

200933042A

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

Claudin-1を標的としたC型肝炎ウイルス感染阻害法の開発とその臨床応用に向けた疫学調査

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 磯田 勝広

平成22(2010)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

肝炎等克服緊急対策研究事業

Claudin-1を標的としたC型肝炎ウイルス感染阻害法の開発とその臨床応用に向けた疫学調査

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 磯田 勝広

平成22(2010)年 3月

平成21年度 総括・分担研究報告書 目次

目 次

I. 総括研究報告書	
Claudin-1 を標的としたC型肝炎ウイルス感染阻害法の開発とその臨床応用に向けた疫学調査	----- 1
磯田 勝広	
II. 分担研究報告書	
C-CPE 構造変異体ライブラリの作製	----- 6
角田 慎一	
III. 分担研究報告書	
Claudin-1 binder の創製に関する研究	----- 10
近藤 昌夫	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 23
V. 研究成果の刊行物・別刷	----- 25

# Claudin-1 を標的とした C 型肝炎ウイルス感染阻害法の開発とその臨床応用に向けた疫学調査

研究代表者 磯田 勝広 帝京平成大学薬学部 講師

## 研究要旨

本研究は、最近新規同定された C 型肝炎ウイルス (HCV) 受容体、claudin-1 (CL-1) に着目し、独自の CL binder [アンタゴニスト] 創出技術を用いて HCV 感染阻害薬を開発すると共に、疫学的に C 型肝炎の炎症・悪化と CL-1 の発現パターンの連関解析を行うことにより、近未来に臨床応用可能な C 型肝炎の画期的予防・治療薬の創製を試みるものである。さらに国民の健康増進、バイオ製薬メーカーの育成、我が国の知的財産の確保に大きく貢献することを目的としている。本年度は昨年度に構築した CL4 アンタゴニストの構造変異体ライブラリと CL1 アンタゴニストスクリーニング系を用い、CL4 アンタゴニスト構造変異体の中から CL1 binder をスクリーニング、CL 結合特性を解析した。

研究分担者氏名: 角田 慎一  
所属研究機関: 独立行政法人 医薬基盤研究所 バイオ創薬プロジェクト  
職名: プロジェクトリーダー

研究分担者氏名: 近藤 昌夫  
所属研究機関: 大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野  
職名: 准教授

HCV E2 蛋白質が claudin-1 の細胞外領域に結合するとエンドサイトーシスによりウイルス粒子が細胞内に取り込まれることから、claudin-1 の細胞外領域に結合して claudin-1 と E2 蛋白質の結合を阻害する分子を創製することができれば、吸着阻害作用を有する C 型肝炎治療薬の開発に繋がると考えられる。本吸着阻害薬の第一選択としては抗 claudin 抗体が挙げられるものの、既存の抗 claudin-1 抗体は細胞内領域を認識する抗体であり、細胞外領域を認識する抗 claudin-1 抗体の作製に成功したグループは未だ皆無である。

本研究は、肝細胞等における C 型肝炎ウイルス (HCV) の感染受容体 (claudin-1 ; CL1) を創薬ターゲットとした初めての“C 型肝炎の画期的予防・治療薬”を、独自の基盤技術 (claudin binder [アンタゴニスト] 創出技術) にて創出しようとするものであり、我が国の国民の健康増進といった社会的側面のみならず、バイオ製薬メーカーの育成や我が国の知的財産の確保にも大きく貢献できるものである。また当該研究によって先駆けて開発された“新規抗 C 型肝炎薬”の有効性に関

## A. 研究目的

現在、我が国では 200 万人が C 型肝炎ウイルスに感染しており、年間 3 万人が C 型肝炎により死亡している。C 型肝炎に対して有効な薬物治療法としては、インターフェロン (免疫賦活化作用) とリバビリン (ウイルス複製阻害作用) の併用療法しか無く、この併用療法ですら 50%の奏効率しかないのが現状である。つまり、患者の 2 人に 1 人は肝硬変から肝癌に至り、最終的には死を待つほかない。肝細胞上の C 型肝炎ウイルス受容体の同定研究は広く行われてきており、ヒト CD81、SR-BI (scavenger receptor class B type I) や claudin-1 が受容体の候補として同定されている。

しては、動物レベルでの基礎研究に加え、疫学的にC型肝炎の発症・悪化とCL1の発現パターンの関連解析を実施することにより評価を行うものであり、近未来的な臨床応用を強く目指したものである。我々は、平成20年度に実施した研究において、CL1と同様の立体構造を有する類縁体(CL4)を標的とした機能阻害剤(claudin binder; アンタゴニスト)の創出技術を活用し、CL4アンタゴニストの構造変異体ライブラリの構築およびCL1アンタゴニストスクリーニング系を構築した。さらに本年度は構築したCL4アンタゴニスト構造変異体の中からCL1 binderをスクリーニング、CL1結合特性を解析した。

