

111/NT	1	MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKIDTRIWIIPERYTFYGYKPED--F NKSSGIFNRDVCEYYDDPYLNTNDKKNIFLQTMIKL FNR	98
Okra/NT	1	MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKIDTRIWIIPERYTFYGYKPED--F NKSSGIFNRDVCEYYDDPYLNTNDKKNIFLQTMIKL FNR	98
BoNT/A	1	MQFVNKQFNKYDVPNGVDIAYIKIPN-VGQMOPVKAFKIHKKIIVIPERDITF--TNPEEGDLNPPPEAKQVPV-SYDSTYLS TDNEKDNVYKGVTKL FER	97
		* * * * *	
111/NT	99	IKSKPLGEKLEMIINGIPLYGDRRVPLEEFNINIASVTVNKLI SNPGEVERKKGIFANLII FGGPVLNENETIDIGIQNHFA SREGFGGIMQMKFCPE	198
Okra/NT	99	IKSKPLGEKLEMIINGIPLYGDRRVPLEEFNINIASVTVNKLI SNPGEVERKKGIFANLII FGGPVLNENETIDIGIQNHFA SREGFGGIMQMKFCPE	198
BoNT/A	98	IYSTDLGRMLLTSIVRGIPIFWGG--STIDTELKVIDTNCINVIQPD-GSYR---SEELNLV IIGPSADIIQFECKSPGHEVLNLRNRYGSGTQYIRFSPD	191
		* * * * *	
111/NT	199	YVSFVNQVENKASIFNRRGYFSDPALILMHელიIHLVHLGlyGIKVDDLPIVPNEKK-FFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNF R	297
Okra/NT	199	YVSFVNQVENKASIFNRRGYFSDPALILMHელიIHLVHLGlyGIKVDDLPIVPNEKK-FFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNF R	297
BoNT/A	192	FTFGFESELEVDINPLLGA GKFATDPAVTLAHELIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYEMSGLEVSPFEE LRTFGGHDAKFIDSLQENEFRLYYNPKF	291
		* * * * *	
111/NT	298	GIVDRNLKVLVCISDP-NININIKYKPKDKYKVFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIY TIEE	396
Okra/NT	298	GIVDRNLKVLVCISDP-NININIKYKPKDKYKVFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGFTETNIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIY TIEE	396
BoNT/A	292	DIAS TLNKA KSI V G--TTASLQYMKNVKPKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDNFVKFFKVLNRKTYLNF-DKAVFKINIVPKVNYTYD	388
		* * * * *	
111/NT	397	GFNISDKMEKEYRQGNKAIKQAY-EEISKEHLAVYKIQMCKSVIAPG-----ICIDVDNEDLFFIADKNFSDDL SKNERIEYITQSN	480
Okra/NT	397	GFNISDKMEKEYRQGNKAIKQAY-EEISKEHLAVYKIQMCKSVIAPG-----ICIDVDNEDLFFIADKNFSDDL SKNERIEYITQSN	480
BoNT/A	389	GFNLRNTLAAANFGQTEINNMFTKLNFTGLFEFYKLVIRGIIITSKTKSLDRGYNKALNDLCKIVNNDLFFSPEDNFTNDLNKGEIITSDTNI E	488
		* * * * *	
111/NT	481	YIENRS--EINLELLDNLISKIELPSEN-TESLTDPN-VDPVVEYEQ-PAIKKI FT DENTIFQYLYSQTPLDIRDISLTS SFDALLFSNKVY SFFS	574
Okra/NT	481	YIENRS--EINLELLDNLISKIELPSEN-TESLTDPN-VDPVVEYEQ-PAIKKI FT DENTIFQYLYSQTPLDIRDISLTS SFDALLFSNKVY SFFS	574
BoNT/A	489	AAEENISLDLQQYLYTFNFDNEPENIS IENLSSDI IQLELMPNIERFP-NGKKYELDKYTMFHYLRAQEF EHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFFS	587
		* * * * *	
111/NT	575	MDYIKTANKVVEAGLFA GWKQIVDFVIEANKSITMDKIADISLIVPYI GLALNVGNETAKGNFENAF E IAGASILLEFIP ELLI PVVGAFLLESYIDN	674
Okra/NT	575	MDYIKTANKVVEAGLFA GWKQIVDFVIEANKSITMDKIADISLIVPYI GLALNVGNETAKGNFENAF E IAGASILLEFIP ELLI PVVGAFLLESYIDN	674
BoNT/A	588	SDYVKVNKATEAAMFLGWVQLVYDFDETSEVSTTDKIADITIIPIYIGPALNIGMMLYKDDFVGALIFSGAVILLEFIP EIAI PVGLTFALVSYIAN	687
		* * * * *	
111/NT	675	KNKIKTIDNALTKRDEKMDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIKYIYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLN EGINQAIDNINNF	774
Okra/NT	675	KNKIKTIDNALTKRDEKMDMYGLIVAQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIKYIYNIYSEKEKSNINIDFNDINSKLN EGINQAIDNINNF	774
BoNT/A	688	KVLVTQIDNALSKRNEKWEVYKIVINWLAKVNTQIDILRKKKEALENQAEATKAIINYQYQYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMINKEF	787
		* * * * *	
111/NT	775	INCSVSYLMKMKIPLAVEKLLDFDNTLKKNLLNIDENKLYLIGSAEYKSKVDEKLTIPFDLSIYTNQILIEF NKYNSEILNNIILNLRYS DNN	874
Okra/NT	775	INCSVSYLMKMKIPLAVEKLLDFDNTLKKNLLNIDENKLYLIGSAEYKSKVDEKLTIPFDLSIYTNQILIEF NKYNSEILNNIILNLRYS DNN	874
BoNT/A	788	LNQCSVSYLMNSMIPYGVKRLDFDASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLLKDKVNNLSTDI PPQLSKVVDNRQLLSTPTEYIKNIINTSILNLYESNH	887
		* * * * *	
111/NT	875	LIDLSGYGAIVEYDGVELNDK-N-QFKLTSSNSIRVTQNCNIFNSFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNSGWKISIRGNRII	972
Okra/NT	875	LIDLSGYGAIVEYDGVELNDK-N-QFKLTSSNSIRVTQNCNIFNSFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCMKNSGWKISIRGNRII	972
BoNT/A	888	LIDLRSYASKINIGSKVNFDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENPSTSFWIRIPKYFN--SISLNNEYTIINCMKNSGWKVSLNYGEII	984
		* * * * *	
111/NT	973	WTLQDINGKTKSVFFEYIREDISYINRWFFVTITNN-SNAKIYINGKLESNDIKDIQEVIANGEIIPKLDGDIRDTPQIWMKYFSIFNTELSQ SNI	1071
Okra/NT	973	WTLQDINGKTKSVFFEYIREDISYINRWFFVTITNN-SNAKIYINGKLESNDIKDIQEVIANGEIIPKLDGDIRDTPQIWMKYFSIFNTELSQ SNI	1071
BoNT/A	985	WTLQDTQEIQRVFKYSQMINISDYINRWFFVTITNNRLNNSKIYINGRLIDQKPI SNLGNIHASNMMPKLDGCRDTHRYIWKYFNFLFDKELNEKEI	1084
		* * * * *	
111/NT	1072	REHYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSVUGEILTRSKYN--QNSYINRDLIYGEKFIIRRKNSQSIN-DDIVRKEDYIY	1168
Okra/NT	1072	REHYKIQSYSEYLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIKLKKDSVUGEILTRSKYN--QNSYINRDLIYGEKFIIRRKNSQSIN-DDIVRKEDYIY	1168
BoNT/A	1085	KDLYDNQNSGILKDFYDKPYMLNLYDPNKVDVNNVGI RGYMYLKGPRGSVMTNIIYLNSSLYRGTKFI IKKYA---SGNKDNIVRNDRVY	1181
		* * * * *	
111/NT	1169	LDFNINAEWRVYIKKPKKBEKFLFLAIIIDSNDFYKTIQIKEYDEQ-PYSCQLLFFKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVKDYKNIYFCISKWYLKEV	1267
Okra/NT	1169	LDFNINAEWRVYIKKPKKBEKFLFLAIIIDSNDFYKTIQIKEYDEQ-PYSCQLLFFKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVKDYKNIYFCISKWYLKEV	1267
BoNT/A	1182	INVVVKNEYRLATNASQAGVEKILSALEIPDVGNLSQVVMVMSKNDQGITNKCKMNLQDN--NGNDIGF IGHFQFN--N-----IAKLVASWYNRQI	1271
		* * * * *	
111/NT	1268	KRKPYNENLGCNWFIPKDEGWDE	1291
Okra/NT	1268	KRKPYNENLGCNWFIPKDEGWDE	1291
BoNT/A	1272	ERSSRTL--GCSWEFI PVDDGWGERPL	1296
		* * * * *	

Fig. 2. Alignment of deduced amino acid sequences. Amino acid sequences of 111/NT and Okra/NT were aligned with BoNT/A [8]. An asterisk indicates strict sequence conservation among BoNT/A-G and TeNT. The amino acid substitutions between 111/NT and Okra/NT are shown in inversion.


```

111/NT      1 MPVTINNFVNDPIDNNIMMPPFARGTGTRYKAFKIDRIWIPIRYTFGYKPED—FNKSSGIFNRDVCEYYDDYLNLTNDKKNIFQTMIKLFNR 98
Okra/NT    1 MPVTINNFVNDPIDNNIMMPPFARGTGTRYKAFKIDRIWIPIRYTFGYKPED—FNKSSGIFNRDVCEYYDDYLNLTNDKKNIFQTMIKLFNR 98
BoNT/A     1 MQFVNKQFNYKDPVNGVDIAIKIPN—VGOMQPVKAFKHANKIWIPIERDIP—TNPEEGDLNPPPEAKQPVV—SYDSTYILTNDNEKDNILKGVTKLFER 97
*** ** *
111/NT      99 IKSKPLGEKLEMIINGPYLGDRRVPLEEFFNTASVTVNKLLSNPGEVEKKGIFANLHFGPPVLNENEITDIQNHFFASREFGGIMQMFKCPE 198
Okra/NT    99 IKSKPLGEKLEMIINGPYLGDRRVPLEEFFNTASVTVNKLLSNPGEVEKKGIFANLHFGPPVLNENEITDIQNHFFASREFGGIMQMFKCPE 198
BoNT/A     98 IYSTDLRMLLTIVRGLPFWGG—STDTELKVIDTNCINVIQPD—GSYR—SEELNLVIIGPSADHDFECKSFGEVNLNLTRNGYGSTQIRFSPD 191
* * * *
111/NT      199 YVSVFNQENKASIFNRRGYFSDPALLMHEIHVLHGLYGIVDDLPIVPEKK—FFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPISLTPSTDKSIYDKVLQNFR 297
Okra/NT    199 YVSVFNQENKASIFNRRGYFSDPALLMHEIHVLHGLYGIVDDLPIVPEKK—FFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPISLTPSTDKSIYDKVLQNFR 297
BoNT/A     192 FTFGFEESLEVDITNLLGAGKFAFDPAVTLAHEIHAGHRLYGIAINPVRVFKVNTNAYEYMSGLEVSFEELRTFGGHDAKFTDSLQENEFRLYYNKKPK 291
* * * * *
111/NT      298 GIVDRLNKVLVCSIDP—NINIMYKKNFKDKYKVEDSE GKYSIDVESFDKLYKSLMF GFETNTIARNYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEYITEE 396
Okra/NT    298 GIVDRLNKVLVCSIDP—NINIMYKKNFKDKYKVEDSE GKYSIDVESFDKLYKSLMF GFETNTIARNYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEYITEE 396
BoNT/A     292 DIASITLNKAKSIVG—ITASLQYMKNVFKKKYLLSEDTSGKFSVDKPKFDKLYKMLTELYTEDNFVFKFVFLNRKTYLNE—DKAVFKIMIVPKVNYTYVD 388
* * * * *
111/NT      397 GFNISKMMKEYRGONKAINKQAY—EELSKEHLAVYKIOMCKSKAPG—ICIDVDNEDLFFIADKNSFSDLLSKNERLEYDTON 480
Okra/NT    397 GFNISKMMKEYRGONKAINKQAY—EELSKEHLAVYKIOMCKSKAPG—ICIDVDNEDLFFIADKNSFSDLLSKNERLEYDTON 480
BoNT/A     389 GFNLRNLTNLAANFNGQNTIENNMFTKLNFTGLFFYKLLICVRGIITSKTKSLDKGYNKALNDLICIKVNNWDLFFSPSEDNFNTDNLNKGEEHTSDTIE 488
* * * * *
111/NT      481 YIENRS—DELLLNLSKTLPSSEN—TBSLTDFN—VDVPPVYEKQ—PAIKKIFTDENTIFQYLYSTFPPLDIRDISLTSFDDALLFSNKVYSFFS 574
Okra/NT    481 YIENDF—INEHTDLISKTLPSSEN—TESLTDFN—VDVPPVYEKQ—PAIKKIFTDENTIFQYLYSTFPPLDIRDISLTSFDDALLFSNKVYSFFS 574
BoNT/A     489 AABENISLDLQOYILTFNFDNEPENISNIENS SDIIGOLELMPNIEFRP—NGKKYELDKYTMFHYLRAQEFEGHCKSRILATNSVNEALLNPSRVYIFFS 587
* * * * *
111/NT      575 MDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVLQDFVIEANKS—TMDKIADSLIVPYIGIALNVGNETAKGNFENAFIAGASILLEFPPELLIPVVGAFLESYIDN 674
Okra/NT    575 MDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQIVLQDFVIEANKS—TMDKIADSLIVPYIGIALNVGNETAKGNFENAFIAGASILLEFPPELLIPVVGAFLESYIDN 674
BoNT/A     588 SDYVYKVNKA TEAAMFLGWVEQLVYDFDTDETSEVSTTDKIADTHTTIPXIGPALNIGNMMLYKDDFVGAIFFSGAVILLEFTEIPEIAPVLGTFALVSIAN 687
* * * * *

