

200712024A

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン分野

抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 角田 慎一

平成20（2008）年 4月

目 次

I. 総括研究報告 抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究 角田慎一	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 22
III. 研究成果の刊行物・別刷	

抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究

主任研究者 角田 慎一
独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部 主任研究員

研究要旨

本研究では、細胞内で機能する一本鎖化Fv (scFv) 抗体、あるいは細胞内発現型抗体（イントラボディ）を創出し、疾患関連蛋白質の機能解析・機能制御に応用することを目的に、①簡便かつ迅速に、微量の抗原蛋白質に対する抗体を創製可能な抗体ライブラリおよび、そのスクリーニング法の確立、②それら抗体と蛍光蛋白等との結合体を用い、蛍光分子イメージング技術を活用することで、細胞内疾患関連蛋白質の動態や蛋白間相互作用等を効率よく解析できる技術の開発を目指すものである。本研究により、イントラボディ創出方法の最適化、細胞内疾患関連蛋白質の動態解析による疾患分子病態の解明、治療標的の探索、細胞内分子標的治療薬（細胞内抗体医薬）創出等への展開が期待される。本年度は疾患サンプルの二次元ディファレンシャル電気泳動解析（2D-DIGE）によって同定・回収される数100ngレベルの疾患関連蛋白質を抗原からも、ダイレクトに抗体を作製可能とするため、蛋白質の固定化効率に優れるプロットメンブランを固相化担体とし、アフィニティパンニングを行うメンブランパンニング法を開発した。本方法により、わずか0.5ngという極微量の蛋白質を単離できれば、多数の疾患関連蛋白質候補に対する抗体を一挙に、かつ2週間程度で作製可能であることを明らかとした。さらに抗体ライブラリから得られたscFv抗体の中から細胞内で可溶性に発現し得るクローンの探索を行うとともに、イントラボディを蛍光蛋白質との融合蛋白質として細胞内で発現させ、顕微鏡観察することなどにより、蛍光イメージング解析プローブとしての基礎評価を行った。また一方で、抗体蛋白質等を細胞外から細胞内に導入しうる技術の確立を目的に、cell penetrating peptide (CPP) を利用したペプチドキャリアの創製と特性評価に関する検討を行い、基礎情報を集積した。

A. 研究目的

細胞の中で遺伝子(ゲノム)の機能を具現する主たるものは、蛋白質(プロテオーム)である。また多くの蛋白質は翻訳後修飾を受けた後、種々生体分子と相互作用することによって機能発現するため、mRNAと蛋白質との間に量的相関関係が成立しない場合も多く、トランスクリプトームレベルの発現解析だけでは生命現象の解明に十分な情報を得るこ

とができない。そのため、疾患プロテオミクスのアプローチにより、疾患の発症や悪化、治癒に至る分子メカニズムを解明し、「創薬ターゲットとなる蛋白質」や「医薬品シークスとなる蛋白質」を同定しようとする試みが世界規模で進展中である。しかし、疾患プロテオミクス研究の成果に基づき、疾患メカニズムの解明や医薬品開発に成功した例は未だ乏しいのが現状である。これは、一般に健常状態と比較して疾患状態で発現変動している疾患関連蛋白

質の候補が数百以上も存在しているため、蛋白質の生体内・細胞内挙動の解析をはじめとする各種機能解析に多大な時間と労力を要することに大きく起因している。即ち、質量分析機器やその周辺の研究環境（データベース等）の著しい進歩によって疾患関連蛋白質の網羅的探索効率や探索精度が向上したものの、数多くの疾患関連蛋白質の中から疾患の発症や悪化、治癒の鍵となる蛋白質を絞り込むための技術が未成熟であるため、医療に有用なターゲットを同定できていないのである。したがって、多種多様な疾患関連蛋白質の中から「創薬ターゲット」や「医薬品シーズ」を絞り込もうと考えた場合、個体レベルおよび細胞レベルで“いつ”、“どこで”、“どの蛋白質”が、“どのようにして”、疾患の発症や悪化、治癒に関わっているのかという情報を簡便に集積できる基盤技術が必要不可欠となっている。本観点から当該研究課題においては、抗体ライブラリ法を有効活用することにより、細胞内での疾患関連蛋白質の効率よい挙動解析技術の確立を目指す。具体的には、まず微量の疾患関連蛋白質に対する抗体を迅速・網羅的に創製する独自技術の確立を行い、さらに、得られた抗体による細胞内蛋白質の機能制御、あるいは細胞内機能型抗体（イントラボディ）をプローブとする新規蛍光イメージング技術の確立を試みる。本研究はプロテオミクスの成果を有効活用するものであり、疾患原因の解明や効率的な医薬品開発に寄与するものと期待される。

B. 研究方法

B-1 微量疾患関連タンパク質に対する抗体作製技術

2D-DIGE

乳腺細胞株 184A1 と乳癌細胞株 SKBR3 をモデルとして使用し、各細胞を溶解処理後、各 50 μg のタンパク質をそれぞれ 400 pmol のラベル化試薬 cy2、cy3、cy5 で標識し混合した。また、蛋白質を回収するための pick ゲル用に、標識しないサンプルも

同様に混合調製した。IPG-gel (pH 5-6) スリップと ETTAN IPGPhor を用いて、上記サンプルの等電点電気泳動を行い、泳動終了後、IPG-gel を平衡化し、Ettan Daltsix Electrophoresis System と、acrylamide と diallyltartardiamide (DATD) を混合して調製したゲルを用いて、2次元目の電気泳動を行った。pick 用ゲルは Deep purple を用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った。解析には、Typhoon scanner、Ettan DIGE を使用し、spot pick には Ettan Spot Picker を使用した。回収した spot ゲルに 88mM NaIO₄ を用いてゲルを溶解し、蛋白質を抽出した。この蛋白質を抗原として以下のパンニング操作を行った。

ファージ抗体ライブラリの作製

前年度までに構築したマウス由来非免疫ファージ抗体ライブラリを用いた。

ファージ抗体ライブラリを用いた dot blot パンニング

2D-DIGE から回収されたスポットゲル由来のタンパク質の 1/10 量をドットプロット装置 (Bio-Dot Microfiltration Apparatus) を用い、ニトロセルロース膜上に固相化した。前年度確立した dot blot パンニング法にパンニングを行った後、output ファージ溶液に 2% Glucose 含有 2YT 培地を加え、その一部を Petrifilm に播種し、37°C で一晩培養し、得られた形質転換コロニー数を計測した。残りのファージを大腸菌 TGI 株に感染させ、増殖させた後、ファージを産出し、パンニング操作を 4 回繰り返した。

