

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15466

研究課題名(和文) 三分割GFPを基盤とした免疫化学的蛍光センサーの開発

研究課題名(英文) Development of immunochemical fluorescent sensor on the basis of tripartite split-GFP

研究代表者

坂元 政一 (Sakamoto, Seiichi)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：50610177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、強力な抗白血球活性を有するハリントニン(HT)の迅速かつ高感度な免疫化学的蛍光センサーの開発を目的としている。

まず、VH-GFP10遺伝子とGFP11-VL遺伝子及びGFP1-9遺伝子を構築し、HTの存在下における蛍光検出を検討した。しかし、四元複合体の形成に伴う蛍光が認められなかった。そこで、GFP断片間の距離を近づけるようVH-GFP10-GFP11-VL(scFvGs)を構築し、その機能解析を行った。その結果、scFvGsがHTを特異的に認識することが見出したものの蛍光検出は僅かであった。これらの結果より、系の確立に向け更なる条件検討を要することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における対象化合物は低分子化合物であることから、二つの波及効果が考えられる。

一つは、違法薬物問題への貢献である。近年、社会問題となっている違法薬物は、その大部分が低分子化合物である。そのため、対象化合物HTを危険ドラッグや麻薬関連化合物へ置き換える事で社会問題となっている違法薬物の簡易迅速検出法へと応用できる。もう一つは、医薬品シーズ探索研究への貢献である。本システムの抗体遺伝子を他の受容体や疾病関連タンパク質に置き換えることで、無限の可能性を有する薬用資源から網羅的なスクリーニングが行なえ医薬品シーズの探索が可能となる。

本研究は、違法薬物問題や希少疾病医薬品開発問題の解決にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop rapid and sensitive immunological fluorescent sensor that can determine harringtonine (HT).

Primarily, VH-GFP10, GFP11-VL, and GFP1-9 genes were constructed to detect fluorescence in the presence of HT. However, the fluorescence derived from quaternary complex was not detected using this system. Subsequently, VH-GFP10-GFP11-VL (scFvGs) gene was constructed, in which VH-GFP10 and GFP11-VL was joined via flexible linker peptides of (GGGS)<sub>n</sub>(n=2, 3). When the activity of scFvGs was investigated by using ELISA, it showed specific competitive activity to HT. Therefore, scFvGs were applied to immunological fluorescent sensor to detect fluorescence. As a result, slight fluorescence was detected compared with control. However, it was too weak to apply to quantitative analysis, suggesting that more optimization is required for development of this system.

研究分野：分析化学

キーワード：小型化抗体 ハリントニン ELISA

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 《研究の学術的背景》

これまでの研究でモノクローナル抗体(MAb)を用いた酵素標識免疫吸着測定法(ELISA)に着目し、有用な植物二次代謝産物を中心とした低分子化合物の定量系を確立してきた[1]。ELISAは、特異的な抗原-抗体反応を利用するため試料の前処理無しで定量が可能で、有機溶媒もほとんど使用しない。しかし、この様に多くの利点があるものの、1回の測定に約5時間を要するといった欠点が存在する。そこで、感度の向上と測定時間の短縮を目的として緑色蛍光タンパク質(GFP)と小型化抗体(scFv)を直接融合したキメラ抗体(fluobody)を作製し、蛍光免疫アッセイの開発も行った。しかし、これらの開発により検出感度の向上は認められたものの、尚も約3.5時間を要した[2, 3]。

MAbにおいて、抗原認識能を有する可変領域の重鎖(VH)及び軽鎖(VL)断片間の相互作用は、抗原の存在下で著しく強まり、安定な抗原-VH/VLの3元複合体を形成する[4]。併せて、近年、三つに分割されたGFP断片同士が近距離で会合した場合にβバレル構造を形成し初めて蛍光を発する三分割GFPという概念が報告された[5]。これらの概念より、VH及びVL断片にGFPの断片をそれぞれ融合し、検出器としての残存GFP断片(GFP1-9)を混ぜた場合、抗原の存在下においてのみ瞬時にGFPの蛍光が検出可能なセンサーの開発が可能となる着想を得た。