## B. 研究方法

### 1) ペプチドライブラリを用いたCL1結合性ファージのパンニング

CL1発現バキュロウイルス(CL1-BV)を用いてペプチドライブラリを用いたファージライブラリー濃縮系の構築を試みた。CL1-BVを4°Cで一晩インキュベーションすることでイムノチューブに固相化した。翌日、BlockAce(0.4 g/10 mLを100%とする)で室温で2時間ブロッキング後、CL1-BVを固相化したイムノチューブにPh. D. -C7C™ Phage Display Library (NEBより購入)を添加し、洗浄後に残ったファージを増幅し回収する操作を3回繰り返し、Output/Input ratioを算出した。算出はパンニングで回収したファージ溶液(output phage) 10 μLを $10^{-3}$ - $10^{-6}$ 倍に2YT培地を用いて希釈した。同様に、パンニング操作前のファージライブラリ溶液(input phage)を $10^{-8}$ - $10^{-11}$ 倍に希釈した。希釈ファージ100 μLをTG1とそれぞれ混合後、37°C 1時間静置した。その後、2YTGA培地をさらに添加し、ペトリフィルムに播種し一晩37°Cで培養した。翌日コロニー数を計測することで求めた。

### 2) CL1結合性ファージのシーケンス解析

CL1-BVを用いたパンニング後、CL1結合性ファ

ージをモノクローン化し、シーケンスを解析した。

### 3) CL結合性解析

ELISA法によりClaudin (CL)への結合性を解析した。CL1-BVとCL4-BVを4°Cで一晩インキュベーションすることでELISAプレートに固相化した。固相化したCL1-BV、CL4-BVのELISAプレートに、ファージ( $1.0 \times 10^{11}$  CFU/ml)を添加して、HRP-conjugate anti M13 mAbを作用させてCL結合性を評価した。

## C. 研究結果

CL1-BVを固相化したイムノチューブにC7C peptide libraryを用いてパンニングを行った。結果、パンニングを行ったところ、1<sup>st</sup> roundから4<sup>th</sup> roundにかけてゆるやかにOutput/Input ratioが上昇した(Fig. 1)。

1<sup>st</sup> roundと4<sup>th</sup> roundのoutput phageの中から13クローンをピックアップしシーケンス解析したところ、11クローンが配列A、2クローンが配列Bを有していた(特許の関係でデータは示さず)。

さらに、Aファージ、BファージのCL結合性を解析したところ、CL1のみならずCL4への結合性も観察された(Fig. 2)。

## D. 考察

C7Cペプチドライブラリの中から、CL1結合性ファージを二つ取得した。当該ペプチドファージはCL4への結合性も有しており、CL4-BVを用いたスクリーニングで得られたクローンと同じ配列を有していたことから、AおよびB配列は広域CL binderとしての応用が期待される。

以上の結果を踏まえ、今後は得られたCL1 binderのCL結合性およびHCV感染阻害活性を解析すると同時に、CL1結合性に優れた新規クローンの探索を引き続き行う予定である。

## E. 結論

1. CL1-BV を用いたファージライブラリー濃縮系を作製した。
2. ペプチドライブラリーより、CL1 結合性ファージを取得した

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. Itoh A., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Kobayashi M., Tamesada M., Yagi K., Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on concanavalin a-induced liver injury. *Biol. Pharm. Bull.*, 32, 1215-1219, 2009.
2. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K., Histological analysis of 70-nm silica particles-induced chronic toxicity in mice. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72, 626-629, 2009.

3. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K., Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72, 496-501, 2009.