Dot Blot を用いたスクリーニング

2D-DIGE spot から抽出したタンパク質を Bio-Dot Microfiltration Apparatus を用い、1 ng/well になるようにニトロセルロース膜上に固相化した。Blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol

1)を添加して、室温で2時間静置した後、TBSで1回洗浄後、大腸菌を用いてモノクローン化したファージ抗体および blocking buffer を添加し、室温で2時間静置した。0.1% TBST で10回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、室温で1時間静置した。TBSTで3回洗浄後、ECL plusを用いて発色させ、LAS3000 イメージャーを用いて発色度合いを定量的解析した。

MSによる蛋白質の同定

Spot pickerによって回収したゲル断片を洗浄後、trypsin 消化を行った。その後、50% アセトニトリルと5% TFAを用いて、消化されたタンパク質由来ペプチドを回収した。このペプチド溶液をSpeed vacで濃縮し、質量分析計(AutoFlexII MS/MS)を用いて、蛋白質を同定した。

ファージ ELISA

各種抗原タンパク質 (TRAIL-R2, KDR, TNFR1, caspase-8, importin- α) を1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し、常温で96穴プレート上に8時間固相化後、4% BSAでブロッキングした。PBSで1回洗浄後、サンプルを添加し、室温で2時間培養した。PBSTで3回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、室温で1時間静置した。その後、PBSTで3回洗浄し、基質溶液を加え発色を行い、吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

ファージ免疫染色

乳腺、および乳癌細胞株を24wellプレートに播種後、氷冷メタノールを用いて細胞の固定化を行った。PBSで洗浄後、Biotin Blocking Systemと5% BSAを用いてブロッキングした。ブロッキング後、PBSで洗浄し、 1×10^{12} CFUに調製したファージを添加し、常温で2h インキュベーションした。PBSTで3回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、1h 静置した。さらにPBSTで3回洗浄後、

Streptavidin/APを加え、1h インキュベーションした。最後にPBSTで3回洗浄後、Liquid Permanent Redにより発色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

B-2. ファージペプチドライブラリによる改良型PTDの創出

Tat 変異体ライブラリ-1の構築

PCR法を用い、アルギニン以外のアミノ酸をコードする塩基コドン、全20種類のアミノ酸をコードするランダムな塩基配列(NNS配列; N = A/T/G/C, S = G/C)に置換した遺伝子ライブラリを調製した。pY03' mTNF FLAGをテンプレートに、PCRプライマー: Y-oligo22 3' exとTat11 (47-57) Rを用い(表1)、PCR(95 $^{\circ}\text{C}$, 1 min \rightarrow 65 $^{\circ}\text{C}$, 1 min \rightarrow 68 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, 35サイクル)によりTat変異体遺伝子を増幅した。得られたPCR産物をQIAquick PCR purification kitで精製後、Hin d III (Toyobo. Co., Ltd.)及びNot I (Toyobo. Co., Ltd.)によって処理した。あらかじめHin d III, Not Iで処理したファージミドベクターpY03' FLAGへ、T4 ligase (Roche Diagnostics)を用いて16 $^{\circ}\text{C}$ 、16時間ライゲーション反応を行った。得られたライゲーション産物をEco 81 I及びAlkaline phosphatase (Toyobo. Co., Ltd.)で処理し、QIAquick PCR purification kitで精製した。あらかじめ2YT培地30 mlでOD600 = 0.4まで培養し、ミリQ水で3回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で200 μl に懸濁し氷冷しておいた大腸菌TG1に対して、精製後の溶液10 μl を添加し、Gene purser II (Bio-Rad)を用い、2.5 kV、0.25 μF 、200 \cdot でエレクトロポレーションを行った。その後、2%グルコース含有2YT培地を添加し、1時間培養した後、その一部をとって50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン (Sigma-Aldrich, Inc.)、2%グルコース含有2YT培地で段階希釈した後、クローンディスク (TAKARA BIO. Inc.)に播種し、一晚培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

Tat 改変体ライブラリ-2 の構築

PCR 法を用い、Tat 配列中の 10 個のアミノ酸（下線部が変異アミノ酸：GRKKRRQRRRPPQ）をコードする塩基コドン、全 20 種類のアミノ酸をコードする NNS 配列に置換した遺伝子ライブラリを調製した。プライマー：P-oligo1 と P-oligo2（表 1）をアニーリング（96℃, 10 min → 72℃, 5 min → 68℃, 5 min → 37℃, 5 min、各段階を 0.01 °C/sec）させた。この反応液に Klenow Fragment (Toyo bo. Co., Ltd.) 1 μl、10 mM dNTP (Sigma-Aldrich, Inc) 1 μl、10 x klenow Buffer 1 μl、DW 7 μl を添加し、37℃で 1 時間反応させた。得られた産物を QIAquick PCR purification kit で精製し、QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN GmbH) で目的の遺伝子を抽出した。抽出後のサンプル 0.5 μl をテンプレートとし、pCANTAB HindIII 及び Not I extension を用い、PCR(96℃, 1 min → 65℃, 1 min → 68℃, 1 min, 35 サイクル) により、Tat 変異体遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hind III 及び Not I によって処理した。あらかじめ Hind III、Not I で処理したファージミドベクター-pY03' FLAG へ、T4 ligase を用いて 16℃、16 時間ライゲーション反応を行った。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で 200 μl に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製後の溶液 10 μl を添加し、Gene purser II を用い、2.5 kV、0.25 μF、200 Ω で電圧ポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μg/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスクに播種し、一晚培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

ランダム 18 mer ペプチド発現ファージライブラリの作製

PCR 法を用い、ランダムな 18 アミノ酸をコードする遺伝子ライブラリを調製した。プライマー：P-oligo1 と P-oligo4（表 1）をアニーリング（96℃, 10 min → 72℃, 5 min → 68℃, 5 min → 37℃, 5 min、各段階を 0.01 °C/sec）させた。この反応液に Klenow Fragment 1 μl、10 mM dNTP 1 μl、10 x klenow Buffer 1 μl、DW 7 μl を添加し、37℃で 1 時間反応させた。得られた産物を QIAquick PCR purification kit で精製し、QIAquick Gel Extraction Kit で目的の遺伝子を抽出した。抽出後のサンプル 0.5 μl をテンプレートとし、pCANTAB HindIII 及び Not I extension を用い、PCR(96℃, 1 min → 65℃, 1 min → 68℃, 1 min, 35 サイクル) により、ランダムな 18 アミノ酸をコードする遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を QIAquick PCR purification kit で精製後、Hind III 及び Not I によって処理した。あらかじめ Hind III、Not I で処理したファージミドベクター-pY03' FLAG へ、T4 ligase を用いて 16℃、16 時間ライゲーション反応を行った。あらかじめ 2YT 培地 30 ml で OD600 = 0.4 まで培養し、ミリ Q 水で 3 回洗浄操作を行い、10%グリセロール溶液で 200 μl に懸濁し氷冷しておいた大腸菌 TG1 に対して、精製後の溶液 10 μl を添加し、Gene purser II を用い、2.5 kV、0.25 μF、200 Ω で電圧ポレーションを行った。その後、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、1 時間培養した後、その一部をとって 50 μg/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地で段階希釈した後、クローンディスクに播種し、一晚培養した。得られたコロニー数を計測することで、ライブラリサイズを算出した。