### 2. 研究の目的

分析化学において検出時間の短縮は、検出感度の向上と併せて最重要課題の一つである。そこで、当該研究課題では、中国やアメリカで慢性骨髄性白血病治療薬として用いられているハリントンニン(HT)をモデル化合物として用い、HTの存在下においてのみ迅速且つ高感度にHTを検出可能な蛍光センサーの開発を企画した。HTは、セファロタキシンアルカロイドの一種で*Cephalotaxus harringtonia*から単離された希少天然化合物である。また、非常に強力な抗腫瘍活性も報告されており、HTを対象とした蛍光センサーの開発は血中濃度のモニタリングやHT含有量が微量なイヌガヤの効率的なスクリーニングの観点からも重要な課題と言える。

本課題では、このように2つの原理を基盤として4元複合体形成によるGFP発光によりHTの免疫化学的蛍光センサーを開発することを目的としている。三分割GFPの概念自体が目新しいため、抗体工学分野と融合したセンサーの開発は世界に類を見ない。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗HT小型化抗体(HT-scFv)の作製

MAb 1D2産生ハイブリドーマから抽出したmRNAを基に、cDNAを合成した。合成したcDNAからVH及びVLのフレームワーク領域に相補的なプライマーを用いてVH、VL遺伝子をそれぞれ増幅させた。増幅した遺伝子はそれぞれpGEM®-T Easy Vectorに組み込み、大腸菌JM109株コンピテントセルを用いて形質転換を行った。50 µg/mLのampicillin含有LB-plate(LB-A plate)で一晩培養後、得られたコロニーをdirect PCRに供し、VH、VL遺伝子が組み込まれていると予想されるクローンを選抜した。次いで、プラスミドを抽出し、シークエンスの解析を行った。続いて、VH及びVL遺伝子を鋳型に設計したプライマーを用いてPCRを行い、それぞれの末端に制限酵素認識配列とリンカー配列を付加した。次いで、これらの遺伝子を鋳型としてSOE-PCRによりHT-scFv遺伝子を構築した。このHT-scFv遺伝子をBamHI、NotIによる制限酵素処理後、同様の酵素処理を行ったpET28a(+) vectorに組みこみ、シークエンスの解析を行った。

#### (2) HT-scFvの発現、精製

構築したHT-scFv-pET28a(+)を用いて発現用大腸菌であるBL21(DE3)株の形質転換を行った(HT-scFv-pET28a(+)/BL21(DE3))。LB-K plateで一晩培養後direct PCRによるインサートチェックを行い、HT-scFv遺伝子が組み込まれていると予想されるクローンを選抜した。選抜したクローンをLB-K培地5 mLで12時間前培養し、40 mLのLB-K培地に加えて37°Cで660 nmの吸光度(OD660)が約0.6に達するまで培養した。次いで、IPTGを最終濃度1 mMとなるように添加し、継時的に同数の菌体を回収した。回収した菌体をSDS-PAGEに付すことでHT-scFvの最適発現誘導時間を検討した。

発現したHT-scFvはN末端にヒスチジン6残基からなるHis6-Tagを有するため、Ni<sup>2+</sup>のような金属イオンとキレートを形成する。そこでNi Sepharose™ 6 Fast Flowを担体とした固定化金属イオンアフィニティーカラムクロマトグラフィー(IMAC)を用いてHT-scFvの精製を行った。精製後Bradford法[6]によりその収量を測定した。

#### (3) HT-scFvの巻き戻し条件の検討

封入体として発現したタンパク質は不活性であるため、希釈法による巻き戻しを行い、抗体活性の回復を試みた。不溶性画分にβ-MEを加えることでジスルフィド結合を切断した後、希釈を行い溶媒中のUrea濃度を低下させることで巻き戻しを促した。dilution bufferには、凝集を抑制するL-Arginine及びGlycerolを添加した。