```

Fig. 2. Alignment of deduced amino acid sequences. Amino acid sequences of 111/NT and Okra/NT were aligned with BoNT/A [8]. An asterisk indicates strict sequence conservation among BoNT/A – G and TeNT. The amino acids substitutions between 111/NT and Okra/NT are shown in inversion.

111/NT 675 KNKIKTDNALTKRDEK IDN GLIVAQ WLSTVNTQFYTIKFGMYKALNYQAQALEEIK KYNISERKKSNIINDFNDINSKLNEGIN AVDNINNF 774
Okra/NT 675 KNKIKTDNALTKRNER SD YGLIVAQ WLSTVNTQFYTIKFGMYKALNYQAQALEEII RYNISERKKSNIINDFNDINSKLNEGIN DADNINNF 774
BoNT/A 688 KVLIVQTIDNALS KRNEK WDEYKIVINWLAQVNTQIDILRKKMKEALENQAEATKAINIYQNYQTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMINIKF 787
*** ** * * * * * * * * * * **

111/NT 775 INECS SYLMKMMPLAVEKLLDFDNTLKKNLNIDENKLYLIGSAEYEKSKV KIKLKTFFDLS YTIIVTLLHEFNKYNSEILNNILLNRY DNN 874
Okra/NT 775 INECS SYLMKMMPLAVEKLLDFDNTLKKNLNIDENKLYLIGSAEYEKSKV KIKLKTMPFDL IYTDIILL FNKYNSEILNNILLNRL DNN 874
BoNT/A 788 LNQCCSVSYLMNSMIPYGVKRLEDFDASILKDALLKXYDNRGTLIGQVDRKDKVNNTLSTDIFFQLSKYVDNQRLLSSTFEYIKNINTSILNLYESENH 887
** * * * * *

111/NT 875 IIDLSGYGANV YDGVVELNDK-N-QFKLTSST SRVTQNQNIIFNS FLDFSVSF WIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTHN KKNNSG WKISIRGNRII 972
Okra/NT 875 IIDLSGYGAKV YDGVVELNDK-N-QFKLTSS S RVTQNQNIIFNS FLDFSVSF WIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTHN MKNNSGWKISIRGNRII 972
BoNT/A 888 IIDLSRYASKDNIGSKVNFDIDKKNQIQLFNLES S KIEVILKNAIVYNSMYENFSTSF WIRIPKYFN--SISLNNEYTHINCMENNSGWKVSINLYGEII 984
** * * * * **

111/NT 973 WTLTDI GKTKSVFFEYSI EDLSDYRNRWFFVITNN-S AKIYINGKLESNI KDIGE LANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNI 1071
Okra/NT 973 WTLTDI GKTKSVFFEYNI EDISEYRNRWFFVITNN-LN AKIYINGKLESNT KDIR IANGEIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIFNTELSQSNI 1071
BoNT/A 985 WTLQDTQETKQRVVFYKYSQMINESDYNRWIFVVTNRRNNSKIYINGRLIDQKPIENLGNHASNIMFKLDGCRDPRYIWKYFNLFDKELNEKEI 1084
* ** * * * ** * * * *

111/NT 1072 KEIKQSYSEYLLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNYSYKLKKB SVGEILLTRSKYN-C SNIYIYRNLYGEKFIRRKKSNSQSIN-DDIVRKEDIYI 1168
Okra/NT 1072 EEEYIQSYSEYLLKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNYSYKLKKB DSPVGEILLTRSKYN--NSKY IYRDLYGEKFIRRKKSNSQSIN-DDIVRKEDIYI 1168
BoNT/A 1085 KDLYDNQSNSEGLKDFWGDYLOYDQPPYIMLNLYDPNKYVDVNVVGERGYMYLKGPRGSVMNTNILNSSLIYRGTFELIKKYA--SGNKDNIVRNDRVY 1181
** * * ** * * * *

111/NT 1169 LDFNNSN EFRVYAKFKEEKLFLLN DNEFKTIQKEYDEQ-PTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGHRFFYES KLYKNYFCISKWYLKEV 1267
Okra/NT 1169 LDFNNSN EFRVYAKFKEEKLFLLN DDEFNTIQKEYDEQ-PTYSCQLLFKKDEESTDEIGLIGHRFFYES EYKDYFCISKWYLKEV 1267
BoNT/A 1182 INVVVKNKEYRLATNASQAGVEKLSALELPDVGNIQSQVVVMSKNDQGITNKKCMNLQDN--NGNDIGFTGFHQFN--N--LAKLVASNWYNRQI 1271
** * * ** * * * *

111/NT 1268 KRKPNPNCNQWQFLPKDEGWE
Okra/NT 1268 KRKPNLNCNQWQFLPKDEGWE
BoNT/A 1272 ERSRRL--GCSWEFIPVDDGWGERPL

Fig. 2 (continued).

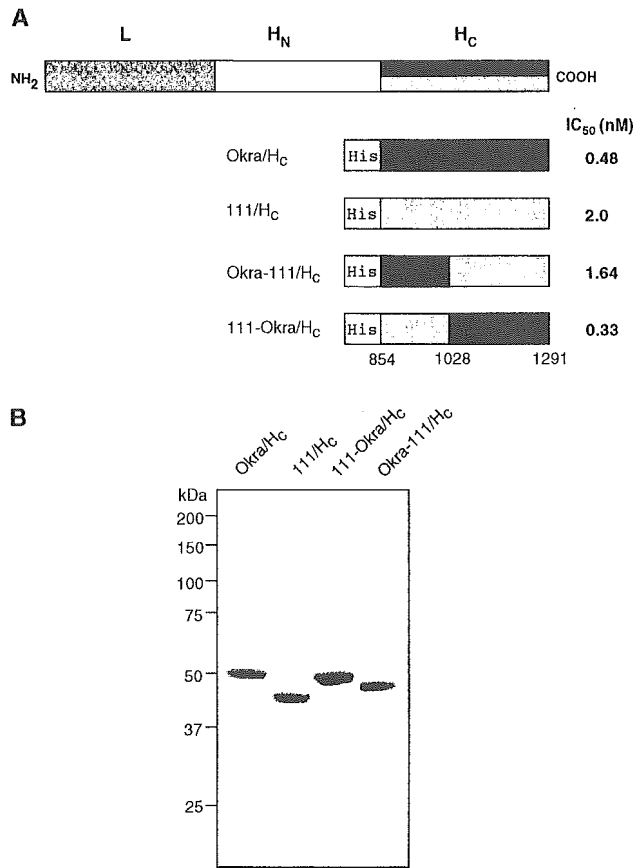


Fig. 3. (A) Schematic representation of the recombinant H_C and the hybrid H_C. A His-tag has been introduced at the N-terminus of the recombinant proteins. The numbers indicate the amino acid number. (B) SDS-PAGE profile of the recombinant H_C. A sample (2 μg of each recombinant H_C per lane) was applied to a 10% of polyacrylamide gel. The positions of molecular mass standards are shown on the left.

amplification, the PCR products were purified using GFX PCR DNA and gel band purification kit (Amersham Pharmacia Biotech). PCR products were directly sequenced using BigDye terminator cycle sequencing kit (Perkin-Elmer). The sequences were analyzed using the GENETYX computer program (Software Development). The number of nucleotide substitutions per synonymous site (Ks) and per nonsynonymous site (Ka) were calculated by the method of Nei and Gojobori [14].

2.3. Construction of recombinant genes

DNA fragments encoding the H_C (amino acids 853 to 1291) of both toxins were amplified by PCR using the following primers: forward, 5'-CGCGGATCCAATAAATA-TAATAGCGAAAT-3'; reverse, 5'-CCCAAGCTTTTATT-CAGTCCACCCTTCAT-3', where *Bam*HI and *Hind*III sites were included at the ends of the forward and reverse primers, respectively. After digestion with *Bam*HI and *Hind*III, the PCR products were ligated into *Bam*HI- and *Hind*III-digested pQE-30 vector (Qiagen) and verified by DNA sequencing. The plasmids including the DNA encod-

ing the H_C of Okra/NT and 111/NT were termed pQE30/OkraH_C and pQE30/111H_C, respectively.

For the hybrid H_C, an *Eco*RV site was newly created in pQE30/OkraH_C and pQE30/111H_C by mutagenesis of codon 1028 (1028 ATT → ATC) without any change in the amino acid residues using the QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The sequences of primers for mutagenesis are as follows: forward, 5'-ACTTCTCTTATATCTTTGATATCTGTATTTGATTC-3' (for Okra) and 5'-ACTTCTCCTATATCTTTGATATCTATATTTGATTC-3' (for 111); reverse, 5'-GAATCAAATACAGATATCAAA-GATATAAGAGAAGT-3' (for Okra) and 5'-GAATCAAATATAGATATCAAAGATATAGGAGAAGT-3' (for 111). Mutagenesis and frame conservation were verified by DNA sequencing. After digestion of pQE30/OkraH_C and pQE-30/111H_C with *Eco*RV and *Hind*III, the DNA fragments were separated by agarose gel electrophoresis and purified. The Okra-111/H_C hybrid gene was constructed by replacing the *Eco*RV–*Hind*III fragment of pQE30/OkraH_C with corresponding *Eco*RV–*Hind*III fragment of pQE30/

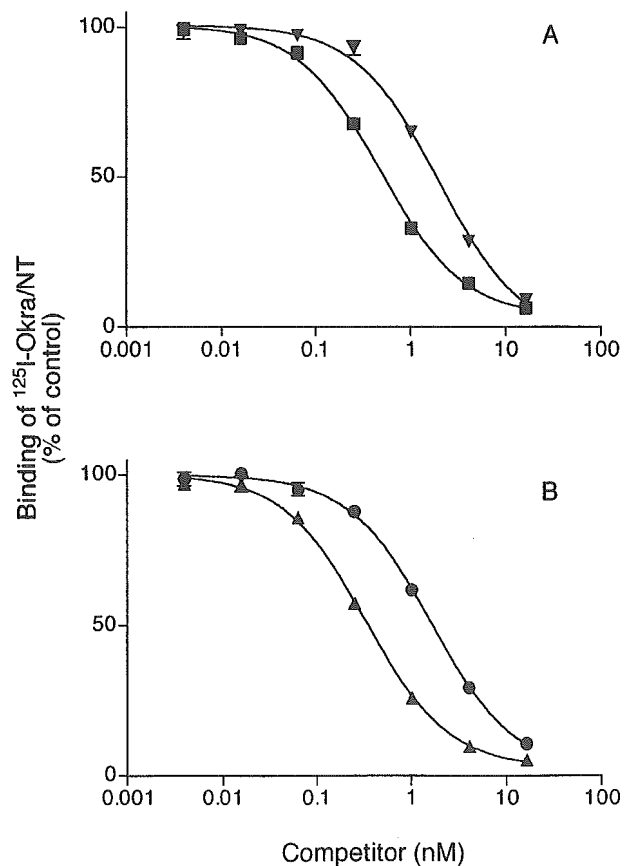


Fig. 4. Competition binding assay of ¹²⁵I-labeled Okra/NT to synaptotagmin II/ganglioside complex with recombinant H_C. ¹²⁵I-labeled Okra/NT (0.25 nM) and recombinant synaptotagmin (5 ng protein) reconstituted into lipid vesicles with ganglioside GT1b (2.5 ng NeuAc) was incubated at 37 °C for 30 min in the presence of increasing concentrations of unlabeled H_C. Values are the mean ± S.E. from three experiments. Error bars smaller than the symbols were omitted. (A) 111/H_C, ▽; Okra/H_C, ■. (B) 111-Okra/H_C, ▲; Okra-111/H_C, ●.