シーケンス解析

得られたコロニーから任意に選択した各クローンのプラスミドを QIAprep Miniprep kit (QIAGEN

GmbH) を用いて回収し、DNA sequencing Kit (Applied Biosystems) 及び 5 × Sequencing Buffer (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行った。その後、PERFORMA Gel Filtration Cartridge (Edge Bio Systems) を用いて精製し、減圧加熱により乾燥させた。シーケンス解析は ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) により行った。

ファージの作製

作製したライブラリ遺伝子を組み込んだファージミドベクターを大腸菌 TGI 株にエレクトロポレーションし、その適量を 50 µg/ml アンピシリン、2%グルコース含有 LB プレートに播種し、37°C で一晚培養した。50 µg/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を加えてコロニーをすべて回収し、OD600 = 0.3 まで振盪培養した。M13K07 ヘルパーファージ (Invitrogen) を添加し、110 rpm、37°C で 30 分間、250 rpm、37°C で 30 分間培養した後、4°C、2000 rpm、10 分間遠心し、得られたペレットに対して 50 µg/ml アンピシリン、100 µg/ml カナマイシン (Sigma-Aldrich, Inc.) 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養することで、Tat のアミノ酸置換体を表面提示したファージを調製した。

ファージの精製

ファージ粒子を含む TGI 培養液を 4°C、2000 rpm、10 分間遠心し、上清を回収した。さらに 4°C、10000 rpm、15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-8000 (Wako Pure Chemicals)、2.5 M NaCl (Wako Pure Chemicals) を 1/5 volume 加え、激しく混和して氷上で 2~3 時間静置した。続いて 4°C、15000 rpm、10 分間遠心して得られたファージペレットを NTE Buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、0.45 µm の Millex-HV (MILLIPORE) を用いてフィルターろ過して精製ファージ溶液とした。

Cell panning

24 穴プレート (Nalge NUNC International) に HaCaT 細胞を 5 × 10⁵ cells/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養した。PBS で 3 回洗浄した後、Opti-MEM I で希釈した 2% ウシ血清アルブミン (BSA) を用いて 37°C で 2 時間ブロッキングした。精製したファージについても等量の 2%BSA を用いて 4°C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキングが終了したファージを HaCaT 細胞に加え、15 分ごとに振とうしながら 37°C で 2 時間培養した。この細胞を PBS で 20 回洗浄した後、50 mM HCl 1 ml を加えて 4°C で 10 分間培養した。このファージ溶出液を回収し、1 M Tris-HCl pH 8.0 500 µl を添加し、その 50 µl を用いて下記の方法に従いタイターを測定した。残りのファージ溶液は 2%グルコース含有 2YT 培地を 4.5 ml 加えて再度 TGI に感染させ、増幅させて上記のファージ作製法に準じてファージを産出し、再度同様のパンニング操作を行ったものを 2nd、3rd パンニングとした。

タイターの測定

2%グルコース含有 2YT 培地で OD600 = 0.3 まで培養した TGI に対して、10 倍希釈で段階希釈したファージ溶液を添加し、37°C で 1 時間培養した。培養液の一部に 50 µg/ml アンピシリン、2%グルコース含有 2YT 培地を添加し、クローンディスクに播種し一晚培養した。各希釈段階でのコロニー数を計測することで、ファージタイターを算出した。

PSIF 発現ベクターへの組換え

作製したライブラリ及び 3rd パンニング後のライブラリから回収したプラスミドを Nco I 及び Not I で処理した。あらかじめ Nco I 及び Not I で処理した PSIF 発現ベクター pY7 (pCANTAB5E に PSIF 発現コドンを組み込んだもの) にライゲーションキット Ver. 2 を用いて組み込むことで、ペプチドと PSIF との融合体を発現するプラスミドを構築した。

ペプチドとPSIFとの融合体を含まない培養上清の調整

ペプチドとPSIFとの融合体を発現するプラスミドをTGIにエレクトロポレーションにより導入し、得られたコロニーを96穴プレートヘランダムにピックアップして一晩培養した。50 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン、2%グルコース含有2YT培地100 μl を新たに添加したプレートに、一晩培養した培養液10 μl を添加し、OD600 = 0.4~0.5まで培養した。4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 rpm、20分間遠心した後、上清を除き1 mM IPTG、50 $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン含有2YT培地200 μl を添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で12時間培養した。再び4 $^{\circ}\text{C}$ 、300 rpm、20分間遠心し、上清を回収して以降のスクリーニングに供した。

ペプチドの細胞内移行能の評価

96穴プレートにOpti-MEMで 1.5×10^4 cells/wellに希釈したHaCaT細胞を播種し、終濃度50 $\mu\text{g/ml}$ となるようにシクロヘキシミド(Wako Pure Chemicals)を添加した。続いて、上記の方法に従って調整した培養上清をそれぞれ50 μl ずつ加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で24時間培養した。その後、5 mg/mlのMTT(Wako Pure Chemicals)溶液を10 μl 加え、さらに37 $^{\circ}\text{C}$ で4時間培養した。20% SDS/0.01 N HClを100 μl 加え暗所で4時間静置することで、生成したホルマザンを溶解し、Benchmark Plusマイクロプレートリーダーで吸光度を測定(Test wave length; 595 nm / Reference wave length; 655 nm)し、PSIFによる細胞傷害性を指標にペプチドの細胞内移行能を評価した。また、viabilityはPSIFを発現しないTGIの培養上清を加えた群を100%、終濃度1 mg/mlのシクロヘキシミドを加えた群を0%として算出した。