### G-2 学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### H-1 特許取得

なし

### H-2 実用新案登録

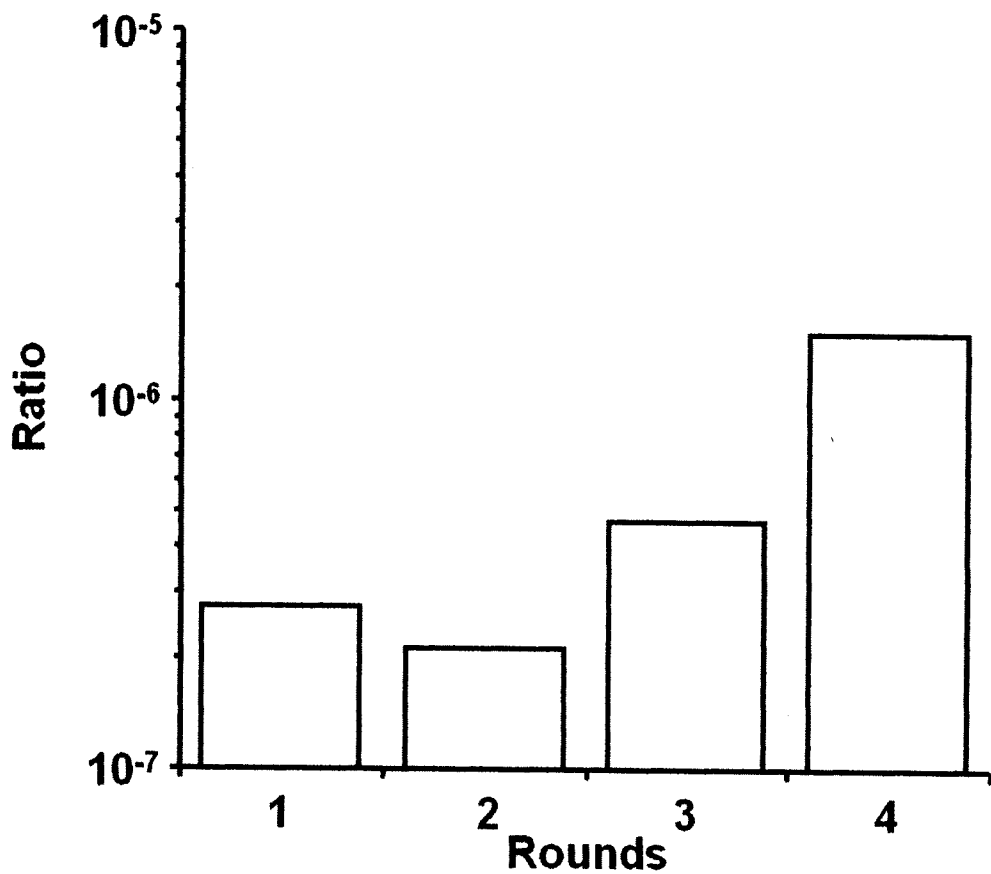
なし

### H-3 その他

なし

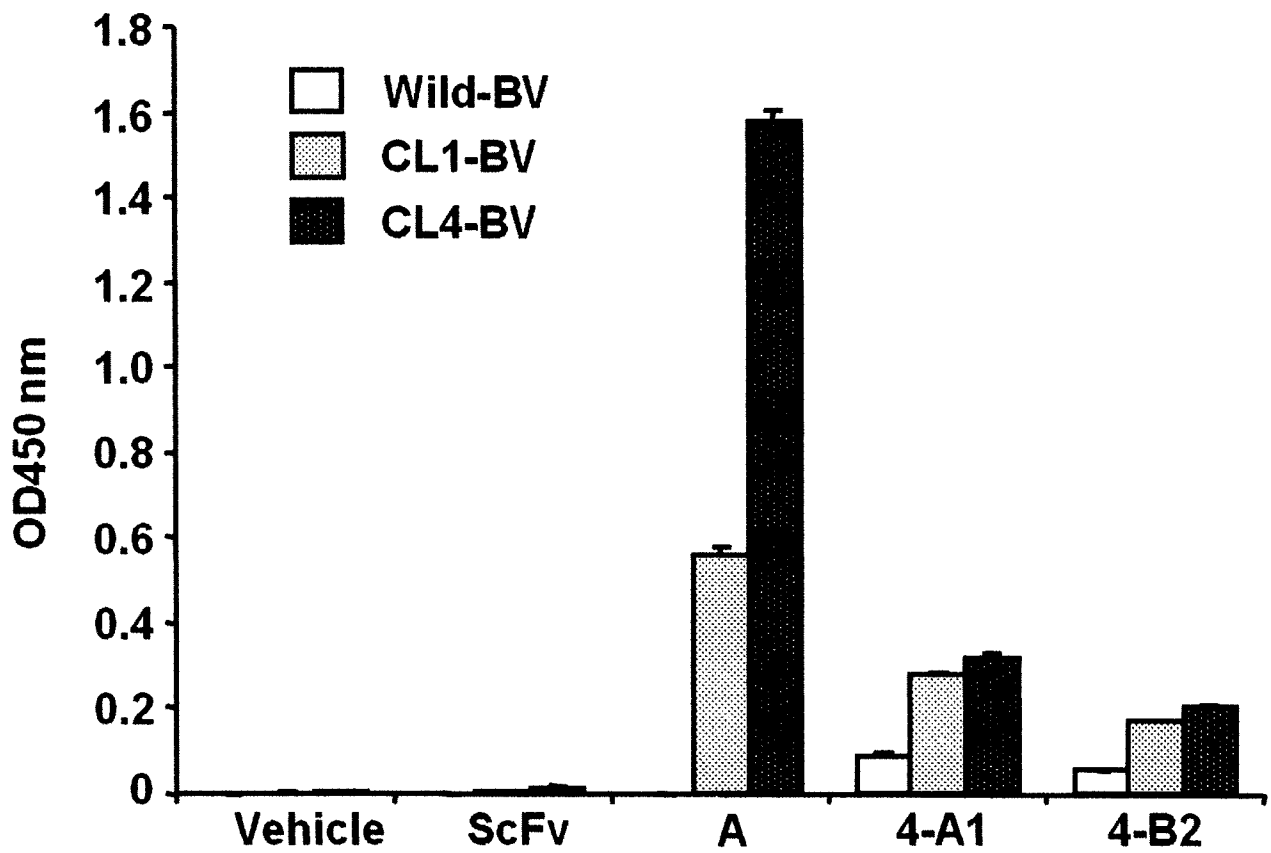
## I. 研究協力者

八木清仁(大阪大学大学院薬学研究科 教授)



**Figure 1 Enrichment of phages with affinity to CL1-BV.**

CL1-BVs coated on immunotubes were incubated with Ph. D.-C7C™ Phage Display Peptide Library at  $2 \times 10^{11}$  CFU titer (1<sup>st</sup> input phage). The phages bound to CL1-BV were recovered (1<sup>st</sup> output phage). The CL1-BV-binding phages were subjected to three additional cycles of the incubation and wash step, resulting in 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> output phage. The ratio of output phage to input phage titers was calculated.



**Figure 2 Interaction of the C7C phages with CL-displaying BV.** CL1-BV-bound phage clones were isolated from 4<sup>th</sup> output phages, and the interaction of the monoclonal phage with CL-displaying BV was examined by ELISA with HRP-anti-M13 Ab. Data are means  $\pm$  SD (n=3).



