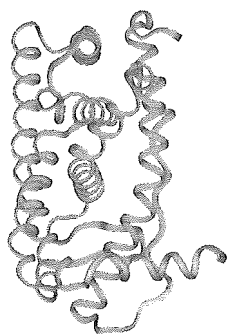
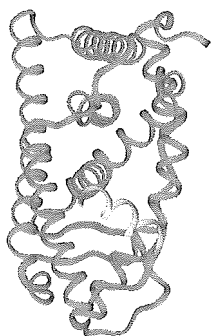


図 1. 一般的な核内受容体のドメイン構造  
DBD: DNA Binding Domain, LBD: Ligand Binding Domain.

1) リガンド無し  
(アポ型)



2) アゴニスト結合  
(ホロ型)



3) アンタゴニスト結合 (ホロ型)

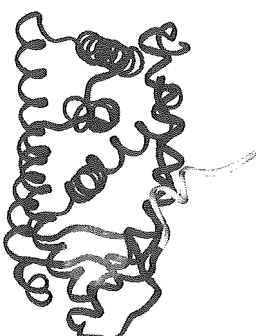


図 2. X線結晶構造解析結果に基づく一般的な核内受容体 LBD の構造変化

内分泌かく乱化学物質は 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結合すると推定されている。

これまでに X線結晶構造解析結果が報告された核内受容体の立体構造から次のような立体構造の変化が推定されている。リガンドと LBD (図 1 の E ドメイン) の結合状態において、LBD の C 端部分にあるヘリックス 1 2 (図 2 の黄色の部分) が大きく構造を変化させている。図 2-1) に示すように、通常はリガンドが結合していないアポ型で存在し、アゴニストタイプのリガンドが結合した場合は図 2-2) に示すようなアゴニスト結合型、そしてアンタゴニストタイプが結合した場合は図 2-3) に示すような構造となる。

そこで、このリガンド結合に伴い構造を大きく変化させるヘリックス 1 2 部分を特異的に認識する抗体を作製することにより、化学物質の受容体結合を評価することが可能となり、我々はこれまでに幾つかの核内受容体系での成功例を既に報告した。よって、48 種類の核内受容体の全てに対する抗体 (センシング抗体) を本研究で作製し、それらの抗体についてのセンシングアッセイを行うこととした。

本年度の研究では、まず、アミノ酸配列情報および立体構造情報を収集・分析し、LBD (E ドメイン) におけるヘリックス 1 2 相当部分のアミノ酸配列解析を実施した。また、同定したヘリックス 1 2 部分を含む抗原作製用ペプチド 11 種類をデザイン・化学合成して、ポリクローナル抗体作製を行った。

## 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 LBD のリガンド結合状態 (アゴニスト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。これらの X 結晶構造解析データを、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



イックワークステーション02を使用した。

### ③ アミノ酸配列データの検索と入手

核内受容体のアミノ酸配列は、NCBI (National Center for Biotechnology Information) の遺伝子・タンパク質配列データベース Entrez から、それぞれ最新の配列取得した。また、配列相同性解析・およびドメイン構造の同定には解析プログラム・ClustalXを使用した。

### ④ 抗原ペプチドの合成

構造解析により同定した受容体の第12ヘリックスを含むC端部分に相当する断片ペプチドをエピトープとして設定し、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、抗原配列中にシステインを持たないペプチドの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/ $\mu$ l) に、MBS の DMF 溶液 (3.6 mg/12  $\mu$ l) を 9.3  $\mu$ 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 エピトープペプチドの 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l) および 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (115  $\mu$ 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、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画し、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て、4°C で終夜インキュベートした。沈殿してくる抗 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こ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。

### ⑪ アフィニティ精製

調製した抗体の抗原ペプチドに対する応答を酵素免疫測定 (ELISA) により調べた。ELISA に用いるプラスチックプレートの調製は、次のように行った。1) ウシサイログロブリンに結合させたペプチドをプレートに吸着 (2.5 mg/ml, 50 ml/well)、2) 1.5 時間インキュベート、3) 洗浄、4) 非特異的な吸着を防ぐ為に 2% BSA によりブロッキング。その後、試験に用いる抗体溶液を 1 時間・室温でインキュベートした後、洗浄操作を行い、HRP 標識された 2 次抗体 (anti-rabbit IgG 抗体) によりペプチドに対する抗体応答を調べた。HRP の基質には過酸化水素を用い、酵素作用によ

り生じた酸素原子が 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt) (ABTS) 発色させることにより 405 nm の吸光度をプレートリーダー検出した。

### (倫理面への配慮)

本研究課題では、抗体を作成するに当たり、ウサギを実験動物として使用する。こうした実験動物はきちんと管理された環境下で飼育され、また、飼料、飲料水、さらには清浄空気を供するなど、十分な動物愛護の配慮のもとで実験に用いられている。また、採血等に際しても麻酔をするなど痛みの無いように配慮するなど、倫理面の問題が生じない状況で行っている。所属部局・理学研究院においては「動物実験審査」システムが確立されており、本研究は審査を承認の上許可された。

一方、内分泌かく乱性の可能性のある化学物質を多種取り扱うが、量的には極めて微量であり、しかも、スクラバー付属のドラフトチャンバーが設備されており、特に危険性は無い。また、揮発性試薬に対応するドラム式換気装置を実験室に備えている。

## C. 研究結果

受容体の構造変化を感知するセンシング抗体は、核内受容体 LDB のヘリックス 1 2 部分を主なエピトープとする。それゆえ、ヘリックス 1 2 部分の同定が、本研究において重要な部分を占めるが、現在のところ全ての核内受容体 LDB の立体構造は決定されてはいない。本研究において、まず、PDB における核内受容体 LDB (Nuclear Receptor LDB) に該当するデータを検索した。CATH classification で Toplogy : Retinoid X Receptor に該当するものを検索すると 1 2 7 件の PDB データが登録されていた。その中には、同じ受容体 LDB に対してリガンドが結合していないもの、異なるリガンドが結合したもの、ヘテロ 2 量体となっているものも存在している。また、ヒトの核内受容体 LDB に関する立体構造データは 9 3 種類あった。これらのデータにも、複数の異なるリガンドが結合したものや、ヘテロダイマーを形成しているものもあり、約 1 0 0 種類の LDB 立体構造データが利用可能であった。ところで、核内受容体の C 末端