B-3. 免疫ライブラリによるscFv抗体作製

BALB/cマウスに対するproCASP8蛋白質の免疫

マウスはBALB/c(メス、6-7週齢、日本SLC)を用いた。proCASP8組み換え蛋白質を等量のTiter Max Gold(Sigma-Aldrich Corporation, USA)と混合し、エマルジョンとした。これを抗原蛋白質量として50 $\mu\text{g/mouse}$ となるように、マウス頸部皮内、左脚筋肉内に数箇所に分けて投与した(1次免疫 day 0)。2週間後(day 14)に同様の方法でエマルジョンを作製し、追加免疫を行なった(2次免疫)。その1週間後(day 21)に眼底採血を行い後述する方法で血清中のproCASP8に対する抗体価を測定した。ELISAによる抗体価測定は次のように行った。免疫に用いたproCASP8蛋白質をB buffer(0.05 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6); Sigma-Aldrich Corporation, USA)で10 $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、Maxisorb 96 well plateに100 $\mu\text{L/well}$ 添加し、一晩4 $^{\circ}\text{C}$ で静置して固相した。PBSで洗浄後、4% Block Ace 300 μL を各wellに添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、2時間でブロッキングした。PBSで洗浄後、0.4% Block Aceで段階希釈された血清それぞれを100 $\mu\text{L/well}$ 添加し、室温で2時間反応させた。PBSTで3回洗浄後、HRP標識anti-mouse IgG抗体を0.4% Block Aceで50,000倍希釈したものを100 $\mu\text{L/well}$ 添加し、1時間室温で反応させた。その後再びPBSTで3回洗浄後、基質溶液(TMBZ)を加えて発色を行い、2 N硫酸を添加することで反応を停止させた。吸光度(測定波長450 nm、対照波長655 nm)はマイクロプレートリーダーで測定した。

cDNAの作製

抗原特異的な抗体価の上昇が認められたマウスをペントバルビタールにより深麻酔し、脾細胞を回収した。50~100 mgの組織に対して1 mLのTRIzol reagent(Invitrogen Corporation, USA)を加え、ホモジネートした。室温で5分間インキュベーションし、TRIzol reagent 1 mLに対して200 μL のchloroformを加え、15秒間攪拌した。室温で3分間インキュベーションし、12,000 \times g、4 $^{\circ}\text{C}$ で15

分間遠心した。上清を新しいマイクロチューブに移し、等量の isopropylalcohol と 1 / 10 容量の 3 M sodium acetate を加えた。室温で 10 分間インキュベーションし、12,000 × g, 4° C で 15 分間遠心した。上清を除き、70% ethanol で wash し、7500 x g, 4° C で 5 分間遠心した。上清を除き、pellet を RNA free 水で溶解し、total RNA を得た。この total RNA 5 μg 当たり、50 μM oligo (dT) 20 (Invitrogen Corporation, USA) 1 μL、10 mM dNTP mix 1 μL を混合し、DEPEC 処理水を加えて 10 μL とし、65° C で 5 分間インキュベーションした。10×RT buffer 2 μL、25 mM MgCl₂ 4 μL、0.1 M DTT 2 μL、RNaseOUT (Invitrogen Corporation, USA) 1 μL、SuperScript I I I RT (Invitrogen Corporation, USA) 1 μL を加えて、50° C で 50 分間、85° C で 5 分間反応させた。RNase H (Invitrogen Corporation, USA) 1 μL を加え、37° C で 20 分間反応させ、脾細胞由来 cDNA を得た。本 cDNA を用いて、前年度確立した方法に準じて免疫ファージ抗体ライブラリを構築した。

アフィニティーパンニング

anti-FLAG M2 Agarose (Sigma-Aldrich Corporation, USA) 100 μL に、精製した scFv 提示ファージライブラリを 4% Block Ace と等量混合した input 溶液を 100 mL 添加した。4° C で 1 時間、転倒混和させた。続いて 0.1% Tween-20-PBS で 5 回洗浄後、1 mg/mL に調整した 3XFLAG Peptide (Sigma-Aldrich Corporation, USA) を 100 μL 添加し、40 分間、4° C で転倒混和することで結合ファージを溶出した。一方で、抗原を炭酸緩衝液で 10 μg/mL に希釈し、イムノプレートに 4° C で一晩固相化させた。4% Block Ace を添加し、37° C で 2 時間ブロッキングした。これに上記 3XFLAG Peptide で溶出したファージを 100 μL 添加し、4° C で 1 時間、インキュベートした。PBST で洗浄後、10 mM glycine-HCl (pH 2.0) と glycine-NaOH (pH 11.0)

をそれぞれ 100 μL 添加し、結合ファージを溶出した。回収したファージ溶液は直ちに 50 μL の Tris-HCl buffer (pH 8.0) で中和し、output 溶液とした。output ファージは大腸菌 TGI に感染させてモノクローン化した。各抗原蛋白質について、本パンニング操作を 2 回繰り返して、ファージ ELISA、DNA シーケンスによりスクリーニングを行った。

C. 研究結果・考察

C-1 微量疾患関連タンパク質に対する抗体作製技術の確立

前年度までに確立したメンブランパンニング法を用い、モデル疾患サンプルとして乳癌細胞株 SKBR3 の 2D-DIGE 解析を行い、発現変動スポットを同定した。ピック用ゲルから発現変動スポットを切りだし、MS によるタンパク同定を行い、一方で、過ヨウ素酸によるゲル分解を行うことでタンパク質を回収し、抗体パンニング、およびスクリーニング用の抗原として用いた。

2D-DIGE 解析の結果、21 個の発現変動スポットが検出され、ピックしたゲルからのタンパク質を MS により同定した (図 1)。一方で可溶化したゲルからのタンパク質を抗原としてファージ抗体ライブラリのパンニングを行った結果、21 種全てのタンパク質に対するファージ抗体の濃縮が確認され (図 2)、スクリーニングの結果、わずか 2 週間という短期間で、それぞれのタンパク質についてモノクローン化ファージ抗体を得ることができた (図 3)。

得られた抗体のひとつ、TRAILR2 抗体を用いて乳癌細胞 SKBR3 および不死化乳腺細胞株 184A1 の蛍光免疫染色を試みたところ、SKBR3 のみ選択的に染色されたことから、得られたファージ抗体が細胞の免疫染色に利用可能であることが判明した (図 4)。また、データには示さないが、組織切片の免疫染色も同様に可能であることが確認できた。

C-2. ファージペプチドライブラリによる改良型 P

TD の創出

まず Tat 改変体ライブラリ、及びランダム 18 mer ペプチドライブラリの構築のため、ランダムな NNS 塩基配列 (N = A/T/G/C, S = G/C) を含む degenerate primer を用いた PCR 法によって、Tat 配列中の目的アミノ酸をランダムなアミノ酸に置換した Tat 改変体ライブラリ遺伝子、及び、ランダムな 18 アミノ酸をコードするランダム 18 mer ペプチドライブラリ遺伝子を作製した。本ライブラリ遺伝子をファージミドベクターに組み込み、大腸菌 TG1 株に導入、ヘルパーファージを感染させることで、多様な種類のペプチドをファージマイナー外殻蛋白質である g3p の先端に発現する各ペプチド発現ファージライブラリを作製した。それぞれ作製したライブラリから任意にピックアップしたクローンの DNA シークエンスを解析した結果、NNS 塩基配列を導入した箇所がランダムなアミノ酸に置換されており、独立したクローンで構成されていることを確認した (表 2, 3, 4)。従って、構築した 3 種類のファージライブラリは、多様なペプチドを提示したファージクローンから構成される質の高いライブラリであることが示唆された。