## C-CPE 構造変異体ライブラリの作製

分担研究者 角田 慎一 （独）医薬基盤研究所 プロジェクトリーダー

### 研究要旨

Claudin は細胞間隙の tight junction を構成する分子量 23 kDa の 4 回膜貫通蛋白質であり、claudin-1~24 の 24 種類の亜分子から成る claudin family を形成している。近年、claudin はバリア機能の本体としての役割のみならず、HCV の co-receptor として働くこと、または、多くの癌細胞でその発現がアップレギュレートされていることが報告されている。Claudin の細胞外領域に結合する分子は、ウェルシュ菌エンテロトキシン *Clostridium perfringens* enterotoxin の C 末断片 (C-CPE) が claudin-4 に結合する唯一の分子である。昨年度は、C-CPE を prototype として用いた CL-1 アンタゴニスト創出に資する C-CPE 構造変異体ライブラリを作製した。さらに、今年度は引き続き C-CPE 構造変異体ライブラリの作製を行い、さらに CL1 発現バキュロウイルス (CL1-BV) を用いたスクリーニング系の構築を試みた。

### A. 研究目的

Claudin は細胞間隙の tight junction を構成する分子量 23 kDa の 4 回膜貫通蛋白質であり、claudin-1~24 の 24 種類の亜分子から成る claudin family を形成している。この claudin family の発現には組織特異性が認められており、各組織によってバリア機能の本体を担う claudin の分子種がそれぞれ異なっている。近年、claudin はバリア機能の本体としての役割のみならず、HCV の co-receptor として働くこと、または、多くの癌細胞でその発現がアップレギュレートされていることが報告されている。Claudin の細胞外領域に結合する分子は、ウェルシュ菌エンテロトキシン *Clostridium perfringens* enterotoxin の C 末断片 (C-CPE) が claudin-4 に結合する分子として知られている。すなわち、claudin の細胞外領域を認識する抗体、または、claudin-4 以外の claudin に結合する分子の存在は皆無に等しい。本研究は、独自の CL-4 アンタゴニスト、C-CPE を用いた CL binder 技術と人工機能性蛋白質迅速創製技術を有効活用し、世界初

の『CL-1 を介した HCV 感染阻害法』を開発することを目的としている。昨年度は、C-CPE を prototype として用いた CL-1 アンタゴニスト創出に資する C-CPE 構造変異体ライブラリの作製した。今年度は、昨年度に引き続き C-CPE 構造変異体ライブラリを作製し、このライブラリより CL1 特異的結合性ファージとペプチドをスクリーニングするための CL1 発現バキュロウイルス (CL1-BV) を用いたスクリーニング系の構築を試みた。

### B. 研究方法

#### C. C-CPE 構造変異体ライブラリの作製

既に、アラニンスキャン解析により、アラニン置換に伴い C-CPE の CL-4 結合性が低下する 5 アミノ酸を同定していた。そこでまず、アミノ酸をランダムに 20 種類のアミノ酸に置換し、ライブラリの作製を試みた。方法はアミノ酸をコードする配列を全てのアミノ酸をコードし得るランダムな配列、NNS 配列 (N; A, T, G, C, S; G, C) に変換したプライマーを用いて PCR を行った。得ら

れた PCR 産物を PCR purification kit を用いて精製した後、Not I および Nco I でそれぞれ一晩ずつ 37 °C で反応させた。制限酵素処理を行った PCR 産物をあらかじめ Not I および Nco I で処理した pCANTAB ベースの phagemid vector である pY03 と 16 °C で一晩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 Sac I および Sph I で 37 °C で 2 時間処理後、PCR purification kit を用いて精製した。あらかじめ 2YT 培地で O.D. = 0.3-0.6 まで培養し、ミリ Q 水で洗浄後、10% グリセロール溶液で 50 mL に懸濁した大腸菌 TG1 に対して、精製したライゲーション産物 2 mL を添加し、Gene-purser II を用い、2.5 KV、0.25 mF、200 Ω 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、一部を 50 mg/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、一晩培養した。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、およびシーケンスの確認を行った。また、残りのサンプルは 50 mg/mL アンピシリン、2% グルコース含有 2YT プレートに播種し、一晩培養してグリセロールストックを作製した。

## 2. CL1-BV を用いたスクリーニング系の構築

Claudin-1 の遺伝子を T-Easy Vector に挿入した pGTCL4 を鋳型とし、KOD-plus-を用いて PCR を行い、得られた PCR 産物を精製後、制限酵素処理とライゲーション反応し、処理後精製を行い、シーケンス解析を行い、CL-1 をコードしたプラスミドを得た。さらに大腸菌にとランフォーメーション後に Bacmid を作製した。その後、培養を行い、得られた CL1-BV を用い免疫チューブおよび ELISA プレートに固相化することを確認した。

## C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

## D. 考察

### 1. C-CPE 構造変異体ライブラリの作製と CL1-BV の作製

作製したライブラリのシーケンス解析により、任意のクローンのアミノ酸配列を解析したところ、ほぼ全てのクローンで置換部位がランダムな配列へと変換されていた。得られたライブラリ 1 のサイズは  $3.2 \times 10^8$  CFU であり、理論値 ( $20^5 = 3.2 \times 10^6$  CFU) よりも大きかった。このことより、理論値を十分に網羅したライブラリの構築に成功した。次に別のライブラリのシーケンス解析結果したところ、上記と同様にほぼ全てのクローンで置換部位がランダムな配列へと変換されていた。得られたライブラリ 2 のサイズは  $1.6 \times 10^7$  CFU であった。以上より、2 種類の C-CPE 構造変異体ライブラリの作製に成功した。