また、HT-scFvの正しい立体構造の形成を促すべく、ジスルフィド結合を交換する還元剤/酸化剤に関して詳細な検討を行った。3種類の還元剤/酸化剤(還元型/酸化型グルタチオン(GSH/GSSG)、システアミン/シスタミン及びL-システイン/L-シスチン)を異なる濃度比で添加

し、至適巻き戻し条件を検討した。この際、巻き戻し後のタンパク質溶液を一次抗体、HTを競合物質として用いた間接競合 ELISA (icELISA)を行い、その阻害率を指標とすることで巻き戻し効率を比較した。

#### (4) GFP10-VH、GFP11-VL 遺伝子の構築、発現、精製及び巻き戻し

GFP10-VH 遺伝子の構築には HT-scFv 及び GFP OPT 遺伝子を鋳型として用いた。GFP11-VL 遺伝子の構築には GenScript 社のカスタムペプチド合成サービスを利用した。GFP11 遺伝子は、GFP OPT 内 GFP11 の逆向きのアミノ酸配列をコードする遺伝子である。HT-scFv、GFP OPT を鋳型に用いて PCR を行い、GFP10 及び VH 遺伝子の末端にリンカー配列、制限酵素認識配列及び 6His-tag をコードする遺伝子を付加した。次いで、これらの遺伝子を鋳型として SOE-PCR を行い、GFP10-VH 遺伝子を構築した。また、GFP11-VL 遺伝子に制限酵素認識配列及び 6His-tag を付加した。これらの遺伝子を *Nco* I、*Eco*R I による制限酵素処理後、同様に制限酵素処理を行った pET28a(+) vector に組みシークエンスの解析を行った。発現、精製は(2)と、巻き戻しは(3)と同様に行った。

#### (5) GFP1-9 遺伝子の構築、発現、精製及び巻き戻し

GFP OPT 遺伝子を鋳型に用いて PCR を行い、GFP1-9 遺伝子の末端に制限酵素認識部位を付加した。この GFP1-9 遺伝子を *Bam*H I、*Eco*R I による制限酵素処理後、同様に制限酵素処理を行った pET28a(+) vector に組み込んだ (GFP1-9-pET28a(+))。大腸菌 JM109 株の形質転換を行い、LB-K plate で一晚培養後、得られたコロニーから、GFP1-9 遺伝子が pET28a(+) vector に組み込まれていると推測されるクローンを direct PCR により選抜した。選抜したクローンのプラスミドを抽出し、シークエンスの解析を行った。その結果、目的の GFP1-9 遺伝子 (196 アミノ酸をコードする 588 塩基) が正しく組み込まれていることが確認された。発現、精製は(2)と、巻き戻しは(3)と同様に行った。

#### (6) scFvGs 遺伝子の構築、発現、精製及び巻き戻し

scFvGs 遺伝子の構築には、HT-scFv 及び GFP OPT を鋳型として用いた。まず、HT-scFv、GFP OPT 遺伝子を鋳型に用いて PCR を行い、VH、GFP10 及び VL、GFP11 遺伝子の末端に制限酵素認識配列とリンカー配列を付加した。次いで、これらの遺伝子を鋳型として SOE-PCR を行い VH-GFP10 及び GFP11-VL 遺伝子を構築した。最後に、SOE-PCR によりこれらを連結し、ペプチドリンカー長が 10 アミノ酸 (GGGGS)<sub>2</sub> の scFvG10、15 アミノ酸 (GGGGS)<sub>3</sub> の scFvG15 遺伝子を構築した。この scFvG10 及び scFvG15 遺伝子を *Nde* I、*Hind*III による制限酵素処理後、同様に制限酵素処理を行った pET21b(+) vector に組み込み(scFvG10-pET21b(+)) 及び scFvG15-pET21b(+))、シークエンス解析を行った。