構築した Tat 改変体ライブラリ-1 を用いて、モデル細胞である HaCaT 細胞に対してパンニングを 3 回行った。セルパンニングにより選別・濃縮されたクローンを、PSIF 発現ベクターに組換えた後に、大腸菌に形質転換し、PTD-PSIF 融合体を含む大腸菌培養上清を標的細胞に添加した際の細胞傷害活性を評価した。Tat 融合 PSIF 作用群が約 70% の viability を示す条件下で検討したところ、パンニング前は、いずれも Tat と同等以下の細胞傷害活性を示すクローンのみであったのに対し、パンニング後のクローンでは Tat よりも強い細胞傷害活性を示す多数のクローンを得ることに成功した (図 5)。このことから、筆者が考案した 2-step スクリーニングが、PTD の機能改変戦略として非常に有効であることが示唆された。Tat 改変体ライブラリ-1 から

選別してきたクローンのアミノ酸配列を確認したところ (表 5)、アルギニンが増加している傾向が認められたことから、PTD の細胞内への移行には塩基性アミノ酸の中でもアルギニンが重要な役割を果たす可能性が示唆された。しかし、Futaki らが報告しているように、鎖長の異なるポリアルギニンペプチドの細胞内移行効率の検討から、アルギニン数と細胞内移行活性が必ずしも正の相関を示すわけではないと考えられている。従って、PTD の細胞内移行活性はアルギニン残基数、つまり塩基性の高さのみに依存するのではなく、アルギニン以外の構成アミノ酸の関与する可能性も十分に考えられる。事実、本検討で得られたクローンでは、アルギニンに次いでプロリンが増加している傾向にあった。プロリンは、唯一の環状アミノ酸であり、主鎖構造の折れ曲がりに関与する等、蛋白質やペプチドの立体構造上、重要な役割の担っていることが知られている。従って、プロリンのように蛋白質の立体構造を維持する上で非常に重要なアミノ酸が保存される傾向にあったという事実は、PTD の一次構造のみならず、高次構造が細胞内移行活性に関与している可能性を示唆するものである。

本研究で得られた PTD と細胞内移行活性との相関に関する情報は、2-step スクリーニングを駆使することによって初めて可能となった非常に興味深い知見である。本年度は、Tat 改変ライブラリ-1 に焦点を絞って解析したが、将来的には残り三つのライブラリを用いて同様の検討を行うことによって、改良型 PTD の設計指針を提示できる有用な知見が得られるものと期待される。今後は、本細胞内蛋白質導入ペプチドを用いて、蛋白質医薬品の細胞内安定性評価系の確立を試みる予定である。

C-3. 免疫ライブラリによる scFv 抗体作製

非免疫ファージ抗体ライブラリよりも、多種類の scFv クローンを得ること、よりアフィニティの高い scFv クローンを得られる可能性のある方法として、

免疫マウス由来抗体遺伝子を用いて免疫抗体ライブラリを構築した。本ライブラリから抗proCASP8抗体を得るために、まずパンニングを2回繰り返し、proCASP8に結合するファージクローンを濃縮した。次に、パンニングによる濃縮後のライブラリから目的クローンをスクリーニングするため、各パンニングラウンドで回収されたファージを大腸菌 TGIに再感染させることでモノクローン化し、大腸菌培養上清中に産生されたファージを用いて、proCASP8に対するファージELISAにより結合性を評価した。その結果、inputファージでは、proCASP8に結合性を示すクローンは認められなかったのに対し、パンニングを繰り返すことによって、抗原結合性のクローンが増加し、2ndパンニング後のoutputファージではproCASP8に結合性を示すクローンが多数認められた(図6)。次に、proCASP8に結合性を有すると考えられる17クローンについてDNAシーケンス解析を行ったところ、異なる7種類の配列(IC-1~7)をもつ抗体であることが確認された(表6)。次にこれらの抗体の特異性をファージELISA法にて評価したところ、単離されたどの抗proCASP8抗体も、proCASP8に対してはファージ表面上に提示された抗体量依存的に結合性を示したのに対し、他の抗原蛋白質には結合性は認められなかった(表7)。この結果から、免疫ファージ抗体ライブラリから単離した7種類の抗体はproCASP8特異的な抗体であることが示唆された。以上のように、免疫抗体ライブラリを用いることにより、多種類のscFvクローンを取得しうるということが明らかとなった。さらにスクリーニングするクローン数を増やせば、より多種類の抗原特異的な抗体を単離・同定できるものと考えられる。また、proCASP8蛋白質をマウスに免疫してからモノクローナル抗体を単離するまでに要した期間はおよそ2ヶ月であり、本方法が、従来の抗体作製法であるハイブリドーマ法に比べても、迅速に高親和性の抗体を単離しうるシステムであると考えられた。また、本研究で構築した免疫ファージ抗体ライブラ

リは、イントラボディ創製にあたり、数多くの抗原特異的モノクローナル抗体を迅速に、かつ効率よく単離できる優れた抗体作製システムになりうるということが明らかとなった。

D. 結論

蛋白質の特異的標識には抗体が最も優れたツールとなるが、通常の抗体では生細胞中の多種多様な蛋白質の解析に迅速に対応することができない。そこで本研究ではファージ抗体ライブラリによる抗体の迅速・網羅的創製技術、およびそれにより得られる低分子化 scFv 抗体の細胞内での応用(イントラボディ)を試みた。疾患プロテオーム解析で汎用される二次元ディファレンシャル電気泳動解析(2D-DIGE)によって同定・回収される数100ngレベルの疾患関連蛋白質を抗原に対して、ダイレクトに抗体を作製し、それを用いて蛋白質の機能解析・バリデーションができれば極めて有用なツールとなりうる。そこで2D-DIGE解析ゲルから回収可能な微量蛋白質に対する抗体作製法の確立のため、蛋白質の固定化効率に優れるプロットメンブランを固相化担体とし、抗体ライブラリのアフィニティパンニングを行うメンブランパンニング法を開発した。本方法により、わずか0.5ngという極微量の蛋白質を回収できれば、それらに対する抗体を一挙に、かつ短期間で作製可能となった。さらに抗体ライブラリから得られたscFv抗体の中から細胞内で可溶性に発現し得るクローンの探索を行うとともに、イントラボディを蛍光蛋白質との融合蛋白質をとして細胞内で発現させ、顕微鏡観察することにより、蛍光イメージング解析プローブとしての基礎評価を行った。また一方で、抗体蛋白質自体を細胞外から細胞内に導入しうる技術の確立を目的に、細胞内移行活性を有するcell penetrating peptide(CPP)を利用したペプチドキャリアの創製と特性評価を行い、基礎情報を集積した。