111H_C. Vice versa, the 111–Okra hybrid gene was constructed with the fragment of pQE30/111H_C. The recombinant plasmids were introduced into *Escherichia coli* M15.

Expression of recombinant H_C was performed according to the pQE system manual (Qiagen). Cultures were grown at 37 °C in Luria–Bertani broth containing 100 µg ampicillin per milliliter and 50 µg kanamycin per milliliter, with shaking, to an A₆₀₀ of 0.5. After addition of isopropyl-β-D-thiogalactoside to 0.05 mM, cultures were continued for an additional 5 h at 25 °C. The cells were collected by centrifugation and suspend in 0.04 ml bacterial protein extraction reagent (Pierce) per milliliter of culture. After treatment with 0.1 mg of lysozyme per milliliter at 4 °C for 1 h, the cells were lysed on ice by sonication with six pulses of 10 s each. The lysates were centrifuged at 27,000 × g for 20 min at 4 °C. The clear supernatant was diluted with 5 volumes of buffer A (50 mM sodium phosphate containing 300 mM NaCl, pH 8.0) and loaded onto a column of Ni-NTA superflow (Qiagen) equilibrated with buffer A. After the column had been washed with buffer A, bound proteins were eluted with buffer A containing 250 mM imidazole. The eluate was dialyzed overnight against buffer B (50 mM sodium phosphate, pH 7.2) at 4 °C. The recombinant H_C were further purified by cation exchange column, Poros HS (Poros). The recombinant H_C were eluted by a linear gradient of NaCl (0–500 mM) in buffer B. The eluates were dialyzed against buffer B and stored at –80 °C until use.

2.4. Binding assay

Recombinant amino-terminal domain of synaptotagmin II (amino acids 1 to 87) was expressed in *E. coli* DH5α as a fusion protein with maltose binding protein, and purified on amylose resin as described previously [11]. The purified recombinant protein was incorporated into phosphatidylcholine lipid vesicles together with ganglioside GT1b by the acetone-precipitation method as described previously [15]. The binding of ¹²⁵I-labeled Okra/NT to reconstituted lipid vesicles was measured by filtration assay as described previously, in the presence or absence of recombinant H_C and the hybrid H_C. The concentration giving 50% inhibition (IC₅₀) was calculated using PRISM (GraphPad) software.

2.5. Other methods

SDS-PAGE was performed in a 10% gel by the method of Laemmli [16]. Protein concentration was determined by the method of Lowry using bovine serum albumin as a standard [17].

3. Results

Genes for 111/NT and Okra/NT were amplified and their nucleotide sequences were determined (DDBJ accession

No. AB084152). Nucleotide and deduced amino acid sequences of the 111/NT gene is shown in Fig. 1. The nucleotide sequence of the Okra/NT gene is completely identical with that from the strain Danish (GenBank accession No. M81186) [18], while that of 111/NT was slightly different. Both sequences had open reading frames of 3873 bp that encoded 1291 amino acids. The identity of nucleotide sequences for coding regions and amino acid sequences of both toxins were 97.6% and 95.7%, respectively. The amino acid substitutions in the light chains concerned only 2 residues (99.5% identity), but those in the heavy chain affected 54 residues (93.8% identity). The substitutions in H_N (residues 442–861) and H_C (residues 862–1291) concerned 19 residues (95.7% identity) and 35 residues (91.9% identity), respectively (Fig. 2).

To gain information about the molecular evolution of the neurotoxins, the numbers of nucleotide substitutions per synonymous site (Ks) and per nonsynonymous site (Ka) in the protein-coding region of the both genes were calculated. The Ka, Ks, and Ka/Ks values for the toxin genes are 0.020, 0.042 and 0.47, respectively.

To confirm whether the binding affinities of 111/NT and Okra/NT are due to the structural differences in H_C, recombinant H_C was expressed as 6 × His-tagged proteins and purified (Fig. 3). The binding of ¹²⁵I-labeled Okra/NT was competed by both unlabeled recombinant H_C in a concentration-dependent manner (Fig. 4). The IC₅₀s of 111/H_C and Okra/H_C were 2.00 and 0.48 nM, respectively, similar to the binding affinities of 111/NT and Okra/NT previously reported [11]. The IC₅₀ of 111/H_C was approximately 4.2-fold higher than that of Okra/H_C. Hybrid H_C, Okra–111/H_C and 111–Okra/H_C all inhibited the binding of ¹²⁵I-labeled Okra/NT (Fig. 4). The IC₅₀s of Okra–111/H_C and 111/Okra H_C were 1.64 and 0.33 nM, respectively. The IC₅₀ of Okra–111/H_C was approximately 5.0-fold higher than that of 111–Okra/H_C.

4. Discussions

The present study showed that the amino acid substitutions between 111/NT and Okra/NT occur mainly in the H_C. Since the H_C is known to be the domain responsible for receptor binding, these observations support previous data suggesting that the two NTs possess different binding affinities.

We revealed by use of hybrid H_C that the residues in the carboxy terminal half of H_C (1029–1291) contribute to differences in binding affinity between the two BoNT/B. Since there are 23 substitutions in this region, it is probable that some if not all of these residues are involved directly or indirectly in binding. The receptor of the neurotoxin is thought to have two components, one ganglioside and the other a protein [4,15]. The residues involved in ganglioside binding have been reported [7,19–23]. In the crystal structure of the complex of BoNT/B with sialyllactose, there is a

cleft between Trp-1262 and His-1241 and the sialic acid sits between these two residues with its sugar moiety making several hydrogen bonds with BoNT/B at Glu-1189, Gly-1190, His-1241 and Tyr-1263 [7]. Because these four residues are conserved in 111/NT and Okra/NT, we suggest that some of the 23 substitutions in the region 1029–1291 of 111/NT adversely affect its interaction with the protein component of receptor and not with the ganglioside component. The involvement of TeNT H_C residues in interactions with gangliosides have been well studied [19–23]. However, the role of residues in other types of BoNT and the molecular analysis of interactions between protein receptor and clostridial neurotoxins have not been clarified, because analysis of toxin binding at the molecular level has been hampered by the difficulties encountered in the expression of functional H_C, especially for BoNT/B [24]. In this study, we succeeded in expressing of recombinant H_Cs of BoNT/B using the pQE vector and *E. coli* strain M15 based on K12 strain. Using the expression system and binding assays with recombinant synaptotagmin II adopted in this study, it became possible to study the molecular interactions. Attempts to define the interaction of the ganglioside and protein receptor with residues of BoNT/B are currently in progress.

Synonymous sites are known to be much more changeable than nonsynonymous ones because of much less functional restriction in the former. Generally, Ka/Ks values for isoprotein genes are approximately 0.2 [25,26], although some exceptions have been reported. For instance, Ka/Ks values of venom phospholipase A2 [27,28], serine protease inhibitors [29] and galactin [30] are greater than 1, showing accelerated molecular evolution. The accelerated evolution of these molecules is thought to be favorable for acquiring functional diversity. The Ka/Ks value for the neurotoxin genes presented here (0.47) is slightly higher than those for ordinary isoprotein genes (0.2), suggesting that the neurotoxin genes have received less functional constraints. Clostridial neurotoxins exhibit diversity in their enzymatic activity and receptor recognition. It is likely that these functions are required to elicit broad toxic spectrum in various vertebrates.

Acknowledgements

We thank Dr. M.J. Seagar for critical reading of the manuscript, and Mr. T. Nakaya and Miss Y. Seto for technical assistance. This work was supported in part by grants-in-aid for scientific research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

References

- [1] L.L. Simpson, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26 (1986) 427–453.
- [2] H. Sugiyama, *Microbiol. Rev.* 44 (1980) 419–448.
- [3] G. Sakaguchi, *Pharmacol. Ther.* 19 (1983) 165–194.
- [4] J. Herreros, G. Lalli, C. Montecucco, G. Schiavo, in: J.H. Freer (Ed.), *The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins*, Academic Press, London, 1999, pp. 202–228.
- [5] T.C. Umland, L.M. Wingert, S. Swaminathan, W.F. Furey, J.J. Schmidt, M. Sax, *Nat. Struct. Biol.* 4 (1997) 788–792.
- [6] D.B. Lacy, W. Tepp, A.C. Cohen, B.R. DasGupta, R.C. Stevens, *J. Mol. Biol.* 5 (1998) 898–902.
- [7] S. Swaminathan, S. Eswaramoorthy, *Nat. Struct. Biol.* 7 (2000) 693–699.
- [8] D.B. Lacy, R.C. Stevens, *Nat. Struct. Biol.* 291 (1999) 1091–1104.
- [9] K. Ginalski, C. Venclovas, B. Lesyng, K. Fidelis, *FEBS Lett.* 482 (2000) 119–124.
- [10] H. Kakinuma, H. Maruyama, H. Takahashi, K. Yamakawa, S. Nakamura, *Acta Paediatr. Jan.* 38 (1996) 541–543.
- [11] S. Kozaki, Y. Kamata, T. Nishiki, H. Kakinuma, H. Maruyama, H. Takahashi, T. Karasawa, K. Yamakawa, S. Nakamura, *Infect. Immun.* 66 (1998) 4811–4816.
- [12] S. Kozaki, G. Sakaguchi, *Infect. Immun.* 11 (1975) 932–936.
- [13] S. Kozaki, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 308 (1979) 67–70.
- [14] M. Nei, T. Gojobori, *Mol. Biol. Evol.* 3 (1986) 418–426.
- [15] T. Nishiki, J. Ogasawara, Y. Kamata, S. Kozaki, *Biochim. Biophys. Acta* 1158 (1993) 333–338.
- [16] U.K. Laemmli, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [17] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [18] S.M. Whelan, M.J. Elmore, N.J. Bodsworth, J.K. Brehm, T. Atkinson, N.P. Minton, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 2345–2354.
- [19] R.E. Shapiro, C.D. Specht, B.E. Collins, A.S. Woods, R.J. Cotter, R.L. Schnaar, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 30380–30386.
- [20] P. Emsley, C. Fotinou, I. Black, N.F. Fairweather, I.G. Charles, C. Watts, E. Hewitt, N.W. Isaacs, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 8889–8894.
- [21] K. Sinha, M. Box, G. Lalli, G. Schiavo, H. Schneider, M. Groves, G. Siligardi, N. Fairweather, *Mol. Microbiol.* 37 (2000) 1041–1051.
- [22] C. Fotinou, P. Emsley, I. Black, H. Ando, H. Ishida, M. Kiso, K.A. Shiha, N.F. Fairweather, N.W. Isaacs, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32274–32281.
- [23] J.M. Sutton, O. Chow-Worn, L. Spaven, N.J. Silman, B. Hallis, C.C. Shone, *FEBS Lett.* 493 (2001) 45–49.
- [24] G. Lalli, J. Herreros, S.L. Osborne, C. Montecucco, O. Rossetto, G. Schiavo, *J. Cell Sci.* 112 (1999) 2715–2724.
- [25] M. Kimura, *Neutral Theory of Molecular Evolution*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK, 1983.
- [26] M. Nei, *Molecular Evolutionary Genetics*, Columbia Univ. Press, Irvington-on-Hudson, NY, 1987.
- [27] K. Nakashima, T. Ogawa, N. Oda, M. Hattori, Y. Sakai, H. Kihara, M. Ohno, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993), 5964–5968.
- [28] K. Nakashima, I. Nobuhisa, M. Deshimaru, M. Nakai, T. Ogawa, Y. Shimohigashi, Y. Fukumaki, M. Hattori, Y. Sakai, S. Hattori, M. Ohno, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995), 5605–5609.
- [29] R.E. Hill, N.D. Hasite, *Nature* 326 (1987) 96–99.
- [30] T. Ogawa, C. Ishii, D. Kagawa, K. Muramoto, H. Kamiya, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 (1999) 1203–1208.