また、作製した CL1-BV は免疫チューブおよび ELISA プレートに固相化することが可能であった。このことより、作製した CL1-BV を用い、ファージライブラリーおよびペプチドライブラリーより CL1 結合性を有するペプチドファージの取得が可能になったと考えられる。

## E. 結論

1. C-CPE の CL-4 結合性が変化するアミノ酸をランダムに 20 種類のアミノ酸に置換し、ライブラリの作製に成功した。
2. CL1 特異的結合性ファージとペプチドをスクリーニングするための CL1 発現バキュロウイルス (CL1-BV) を用いたスクリーニング系を構築した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. :

- Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library., *Pharmazie*, 64, 238-241, 2009.
2. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Crystallization and preliminary X-ray analysis of TNF-TNFR2 complex, *Acta Crystallogr.*, 65, 295-298, 2009.
  3. Mukai Y., Nakamura T., Yoshioka Y., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Taniai M., Ohta T., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata, Y., Tsutsumi, Y. : Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists., *J. Biochem.*, 146, 167-172, 2009.
  4. Nomura T., Abe Y., Kamada H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Novel protein engineering strategy for creating highly receptor-selective mutant TNFs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 388: 667-671, 2009.
  5. Shibata H., Yoshioka Y., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Taniai M., Ohta T., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. The treatment of established murine collagen-induced arthritis with a TNFR1-selective antagonistic mutant TNF. *Biomaterials*, 30: 6638-6647, 2009.
  6. Nomura T., Abe Y., Kamada H., Inoue M., Kawara T., Arita S., Furuya T., Minowa K., Yoshioka Y., Shibata H., Kayamuro H., Yamashita T., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology. *Pharmazie*, 65: 93-96, 2010.
- G-2 学会発表**
1. Tsunoda S., Abe Y., Nomura T., Kayamuro H., Shibata H., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis with a novel TNFR1-selective antagonistic mutant TNF. 12th International TNF Conference, April 2009, Madrid.
  2. Abe Y., Nomura T., Kayamuro H., Yoshioka Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Creation and X-ray structural analysis of TNFR1-selective mutant TNF with antagonistic activity. HUPD 8th Annual World Congress, 26-30 September, 2009, Toronto.
  3. Kawara T., Abe Y., Kamada H., Nomura T., Kayamuro H., Tsunoda S., Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K. Creation of mutant IFN-alpha8 with enhanced anti-HCV activity using phage display technique. 2009 Annual Meeting of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research (Tri-Society), 18-21 October, 2009, Lisbon.

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

**H-1 特許取得**

なし

**H-3 その他**

なし

**H-2 実用新案登録**

なし

## Claudin-1 binder の創製に関する研究

研究分担者 近藤 昌夫 大阪大学大学院 薬学研究科 准教授

### 研究要旨

本研究は、肝細胞等における C 型肝炎ウイルス(HCV)の感染受容体(claudin-1; CL-1)を創薬ターゲットとした初めての“C 型肝炎の画期的予防・治療薬”を、独自の基盤技術(claudin binder[アンタゴニスト]創出技術)にて創出しようとするものであり、我が国の国民の健康増進といった社会的側面のみならず、バイオ製薬メーカーの育成や我が国の知的財産の確保にも大きく貢献できるものである。また当該研究によって先駆けて開発された“新規抗 C 型肝炎薬”の有効性に関しては、動物レベルでの基礎研究に加え、疫学的に C 型肝炎の発症・悪化と CL-1 の発現パターンの連関解析を実施することにより評価を行うものであり、近未来的な臨床応用を強く目指したものである。

当該研究を申請者らが実施する際のアドバンテージ・独創性は、①世界で唯一 CL 結合分子である CL-4 アンタゴニストの機能解析を推進してきたこと、②受容体特性を変化させた構造変異体人工蛋白質の作製に習熟していること、③従来までの問題点を解決した独自の PEG 化インターフェロン  $\alpha$  を開発・評価し、当該研究で創出するアンタゴニストの効果を相乗的に高め得る方法論を有していること、④阪大病院、感染研、阪大微研との連携体制を整備できている点にある。

既に当研究グループでは、平成 20 年度に実施した研究において、CL-1 と同様の立体構造を有する類縁体(CL-4)を標的とした機能阻害剤(claudin binder; アンタゴニスト)の創出技術を活用し、CL-4 アンタゴニストの構造変異体ライブラリの構築および CL-1 アンタゴニストスクリーニング系を構築した。

本成果を基に、平成 21 年度は CL-4 アンタゴニスト構造変異体の中から CL-1 binder をスクリーニング、CL 結合特性解析を試みた。

### A. 研究目的

本研究は、最近新規同定された C 型肝炎ウイルス(HCV)受容体、claudin-1 (CL-1)に着目し、独自の CL binder[アンタゴニスト]創出技術を用いて HCV 感染阻害薬を開発すると共に、疫学的に C 型肝炎の発症・悪化と CL-1 の発現パターンの連関解析を行うことにより、近未来に臨床応用可能な C 型肝炎の画期的予防・治療薬の創製を試みるものであり、国民の健康増進、バイオ製薬メーカーの育成、我が国の知的財産の確保に大きく貢献できる。