に存在するヘリックス 1 2 は、多くの場合  $\alpha$ ヘリックス構造を取っているが、ヘリックスの長さが LBD に結合しているリガンドにより異なっており、その構造は比較的变化しやすい。特徴的なのは、リガンドが結合していないアポ型の場合は、ヘリックス全体が分子表面に露出しているが、アゴニストや LBD と結合して転写を活性化する SRC-1 に代表されるコファクターペプチドが共存している場合は、ヘリックス 1 2 は

NR3A1_ER $\alpha$ _	YSMKCKNVVPLYD <u>LLLEMLDA</u> HRLHAPTSRG 490
NR3A2_ER $\beta$ _	LNMCKKNVV <u>YVYD</u> LLLEMLNAHVLRGCKSSI 490
NR3B2_ERR $\beta$ _	YSVKLGKVPMHKLFLEMLEAKAWARADSLQ 490
NR3B3_ERR $\gamma$ _	YNIKLEGKVPMHKLFLEMLEAKV----- 482
NR3B1_ERR $\alpha$ _	YGVKLEGKVPMHKLFLEMLEAMMD----- 483
NR3C1_GR_	FQTFLD-KTMSIEFPEMLAEIITNQIPKYSN 489
NR3C2_MR_	FYTFRESHALKVEFPAMLVEIISDQLPKVES 490
NR3C3_PR_	LNTFIQSRLASVEFPEMSEVIAAQLPKILA 490
NR3C4_AR_	FDLLIKSHMVSVDPEMMAEIIISVQVPKILS 490
NR2A1_HNF4 $\alpha$ _	QFIKLFMAKIDNLLQEMLLGGSPSDAPHAH 490
NR2A2_HNF4 $\gamma$ _	QFVKLFGMVKIDNLLQEMLLGGASNDGSHLH 490
NR2B1_RXR $\alpha$ _	FFFKLIGDTPIDTFLMEMLEA----- 480
NR2B2_RXR $\beta$ _	FFFKLIGDTPIDTFLMEMLEA----- 480
NR2B3_RXR $\gamma$ _	FFFKLIGDTPIDTFLMEMLET----- 480
NR2C1_TR2_	FFKGLIGNIRIDSVIPHILKMPADYNSQII 490
NR2C2_TR4_	FFTGLIGNVSDSIIPYILKMETAFYNGQIT 490
NR2E1_TLX_	FFKKTIGNVPITRLLSDMYKSSDI----- 483
NR2E3_PNR_	FFRKTIGNTPMEKLLCDMFKN----- 480
NR2F1_COUPTFI_	FFVRLVGKTIPIETLIRDMLLSGSSFNWPYMS 490
NR2F2_COUPTFII_	FFVRLVGKTIPIETLIRDMLLSGSSFNWPYMA 490
NR2F6_EAR2_	FFMRLVGKTIPIETLIRDMLLSGSTFNWPYGS 490
NROB1_DAX1_	FFRPPIIGTVSMDDMLEMLCTKI----- 482
NROB2_SHP_	FFRPPIIGDVDIAGLLGDMLLR----- 481
NR5A1_SF1_	YHKHLGNEMPRNLLIEMLQAKQT----- 483
NR5A2_LRH1_	YYKHLNGDVPYNLLIEMLHAKRA----- 483
NR1A1_TR $\alpha$ _	LHMKVECP-----ELFPPLFLEVFEDQEV--- 484
NR1A2_TR $\beta$ _	LHMKVECP-----ELFPPLFLEVFED----- 481
NR1B1_RAR $\alpha$ _	ITLKMEIP-----GSMPLIQEMLENSEGLDT 486
NR1B2_RAR $\beta$ _	ITLKMEIP-----GSMPLIQEMLENSEGHEP 486
NR1B3_RAR $\gamma$ _	ITLKMEIP-----GMPPLIREMLENPEMFED 486
NR1C1_PPAR $\alpha$ _	QI IKKTESDAA---LHPLLQEIYRDMY----- 483
NR1C2_PPAR $\beta$ _	QR IKKTETETS---LHPLLQEIYKDMY----- 483
NR1C3_PPAR $\gamma$ _	QV IKKTETDMS---LHPLLQEIYKDLY----- 483
NR1D1_Reverb $\alpha$ _	LSFRVDAQ----- 467
NR1D2_Reverb $\beta$ _	LAFKVHP----- 466
NR1F1_ROR $\alpha$ _	MAFKAIYDPDIVRLHFPPLYKELFTSEFEPAM 490
NR1F2_ROR $\beta$ _	QVFKQSHPEIVNTLFPPLYKELFNPDCAATG 490
NR1F3_ROR $\gamma$ _	QIFQHLHPVVQAAPPLYKELFSTETESPV 490
NR1H2_LXR $\beta$ _	FALRLQ-----DKKLPLLSEIWDVHE----- 481
NR1H3_LXR $\alpha$ _	FALRLQ-----DKKLPLLSEIWDVHE----- 481
NR1H4_FXR_	MSWRVN-----DHKFTPLLCEIWDVQ----- 480
NR1I2_PXR_	RLLRIQ---DIHPFATPLMQELFGITGS--- 484
NR1I3_CAR_	QIQHIQ---GLS-AMPLLQEICS----- 479
NR1I1_VDR_	RCLSFQP---ECSMKLTPLVLEVFNGEIS--- 485
NR4A2_NURR1_	FYLKLEDLVPPPAIDKFLDLPF----- 484
NR4A3_NOR1_	FYLKLEDLVSPPSIDKFLDLPF----- 484
NR4A1_NGFIB_	FYLKLEDLVPPPIIDKIFMDLPF----- 484
NR6A1_GCNF_	LEQLPLLFKVVLHSCKTSVYKGE----- 481

図 3 核内受容体 LDB・ヘリックス 1 2 領域の  
アミノ酸配列アラインメント

下線部分はヘリックス 1 2 相当部分

LBD や SRC-1 ペプチドと結合することで、その疎水面は隠された形になる。一方、アンタゴニストが結合している場合においては、ヘリックス12の形が変化し、場合によっては折れ曲がったりする。この様な、ヘリックス12の構造変化をセンシング抗体は認識していると考えられるため、エピトープペプチドのデザインにおいては、このヘリックス12を中心としてその前後に抗原配列を延長することとした。