#### (7) icELISA による HT-scFv および scFvGs の活性測定及び交差反応性試験

HT-scFv 及び scFvGs の HT に対する結合活性は HT-OVA を固相化抗原とした icELISA により行った。まず、固相化抗原を 50 mM carbonate buffer (pH 9.6) で 2 µg/mL に希釈し、96-Well Microplate に 100 µL/well ずつ分注後、37°C で一時間インキュベートした。T-PBS で三回洗浄 (以下、「洗浄」) 後、ブロッキング溶液 300 µL/well ずつ分注し、37°C で一時間インキュベート後、洗浄した。次に、競合物質 50 µL/well を加え、更に一次抗体 50 µL/well を分注し、37°C で一時間インキュベートし、洗浄した。続いて、二次抗体 100 µL/well ずつ添加し、同様に 37°C で一時間インキュベート後、洗浄した。最後に基質溶液を 100 µL/well ずつ加え、37°C で 20 分インキュベート後、405 nm の吸光度を測定した。

また、HT-scFv 及び scFvGs の交差反応性試験は icELISA により行い、Weiler らの方法に基づき交差反応性 (CR) を算出した[7]。

#### (8) 蛍光検出

発現、精製、巻き戻し後の GFP10-VH、GFP11-VL 及び HT(50 µg/mL)をタンパク質濃度、反応温度(4°C、25°C、37°C)、緩衝液(PBS pH7.4, Tris-buffer pH7.0-9.0, Carbonate buffer pH 9.6)等をふって混合後、1 時間インキュベートし、GFP1-9 を添加後、蛍光プレートリーダー CORONA FLUORESCENCE MICROPLATE READER MTP-600F (Corona Electric, Ibaraki, Japan)を用いて 490 nm の励起光を照射した時の 530 nm における発光を検出した。

scFvGs に関しても、scFvGs 及び HT(50 µg/mL)を上記種々の条件で混合しインキュベート後、GFP1-9 を添加後、蛍光検出を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 抗 HT 小型化抗体の作製

VH、VL 遺伝子が組み込まれていると予想されるクローンより、プラスミドを抽出し、シークエンスの解析を行った。その結果、VH 遺伝子は 117 アミノ酸をコードする 351 base pair (bp)、VL 遺伝子は 110 アミノ酸をコードする 330 bp であることが明らかとなった。また、リンカー配列を有する HT-scFv のシークエンス解析を行った結果、242 アミノ酸をコードする 726 bp からなることが判明した。

## (2) HT-scFv の発現、精製

IPTG を最終濃度 1 mM となるように添加し、継時的に同数の菌体を回収し HT-scFv の最適発現誘導時間を検討した。その結果、HT-scFv と推測される 28.7 kDa のタンパク質の発現を確認し、IPTG 添加後 6 時間で発現量が最大に達することが判明した。

また、IMAC により精製後、その収量を測定したところ、LB 培地 1 L あたり 21.5 mg の HT-scFv が精製されることが判明した。

## (3) HT-scFv の巻き戻し条件の検討

HT-scFv の巻き戻し条件の検討を行い、ELISA によりその評価を行った。その結果、システアミン/シスタミン及び L-システイン/L-シスチンを用いた巻き戻し系ではほとんど HT-scFv の活性が回復せず、GSH/GSSG を用いた場合にのみ活性が回復した。また、GSH/GSSG 系中ではそのモル濃度比が 0.5 の時、阻害率が最も高く 80.7% を示し、10 の時に次に高い 80.0% の阻害率を示した。GSSG は非常に高価であり、両者の阻害率の差も僅かだったことから費用対効果が優れた 2 mM GSH 及び 0.2 mM GSSG を添加した場合を最適条件と定めた (図 1)。