2000) (9,10). Of the two case-patients, one soldier did not leave NDjamena during his 3-month tour of duty, whereas the other had been in contact with livestock in a flooded area before onset of symptoms. Contamination may have occurred through infected animals or mosquitoes, although sheep living in the area did not show any sign of disease (i.e., spontaneous abortions, deaths). The two cases we describe were self-limiting; however, deaths from this illness have been reported in nonepidemic settings in Central African Republic (11). Our data emphasize that healthcare providers should systematically consider Rift Valley fever as a diagnosis for febrile syndromes in persons returning from Africa, even in nonepidemic settings (12).

Jean Paul Durand,*
Michèle Bouloy,†
Laurent Richecoeur,‡
Christophe Nicolas Peyrefitte,*
and Hugues Tolou*

*Tropical Medicine Institute of the French Army Medical Corps (IMTSSA), Marseille, France; †Institut Pasteur, Paris, France; and ‡3ème Régiment d'Infanterie de Marine (RIMa), Vannes Cedex, France

References

1. Daubney R, Hudson JR, Graham PC. Enzootic hepatitis of Rift Valley fever, an undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa. *Journal of Pathology and Bacteriology* 1931; 34: 545-79.
2. Maurice Y. Premières constatations sérologiques sur l'incidence de la maladie de Wesselsbron et de la Fièvre de la Vallée du Rift chez les ovins et les ruminants sauvages du Tchad et du Cameroun. *Rev Elev Méd Vét Pays Trop Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* 1967;20:395-405.
3. Meegan JM, Hoogstraal H, Moussa MI. An epizootic of Rift Valley fever in Egypt in 1977. *Vet Rec* 1979;105:124-5.
4. Jouan A, Le Guenno B, Digoutte JP, Philippe B, Riou O, Adam F. An RVF epidemic in southern Mauritania. *Ann Inst Pasteur Virol* 1988;139:307-8.
5. Nasher AAW, Shibani AK, Eriyani MA, Aly Bourgy A, Al Kohlani AH, Benbrake M, et al. Outbreak of Rift Valley fever, Yemen, August–October 2000. *Wkly Epidemiol Rec* 2000;75:392-5.
6. Arishi H, Ageel A, Abdu Rahman M, Al Hazmi A, Arishi AR, Ayoola B, et al. Outbreak of Rift Valley fever, Saudi Arabia, August–November 2000. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000;49:982-5.
7. Sall AA, de Zotto PM, Sene OK, Zeller HG, Digoutte JP, Thiongane Y, et al. Genetic reassortment of Rift Valley fever virus in nature. *J Virol* 1999;73:8196-200.
8. Sall AA, de Zotto PM, Zeller HG, Digoutte JP, Thiongane Y, Bouloy M. Variability of the NSs protein among Rift Valley fever virus isolates. *J Gen Virol* 1997;78:2853-8.
9. Miller BR, Godsey MS, Crabtree MM, Savage HM, Al-Mazrao Y, Al-Jeffri M, et al. Isolation and genetic characterization of Rift Valley fever virus from *Aedes vexans arabiensis*, Kingdom of Saudi Arabia. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1492-4.
10. Shoemaker T, Boulianne C, Vincent MJ, Pezzanile L, Al-Qahtani MM, Al-Mazrou Y, et al. Genetic analysis of viruses associated with emergence of Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen, 2000-01. *Emerg Infect Dis* 2002;8:1415-20.
11. Meunier DMY, Madelon MC, Lesbordes JL, Georges AJ. La fièvre de la Vallée du Rift et les phléboviroses en République Centrafricaine. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 1988;81:49-57.
12. Durand JP, Richecoeur L, Peyrefitte C, Boutin JP, Davoust B, Zeller H, et al. La Fièvre de la Vallée du Rift: infections sporadiques de militaires français hors des zones d'épidémies actuellement connues. *Med Trop (Mars)* 2002;62:291-4.

Address for correspondence: Jean Paul Durand, Laboratoire Associé au Centre National de Référence des Arbovirus, Unité de Virologie, IMTSSA, BP 46, 13998 Marseille Armées, France; fax: 01 40 61 31 51; email: imtssa.vro@wanadoo.fr

***Corynebacterium ulcerans* Diphtheria in Japan**

To the Editor: *Corynebacterium ulcerans* causes a zoonotic infection similar to diphtheria, which is caused by *C. diphtheriae*. Studies indicate that signs and symptoms of a diphtheria-like illness caused by *C. ulcerans*

are milder than those caused by *C. diphtheriae*. However, some strains of *C. ulcerans* produce potent diphtheria toxin and may cause severe symptoms similar to those caused by *C. diphtheriae* (1). We report a case of a diphtheria-like illness caused by *C. ulcerans* infection.

A previously healthy 52-year-old woman first noticed hoarseness approximately 3 days before admission to the hospital. On February 16, 2001, severe dyspnea and fever developed, and the patient was referred to the emergency room of the Asahi General Hospital by her private practitioner. Physical examination indicated a large stridor, which could be heard without using a stethoscope. Cyanosis was not observed. The endoscopic examination showed a thick white coat covering the nasopharynx and laryngeal vestibulum, and subglottic constriction was also observed. A chest x-ray showed diffuse infiltrates in both lungs. Pertinent laboratory findings on admission included leukocyte count of $16.8 \times 10^3/\mu\text{L}$ and C-reactive protein of 20.0 mg/dL. The serum level of liver transaminase was normal, and both Wassermann reaction and anti-HIV antibody tests were negative. Pharyngolaryngitis and pneumonia was diagnosed in the patient. Because of severe dyspnea, intubation was performed, which caused sudden and unexpected exacerbation of the condition. Severe cyanosis subsequently developed. Extubation was immediately performed, and a thick white material was found to be filling the lumen of the endotracheal tube. Reintubation was performed, and dyspnea subsided. The patient was hospitalized in the intensive-care unit. Sulbactam sodium/ampicillin sodium (6 g per day) was intravenously administered for 4 days; however, the symptoms were not much improved. The symptoms were most consistent with those of diphtheria. Therefore, the patient was subsequently placed

on erythromycin (1.0 g/day) and quickly responded to this treatment without administration of diphtheria antiserum. Erythromycin was intravenously administered at 1 g per day for 9 days, then orally administered at 1,200 mg per day for the next 14 days. Throughout the hospitalization, no complication occurred, and no abnormalities were noted in the electrocardiograms or in the patient's neurologic status. The patient was discharged uneventfully, and no serious sequelae were noted for 20 months. History of immunization for diphtheria was not known.

After the hospitalization for this acute illness, a laboratory report showed that *C. ulcerans* was cultured from the thick white coat of the throat. No other bacteria were found. The National Institute of Infectious Diseases in Tokyo later confirmed identification of the bacteria. By using Elek's test, Vero cell toxicity, and polymerase chain reaction for toxigenic gene, this strain of *C. ulcerans* was proven to produce diphtheria toxin identical to *C. diphtheriae* (2,4). Although administering appropriate antibiotics as well as antitoxin is a standard of care for patients with diphtheria, antitoxin was not given to this patient because of her rapid response to the erythromycin therapy.

C. ulcerans infections in humans occur after drinking unpasteurized milk or coming in contact with dairy animals or their waste (5,6). However, person-to-person transmission of *C. ulcerans* has not been reported, and in some cases, the route of transmission is not clear (7). Recently, *C. ulcerans*-producing diphtheria toxin was isolated in the United Kingdom from cats with nasal discharge (8).

Our patient did not have direct contact with dairy livestock or unpasteurized dairy products; however, more than 10 dairy farms are scattered around her home. Moreover, she kept nearly 20 cats in her house and had been scratched by a stray cat a week

before illness developed. This stray cat, which had rhinorrhea and sneezing, had wandered into her house. The stray cat died before the patient became ill, and no further investigation could be made. Stray cats might well be one of the possible carriers of *C. ulcerans* and might have transmitted the bacteria to this patient. To our knowledge, a case of human infection caused by *C. ulcerans* has never been reported in Japan. On the basis of current experience, this bacterium does exist in Japan and can potentially cause a serious diphtheria-like illness in humans.

Akio Hatanaka,* Atsunobu
Tsunoda,* Makoto Okamoto,*
Kenji Ooe,* Akira Nakamura,*
Masashi Miyakoshi,*
Takako Komiya,†
and Motohide Takahashi†

*Asahi General Hospital, Chiba, Japan; and †National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

References

1. Kisely SR, Price S, Ward T. 'Corynebacterium ulcerans': a potential cause of diphtheria. *Commun Dis Rep CDR Rev* 1994;4:R63 4.
2. Reinhardt DJ, Lee A, Popovic T. Antitoxin-in-membrane and antitoxin-in-well assays for detection of toxigenic *Corynebacterium diphtheriae*. *J Clin Microbiol* 1998;36:207 10.
3. Nakao H, Popovic T. Development of a direct PCR assay for detection of the diphtheria toxin gene. *J Clin Microbiol* 1997;35:1651 5.
4. Miyamura K, Nishio S, Ito A, Murata R, Kono R. Micro cell culture method for detection of diphtheria toxin and antitoxin titers by VERO cells. *J Biol Stand* 1974;2:189 201.
5. Bostock AD, Gilbert FR, Lewis D, Smith DCM. *Corynebacterium ulcerans* infection associated with untreated milk. *J Infect* 1984;9:286 8.
6. Barret NJ. Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1983 84. *J Infect* 1986;12:265 72.
7. Pers C. Infection due to "Corynebacterium ulcerans," producing diphtheria toxin. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand [B]* 1987;95:361.
8. Taylor DJ, Efstratou A, Reilly WJ.

Diphtheria toxin production by *Corynebacterium ulcerans* from cats. *Vet Rec* 2002;150:355.