ヒトゲノム解析で明らかとなった核内受容体の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、その配列を基に相同性解析を実施した。ヘリックス12に相当する部分の結果をまとめ図3に示す。

図3に示すように、ヘリックス12に相当する領域は、単純にアミノ酸配列の相同部位に重ならない。また、前述の通りヘリックス12を構成するアミノ酸配列は、リガンド結合によって変化する。そこで、エ

ピトープ部位を同定する場合は、X線結晶構造が解析されている受容体に対して抗体作製を行う場合には、同定されたヘリックス12を含み前後に数残基を延長した。また、3次元構造が未確定の場合でも、配列相同性が高い構造既知の受容体構造を鋳型として、2次構造予測を行い（ホモロジーモデリング）、やはりヘリックス12と推定された領域の前後をエピトープとした。抗体の作製にあたり、まず本年度取り組む17の核内受容体ヘリックス12認識抗体作製のためのエピトープ11個を上記の方針に基づき決定した（表1）。抗原ペプチドの合成は、自動固相合成機による Fmoc アミノ酸を用いた HBTU-HOBt 法で行った。今回合成した数種類のヘリックス12を含むペプチドにおいては、水溶液に対する溶解性が著しく低く、そのような合成ペプチドはカラムクロマトグラフィーでの精製が困難で収率が低下した（データは省略）。

本研究においては、ポリクローナル抗体をウサギに免疫して作製した。得られた抗血清より抗体画分を調製して、抗体力価を検討した。現在までに力価の検討が終了したものは10種類の抗体である（図4.1-10）。

全ての抗体において、抗原ペプチドに特異的で明確な吸光度の上昇が確認された。番号11抗体は、現在最終採血の直前であるが抗血清において明確な抗体価の上昇が既に確認された。

表1. 17種類の核内受容体LBDヘリックス12センシング抗体作製のためのエピトープ

番号	名称	通称	配列
1	NR1A1	TR $\alpha$	CPTFLFPPLFLEVFE
	NR1A2	TR $\beta$	CPTFLFPPLFLEVFE
2	NR1B1	RAR $\alpha$	CKMEIPGSMPLIQEMLEN
	NR1B2	RAR $\beta$	CKMEIPGSMPLIQEMLEN
3	NR1B3	RAR $\gamma$	CKMEIPGMPPLIREMLN
4	NR1C1	PPAR $\alpha$	CALHPLLQEIYRDMY
5	NR1C2	PPAR $\beta$	CSLHPLLQEIYKDMY
	NR1C3	PPAR $\gamma$	CSLHPLLQEIYKDLY
6	NR1H2	LXR $\beta$	CRLQDKKLPPLLSEIWDV
	NR1H3	LXR $\alpha$	CRLQDKKLPPLLSEIWDV
7	NR1H4	FXR	HKFTPLLCEIWDVQ
8	NR1I1	VDR	CSMKLTPLVLEVFGEIS
9	NR2B1	RXR $\alpha$	CKLIGDTPIDTFLMEML
	NR2B2	RXR $\beta$	CKLIGDTPIDTFLMEML
10	NR3A2	ER $\beta$	CKNVVPVYDLLLEMLNAHV
11	NR3C2	MR	CMLVEIISDQLPKVESGNAK

赤字で示すのは、X線結晶構造解析から同定されたヘリックス12

#### D. 考察

ステロイドホルモン受容体に代表される核内受容体は、リガンド結合により受容体の立体構造が変化して、転写因子の結合状態が変化することで標的遺伝子の転写活性を調節すると考えられている。この機構では、ヘリックス12が最も構造変化の大きな部分であり、その構造変化を感知・センシングできれば化学物質のリガンド結合を検出することができる。立体構造解析から全48種の核内受容体においては、お互いの相同性が高くドメイン構造は高く保持されているが、そのリガンド選択制や活性化機構、特に、狭い意味でのリガンド結合ポケットの構造には違いも存在している。中でも、リガンド結合が転写活性化に必須であるかどうかについては、活性化にリガンドを必要としない常時活性化受容体も存在するため、そのような受容体