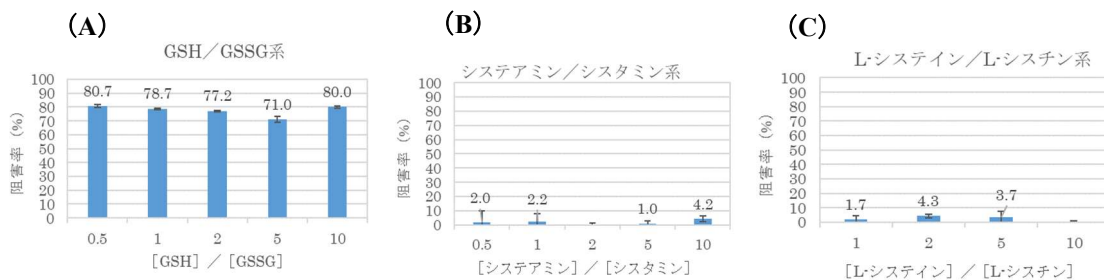


図 1 icELISA における阻害率を指標とした巻き戻し効率の比較

(A) GSH/GSSG 系 (B) システイン/シスタミン系 (C) L-シスチン/L-システイン系における巻き戻し。

## (4) icELISA による HT-scFv の活性測定

より高い反応性を示した HT-OVA を固相化抗原として用いて icELISA を行った結果、遊離抗原の HT 濃度が 0.0244–6.25  $\mu\text{g/mL}$  の範囲で濃度依存的な吸光度の減少が確認された (図 2)。この結果より HT-scFv は HT を遊離抗原として認識することが明らかとなった。また、本 icELISA を利用して 0.0244–6.25  $\mu\text{g/mL}$  の濃度範囲で HT を定量可能であることが示唆された。

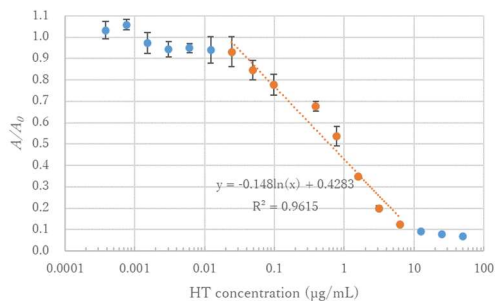


図 2 icELISA における HT 濃度依存性

## (5) GFP10-VH、GFP11-VL 遺伝子の構築、発現、精製、巻き戻し

シーケンスの解析を行った結果、GFP10-VH 遺伝子は 141 アミノ酸をコードする 423 bp からなる塩基配列として、GFP11-VL 遺伝子は 134 アミノ酸をコードする 402 bp からなる塩基配列として決定づけられた。また、この発現系における GFP10-VH、GFP11-VL の溶解性を細胞分画により調べたところ、いずれも大部分が不溶性画分に封入体として局在することが明らかとなった。精製後に GFP1-9 の収量測定を行った。その結果、GFP1-9 の収量は LB 培地 1 L あたり 2.2 mg となった。その後、巻き戻しを行い蛍光検出に用いた。

## (6) scFvGs 遺伝子の構築、発現、精製及び巻き戻し

シーケンス解析の結果、scFvG10 遺伝子は 265 アミノ酸をコードする 795 bp からなる塩基で、scFvG15 遺伝子は 270 アミノ酸をコードする 810 bp からなる塩基で構成されることが判明した。また、IPTG を最終濃度 1 mM となるように添加し、37°C で培養を継続し、経時的に同数の菌体を回収し、最適発現誘導時間を検討した。その結果、scFvG10 及び scFvG15 の発現を確認し、両者はともに IPTG 添加後 12 時間で発現量が最大に達することを確認した。精製後に Bradford 法によりそれぞれのタンパク質量の測定を行った。その結果、scFvG10 及び scFvG15 の収量はそれぞれ LB 培地 1 L あたり 19.2 mg、14.0 mg であった。