Address for correspondence: Atsunobu Tsunoda, Department of Otolaryngology, Asahi General Hospital, Asahi 1-1326, Chiba, 289-2511, Japan; fax: 81-479-63-8580; email: atsunoda@mac.com

Salmonella in Birds Migrating through Sweden

To the Editor: To determine how common *Salmonella* infection is in the migrating wild bird population, we considered the biology of the bacterium and that of its avian hosts. Previous studies have attempted to determine in which stages wild birds become infected, how infections are acquired, and how this information should be translated into epidemiologic risk assessments for human and animal health. For instance, most published studies originate from small epizootics and are of either dead birds at feeding stations (1) or infected birds in or around barns where the livestock has *Salmonella* infection (2). This bias has important consequences, as the natural prevalence of *Salmonella* in the non-epizootic situation likely is overestimated. Finding infected birds close to a barn with infected cattle does not prove that transmission occurred from the birds to the animals. In addition, an epizootic at a feeding station does not prove that *Salmonella* normally occurs in the inflicted bird species, as the birds could have become infected through proximity to the infected animals, or in the case of the bird feeder, through feed contaminated from an unknown source. We need baseline surveillance data on the prevalence of *Salmonella* in non-epizootic situations, in healthy bird communities and in different

抗体をツールとした創薬および抗体創薬の戦略

特集 プロテオーム創薬と DDS

黒澤良和*

Strategies for development of medicine using antibodies as tools and of therapeutic antibodies

Antibodies can specifically bind to various antigens and form a large repertoire. If we well understand the characteristics of antibodies and utilize them as tools, we can obtain various informations which will be useful for development of medicine. Furthermore, since antibodies themselves are powerful self-defense molecules, we can directly develop human therapeutic antibodies against various diseases. In this review, I describe what should be considered and what kinds of problems should be solved to reach the above goals, based on the experiences of our "antibody project".

抗体は、さまざまな形をした分子に特異的に結合できる巨大レパートリーを形成した分子群である。その性質を正しく理解しツールとして利用すれば、創薬に結びつくさまざまな情報を入手できる。一方、抗体自身は生体防御分子であり、最近の組換え DNA 技術の発展からヒト抗体調製も可能になった。本稿では、抗体を利用するうえでなにを考え、どのような問題点を克服すべきか、筆者のグループが実施している“抗体プロジェクト”の理論的背景を概説する。

Yoshikazu Kurosawa*

key words : antibody, phage-display system, library of antibodies, therapeutic antibodies, tumour-specific antigens

現在、巨大製薬企業にとっても新薬開発が非常に困難な時代にさしかかったといわれている。ゲノムサイエンスの展開から得られる膨大な情報から治療薬の標的を探す試みに期待が集まるわけである。しかし、多すぎる情報のなかから真に役立つ情報のみを取り出し、最小限の労力と最短時間を使って、新薬開発に至るソフトウェアの開発(アルゴリズムの発見)に成功したグループが出現したという話は聞こえてこない。一方、ハーセプチンやリツキシカンに代表される抗体治療薬の華々しい登場は、これからはしばらくの間、巨大製薬企業を含めた多くのグループによる抗体創薬が試みられ、そして多くの成功例が得られるであろうことを予想させる。

筆者は、藤田保健衛生大学という地方の私立大学で10数名からなる小さな研究グループを組織して“抗体プロジェクト”を展開している。このプロジェクトは、大きく二つの目標を掲げて展開している。“ポストシーケンス時代におけるゲノムサイエン

スの蛋白質機能解析ツールとして、抗体を用いる技術開発”および“さまざまな疾患に役立つ治療薬としてのヒト抗体の単離調製”である。

本稿では、筆者らのグループがここ数年にわたって実施している“抗体プロジェクト”を支える考え方、研究戦略を述べたい。

なぜ“抗体”か

抗体は、脊椎動物(系統樹で軟骨魚以降)が持つ最も有能な生体防御分子である。H鎖とL鎖からなり、それぞれのN末端に位置する約110アミノ酸残基からなる変異(V)ドメインが抗原結合部位を構成する。この2個のVドメインが示すさまざまな分子を特異的に識別する、換言すると、さまざまな分子と選択的に結合できる能力が、抗体分子が持つ最も重要な性質である。現在、RNAに関してはPCR法を、さらにオリゴペプチド鎖については、いくつかのディスプレイ系を利用して、さまざまな分子と選択的に結合する配列(アプタマー)の探索が実施されて

* Institute for Comprehensive Medical Science, Fujita Health University 藤田保健衛生大学総合医科学研究所

いる^{1,2)}。しかし筆者らは、本稿で示す抗体ライブラリーの使用経験に基づき、さまざまな分子に対して結合する分子群として、網羅的かつ体系的に巨大レパートリーを形成しうるのは、抗体分子であり、それ以上の性能を示す分子形態を見いださうとは考えにくいという印象を持っている。

分子 A (抗体) が分子 X (抗原) と強い結合力を持って特異的に結合するには、さまざまな物理化学的条件が満たされる必要がある。

1. 分子 A は、しっかりした (熱力学的に安定な) 一定の立体構造を持つ必要がある。分子 A が柔軟にさまざまな立体構造をとり、そのうちの一つの形をとった場合に分子 X と結合するような例では、複合体形成によりエントロピーの減少をもたらすことから強い結合力を持ちにくい。
2. 分子 A と分子 X が強固な複合体を形成するには、結合面における立体的相補性が存在し、そこで生じる水素結合、ファンデルワールス力、疎水結合、クーロン力が K_A 値として $10^9 \sim 10^{10} M^{-1}$ を作り出す必要がある。その場合、熱力学的法則である $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ に従って、 ΔG として大きな負の値を示す場合に、 $\Delta G = -RT \ln K_A$ の関係にある K_A 値が十分大きな値として得られる。複合体形成において、エントロピー項 (ΔH) による結合力の獲得と、エントロピー項 (ΔS) による結合力の獲得は相反する性質を示す³⁾。
3. ほとんどの場合に、分子 A と分子 X の複合体形成反応は、水溶液中で行われるために、水分子の影響がきわめて重要である。水分子の存在は、1 個の水素結合により獲得される自由エネルギーを常に小さくする。
4. 分子 A は分子 X 群のさまざまな形に対応できるように、巨大なレパートリーを持つ分子群でなくてはならない。

筆者にとって、長年にわたる抗体および抗体遺伝子の研究に引きつづいて実施している抗体ライブラリーの研究から、いまさらのように抗体は見事にこの条件すべてを満たす分子であることを実感している。ここではつぎの 3 点を指摘したい。

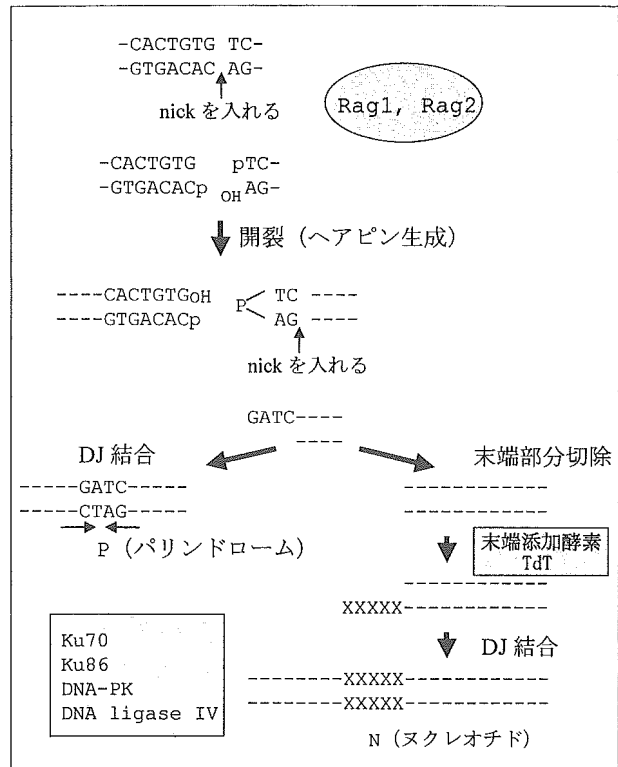


図 1 抗体遺伝子座における V-D-J DNA 再編成の模式図
D 遺伝子と J 遺伝子の間で行われる D-J 結合を例に示す。最も大きな多様性が作り出されるのは、TdT によるランダム配列の挿入である。

1. 1 個体中での抗体レパートリーの大きさ (パラトープの総数) は、いくら巨大であるといっても B リンパ球の総数を超えることはありえない。抗体遺伝子座における DNA 再編成は図 1 に示す過程を経て進行するが、ここでアミノ酸配列の多様性増大に最も大きく貢献するのは、末端添加酵素 (TdT) がランダム配列を挿入する段階である。T 細胞レセプター遺伝子系では、 α 鎖 β 鎖両方でこの TdT の関与がみられるが、抗体では TdT は H 鎖のみに関与し、L 鎖の多様性増大には関与しない。一般的にいえば、ランダムヌクレオチド配列をつくることは当然ランダムアミノ酸配列を生み出し、結果として生じるペプチド鎖が上記にあげた条件 1 を満たす例はまれである。抗体の場合、H 鎖の VDJ DNA 再編成を起こしたのち、H 鎖がポリペプチド鎖として発現されて、代替 L 鎖との (VpreB および $\lambda 5$) との会合を通して、H 鎖が正しく fold-

ingし抗原結合部位を形成するかチェックする段階が入る⁴⁾。ランダム配列の挿入は、多様性の増大という点ではきわめて大きなメリットを抗体に与えるが、立体構造的にみて多くの役に立たないH鎖を生じるという効率のわるいデメリットを与える結果を生み、つくったH鎖を取捨選択する機構としてこのステップを導入することにより、はじめて有効な抗体レパートリーをつくり出すことに成功している。このような機構を人工的につくるのは非常に困難な課題である。

2. 抗体は、H鎖における3種のDNA断片V_H、D、J_H遺伝子間の再編成、L鎖における2種のDNA断片V_L、J_L遺伝子の結合でつくられた一組の成熟型V_HおよびV_L遺伝子によりコードされる。それぞれの生物種が進化過程でこの断片化された5種の遺伝子群をどのように多様化、そして結果として出来上がった多様な配列を積極的に選択してきたかについて考えてみる。実験的には1個のヒトVH遺伝子のみを持つトランスジェニックマウスで、十分多様な抗体をつくれることが証明されている⁵⁾。この場合、ほとんどの多様性をTdTの関与のステップでつくり出している。以前からマウスではD遺伝子に多様性が少なく、ヒトのD遺伝子として多種多様な配列が存在することはわかっていた^{6,7)}。マウスはBリンパ球総数が1個体あたり10⁸オーダーであり、多様なD遺伝子を有していても、それがつくり出す多様性を1個体では利用しきれない。

最近、筆者のグループで単離した数百種類のヒト抗体に関して、ヒト抗体H鎖CDR3(D遺伝子近傍がつくり出す部位)の-NDN-(NはTdTによる産物)配列を詳細に解析した⁸⁾。一見するときわめてランダムに見える配列だが、どの程度もともとのゲノムにコードされたD遺伝子配列由来であるか調べると、約50%がそれに相当する。換言すれば、ヒトのD遺伝子(総数25)は、実際に存在する抗体のなかで十分に使われている。こ

の例に代表されるように、生殖細胞ゲノム上に存在する多数のV_H、D、J_H、V_L、J_L遺伝子群は、進化過程で十分に役立つセットとして選別を受けていると推定できる。ちなみに、マウスのH鎖CDR3は、ヒトより少し短く、多くが中心部分にチロシン-チロシン-グリシン配列を持ち、その両側にランダム配列が配置された構造をしている例が多い。

3. 第三の点は、抗体の抗原結合力を高めるために使われている体細胞突然変異機構に関してである。体内でつくられる抗体は、抗原によるチャレンジ(体内への異物の複数回の侵入)によりその抗原に対する結合力を大幅に増す。これは抗体遺伝子座への変異の導入と特定の抗体産生細胞(抗体結合力を増加した抗体を産生する細胞)の選別がカップルして起こることによってはじめて可能になる⁹⁾。試験管内でこのことを再現することは容易ではない。単離した遺伝子にさまざまな手段で変異を導入することは可能だが、ランダムな位置への多数の変異の導入は、せっかく結合力を高める変異を導入しても、それを打ち消す変異をさらに導入する結果を生む頻度がきわめて高いと予想される。変異の導入の効果を個別に識別して、+の例のみを選択的に残すシステムが必要である。