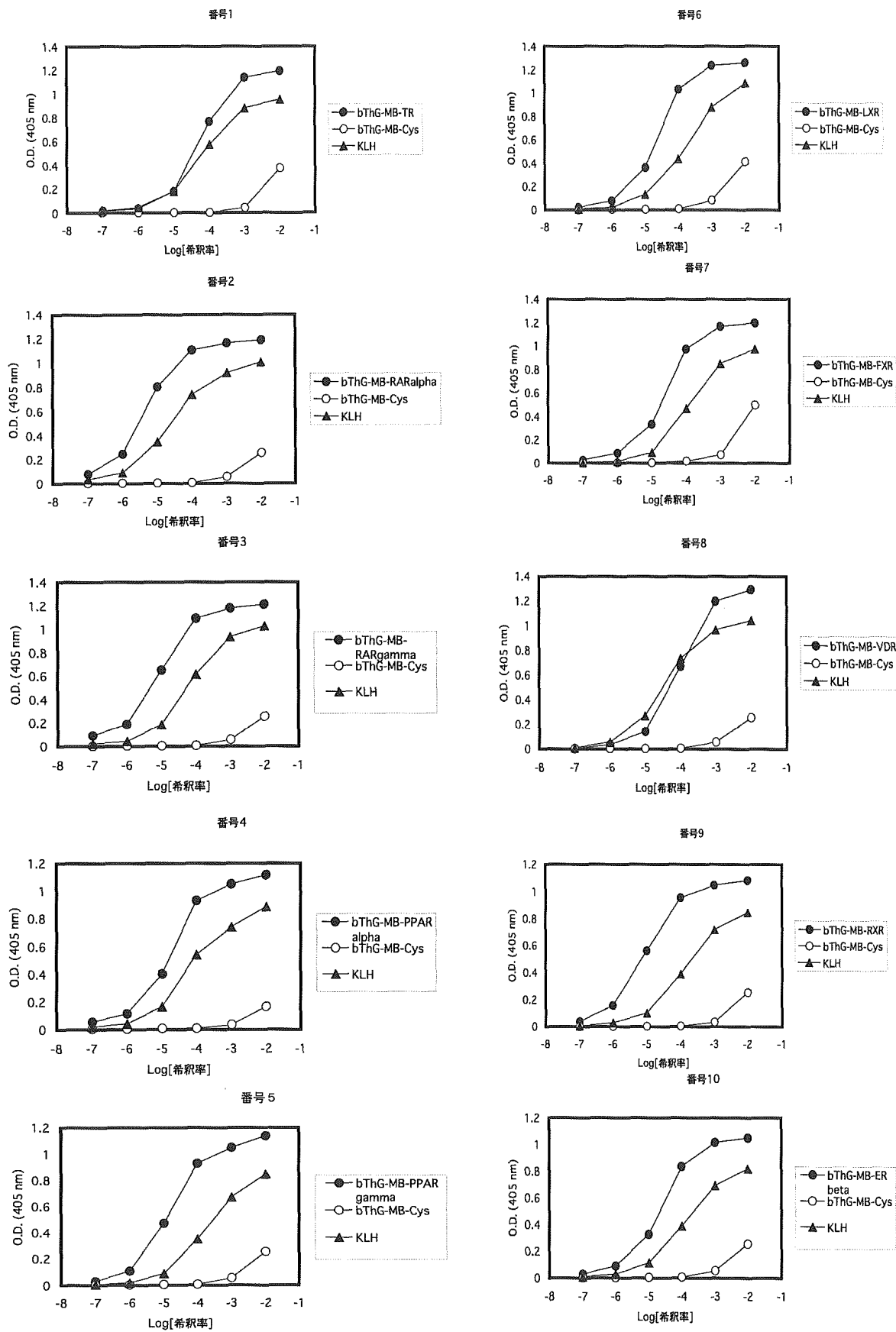


図4 ウサギ由来抗ヘリックス12ポリクローナル抗体のカ価の検討  
表1における番号1～10の抗原ペプチドで作製したポリクローナル抗体を用いた

に対する化学物質の攪乱性の解析は非常に興味のある研究対象である。本センシングアッセイ法は、単に化学物質の受容体結合性を測定するだけではなく、ヘリックス12はその位置取りにより転写因子・cofactorの結合性を制御して転写活性を調節しているため、そのようなヘリックス12のコンホメーションをセンシングする抗体を用いる本方法は、リガンド結合を活性化に必要としない受容体においても適応可能であると考えられた。

ところで、ポリクローナル抗体は、モノクローナル抗体とは異なり、異なる分子の混合物として作製される。また、その性状は免疫した動物個体の性質に依存し、任意の抗体を作製することはできない。モノクローナル抗体では、作製の際に望ましい認識能を持った抗体分子をスクリーニングすることで、最適なセンシング抗体を作製することができる。しかしながら、そのスクリーニングには非常に大きな労力と最適なエピトープの設定が必須となる。一方、ポリクローナル抗体の場合は、その作製は比較的単純化されており、外部の業者への作製依頼も比較的容易である。そのみならず、センシングアッセイにおいてはヘリックス12に対していろいろな認識能を持つ抗体群の全体的な結合量でヘリックス12の状態を判断するので、個々の抗体の存在比率の違いは抗体のロット毎で比較すれば大きな問題とはならないと考えられる。すなわち、迅速に抗体を作製してアッセイを行う場合はポリクローナル抗体が、厳密で高性能かつ均一の抗体の再生産が必要な場合においてはモノクローナル抗体が選択されることになるであろう。

## E. 結論

本研究により、11種類の核内受容体LBD抗ヘリックス12ポリクローナル抗体が作製された。今後、これを用いて受容体タンパク質と種々の化学物質を用いたセンシングアッセイを行う予定である。また、残りの受容体LDBに対するセンシング抗体作製も行い、全ての受容体に対するポリクローナル抗体を作製しアッセイに共する予定である。

## 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 Conformation Sensing Assay Using Polyclonal Antibody Specific for the C-terminal  $\alpha$ -helix of Glucocorticoid Receptor and Progesterone Receptor. T. Tokunaga, H. Okada, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2005, 291-294 (2006).

2  $\alpha$ -Helix peptides for bio-panning in the phage display method to obtain the antibodies specific for conformation-change in nuclear receptors. H. Okada, T. Tokunaga, N. Shirasu, T. Nose, and Y. Shimohigashi: *Peptide Science* 2005, 475-478 (2006).

### 学会発表

1. 下東康幸、徳永隆俊、岡田浩幸、野瀬健、中井 誠、矢加部芳州  
受容体コンホメーション変化センシング抗体法による受容体結合能およびホルモン活性の同時評価：黄体ホルモン・プロゲステロン受容体に対する化学物質の応答解析  
第8回環境ホルモン学会，2005，8/24～29

2. 徳永隆俊、渋谷あゆみ、浅井大輔、野瀬健、中井 誠、矢加部芳州、毛利資郎、小泉 修、下東康幸  
高感度センシング抗体によるエストロゲン受容体-化学物質系のリスク評価  
徳永隆俊、渋谷あゆみ、浅井大輔、野瀬健、中井 誠、矢加部芳州、毛利資郎、小泉 修、下東康幸  
第8回環境ホルモン学会，2005，8/24～29。

3. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸  
糖質コルチコイド受容体に対する内分泌攪乱作用性のコンホメーション変化センシング抗体法による評価  
第8回環境ホルモン学会，2005，8/24～29。

4. 徳永隆俊、岡田浩幸、劉 暁輝、松島綾美、野瀬 健、下東康幸  
男性ホルモン・アンドロゲン受容体と黄体ホルモン・プロゲステロン受容体におけるコンホメーションセンシングアッセイ  
第78回日本生化学会，2005，10/19～22。

5. 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、松島綾美、野瀬 健、下東康幸  
αヘリックス認識抗体による糖質コルチコイド受容体におけるリガンド依存的コンホメーション変化の識別  
第78回日本生化学会, 2005, 10/19-22。

6. 徳永隆俊、岡田浩幸、野瀬 健、下東康幸  
糖質コルチコイド受容体と黄体ホルモン受容体におけるC端α-Helix認識抗体を用いたコンホメーションセンシングアッセイ  
第42回日本ペプチド学会, 2005, 10/27-29。

7. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイ法による核内受容体コンホメーション

変化センシング抗体調製のためのα-ヘリックスペプチド、第42回ペプチド討論会、2005. 10. 27-29。

8. 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸  
コンホメーション変化センシング抗体による糖質コルチコイド受容体における化学物質の内分泌攪乱作用性評価  
第52回日本臨床検査医学会・第45回日本臨床化学会合同大会, 2005, 11/17-20。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