現在までに、研究代表者磯田と分担者近藤は、C-CPE (CL-4 binder)の機能解析を行い、C-CPE の CL-4 結合残基を同定した。また、研究分担者角田は、ファージ表面提示法を利用した独自の人工機能性蛋白質迅速創出技術を用いて、インターフェロンの構造変異体アンタゴニストを作製している。当該申請課題は、C-CPE 機能解析の成果を基に C-CPE 構造変異体ライブラリを作製し、CL-4 構造類似体 CL-1 アンタゴニスト (CL-1 binder)の創出を試みるものであり、平成 20 年度は独自に改良したファージ表面提示法を活用

して C-CPE 構造変異体ライブラリを作製し、CL-1 蛋白質発現系を構築していた。

そこで平成 21 年度は、初年度に構築した CL-1 アンタゴニストスクリーニング系を有効活用し、CL-1 結合分子の創出を試みた。

## B. 研究方法

### B-1. CL-BV の作製

#### pFastBac-CL4 の作製

Claudin-4 の遺伝子を T-Easy Vector に挿入した pGTCL4 (神戸大学大学院医学研究科 古瀬幹夫博士より供与) を鋳型とし、KOD-plus-を用いて PCR を行った。なお、Forward primer として 5′-gctctagaatggattacaaggatgacgacgataagatggcgtctatggga ctacaggtcctgggaatctccttagca-3′ (the underline indicates *Xba*I site) を、Reverse primer として 5′-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3′ (the underline indicates *Kpn*I site) を用いた。得られた PCR 産物を PCR Purification Kit を用い精製後、*Xba*I および *Kpn*I を用い、37 °C にて一晚制限酵素処理した。あらかじめ *Xba*I および *Kpn*I 処理した pFastBac1 (東京大学先端科学技術研究センター 浜窪隆雄博士より供与) と T4 DNA ligase を用いて 16 °C にて一晚ライゲーション反応を行い、続いて *Xho*I を用いて制限酵素処理を行った。ライゲーション産物からプラスミドを精製し、インサートの確認およびシーケンス解析を行い、claudin-4 をコードしたプラスミド (pFastBac-CL4) を得た。

#### Bacmid の作製

pFastBac-mCL4 をヒートショック法にて大腸菌 DH10Bac (Invitrogen) にトランスフォーメーションし、50 µg/ml kanamycin, 7 µg/ml gentamicin, 10 µg/ml tetracycline を含み、2% X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside) 100 µl および 50 mM IPTG 100 µl を塗布した LB 培地プレートに播種し、37 °C で 24 時間培養した。任意の白コロニーをピックアップし、アルカリプレップにて大腸菌から bacmid を精製した。精製した bacmid に目的とする遺伝子が挿入されていること

を PCR 法にて確認した。なお、Forward primer として 5′-gttttcccagtcacgac-3′ を、Reverse primer として 5′-ggaaacagctatgacctag-3′ または 5′-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3′ を用いた。目的とする遺伝子の確認がとれた bacmid をヒートショック法にて大腸菌 DH5α にトランスフォーメーションし、50 µg/ml kanamycin を含む LB 培地 (LK) プレートに播種し、37 °C で一晚培養し、コロニーをピックアップ後、LK 培地 100 ml でさらに一晚培養した。大腸菌を回収し、QIAfilter™ plasmid Midi kit (QIAGEN) を用いて bacmid-mCL4 を精製した。

#### Budded baculovirus (CL4-BV) の作製

培養用 6 穴プレートに  $2 \times 10^6$  cells/well の濃度で Sf9 細胞 (Invitrogen) を播種し、室温で 1 時間静置した。静置中に tube A (cellfectin (Invitrogen) 6 µl、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 (Invitrogen) 100 µl) と tube B (bacmid-CL4 1 µg、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 µl) を用意し、tube A と tube B とをよく混和し、泡立てないようにゆっくりピペティングした後、室温で 30 分間放置した。1 時間静置することで接着させた Sf9 細胞を血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地で洗浄後、培地を除去し、tube A と tube B との混合溶液に血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 800 µl を加え、ウェルに全量 (1 ml) 添加し、プレートをビニールテープで密封して 5 時間、27 °C で培養した。その後、培地を除去し、血清と抗生物質を含む 2 ml の Grace's Insect 培地 (Invitrogen) に交換し、27 °C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を  $800 \times g$  で 10 分間遠心することで回収した (P1 ストックと称する)。続いて、 $2 \times 10^6$  cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに 200 ml 用意し、そこに P1 ストック 2 ml を加え、27 °C で 2 日間培養した。2 日後、培養上清を  $800 \times g$  で 10 分間遠心することで回収した (P2 ストックと称する)。

培養用 6 穴プレートに  $2 \times 10^6$  cells/well の濃度で Sf9 細胞を播種し、P2 ストックを 10, 100, 1,000 µl ずつ加え、27 °C で 3 日間培養した (全量 2 ml)。

3日後、800 × gで10分間遠心し、上清を回収した。沈殿物（細胞）には protease inhibitor (SIGMA) および 1% Triton-Xを含むPBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.15 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)で懸濁後、超音波処理で破碎し細胞可溶化液とした。培養上清および細胞可溶化液を用いて、Western blot 法にて目的とする蛋白質の発現を確認した。