これまでの基礎検討をもとにして、次年度では、各種 scFv 抗体を用いて、蛍光標識イントラボディを用いた種々細胞内蛋白質の細胞内局在等の可視化解析を試みるとともに、細胞内シグナル制御法としてのイントラボディ法の可能性について検討を行う。また、細胞外から細胞内に蛋白質を導入するペプチドキャリアを用いて抗体の細胞内導入法を試みる。以上の研究から、抗体ライブラリを活用した蛋白質解析技術の有用性を実証していく予定である。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Kamada H., Tsunoda S (C. A.), Tsutsumi Y.: Comparative Study of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction., Br. J. Pharmacol. (in press).
- 2) Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Yamato T., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S (C. A.), Tsutsumi Y.: Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused membrane-disruptive HA2 peptide., Biochem. Biophys. Res. Commun. 363: 1027-1032, 2007.
- 3) Nomura T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H.,

Nakagawa S., Tsunoda S.: Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library. Pharmazie, 62: 569-573, 2007.

- 4) Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S.: Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain., Biol. Pharm. Bull. 30: 218-223, 2007.

2. 学会発表

- 1) 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向洋平, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央: プロテオミクス創薬を志向した疾患関連蛋白質抗体の迅速単離システムの開発., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
- 2) 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央: 腫瘍壊死因子- α の活性に及ぼす90番目のアミノ酸の影響に関する検討., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
- 3) Mukai Y., Tsutsumi Y., Nakagawa S.: Application of membrane-permeable Protein Transduction Domain (PTD) for efficient intracellular drug delivery., 第5回メンブレン・ストレスバイオテクノロジー(MSB)シンポジウム, 大阪, 2007年9月.
- 4) Tsunoda S., Mukai Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y.: A method for rapid preparation of antibodies to tumor-related proteins by the combination of p

- hage library and 2D-DIGE., 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月.
- 5) 吉川友章, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 細胞膜透過性TATペプチドと膜融合性HA2ペプチドを活用した核内高分子送達法の開発., 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月.
 - 6) 向 洋平, 今井 直, 吉川友章, 長野一也, 中川晋作, 堤 康央, 角田慎一 : 新規抗体医薬の開発を目指した乳がん細胞特異マーカーの探索とそれらに対する網羅的抗体創製法の開発., 第57回日本薬学会近畿支部大会, 大阪, 2007年10月.
 - 7) 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向 洋平, 吉川友章, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血栓性疾患の機能解明・治療を目指した新規抗体単離システムの構築., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 - 8) 長野一也, 今井 直, 杉田敏樹, 向 洋平, 吉川友章, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血栓性疾患の機能解明・治療を目指したファージ抗体ライブラリの構築., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 - 9) 吉川友章, 杉田敏樹, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 - 10) 杉田敏樹, 吉川友章, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発-2., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 - 11) 吉田康伸, 吉川友章, 杉田敏樹, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規細胞内移行ペプチドの創出と血管機能制御技術としての展開., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 - 12) 杉田敏樹, 吉川友章, 長野一也, 鍋師裕美, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規Protein Transduction Domain peptideの細胞内DDSキャリアーとしての特性解析., 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008年3月.
 - 13) 今井 直, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : 疾患関連蛋白質の同定およびこれらに対する抗体を一挙かつ短期間で網羅的作製できる抗体プロテオミクスの確立., 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008年3月.
 - 14) 長野一也, 吉川友章, 杉田敏樹, 今井 直, 鍋師裕美, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 免疫制御技術の開発に向けた制御性T細胞の抗体プロテオミクス研究., 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008年3月.
 - 15) 吉田康伸, 今井 直, 杉田敏樹, 阿部康弘, 萱室裕之, 長野一也, 鍋師裕美, 野村鉄也, 小泉桂一, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 抗体プロテオミクスによるリンパ管新生関連分子の探索と機能評価に向けて., 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008年3月.
 - 16) Tsunoda S., Imai S., Yoshida Y., Nagano K., Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y. : An efficient method for the production of monoclonal antibodies to tumor-related proteins using a combination of phage display library and 2-dimensional differential gel electrophoresis, HUP0 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.

- 17) Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of a novel therapeutic approach using an intracellular targeting strategy with membrane-permeable peptides., HUP0 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
- 18) Yoshikawa T., Imai S., Nagano K., Sugita T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Simultaneous identification of tumor-specific proteins and their antibodies by combining a proteomic s technique and phage display library, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
- 19) 角田慎一 : 疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発-1., 大阪大学大学院薬学研究科特別講演会, 大阪, 2007年6月.
- 20) 鎌田春彦 : 疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発-2., 大阪大学大学院薬学

研究科特別講演会, 大阪, 2007年6月.

- 21) 堤 康央 : ナノマテリアルの医薬品への展開とリスク Overview.. 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008年3月.

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

H. その他

該当なし

I. 協力研究者

堤 康央 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬プロテオミクスプロジェクト
プロジェクトリーダー

鎌田春彦 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬プロテオミクスプロジェクト
主任研究員

表1 ペプチドライブラリ作製用オリゴDNA配列

Y-oligo22 3'ex	TCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAGCC
Tat11 (47-57) [5] R	TCATCCTTGTAGTCTGCGGCCGCACGACGACGSNNACGACGSNNSNNA CGSNNSNNGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCATGAAAG
P-oligo1	GATTACGCCAAGCTTTGGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAA AAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCTTTCTATGCGGCCAGCC GGCCATGGCC
P-oligo2	CGGCGCACCTGCGGCCGCSNNSNCGGSNNSNNSNCTGSNNSNNSN NSNNSNACCGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCATAGAAAGG
P-oligo4	CGGCGCACCTGCGGCCGCSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSN NSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNGGCCATGGCCGGCTGGGCCGCA TAGAA