現在のところ、出願・登録されていない。

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

ファージディスプレイ法によるヒト核内受容体 48 種  
センシング抗体の作製

分担研究者 松島綾美 九州大学大学院理学研究院助手

研究要旨

内分泌かく乱作用は、ヒト核内受容体 48 種類が複合的に関与する複雑な制御機構に対して化学物質が影響を及ぼした結果発現される可能性が高く、全ての核内受容体において環境化学物質の内分泌かく乱作用性を評価することはきわめて重要である。一方、我々が開発したセンシング抗体法は、1 段階の試験で化学物質の受容体結合性とホルモン活性についての評価を同時に与えるハイスループットな評価系であり、膨大な数の化学物質を 48 種の核内受容体について評価するためには最も有効な評価法である。そこで本研究では、48 種の核内受容体において高効率にセンシング抗体を作製することを目的として、近年発展が著しいファージディスプレイ法を利用した最適なセンシング抗体作製系の確立に着手した。まずは、一般的な核内受容体である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を行ない、そこに幾つかの改良を加えた抗体作製系をエストロゲン受容体に対して適用した。GR での結果より、抗体選別操作に適切な抗原ペプチドをデザイン・使用することで目的の結合特異性を持つ抗体を選別することが可能であることが示され、実際にリガンド依存的なコンホメーション変化をセンシングするファージ抗体を得るに至った。現在、本抗体作製系を他の受容体に展開中であり、22 種の受容体については抗原ペプチドの合成を完了し、バイオパンニングの準備に取り掛かっている。

A. 研究目的

ヒトゲノム解析の完成により、ヒトには 48 種の核内受容体が存在することが明らかにされ、環境化学物質による内分泌かく乱作用は、これらの核内受容体群が複合的に関与する複雑な制御システムに対する影響の結果生じる可能性が強いと懸念されている。事実、内分泌かく乱作用に直接的に関与するエストロゲン受容体 2 種 (ER $\alpha$ 、 $\beta$ ) の他にエストロゲン関連受容体 3 種 (ERR $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ ) の存在が明らかとされ、これらが一部の外因性リガンドを同じくすることから、5 種の受容体が相互に関連した機能調節機構へ及ぼす環境化学物質の複合的な影響が危惧されている。さらに、我々の調査の結果、核内受容体 48 種のうち、実に 20 種を超える受容体が脳神経系において機能発現していることが明らかとなり、かく乱作用の標的は内分泌系にとどまらず、脳神経系にまで及ぶ危険性

が高いことが判明した。従って、すべての核内受容体において環境化学物質のかく乱作用の予測・順位付けを行うことは緊要な課題である。我々は、核内受容体断片ペプチドを抗原とした動物免疫によって、コンホメーションセンシング能を有するポリクローナルおよびモノクローナル抗体の作製に成功し、それをを用いた内分泌かく乱作用性の簡便な評価系構築に成功している。しかしながら、動物免疫を経る抗体作製法では、①経済的・時間的なコストが高い ②核内受容体のように哺乳類間で高度に保存された分子への高親和性抗体を得ることは困難 ③免疫動物体内での強力な取捨選択により、得られる抗体の抗原認識および機能の多様性が低いなどの問題を内包しており、48 種という数多くの核内受容体についてセンシング抗体を得る上では大きなネックであった。

そこで我々は、昨年度よりファージディス

プレイによる抗体作製法を導入した。本手法は、ファージと呼ばれるウイルスに抗体タンパク質を産生させる手法で、試験管内でテラーメードな抗体作製を可能にするものであり、高効率にセンシング抗体を得ることが期待される。本研究では、センシング抗体法の48種への展開を見据えた抗体作製系の確立を目的として、生体内のほぼ全ての細胞で発現する一般的な核内受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) についてセンシング抗体の作製を行ない、さらに改良した抗体作製系を ER $\alpha$  において展開した。

## B. 研究方法

### (1) 抗原ペプチド・スクリーニング用タンパク質の調製

GR、ER $\alpha$  について、リガンドの結合時に大きく構造変化を起こすことが知られているリガンド結合ドメイン (LBD) の12番目のヘリックス (H12) 付近の配列から成るペプチドを化学合成し、キャリアタンパク質 (KLH, BthG) に架橋した。一方で、GR-LBD に相当する遺伝子断片をタンパク質発現ベクターである pGEX6P-1 へ組み込み、宿主大腸菌 BL21 へ導入した。これにより、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として GR-LBD を発現させ、グルタチオンセファロース 4B 担体を用いたアフィニティ精製を行って抗体分子のスクリーニングに用いる GR-LBD を得た。

### (2) バイオパンニング

ファージ抗体ライブラリーには、英国医学会議 (MRC) より入手した Tomlinson I ライブラリーを使用した。このライブラリーに含まれるファージは、抗体タンパク質の可変領域を単鎖化した遺伝子と G3P コートタンパク質遺伝子とが融合された遺伝子をもつため、対応する単鎖型抗体タンパク質がファージ表面に提示される (図1)。

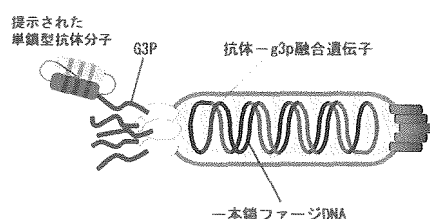


図1. ファージ抗体の構造

一般にファージディスプレイ法では、①固定化抗原とファージ抗体ライブラリーの結合、②洗浄、③結合ファージの溶出、④溶出ファージの大腸菌への再感染、⑤溶出ファージの増幅・回収、というバイオパンニングと呼ばれる一連の操作によって、抗原特異的な抗体を発現したファージ粒子を選択的に濃縮させる。本研究では、バイオパンニングを GR において3回繰り返した。ER $\alpha$  においては、より効率的に抗体を得るために、特異的なファージ粒子をさらに濃縮することを目的として4回繰り返した (詳細は後述)。