## (7) icELISA による scFvGs の活性測定

scFvGs の HT に対する結合活性を HT-OVA を固相化抗原として用いた icELISA で評価した。

その結果、scFvG10 では遊離抗原 HT 濃度が 3.10–391 ng/mL、scFvG15 では 3.10–782 ng/mL の範囲で濃度依存的な吸光度の減少が確認された (図 3)。したがって scFvG10 及び scFvG15 は共に HT を抗原として認識することが明らかとなった。

両者は共に HT に対して同等の検量域を示したものの、最大阻害率を比較した結果、scFvG10 (69.9%) が scFvG15 (39.0%) より高い阻害率を示したことから、scFvG10 は免疫化学的蛍光センサーのプロープとしての有用性がより高いことが示された。

また、作製した HT-scFv を用いて同条件で icELISA を行った (図 3)。その結果、その最大阻害率は 80.9%と、scFvG10 (69.9%)、scFvG15 (39.0%) より高い阻害率を示した。

更に、HT-scFv、scFvG10 及び scFvG15 の感度を検出限界 (IC<sub>10</sub>) で算出し、比較した結果、scFv10 (IC<sub>10</sub>=2.77 ng/mL) > scFv15 (IC<sub>10</sub>=4.62 ng/mL) > HT-scFv (IC<sub>10</sub>=9.29 ng/mL) となり、scFvG10 の感度が最も優れていることが示唆された。

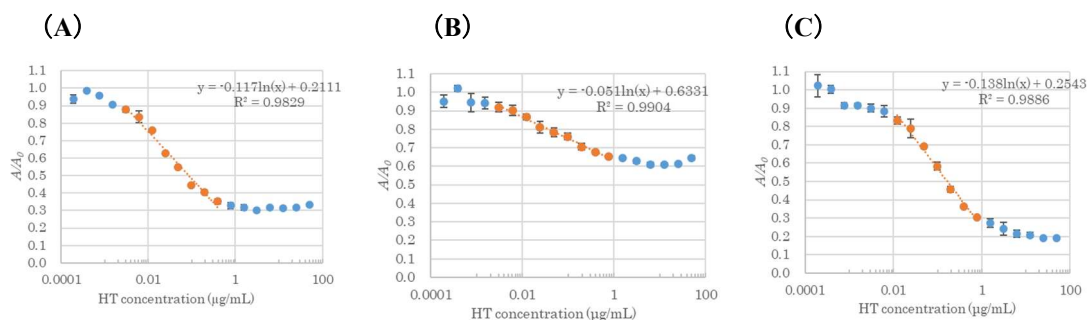


図 3 icELISA における HT の濃度依存性

(A) は scFvG10、(B) は scFvG15、(C) は HT-scFv を用いた icELISA を示した。

#### (7) HT-scFv 及び scFvGs の交差反応性

HT-scFv 及び scFvGs の HT に対する特異性を検討するために、HT 及び他のセファロタキサスアルカロイドを用いて icELISA を行った。その結果、HT-scFv では、HHT に対してのみ 4.2%の CR が認められたものの、その他の化合物とは CR が認められず、HT-scFv は HT に対して高い特異性を有することが判明した。また、scFvG10 及び scFvG15 の交差反応性は、HT-scFv 同様、HT を特異的に認識し、HHT に対する反応性も示されたが、いずれも CR 値は HT-scFv に比べて極めて低く、親抗体 MAb 1D2 と類似した交差反応性を示した (表 1)。

表 1 scFvG10、scFvG15 及び HT-scFv の交差反応性

Compound	CRs (%)			
	scFvG10	scFvG15	HT-scFv	MAb 1D2
HT	100	100	100	100
HHT	0.21	0.0079	4.2	0.66
CET	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005

#### (8) 蛍光検出

先ず、VH-GFP10 遺伝子と GFP11-VL 遺伝子及び GFP1-9 遺伝子を構築し、HT の存在下における傾向検出を目指した。しかし、四元複合体の形成に伴う蛍光が認められなかった。