2 × 10<sup>6</sup> cells/ml の Sf9 細胞をスピナーフラスコに用意し、発現確認のできた P2 ストックを適量加え、27 °C で 3 日間培養した。3 日後、培養上清を 800 × g で 10 分間遠心することで回収した。回収した培養上清を 10,000 × g で 25 分間さらに遠心した。得られた沈殿を PBS で懸濁後、800 × g で 10 分間遠心し、上清をさらに 10,000 × g で 25 分間遠心した。得られた沈殿を protease inhibitor を含む TBS 250 μl で懸濁し、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA)を用いて蛋白質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

#### CL4-BV の発現確認

蛋白質量として 5 μg を供し 15 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS で 5 回 洗浄し、T-TBS により 1/2000 に希釈した一次抗体: Mouse anti claudin-4 (ZYMED) と 2 時間反応させた。T-TBS で 5 回 洗浄し、T-TBS により 1/3000 に希釈した二次抗体: Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare

Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、暗室にて露光した X 線フィルム (KONICA MINOLTA MEDICAL&GRAPHIC, INC., Japan) を現像し、claudin-4 蛋白質の検出を行った。

#### B-2. BV ELISA

96 well ELISA plate (Greiner Bio-One GmbH, Germany) に WT-BV 及び CL4-BV を 0.5 μg/well で、4 °C、一晚固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、1.6% ブロックエース (DS PHARMA BIOMEDICAL) を用いて、室温で 2 時間ブロッキングした。BV をブロッキング後、PBS で 3 回洗浄し、蛋白質量として 0.002, 0.02, 0.2 μg/well の条件で各種蛋白質を添加し、室温で 2 時間反応させた。その後、PBST で 3 回洗浄し、1.6% ブロックエースで 3,000 倍に希釈した Mouse anti His-tag mAb (Zymed) を加え、室温にて 2 時間反応させた。2 時間後、0.05% Tween20 (MP Biomedicals, LLC) 含有 PBS (PBST) で 5 回洗浄し、0.4% ブロックエースで 2,000 倍に希釈した Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated を添加し、室温にて 1 時間反応させた。PBST で 5 回洗浄した後、TMB solution (Thermo Scientific) を加え、20 分間反応させ、2 M 硫酸を加え反応を停止させた。マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。

#### B-3. CL binder スクリーニング条件の設定 ファージ作製

ScFv または C-CPE をコードした cDNA を組み込んだ pY03' ファージミドベクター (医薬基盤研究所堤康央博士より供与) を用いて形質転換した大腸菌 TG1 のグリセロールストックを 37 °C、一晚培養し、翌日 100 μg/ml ampicilin sodium および終濃度 2% D-glucose (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した 2YT (2-YT BROTH, Invitrogen, Co., Ltd) (2YTGA) 培地 25 ml に OD<sub>600</sub> = 0.05-0.1 となるように添加し、37 °C で OD<sub>600</sub> = 0.4-0.6 まで培養した。次に M13K07 helper phage を OD × 8 × 10<sup>8</sup> (cells/mL) × 25 (mL) ÷ 10<sup>11</sup> (CFU/mL) となるよう

に添加し、37 °C、30 分間静置した。さらに 37 °C、30 分間 250 rpm で培養した後に、1000 × *g* で 10 分間 遠心し、ペレットを回収した。100 μg/ml ampicillin sodium, 50 μg/mL kanamycin (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) を添加した 2YT (2YTAK) 培地 50 mL にペレットを懸濁し、37 °C、250 rpm で振盪培養した。6 時間後 1000 × *g* で 10 分間遠心分離し、その上清を回収し、さらに 15660 × *g*、15 分間の遠心分離を行なった。上清 40 mL に対して PEG-NaCl (20% PEG6000, Wako Pure Chemicals Ind., Osaka, Japan, 2.5 M NaCl, NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) 溶液 10 mL を添加し、転倒混和後 4 °C、1 時間静置した。次に再び 15660 × *g* で 10 分間遠心分離し、沈殿したペレットを NTE buffer (0.1 M NaCl, 10mM Tris, SIGMA aldrich Japan Co., Ltd, 1 mM EDTA-2Na, NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) 1 mL に溶解した後に 0.02 μm フィルター (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) を用いて濾過し、この溶液をファージ溶液とした。

#### ファージを用いた BV ELISA

96 well ELISA plate に 0.5 μg/50 μL TBS/well で、WT-BV および mCL4-BV を 4 °C で一晩静置することで固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、1.6% Block Ace (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で常温 2 時間ブロッキングした。また、上記方法で作製したファージを 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup>, 10<sup>11</sup> CFU に調整したものを、終濃度 0.32% Block Ace で 4 °C 1 時間ブロッキングした。BV をブロッキング後、PBS で 3 回洗浄し、同じくブロッキングしたファージを 50 μL/well で添加し、常温で 2 時間作用させた。その後、PBST で 3 回洗浄し、anti M13-HRP mAb (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を 20000 倍希釈した溶液を 100 μL 添加して常温で 1 時間作用させた。PBST で 5 回洗浄した後、TMB 試薬 (Thermo Scientific, Rockford, IL) 100 μL を添加し、約 10 分間反応後、2M 硫酸 100 μL を加えて反応を停止した。その後マイクロプレートリーダーを用いて、主波長 450 nm、副波長 595 nm で吸光度を測定した。