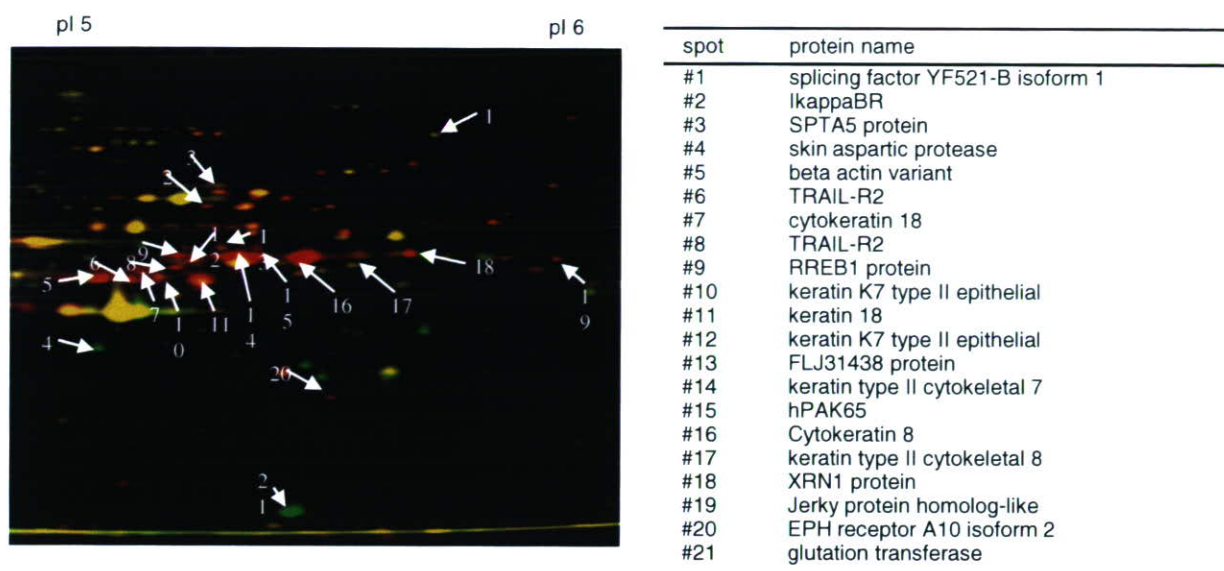


図1 乳癌細胞の2D-DIGE解析と同一化された発現変動タンパク質

(左)SKBR3細胞(乳癌細胞)と184A1細胞(対照)の2D-DIGE解析。赤色は癌細胞で発現増加しているタンパク質を、緑色は癌細胞で発現減少しているタンパク質を、黄色は発現変動のないタンパク質を示している。

(右)MSにより同一化したタンパク質を示している。

spot	protein name	Output/Input (x 10 ⁻⁷) / round			
		1st	2nd	3rd	4th
#1	splicing factor YF521-B isoform 1	6	7	16	480
#2	IkappaBR	6	7	15	500
#3	SPTA5 protein	5	6	32	860
#4	skin aspartic protease	5	6	5	24
#5	beta actin variant	7	11	17	480
#6	TRAIL-R2	6	7	25	420
#7	cytokeratin 18	5	11	62	260
#8	TRAIL-R2	5	27	41	1500
#9	RREB1 protein	8	9	14	370
#10	keratin K7 type II epithelial	6	7	3	2200
#11	keratin 18	6	8	15	84
#12	keratin K7 type II epithelial	10	11	13	94
#13	FLJ31438 protein	7	9	32	80
#14	keratin type II cytokeletal 7	4	7	46	280
#15	hPAK65	7	11	51	580
#16	Cytokeratin 8	8	7	16	4100
#17	keratin type II cytokeletal 8	5	12	33	240
#18	XRN1 protein	6	20	18	200
#19	Jerky protein homolog-like	7	10	49	940
#20	EPH receptor A10 isoform 2	8	6	57	3000
#21	glutation transferase	7	8	110	1900

図2 疾患関連タンパク質候補に対するファージ抗体ライブラリのインプランパンニング

パンニングラウンドを繰り返すごとに特異的抗体ファージの濃縮効果が認められた。

1st~4th パンニングでのOutput phage (titer) / Input phage (titer)の増加は、抗原に結合するクローンの濃縮が示唆される。

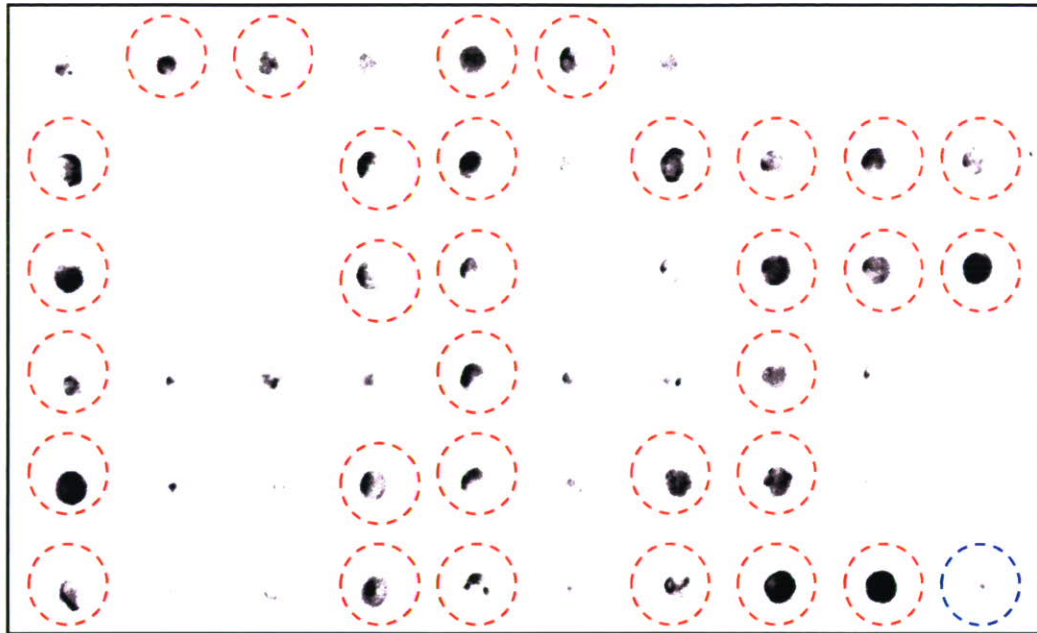


図3 抗TRAILR2ファージ抗体のスリーニング

抗原(TRAILR2)に対して濃縮されたファージ抗体ライブラリをモノクローン化し、Dot blot western法によりスリーニングを行った。ニトロセルロース膜上に2D-DIGEゲルから抽出したTRAILR2タンパク質を固相化した。青い丸印はネガティブコントロールファージ。