次にそこで、次に scFvGs を構築し、巻き戻した GFP1-9 を HT の存在下で反応させた。その結果、コントロールと比較した場合僅かな蛍光が検出されたものの、蛍光強度が低く、定量に用いることができなかった。現在、巻き戻しの条件検討、発現系の検討、検出系の条件検討を行い、本課題の完結を目指した研究を遂行している。

#### <引用文献>

- [1] Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., Morimoto, S. *J. Nat. Med.*, **72**(1), 32-42, 2018.
- [2] Sakamoto, S., Taura, F., Pongkitwitoon, B., Putalun, W., Tsuchihashi, R., Kinjo, J., Tanaka, H., Morimoto, S. *Anal. Bioanal. Chem.*, **396**(8), 2955-2963, 2010.
- [3] Sakamoto, S., Tanizaki, Y., Pongkitwitoon, B., Tanaka, H., Morimoto, S. *Protein Expr. Purif.*, **77**(1), 124-130, 2011.
- [4] Ueda, H., Tsumoto, K., Kubota, K., Suzuki, E., Nagamune, T., Nishimura, H., Schueler, P.A., Winter, G., Kumagai, I., Mohoney, W.C. *Nat. Biotechnol.*, **14**(13), 1714-1718, 1996.
- [5] Cabantous, S., Nguyen, H.B., Pedelacq, J.D., Koräichi, F., Chaudhary, A., Ganguly, K., Lockard, M.A., Favre, G., Terwilliger, T.C., Waldo, G.S. *Sci. Rep.*, **3**:2854, 2013.
- [6] Bradford, M.M. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, 1976.
- [7] Weiler, E.W., Zenk M.H. *Phytochemistry*, **15**, 1537-1545, 1976.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakamoto, S., Miyamoto, T., Usui, K., Tanaka, H., Morimoto, S.	4. 巻 81
2. 論文標題 Sodium-periodate mediated harringtonine derivatives and their antiproliferative activity against HL-60 acute leukemia cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 34-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jnatprod.7b00541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., Morimoto, S.	4. 巻 72
2. 論文標題 Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 32-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-017-1144-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Pongkitwitoon, B., Sakamoto, S., Nagamitsu, R., Putalun W., Tanaka, H., Morimoto, S.	4. 巻 84
2. 論文標題 A monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for determination of homoharringtonine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Planta Medica	6. 最初と最後の頁 1038-1044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1055/a-0578-8689.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 S. Sakamoto, T. Miyamoto, K. Usui, H. Tanaka, S. Morimoto
2. 発表標題 Antiproliferative activity of sodium periodate-mediated harringtonine derivatives against HL-60 acute leukemia cells
3. 学会等名 The 5th International Conference on Current Drug Development 2018 (CDD 2018) and The 3rd International Conference on Herbal and Traditional Medicine 2018 (HTM 2018)（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂元政一
2. 発表標題 植物二次代謝産物の免疫化学的分析法の開発
3. 学会等名 日本生薬学会 第65回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小松 頌平、坂元 政一、Gorawit Yusakul、Putalun Waraporn、田中 宏幸、森元 聡
2. 発表標題 Cephalotaxus属由来ハリントニン的一本鎖抗体の作製及びその応用研究
3. 学会等名 日本生薬学会 第64回年会、東邦大学 習志野キャンパス(千葉)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂元 政一、宮本 智文、臼井 一晃、田中 宏幸、森元 聡
2. 発表標題 過ヨウ素酸ナトリウムによるハリントニン誘導体の作出及びヒト前骨髄性白血病細胞HL60に対する増殖阻害活性
3. 学会等名 日本薬学会 第138年会、石川県立音楽堂他(金沢)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sakamoto, S.
2. 発表標題 Immunoassays for cephalotaxus alkaloids, harringtonine and antiproliferative activity of its derivatives
3. 学会等名 5th International Conference on Pharmaceuticals, Nutraceuticals and Cosmetic Science (IPNaCS 2017), The Tawana Hotel, Bangkok, Thailand (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----