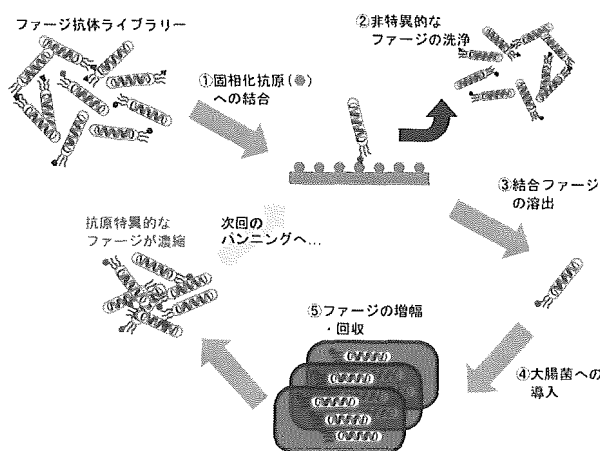


図2. バイオパンニング

### 2.1. バイオパンニング (GR)

GR において、リガンド結合後にホルモン作用を示す場合 (アゴニスト結合型) の H12 は、ホルモン作用を遮断する場合 (アンタゴニスト結合型) の H12 よりも C 端側のアミノ酸配列により形成されることが結晶構造解析より確認されている。そこで2種のペプチドを用いて、①アゴニスト結合型 H12 を認識する抗体、②アンタゴニスト結合型 H12 を認識する抗体、③いずれの構造も識別する抗体をバイオパンニングによって選別することを計画した。まずは、アゴニストおよびアンタゴニスト両方の化学物質評価に有効な抗体の取得が期待される③の選別に着手した (図3)。

GR ペプチド1 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS) をイムノチューブ (Maxisorp, Nunc 社) に加え、終夜インキュベートして固定化した。洗浄後、2%スキムミルク-PBS (MPBS) にて2時間ブロッキングを行った。4 ml の MPBS 中に  $5 \times 10^{12}$  のファージを含むように調製した Tomlinson I ライブラリーをイムノチューブに加え、2時間反応させた。0.1% Tween20-PBS



(TPBS) で 3 回、PBS で 3 回洗浄後、500  $\mu$ l のトリプシン溶液 (1 mg/ml) を加えて、抗原に結合したファージを溶出させた。溶出ファージを宿主菌 TG-1 に感染させ、培養プレートに播種した。育成したコロニー群を液体培地によって懸濁させ、50 ml の 2 $\times$ TY 培地 (含 1% グルコース) に植菌して対数増殖期にまで 37 $^{\circ}$ C で震盪培養した。遠心により培地を除いた後、10 ml の 2 $\times$ TY で再度菌体を懸濁させ、 $5 \times 10^{10}$  の KM13 ヘルパーファージを添加して 30 分間静置した。遠心して上清を除去した後、50 ml の 2 $\times$ TY 培地 (含 0.1% グルコース) で菌体を懸濁させ、30 $^{\circ}$ C で終夜培養した。パッケージングされたファージ粒子は培養上清に含まれるため、これをポリエチレングリコール沈殿法によって回収し、最終的に得られるファージペレットを 2 ml の PBS にて懸濁させた。得られたファージ液のうち 1 ml を次回のパンニングに使用した。2 および 3 回目のバイオパンニングについては、より高親和性の抗体を回収するために固定化抗原の濃度を 25  $\mu$ g/ml と希釈し、ライブラリー反応後の洗浄操作を TPBS、PBS 共に 20 回と厳しく変更した。さらに、3 回目のパンニングにおいては、固定化抗原を GR ペプチド 2 に変更することで、アゴニスト結合型とアンタゴニスト結合型に共通する配列部分を認識する抗体の選別・回収を行なった。回収したファージは、過剰量の宿主菌 TG-1

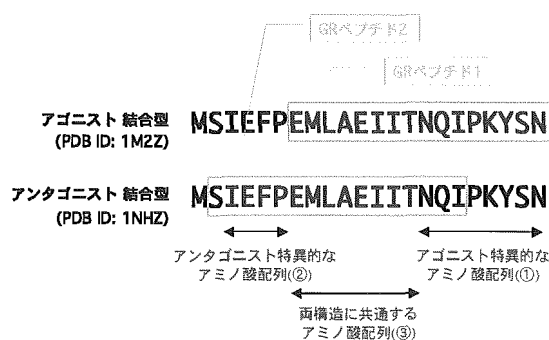


図 3. GR 抗原ペプチドの配列  
青で示す配列が H12 を形成。2 つのペプチドにより③を認識する抗体を選別。

に感染させ、培養プレートに播種した。育成後のプレートからシングルコロニーを回収することで、得られたファージ抗体群をモノクローナル化した。

## 2.2. バイオパンニング (ER $\alpha$ )

GR と同様にバイオパンニングを実施した。ER $\alpha$  については、アゴニスト結合型およびアンタゴニスト結合型における H12 構成アミノ酸配列に大きな差異は認められないため、H12 とその近傍からなるペプチドを抗原とした (図 3)。合計 4 回のパンニングを実施し、より高親和性の抗体取得を期待して、先の 2 回では固定化抗原の濃度を 50  $\mu$ g/ml、後の 2 回では 25  $\mu$ g/ml に希釈して行なった。



図 4. ER $\alpha$  抗原ペプチドの配列  
青で示す配列が H12 を形成。

## (3) ファージクローンのスクリーニング

### 3.1. 1 次スクリーニング (GR)

ペプチドによるバイオパンニングに引き続き、GR-LBD を用いた間接 ELISA 法による 1 次スクリーニングを実施した。GR-LBD (100  $\mu$ g/ml in PBS) を 96 穴プレート (Maxisorp, Nunc 社) に固定化し、洗浄後、MPBS にて 2 時間ブロッキングした。洗浄後、パンニング後のファージモノクローナル抗体 (120 クローン) を各ウェルに加え、1 時間反応させた。未結合の抗体を洗浄後、M13 ファージ認識二次抗体 (Pharmacia 社) により結合ファージ抗体を検出することにより GR-LBD に特異的な結合能を持つファージクローンを探索した。得られたファージクローンに対して DNA シークエンス解析を実施し、提示された抗体分子のアミノ酸配列を確認した。

### 3.2. 2 次スクリーニング (GR)

GR ペプチド 1 を固定化し、全長 GR (Panvera 社) を競合剤として用いた競合 ELISA 法による 2 次スクリーニングを実施した。GR のみを競合剤として用いた場合と強力なアゴニストであるデキサメタゾン (DEX) を結合させた GR を用いた場合との間で抗体応答に差異のあるファージクローンを検定した。

### 3.3. 1 次スクリーニング (ER $\alpha$ )

GR において LBD による 1 次スクリーニングを行なった結果、相当量の LBD を要することや多くのファージクローンがこの段階で陰性と判断されることが判明した。そこで 48 種において効率的に複数のセンシング抗