以上の3例に示されるように、抗体系はさまざまな分子(抗原)と高い結合力で選択的に結合する分子(抗体)を生み出すシステムとして、実に合理的につくられている。ランダムなペプチド集団を例として比較すれば、たとえば、15アミノ酸残基からなるオリゴペプチドそのすべての部位に20種のアミノ酸を持つ集団を考えてみると、理論的には20¹⁵=3×10¹⁹種類の配列を有することになるが、すでにその配列すべてを持つ集団を試験管内に再現できない。この大分子集団のなかで一定の立体構造をもちうる分子がどの程度を占めるか、さらには特定の分子Xと安定な複合体をつくる分子の存在確率は、といった根本的疑問に対する答えは存在するのだろうか。

抗体単離のソースは

抗体を創薬に結びつけようとする場合に、“抗体を試薬として利用する”または“抗体をそのまま治療薬として用いる”例が考えられる。では、抗体調製にいかなる方法があるか。

1. 最も頻繁に用いられているのは、精製した抗原を有し、その抗原を用いて動物を免疫し抗体産生を誘導する方法である。まずポリクローン抗体を含む抗血清が得られるが、細胞融合法によるモノクローン抗体産生細胞作製技術も確立している。ヒト抗体産生トランスジェニック動物がつくられたことからヒト抗体を得ることも可能である。ファージディスプレイ法を用いて産生されている抗体を遺伝子レベルでライブラリー化したのち、モノクローン抗体として単離する方法も開発された。筆者のグループでは、蛍光標識した抗原を用いて抗体産生細胞に印をつけて、それをメルクマールにして1細胞化し、DNA再編成した抗体遺伝子(V_HDJ_HおよびV_LJ_L)をゲノムDNAから直接クローン化する方法を開発した(森野ら、論文準備中)。
2. ウイルスや病原菌が感染し発病した患者の体内では、その治癒過程で大量のウイルス中和抗体、病原菌毒素中和抗体が産生されている。同様に、各種ワクチン接種者の体内にも中和抗体産生が誘導される。抗体が存在することは、その抗体産生細胞が体内に存在することを意味する。感染やワクチン接種直後だけでなく、過去において、感染経験のあるヒト体内にも少数ではあるが、記憶細胞の形でその抗原に対する抗体産生細胞が長期間存在する。このことが元来“一度病気になると二度同じ病気にかからない”，よく知られた免疫現象の基礎である。それぞれの抗体産生細胞が、ヒトの体内でどの器官に頻度高く存在するかについて詳細にはわかっていないと思うが、経験的に、これら中和抗体をつぎの3通りの方法を用いて確実にモノクローン化可能である。
 - ① 多くのヒト(それぞれ免疫学的経歴が異なる)

る)の器官(扁桃、臍帯血、骨髓、末梢血)のBリンパ球画分からmRNAを調製し、作製した巨大抗体ライブラリーを用いる(筆者らのグループでは1,000億種のクローンからなるAIMSライブラリーを作製し使用している)。

- ② 特定のヒト(標的抗原に対する抗体を有することが判明している個人)から成分採血(リンパ球画分)して、それから抗体ライブラリーを作製しモノクローン抗体を得る(筆者らのグループでは、ハブ毒中和抗体単離を例にこの方法に関する技術開発に成功した)。
- ③ 上述した1細胞化を通して直接抗体遺伝子を得る。

以上の方法を駆使して筆者のグループでは、すでに水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)(鈴木ら、富山医科薬科大学・白木公康教授との共同研究)、インフルエンザウイルス(廣野ら、大阪公衆衛生研究所・奥野良信博士との共同研究)、ロタウイルス(守口ら、本学・谷口孝喜教授との共同研究)、ジフテリア毒素および破傷風毒素(柿田ら、国立感染症研究所・高橋元秀博士との共同研究)、ハブ毒素(東ら、沖縄衛生研究所・野崎真敏博士との共同研究)に対して、治療薬として使用可能と判断できる十分に強い中和活性を有するヒト抗体単離調製に成功している。

3. 1および2で述べている方法は、血清中に抗体が存在し、精製抗原を利用できる条件が整っていれば、ライブラリー作製を通して、またはその抗体産生細胞を1細胞化することによりモノクローン化できることを示している。さらにこの方法はすべての脊椎動物(たとえばニワトリ、ウサギ、ラクダを含む)を対象に応用できる。さらにこの方法は抗体が関与した自己免疫疾患の患者に対しては、その抗体が対象とする未知抗原の同定、その抗原を用いた抗体産生細胞の単離へ道が開けると考えている。
4. 体内での抗体レパートリーは、抗原侵入前にすでにつくられている。そこで体内の抗体産

生細胞群は、抗原による刺激を受けて成熟した(抗原結合力を増した)抗体からなる群と、抗原による刺激を受けていないナープ抗体群に大きく分けられる。ファージディスプレイ系を用いた抗体ライブラリー作製技術は、このナープ抗体レパートリーをそのまま反映した抗体セットを膜上に発現したファージ集団作製を可能にした。この抗体ライブラリーを使用すると、結合力は必ずしも強くなくてもよいならば($10^6 \sim 10^7 M^{-1}$)、さまざまな抗原に対して網羅的な抗体単離が可能である。

以上のように、組換え DNA 技術の進歩に基づく抗体単離技術は近年飛躍的に進んだ。それでは創薬にどのように利用できるか。

網羅的抗体単離に関して——既知抗原に対して

いままでの生物学の研究様式と異なり、ゲノムサイエンスがもたらした最大のインパクトはその網羅性にある。ゲノムサイエンスにおける蛋白質機能解析のツールとして抗体の利用法を開発する場合も、網羅的に適用可能な技術であることが条件となる。筆者らのグループでは国立遺伝学研究所・小原雄治教授のグループと協力して、*C. elegans* の母系遺伝子約 800 種を対象として、その蛋白質レベルでの発現パターンを抗体を用いて解析することとした。蛋白質レベルでの発現パターン解析には、対象とする蛋白質に GFP のような蛍光を発するタグをつける、もしくは抗体で検出可能なタグをつけて抗体で同定することが通常行われている方法だが、artifact のない“ありのままの姿”を検出しようとする場合に、対象抗原を選択的に検出する抗体の使用がベストである。

本稿の主題は、“創薬の戦略”であるが、筆者らの試みを historical に紹介する。ここで記すことは、抗体利用に関するさまざまな教訓を含むと考えるからである。

すでに、対象とする多数の遺伝子に関して、塩基配列が判明した cDNA クローンが利用可能であるとすれば、それを蛋白質(ポリペプチド鎖)として発

現したのち精製し、それを抗原として用いて上述したファージ抗体ライブラリー(AIMS)をスクリーニングすれば、網羅的に抗体を単離できる。これが最初のプリミティブな考えであった。抗体を発現したファージ粒子(ファージ抗体)は、スクリーニングに用いた抗原に結合させることにより単離可能である。筆者らの AIMS ライブラリーはレパートリーが十分に巨大であり、どのような抗原に対しても最低数種類のモノクローン抗体が単離された。

筆者らの研究目的では、その遺伝子の発現パターンを蛋白質レベルで解析する検出試薬として単離した抗体を用いる。そこで抗体に要求される性質は、免疫染色のために固定した状態の標的蛋白質に選択的に結合することである。さまざまな配列をした多数の cDNA から特定領域を PCR で増幅してその配列を確認しつつ、大腸菌発現系(PET システムを用いた)で発現させ、抗原を精製する(His-tag-Ni カラム系)操作を効率よく high-throughput に実施するために、それぞれの蛋白質のなかから約 150 アミノ酸残基からなる部分を選ぶことにした。そうすると 80~90%の確率で精製抗原を調製できる。大腸菌発現系でよく起こる“組換え蛋白質が合成されない”率が低かった。この蛋白質のなかの一部である 150 アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖が形づく立体構造が、免疫染色を行う際の対象蛋白質の立体構造の一部を正しく反映しているならば、筆者らの戦略は有効に機能すると予想された。結果は、期待を裏切るものであった。High-throughput に実施するどころか、多くの抗原に対して単離した多数の抗体のなかから、正しく染色できたと考える抗体を数個見いだすのがやっとであった。この失敗は、ファージ抗体ライブラリーを有効に用いるために多くの示唆を与えた。もし、抗原として個々の蛋白質の全長を含み、正しい立体構造をしたものが準備されているならば(実はこの条件を満たした蛋白質を high-throughput に調製することが、蛋白質の機能解析—構造解析における現在の最も重要で困難な課題だが)、ファージ抗体ライブラリーのスクリーニングで十分性能のよい抗体単離を期待できる。

PET システムで合成される約 150 アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖は、70%くらいが不溶性で、

残り 30%が可溶性であった。両方とも精製可能であり、それを抗原としてラットを免疫すると、その抗血清は多くの場合に、免疫染色用試薬として有効であることを国立遺伝研の小原グループは示していた。ファージ抗体ライブラリーの使用と、動物を抗原で免疫する過程を経て産生される抗体の間で差が生じる原因はどこにあるか。両方の実験でまったく同じ構造の抗原を用いている。ファージ抗体の場合、用いた抗原そのままの形でファージ抗体が結合する(抗原抗体複合体を形成する)かどうかのみが、抗体単離の条件となる。

一方、動物を抗原で免疫した場合には、その動物にとってその抗原が生物学的に免疫原性(immunogenicity)を持つかということが重要であり、さらに抗体産生が誘導されるプロセスで、その抗原がさまざまなプロセッシングを受けることが示されている。たとえば、不溶性物質がそのままの形で抗原となることは考えにくい。免疫を有効に行うには、通常アジュバンドとともに抗原を与える(抗原を油と混合してエマルジョンにする)。そこで、プロセッシングされた抗原はある一定の立体構造をとり、それがナチュラルな蛋白の構造を反映する場合を含むと期待できる。それが免疫した動物の抗血清が、検出試薬として有効であった根拠である。

筆者らは方針を大転換し、抗原で動物を免疫することにした。免疫された動物の抗血清を試薬として用いるとともに、脾臓を摘出し、その mRNA から抗体ライブラリーを作製してモノクローン抗体を得る方法を採用した。動物としてマウスおよびラットを用いた。いままでに行われた抗体遺伝子座の解析結果からみてマウスとラットは同等である。そこで抗体の多様性に代表されるレパートリーの大きさに差があると予想していなかった。しかしマウスとラットは体の大きさが異なり、Bリンパ球総数はマウスが 10^8 オーダーであるのに対し、ラットは 10^9 オーダーである。約 150 アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖を抗原としたときに、何種類の抗体産生が誘導されて、またその抗体のなかに、免疫染色で試薬として有効に機能するものが含まれる確率に差があることが明らかになってきた。ラットから得られる抗体の種類がマウスから得られるものより数倍多い。

この結論は、当然のことだったのかもしれない。なんとなく感じていたこと(同じ抗原で数匹のマウスを免疫してモノクローン抗体を得ようとする、同系マウスであっても個体差間があるという経験)が定量的に実証された。“免疫系は巨大な数の抗体をつくり出すシステムだが、実際の動物個体はその一部を使って生体防御をしており、それでもウイルスや毒素を中和するには十分である”。

もう一つの教訓は、抗原が利用できる限り、動物を抗原として得られる抗体の性質はすぐれており、それと比較して、AIMSのような巨大なクローン数からなる抗体ライブラリーであっても、ナイーブ抗原に対しては性能のよい(抗原結合力の強い)抗体を得るのは容易でない。本プロジェクトの目的である多数の抗原に対する免疫染色が与えた情報についての総括は、別途論文として発表する(伊庭ら、伊藤ら、論文準備中)。

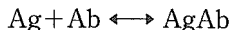
網羅的抗体単離——未知抗原に対して

前述したように、抗原が既知である場合に、換言すれば精製抗原が利用可能な条件下では、その抗原で動物を免疫することにより抗体を調製する選択肢がすぐれている。それでは巨大なレパートリーサイズの抗体ライブラリーの有効な利用対象はなにかであろうか。この課題を考えているときに、さまざまな抗原に対して抗体ライブラリーをスクリーニングする経験を通して、一見すると欠点と思える特徴が浮かび上がっていた。そこに新しい道を開く鍵があった。