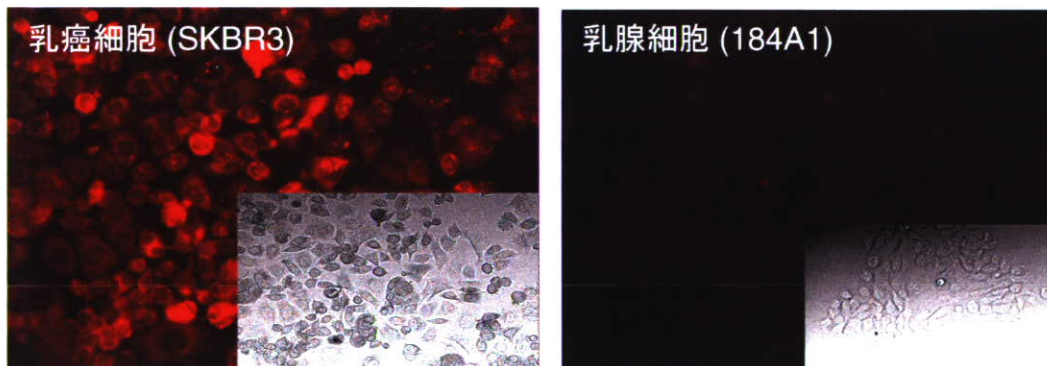


図4 取得したファージ抗体による培養細胞の蛍光免疫染色

TRAILR2に対するファージ抗体を用いて、培養SKBR3細胞、および184A1細胞の免疫染色を行い、蛍光顕微鏡により観察したところ、SKBR3細胞のみ特異的に染色された。右下のパネルは微分干渉顕微鏡像。

表2 mutant Tat library-1のアミノ酸配列

clone	position										
	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57
Tat	Y	G	R	K	K	R	R	Q	R	R	R
1	T	L	R	T	R	R	R	N	R	R	R
2	N	Y	R	T	G	R	R	K	R	R	R
3	L	T	R	W	T	R	R	M	R	R	R
4	Y	P	R	I	D	R	R	P	R	R	R
5	S	K	R	T	W	R	R	N	R	R	R
6	K	E	R	H	L	R	R	H	R	R	R
7	D	R	R	N	S	R	R	N	R	R	R
8	H	R	R	P	V	R	R	F	R	R	R
9	N	K	R	R	Q	R	R	K	R	R	R
10	A	P	R	D	W	R	R	A	R	R	R

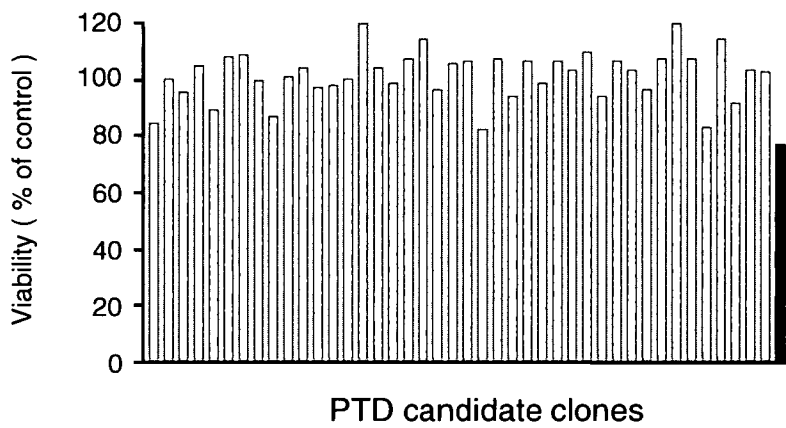
表3 mutant Tat library-2のアミノ酸配列

clone	position												
	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Tat	G	R	K	K	R	R	Q	R	R	R	P	P	Q
1	G	M	H	I	N	G	Q	S	N	P	P	H	A
2	G	G	M	H	E	S	Q	S	H	M	P	G	D
3	G	T	Q	A	F	L	Q	Q	F	E	P	W	I
4	G	I	K	H	S	P	Q	Q	I	S	P	R	W
5	G	I	L	C	I	Q	Q	D	H	Q	P	L	G
6	G	F	K	L	S	S	Q	A	V	A	P	L	Q
7	G	S	I	R	A	P	Q	G	D	S	P	W	P
8	G	T	R	H	G	I	Q	T	Q	P	P	N	N

表4 random 18 mer peptide libraryのアミノ酸配列

clone	sequence
1	Y A Q Y K I T T A S P G D V K T S N
2	T Y A W Q Y C Q R T G R A L P N T K
3	R K H D A M D S T R R C W P H A P C
4	H N Q R H V K N W P D G F Q R N W S
5	K E Q K N P Q K Q F S S R G P A P N
6	Y P R Y K L Q D T V Q D R L R H R H
7	P K D A Q A S Y T P N N F N L S T T
8	M R Q P K P D T S N Y K D R V K S S
9	M F K G A F T Q Y H S T H E S T E N

(A) Before cell panning



(B) After 3rd cell panning

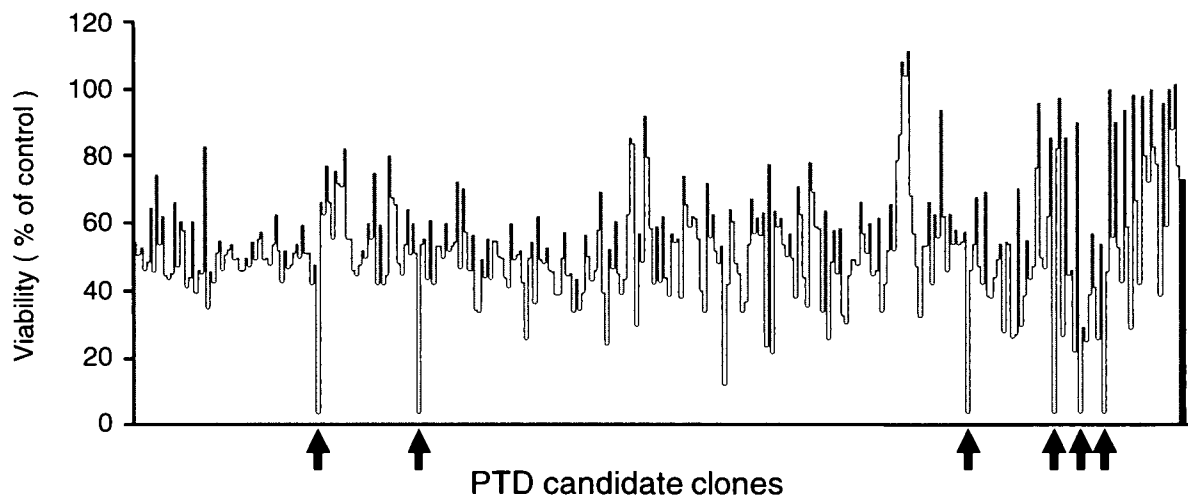


図5 モノクローン化したTat-PSIF融合蛋白質の細胞内移行能評価