体を得るために、1次スクリーニングにはペプチド抗原を使用するスキームに変更して実施した。これにより2次スクリーニングに供するセンシング抗体候補クローンが数多く残ることが期待される。得られたファージクローンについてはDNAシーケンス解析を実施し、提示された抗体分子のアミノ酸配列を確認した。

#### (4)コンホメーション変化センシングファージ抗体による化学物質応答 (GR)

2次スクリーニング (GR) 後のファージ抗体を用いた競合 ELISA 法により、内因性アゴニストであるコルチゾール、外因性アゴニストである DEX、アンタゴニストであるミフェプリストン (RU486) によるコンホメーション変化センシング抗体法による化学物質評価を実施した。

##### (倫理面への配慮)

一般の抗体作製法とは異なり、ファージディスプレイ法は実験動物に痛みを与える抗原免疫や採血を行う必要がないため、今回の研究では動物愛護の観点からの倫理上の問題が大幅に軽減されている。また、研究に用いたファージはヒトに対する感染性が皆無であり、安全性の点でも問題がない。

### C. 研究結果

#### (1)GR センシング抗体の作製

3回目のバイオパンニングにおける溶出ファージの力価を調べた結果、 $6.7 \times 10^5$  のファージが回収されたことが分かり、それらをモノクローナル化した後 120 クローンについて GR-LBD による 1次スクリーニングを実施した。1次スクリーニングでは 3/120 クロー

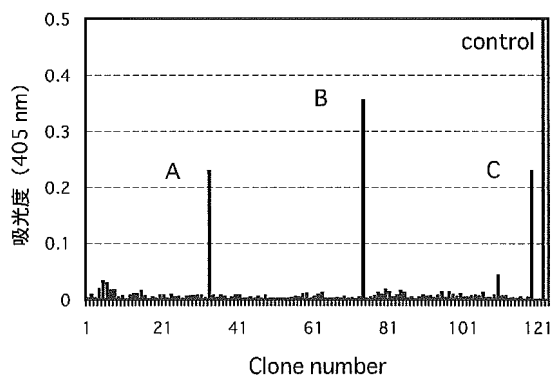


図5. 1次スクリーニングの結果 (GR)

Clone	VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3
A	SYAMS	-----	-----
B	SYAMS	-----	-----
C	RYSMR * *	YYADSVKG	GRPPFDYWGGTLVT

Clone	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
A	RASQSISSYL	TASYLWS	YGTYPNTFGQGTKVEI
B	RASQSISSYL	TASYLWS	YGTYPNTFGQGTKVEI
C	RASQSISSYL *****	AASDLQS * * *	NYSTPDTFGQGTKVEI * **** *

図6. 各ファージクローンに提示された抗体可変領域アミノ酸配列の相違

ンにおいて有意に高い吸光度が検出され、特異的な結合が認められたが (図5)、それらクローンの DNA シーケンス解析を実施したところ、2/3 クローンが同一の抗体分子を提示していることが判明した (図6)。得られた2クローンについて2次スクリーニングを行なった結果、ペプチド抗原濃度 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 、GR 濃度 1 nM 条件下での競合 ELISA においてリガンド有無の抗体応答に約10%の差異を与えるセンシング抗体 scFv  $\phi$  A (上記クローン A 由来) を得ることに成就した (図7)。

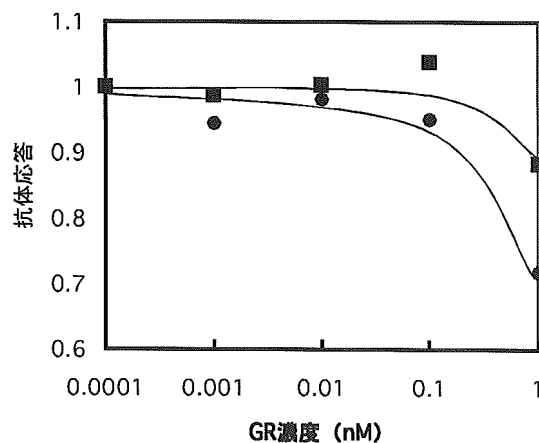


図7. 2次スクリーニング (GR) の結果

scFv  $\phi$  A は、アゴニスト結合型とアンタゴニスト結合型の両方の構造において、リガンド依存的なコンホメーション変化を識別することが期待されるモノクローナル抗体である。そこで実際に、scFv  $\phi$  A を用いたセンシング抗体法による化学物質評価を実施し、内因性アゴニストであるコルチゾール、外因性アゴニストである DEX、アンタゴニストである RU486 をリガンドとした場合における

センシング能を調査したところ、いずれのリガンド結合に対しても鋭敏な抗体応答が検出された (図 8)。本結果は、バイオパンニングによって目的とするセンシング抗体の選別が可能であることを示す有力な証拠である。

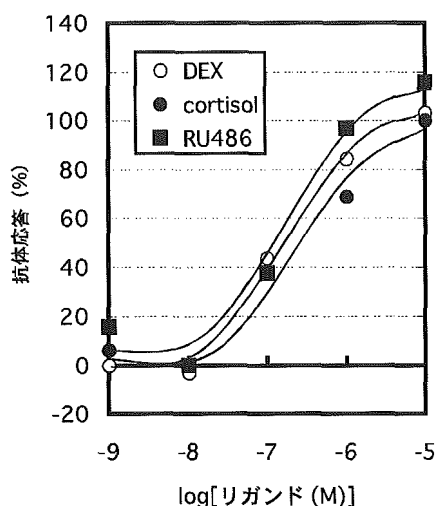


図 8. scFv  $\phi A$  によるコンホメーション変化センシングアッセイの結果

## (2)ER $\alpha$ センシング抗体の作製

ER $\alpha$  についても、GR 同様にセンシング抗体の作製に着手したが、48 種の核内受容体を対象とした高効率な抗体作製系の構築のために、パンニング回数を増やし、1 次スクリーニングをペプチド抗原で行なうよう改良した。4 回目のバイオパンニングにおける溶出ファージの力価を調べた結果  $1.3 \times 10^9$  のファージが回収されたことが確認され、目的抗体を提示したファージ粒子がかなり濃縮されたことが伺えた。それらをモノクローナル化した後、188 クローンを対象に 1 次スクリーニングを実施したところ、実に 163 クローンがペプチド抗原を特異的に認識することが判明した。現在、これらクローンのシークエンス解析を実行中である。