1. 抗体ライブラリーのパニング法によるスクリーニングによって得られる抗体は、特定のクローンに片寄る傾向がある。ただし、独立して実施したスクリーニングで得られるクローンの種類は、必ずしも重複しない。
2. 用いる抗原濃度を下げるとか、洗浄時間や回数を多くするなどの工夫をしても、抗原結合力が強いクローンが必ずしも濃縮されてこない。

この二つの問題は、ファージ抗体ライブラリーを扱っているグループにとって、必ず経験している。

その原因を探っていくと、用いた抗原に対してファージ抗体がどのようにして回収されるかが推定できるようになる。まず、抗原抗体反応は平衡反応である。そこで



に示される関係があり、

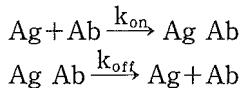
$$\frac{[\text{AgAb}]}{[\text{Ag}][\text{Ab}]} = K_A$$

が成立する。筆者らが用いている AIMS ライブラリーは、1,000 億種 (10^{11}) のクローンから構成されているので、たとえ総数 10^{14} のファージを用いても個々のクローンの濃度は非常に低い。つまり $[\text{Ag}] \gg [\text{Ab}]$ という条件下で実験を行っていることになる。

$$\frac{[\text{AgAb}]}{[\text{Ab}]} = K_A [\text{Ag}] = K_A [\text{Ag}]_0 \dots\dots\dots (1)$$

この式(1)はなにを意味するかというと、ライブラリーのなかにその抗原に対して結合する抗体が含まれていても、複合体を形成しているもの $[\text{AgAb}]$ と、抗体がフリーの状態であるもの $[\text{Ab}]$ の比は $K_A [\text{Ag}]_0$ によって決まる。つまり複合体を形成しないファージは回収されない。スクリーニングは、複合体を形成しなかったファージを捨てるプロセスでもある。このことは上記(1)の問題点が生じる理由を説明している。パニングの最初の段階で回収に成功したクローンのみが、どんどん濃縮される(結果として片寄ったクローンが得られる)。

上記式(1)が示すことは、 K_A が大きいほど、つまり結合力が大きいほど回収率が高まることを意味するはずである。しかし結果はそうならない。そこで平衡反応を反応速度論的に考察し直している。平衡状態にあるということは、



という両方向の反応が拮抗している状態を指す。パニング法によるスクリーニングは、複合体を形成しなかったファージを除く“洗浄”という段階が入る。洗浄する段階では事実上 $[\text{Ab}]$ (複合体を形成していないフリーファージ) = 0 となる。すると理論的に走りうる反応は解離反応のみとなり、

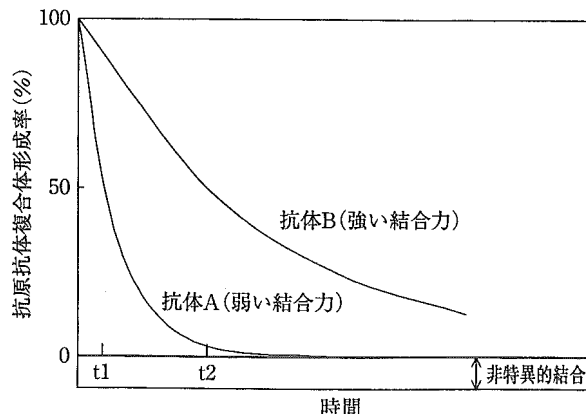


図 2 抗原抗体複合体が時間とともに一次解離曲線に従って解離する模式図 k_{off} 値に従って半減期 (t_1 および t_2) が決まる。実際には、非特異的結合がある頻度で起こることを示している。

$$-\frac{d[\text{AgAb}]}{dt} = k_{\text{off}} [\text{AgAb}]$$

で示される単純な一次解離式に従う。この式に従えば、半減期 $T_{1/2} = 0.693/k_{\text{off}}$ で複合体からファージは離れていく。その状況を図 2 に示すが、もしこの単純な式に従うならば、結合力の強いクローンを濃縮することは実験的に容易であるはずである。

実際のパニングではそうっていない。もし $0.693/k_{\text{off}}$ を半減期として複合体が解離しているならば、 K_A 値が $10^6 \sim 10^7 \text{M}^{-1}$ 程度のファージ抗体は回収されないはずである。筆者らはさまざまな系で k_{on} と k_{off} 値を実測しているが、 k_{on} は $10^5 \text{mol}^{-1} \text{sec}^{-1}$ オーダーである例が多く³⁾、その値からみて k_{off} が $10^{-1} \sim 10^{-2} \text{sec}^{-1}$ と推定される。そうすると洗浄を繰り返す、または時間をかけると複合体は破壊される。しかし、回収されるクローンの多くは $10^{-6} \sim 10^7 \text{M}^{-1}$ の解離定数を持つクローンが圧倒的に多い。この現象を説明する理由として、ファージ抗体は抗原抗体複合体をつくるが、それと同時にファージ粒子は一定頻度(速度)でパニングの際用いているチューブに非特異吸着を起こす。つまり、図 2 で示すように下駄を履いた状態をつくる。パニングで何度か洗浄したのち回収されてくるファージは、抗原抗体反応 + 非特異的吸着を起こしたものと考えると、観察される現象を説明できる。明らかに抗原と結合できないファージも、パニングのプロセスである頻度で必ず回収されてくることからこの解釈は妥当であると

思われる。パニングにより抗原抗体複合体を形成するファージを単離できる根拠は、複合体を形成したファージが相対的に長時間非特異的吸着を起こす状態にとどまっているからである。

このように考えると解決すべき課題はみえてくる。“さまざまな未知抗原に対して網羅的に抗体を単離したい”という目標を達成できなかった理由は、AIMS ライブラリーのなかに十分多様な抗体が含まれていないからではなく、スクリーニング方法がまずいからであった。最近、筆者の研究室の赤堀は、細胞上に存在する多くのエピトープに対して、結合する抗体を網羅的に単離する方法を開発した(論文準備中)。その方法では、抗原抗体複合体を形成したファージ粒子を、“洗浄”という段階を経ずに、直接単離する工夫を行った。その威力は絶大である。たとえば、癌細胞自身を抗原として抗体を単離すれば、費やす労力の程度に応じて数百～数千種類の抗体を単離できる。もし癌細胞の膜上に存在し、正常細胞の膜上に存在しないエピトープが存在すれば(癌特異抗原)、それを認識する抗体が必ずそのなかに含まれていることになる。癌治療用抗体単離のストラテジーがおのずから開けてくる。

展 望

本稿では筆者の研究室で行われている未発表のデータに基づき、その考え方の基礎を示した。具体的データに乏しく理論的考察が多いので、読者に

とって理解しにくい点も含まれていたであろう。しかし、筆者らは今後“抗体をツールとした創薬”および“抗体創薬”は確実に展開されていくと確信している。

筆者が属する大学では、平成15年度から開始された21世紀COEプログラムの医学分野で、“超低侵襲標的化診断治療開発センター”構想を提案し、採択された。“抗体”はここでいう“標的化治療”を実施するための中心分子である。

文 献

- 1) Seetharaman S, Zivarts M, Sudarsan N, Breaker RR : Immobilized RNA switches for the analysis of complex chemical and biological mixtures. *Nature Biotechnol* 19 : 336-341, 2001.
- 2) McConnell SJ, Kendall ML, Reilly TM, Hoess RH : Constrained peptide libraries as a tool for finding mimotopes. *Gene* 151 : 115-118, 1994.
- 3) Ito W, Yasui H, Kurosawa Y : Mutations in the CDRs do not cause differences in free energy during the process of formation of an activated complex between antibody and protein antigen. *J Mol Biol* 248 : 729-732, 1995.
- 4) Melchers F et al. : The surrogate light chain in B cell development. *Immunol Today* 14 : 60-68, 1993.
- 5) Xu JL, Davis MM : Diversity in the CDR 3 region of VH is sufficient for most antibody specificities. *Immunity* 13 : 37-45, 2000.
- 6) Kurosawa Y, Tonegawa S : Organization, structure and assembly of immunoglobulin heavy-chain diversity DNA segments. *J Exp Med* 155 : 201-218, 1982.
- 7) Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa Y : Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J* 7 : 4141-4150, 1988.
- 8) Akahori Y et al. : Construction and characterization of antibody libraries : isolation of therapeutic human antibodies and application to functional genomics. (投稿中)
- 9) Neuberger MS et al. : Monitoring and interpreting the intrinsic features of somatic hypermutation. *Immunol Rev* 162 : 107-116, 1998.

Original Article

Attempt to Curtail the Observation Period of Mice in the Tetanus Vaccine Potency Tests

Tadashi Fukuda*, Masaaki Iwaki, Takako Komiya, Yoshichika Arakawa and Motohide Takahashi

*Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control,
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011, Japan*

(Received April 21, 2004. Accepted July 23, 2004)

SUMMARY: Curtailing the observation of mice challenged with tetanus toxin in potency test of tetanus vaccine would reduce the agony of mice from spastic paralysis. From the viewpoint of animal welfare, we investigated the feasibility of this measure. The potencies of 85 lots of vaccine obtained on the 4th day after challenge were compared with those obtained on the 7th day. No significant difference was found ($P = 0.05$), indicating that the observation period could be curtailed from 7 days to 4 days without impairing the assessment of the vaccine's potency.

INTRODUCTION

Tetanus vaccines are used in many countries, each employing their own domestic standard to ensure the efficacy of the vaccine. The toxin challenge is the most convenient method for estimation of tetanus vaccine potency. In this method, mice immunized with the vaccine are challenged with tetanus toxin. The mice that have produced sufficient amount of anti-tetanus antibody by vaccination will not develop spastic paralysis, whereas those that have not been endowed with sufficient antibody will develop paralysis and die.

There is increasing controversy over the issue of animal welfare, in light of which it seems desirable to avoid any unnecessary agony of mice. Ideally, a tetanus vaccine potency testing method that would not use experimental animals will eventually be developed. At present, methods based on immunological assay are being considered as a possible alternative for the tetanus toxin challenge method (1-6). These methods are not based on the tetanus toxin-neutralizing ability but on its binding ability. In Japan, such alternative methods have not yet been accepted for use in a routine tetanus antibody measuring system.

Under these circumstances, curtailing the observation period would be one of the possible options to reduce the suffering period of mice. This report describes the results of our investigations in this area, which demonstrated that the observation period can be curtailed from 7 to 4 days without affecting the potencies.

MATERIALS AND METHODS

Tetanus vaccines: Forty-six lots of adsorbed diphtheria, tetanus, and acellular pertussis combined vaccine (DTaP), 14 lots of adsorbed diphtheria and tetanus combined toxoid vaccine (DT), and 25 lots of adsorbed tetanus toxoid vaccine (T) were used in this study.

Reference preparations: To measure the potency of DTaP,

a preparation of the Japanese reference tetanus vaccine (lot 2, 40 U/vial) was used. It was dissolved and diluted in sterile distilled water.

To measure the potency of DT and T, the Japanese standard tetanus toxoid preparation (Lot 3, 65 IU/vial) was used. It was dissolved and diluted in sterile saline.

Potency test: The potency tests were performed according to the method described in the Japanese Minimum Requirements for Biological Products (7). Several vaccine sample lots can be titrated simultaneously in one assay. Successive twofold dilutions were used to immunize mice; three doses for the reference preparations and two for the sample lots. Appropriate dilutions were employed for each sample lot and the reference preparation in order to obtain adequate dose-responses. Mice (Slc:ddY, SPF, female, body weight 22-24 g, 5 weeks old, 10 mice/group) were immunized subcutaneously, in the lumbar region, with 0.5 ml of each dilution.

At 32 days after immunization, the mice were subcutaneously challenged in the left lumbar region with 0.5 ml of a tetanus toxin solution containing approximately 200 mouse LD₅₀/ml. The time of death and the symptoms of the challenged mice were observed daily over 7 days, and this data was converted to scores according to the method of Murata et al. (8), with some modifications (Table 1). In 1952, the score method was established by Ipsen (9). The scores

Table 1. The scores assigned to the time of death and the symptoms of the challenged mice

Symptoms	Score
Death on 1st day	0
Death on 2nd day	1
Death on 3rd day	2
Death on 4th - 7th day	3
Severe tetanus ¹⁾	3
Mild tetanus ²⁾	4
No tetanus ³⁾	8

¹⁾: Difficulty of moving, tonic spasm or respiratory distress.

²⁾: Local spasm of the abdominal muscle in opposite side to the site of injection, or mouse's body bends to the injected side.

³⁾: No specific symptoms.

*Corresponding author: Mailing address: Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases, 4-7-1 Gakuen, Musashimurayama, Tokyo 208-0011, Japan. Tel: +81-42-561-0771 ext. 545, Fax: +81-42-561-7173. E-mail: yfukuda@nih.gov.jp

of this method were prescribed so that mean scores of groups of mice would have approximately linear regression when plotted versus a log dose of toxoid. The potency of the tetanus vaccine sample lot was calculated by statistical analysis of scores by using the parallel line assay method (10,11). Pathological examination, not described in the Japanese Minimum Requirements (7), was not undertaken in this study.

For confirmation of the toxicity of the challenge toxin solution used for the assay, four groups of unvaccinated mice were challenged with 0.5 ml of 1:1 (undiluted), 1:50, 1:100, and 1:200 dilutions of the challenge toxin solution (i.e., 100, 2, 1, and 0.5 LD₅₀/mice, respectively). These mice, along with the vaccinated groups, were observed daily for 7 days.

RESULTS

Comparison of scores of challenged mice on the 4th and 7th days: The potencies of 85 tetanus vaccine sample lots were determined in 3,269 mice in 28 tests. A total of 1,175 mice (35.9 %) died by the 4th day after tetanus toxin challenge. Among the mice surviving on the 4th day after the

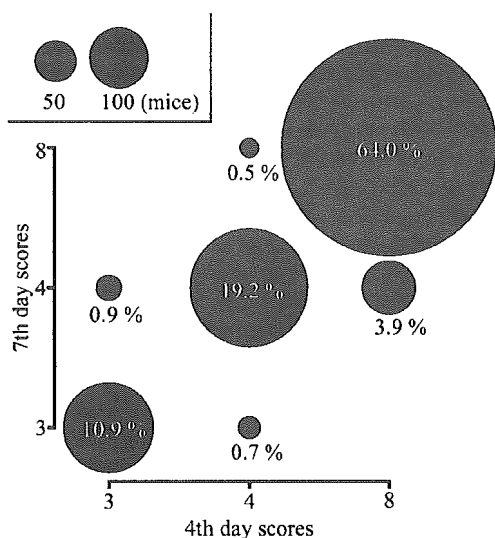


Fig. 1. Comparison of scores of mice immunized with tetanus toxoid vaccine at 4 and 7 days after toxin challenge. The square measure of a closed circle (●) indicates the number of mice with corresponding scores (see inset; the largest circle in the figure corresponds to 1,341 mice). The values in or below each circle indicate the % ratio of the number to the number of surviving mice at 4 days (2,094), rounded off to the first decimal place. Correlation coefficient: 0.919 ($n = 2094$).

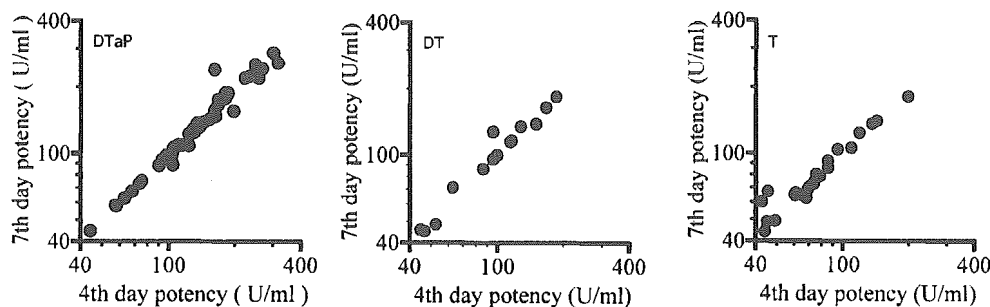


Fig. 2. Correlation of the potencies obtained from the scores on the 4th and 7th days. DTaP, DT, and T, respectively show adsorbed diphtheria, tetanus, and acellular pertussis combined vaccine, adsorbed diphtheria and tetanus combined toxoid vaccine, and adsorbed tetanus toxoid vaccine. Correlation coefficient (r) for DTaP: 0.964 ($n = 46$), r for DT: 0.975 ($n = 14$), r for T: 0.983 ($n = 25$), r for all the vaccines: 0.973 ($n = 85$).

toxin challenge, those having the same scores on the 4th and the 7th days accounted for 94.1 % (1,971/2,094 mice). In these mice, there was no statistically significant difference in the score on the 4th and that on the 7th day ($r = 0.919$, $n = 2094$) (Figure 1).

Comparison of the potencies estimated from the 4th- and 7th-day scores: The regression of 4th and 7th day potencies were $y = 0.903x + 10.257$ in the DTaP group ($n = 46$), $y = 0.960x + 5.845$ in the DT group ($n = 14$), and $y = 0.871x + 12.980$ in the T group ($n = 25$) (Figure 2). The correlation coefficients were $r = 0.964$ in the DTaP group ($n = 46$), $r = 0.975$ in the DT group ($n = 14$), $r = 0.983$ in the T group ($n = 25$), and $r = 0.973$ in the whole group ($n = 85$). No significant difference ($P = 0.05$) was observed between the 4th and 7th day among groups.

Confirmation of toxicity of the challenge toxin solution: Based on the results of the observation of the groups for confirmation of the toxicity of the challenge toxin solution, the challenge toxin solution was confirmed to contain 68.0 LD₅₀/mouse on the 4th day and 103.4 LD₅₀/mouse on the 7th day. The toxicity of the toxin solution satisfied the minimum requirement.

DISCUSSION

To reduce the period of experimental animals' suffering, we examined the possibility of curtailing the conventional observation period used in the tetanus toxin challenge method from 7 to 4 days. Based on previous findings that the symptoms of challenged mice progress until the 6th day after the tetanus toxin challenge (12), the Japanese official procedure currently requires an observation period of 7 days, which is notably longer than the 5 days required in the WHO method (13). However, from the results described herein, symptoms on the 4th and 7th days showed no significant difference when converted to scores. The parallel line assay method (10,11) is in current use to calculate vaccine potencies. The application of this method to statistical analysis of assigned scores requires satisfying the following three conditions: (i) similar variances of average scores of mice immunized with each dose of tetanus vaccine sample lots and that of the reference preparation; (ii) linearity of dose-response curves of each sample lot and the reference preparation; and (iii) parallelism between the dose-response curves of each sample lot and the reference preparation. In this study, all three conditions were satisfied. There was no significant difference in the variances of average scores of mice immunized with each tetanus vaccine sample lot and those immunized with the reference

Table 2. Common variance and coefficient of regression for reference and sample vaccines at 4 and 7 days

Preparation	Common variance		Regression coefficient	
	4th day	7th day	4th day	7th day
DTaP reference	6.208	6.170	7.135	7.358
DTaP vaccine	7.591	7.380	6.631	6.718
DT standard	6.470	6.335	8.491	8.531
DT vaccine	7.116	7.079	9.257	9.300
T standard	6.659	6.282	7.941	8.005
T vaccine	8.244	8.208	9.899	9.546

DTaP, adsorbed diphtheria, tetanus, and acellular pertussis combined vaccine; DT, adsorbed diphtheria and tetanus combined toxoid vaccine; T, adsorbed tetanus toxoid vaccine; reference, Japanese national reference tetanus toxoid preparation (Lot 2, 40 U/vial); standard, Japanese national standard tetanus toxoid preparation (Lot 3, 65 IU/vial).

preparation. Based on the finding that the dose-response of each sample lot and that of the reference preparation showed no significant deviation from parallelism or linearity, it can be assumed that the assay results with a 4-day observation period are reliable. A comparison of the common variances and regression coefficients of potencies on the 4th and the 7th day indicated no statistically significant difference between the results, suggesting that the results can be considered interchangeable; the statistical parameters were essentially the same on both days (Table 2). In addition, no significant difference ($P = 0.05$) was observed between the potencies on the 4th and the 7th day for any of the three types of vaccine products (i.e., DTaP, DT, and T).

In this study, the vaccine potencies on the 3rd day were not examined. The challenge toxin solution used in this study was suitable for a 7-day observation period. The toxin solution did not have sufficiently high toxicity to show 50-200 LD₅₀/mouse on the 3rd day; the toxin solution did not satisfy the Japanese minimum requirement. The potencies on the 3rd day and the 7th day were not compared.

In conclusion, a reduction of the observation period in the tetanus toxin challenge method from 7 to 4 days is acceptable from the statistical point of view. This means that the results obtained on the 4th day can be considered to be a reliable indicator of a tetanus vaccine's potency. If widely adopted, this method will reduce animal suffering and provide significant cost benefits and labor-saving. Thus, curtailing the observation period from 7 to 4 days would be fully applicable to the toxin challenge method and adoptable in the forthcoming version of the Minimum Requirements for Biological Products of Japan.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Mr. Yoshiaki Nagaoka for his excellent technical support with the animal experiments.

REFERENCES

1. World Health Organization (1997): ELISA methods for

the determination of diphtheria and tetanus antibodies. Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. p. 135-141. WHO/BLG/95-1. World Health Organization, Geneva.

2. World Health Organization (1997): Toxin binding inhibition test as secondary method for testing the potency of vaccines containing tetanus and diphtheria toxoids. Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. p. 142-150. WHO/BLG/95-1. World Health Organization, Geneva.
3. World Health Organization (1997): Direct ELISA as a secondary test for assessing the potency of vaccines containing tetanus toxoid. Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. p. 151-156. WHO/BLG/95-1. World Health Organization, Geneva.
4. Nyerges, G., Virag, E. and Lutter, J. (1983): The potency testing of diphtheria and tetanus toxoids as determined by the induction of antibody in mice. *J. Biol. Stand.*, 11, 99-103.
5. Hendriksen, C. F., van der Gun, J. W., Marsman, F. R. and Kreeftenberg, J. G. (1991): The use of the in vitro toxin binding inhibition (ToBI) test for the estimation of the potency of tetanus toxoid. *Biologicals*, 19, 23-29.
6. Winsnes, R., Hendriksen, C., Sesardic, D., Akkermans, A. and Daas, A. (1999): Serological assays as alternative to the Ph Eur challenge test for batch release of tetanus vaccines for human use. *Dev. Biol. Stand.*, 101, 277-288.
7. Association of Biologicals Manufacture of Japan (1993): Minimum Requirement for Biological Products. p. 185-189. Association of Biologicals Manufacture of Japan, Tokyo.
8. Murata, R., Wada, E., Yamamoto, A. and Kubota, K. (1961): Studies on the standardation of tetanus toxoid. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 14, 121-129.
9. Ipsen, J. (1952): The effect of environment temperature on the immune response of mice to tetanus toxoid. *J. Immunol.*, 6, 273-283.
10. Finney, D. J. (1964): *Statistical Methods in Biological Assay*. 2nd ed. Charles Griffin Co., London.
11. World Health Organization (1997): Parallel line analysis. Manual of laboratory methods. Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. p. 191-195. WHO/BLG/95-1. World Health Organization, Geneva.
12. Matuhasi, T. and Iwase, I. (1986): Report of a study group on simplification of potency test method of biological products (submitted to the Ministry of Health and Welfare on March 1986) (in Japanese).
13. World Health Organization (1997): Traditional method for testing the potency of vaccines containing adsorbed diphtheria and tetanus toxoids. Manual of laboratory methods for potency testing of vaccines used in the WHO Expanded Programme on Immunization. p. 110-112. WHO/BLG/95-1. World Health Organization, Geneva.