## D. 考察

バイオパンニングにおいて、合成ペプチドを直接イムノチューブへ固定化することにより起因する合成ペプチドの歪なコンホメーションは、非センシング抗体を回収する要因となるため、避けるべきである。そこで、合成ペプチドをキャリアタンパク質と架橋させ、間接的イムノチューブへ固定化させてバイオパンニングを実施した。これにより合成ペ

プチドは、リガンド非結合型受容体における H12 部分の構造と類似した構造であることが想定される。しかしながら、この手法ではキャリアタンパク質認識抗体を提示したファージが回収される可能性が高くなる。本研究においては、あらかじめキャリアタンパク質とインキュベートした抗体ライブラリーを用いることで、そのようなファージがイムノチューブ上の抗原と結合できないように対処した。

GR では、1 次スクリーニングに GR-LBD を使用した。これは、GR (タンパク質) 構造中の H12 を認識可能である抗体を、早い段階で絞り込むことを目的に実施したものであるが、予想以上に多くのクローンが陰性と判断された。その原因として、1 次スクリーニングでは多数のクローンを対象にアッセイを行なうため、それらから得られるファージ抗体を未精製の状態でスクリーニングに使用したことが考えられる。これによって検出感度が低下した結果、多くのクローンが陰性と判断された可能性がある。また、1 次スクリーニングに大量の受容体タンパク質が必要となることも問題である。核内受容体 48 種での抗体作製を視野に入れた場合、全ての受容体タンパク質を大量に確保するのは困難である。これらの問題点を改善すべく、ER $\alpha$  での抗体作製においてはペプチド抗原を用いることで比較的緩やかな 1 次スクリーニングに変更した。実際、多くのクローンが陽性と判断され、センシング抗体の候補となるクローンをみれなく 1 次スクリーニングできたと考える。結果的に ER $\alpha$  において、DNA シークエンス解析の対象クローンが著しく増加したが、最大 96 サンプルのシークエンス解析を一度に実行可能であるキャピラリーシークエンサー (Beckman CEQ8800) が本年度より導入されており、順調に解析が進行している。

GR については、2 次スクリーニングおよび scFv  $\phi A$  によるコンホメーション変化センシングアッセイを実施した。今回、アゴニスト結合とアンタゴニスト結合のいずれにおいても化学物質のかく乱作用性評価を与える抗体の作製を試みた。実際のアッセイ結果より、いずれのリガンド結合に対してもコンホメーション変化のセンシングを示すシグモイド曲線が得られた。これにより、ペプチドによるバイオパンニングによって目的とする結合特異性を持つ抗体を選別することが可能であることが証明され、ファージディス

プレイを適用することで核内受容体 48 種に対して効果的にセンシング抗体が得られることが判明した。しかしながら、2 次スクリーニングおよびコンホメーション変化センシングアッセイにおいて、アッセイ結果がポリクローナル抗体を使用した場合よりも不安定であることも確認された。これは、現在使用している抗体がファージに提示された状態であることが大きな原因と考えられる。そこで、得られたファージクローンについては、これを大腸菌に再感染させ、大量に単一の抗体タンパク質とした後にアッセイに供すべきである。

また、ファージディスプレイを用いた抗体作製系のある程度の確立を受け、GR, ER $\alpha$ 以外の核内受容体についての抗原ペプチド合成に着手し、現在 22 種の核内受容体については合成および精製が完了している。そして、アゴニスト優先認識の抗体か？ アンタゴニスト優先認識の抗体か？ など、どのような抗体を得るかの戦略によってさらに必要なバイオパンニング用のペプチドの設計を実施している。したがって次年度は、同時並行にバイオパンニングを実施することで多数のセンシング抗体の作製が期待される。

## E. 結論

今回、ヒト GR のリガンド依存的なコンホメーション変化をセンシングする抗体の作製に成功した。さらに、同様の抗体作製系を改良し、ER $\alpha$ に展開したところ ER $\alpha$ についても順調に抗体が得られつつある。本手法は、1 つの抗体ライブラリーから核内受容体 48 種に対するセンシング抗体を選別するものであり、従来の免疫動物を介したポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体作製法と比較してはるかに迅速かつ簡便であるため、48 種という多種の核内受容体に対するセンシング抗体作製において効果的かつ現実的な手法である。手法的にほぼ確立されたので、今後はバイオパンニング用の $\alpha$ -ヘリックス 12 を中心とした受容体断片からのペプチドの選定が最も重要な課題となる。これについては、分子進化学的なタンパク質構造解析に着手しつつあり、今後の進展を図りたい。

## F. 健康危険情報

該当する情報はない。

## G. 研究発表

### 学会発表

- 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイによる核内受容体コンホメーション変化センシングモノクローナル抗体の作製、平成 17 年度日本生化学会九州支部例会、2005. 5. 21-22。
- 岡田浩幸、白須直人、徳永隆俊、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイ法による核内受容体認識モノクローナル抗体の調製、平成 17 年度日本化学会化学関連支部例会、2005. 7. 2。
- 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、Simultaneous Evaluation of Binding and Hormonal Activities of Human Glucocorticoid Receptor by the Sensing Assay for Receptor Conformation Change、11<sup>th</sup> International Asian Chemical Congress (11<sup>th</sup> ACC)、2005. 8. 24-26。
- 岡田浩幸、核内受容体コンホメーション変化センシングアッセイにおけるファージディスプレイ法の導入、第 5 回泉屋コロキウム、2005. 8. 29-30。
- 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、糖質コルチコイド受容体に対する内分泌攪乱作用性のコンホメーション変化センシング抗体法による評価、平成 17 年度環境ホルモン学会、2005. 8. 27-29。
- 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、Discriminative Recognition of Ligand-Dependent Conformation Change in the Human Glucocorticoid Receptor by Using the  $\alpha$ -helix-recognizing Antibody、平成 17 年度日本生化学会大会、2005. 10. 19-22。
- 岡田浩幸、徳永隆俊、白須直人、松島綾美、野瀬 健、下東康幸、ファージディスプレイ法による核内受容体コンホメーション変化センシング抗体調製のための $\alpha$ -ヘリックスペプチド、平成 17 年度ペプチド討論会、2005. 10. 27-29。