#### mCL4-BV による CL4 結合性ファージのスクリーニング条件検討

イムノチューブ (Thermo Scientific, Rockford, IL) に各濃度で CL4-BV を 4 °C で一晩静置することで固相化した。翌日、BV を PBS で 3 回洗浄し、各濃度の Block Ace で常温 2 時間ブロッキングした。また、ファージ溶液 (scFv:C-CPE=10:2) 50 μL と各濃度の Block Ace 50 μL を混合し、4 °C で 1 時間ブロッキングした。BV を PBS で 3 回洗浄し、ファージ溶液を 100 μL 添加し、常温で 2 時間静置した。その後、PBST で各条件の下洗浄し、100 mM HCl (Wako Pure Chemicals Ind., Osaka, Japan) 100 μL 添加、4 °C、10 分間作用させた後に mCL4-BV に結合しているファージを解離させた。1 M Tris-HCl 50 μL を加えて HCl を中和し、ファージ溶液を回収した。次に回収したファージ溶液 (output phage) 10 μL を 10<sup>-3</sup>-10<sup>-6</sup> 倍に 2YT 培地を用いて希釈した。同様に、添加前のファージ溶液 (input phage) を 10<sup>-8</sup>-10<sup>-11</sup> 倍に希釈した。希釈ファージ 100 μL を大腸菌 TG1 (OD<sub>600</sub> = 0.4-0.6 に調整) 300 μL とそれぞれ混合後、37 °C 1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600 μL をさらに添加し、ペトリフィルム (3M Microbiology Products, co., USA.) に播種し一晩 37 °C で培養した。翌日コロニーを milliQ 30 μL にピックアップし、95 °C、5 分間加熱した。14,000 rpm、5 分間遠心した後の上清を回収し、primer として pY03'-S-1 (5'-caggaaacagctatgac-3')、pY03'-AS-1 (5'-gtaaatgaatttctgtatgagg-3') を用い、KOD-plus (TOYOBO, Co., Ltd, Sience, USA) により PCR を行なった。PCR 産物を 2% agarose gel にアプライし、40 分後の泳動像を観察した。

#### B-3. CL binder のスクリーニング

##### C-CPE mutant ライブラリの作製

C-CPE の遺伝子を pET-16b (Novagen Inc., USA) に挿入した pET-H<sub>10</sub>PER (大阪大学微生物病研究所堀口安彦博士より供与) を鋳型とし、C 末端側 6 箇所 を NNS 配列に置換した reverse primer (特許の関係で配列は示さず) と forward primer (sait1, 5'-catgccatggccgatagaaaaagaat



ccttgatttagctgctt-3' including *Nco* I site) を用いて、KOD-plus (TOYOBO, Co., Ltd, Sience, USA) により PCR を行なった。PCR 産物を PCR Purification Kit (50) (QIAGEN Sience, ISA) で精製し、さらにエタノール沈殿により濃縮した。この PCR 産物を *Nco* I (New England Biolabs., Inc.) を用いて 37 °C で 20 時間処理し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なった。次に *Not* I (New England Biolabs., Inc.) で 37 °C で 20 時間処理し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なった。同様に *Nco* I、*Not* I で 2 時間処理し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により精製した pY03'-scFv (医薬基盤研究所堤康央博士より供与) と T4 ligase (Promega, Corp., USA) を用いて 16 °C にて一晚ライゲーション反応を行なった。得られたライゲーション産物をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿した後、*Sac* I、*Sph* I (New England Biolabs., Inc.) を用いて 37 °C で 2 時間処理した。その後、ライゲーション産物を PCR Purification Kit (50) (QIAGEN Sience, ISA) で精製し、さらにエタノール沈殿により濃縮した。ライゲーション産物を大腸菌 TG1 にエレクトロポレーションすることにより形質導入した。その後、100 µg/ml ampicillin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) と終濃度 2% D-glucose (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地 (LAG 培地) プレートに播種した。一晚培養後大腸菌のコロニーを回収した。この大腸菌溶液を終濃度 10%グリセロール (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) と混合し、-80 °C で保存し、C-CPE mutant DNA ライブラリとした。

#### エレクトロポレーション

TG1 をグリセロールストックから 2YT 培地 2 mL で一晚培養した。翌日、2YT 培地 200 mL に OD<sub>600</sub> = 0.05-0.1 となるように植え継ぎ、37 °C で OD<sub>600</sub> = 0.4-0.6 まで培養した。その後、4 °C 3000 rpm 10 分間遠心分離し、上清を捨て、milliQ を加え懸濁し、さらに 4 °C 3000 rpm 10 分間遠心分離し上清を捨てた。この洗浄作業を三回繰り返した後、TG1

を終濃度 10%グリセロールを含む SP 水 (Fuso, Co., Ltd, Osaka) で懸濁した。TG1 溶液 50 µL とライゲーション産物 1 µL (10 セット) を氷上で 15 分間なじませた後、混合液をキュベットに移し Gene pulser<sup>®</sup> (Bio-Rad Laboratories, Inc., C.A., USA) を用いて電気パルスを与えた (Ec1)。その後、2YTG 培地 950 µL に移し、37 °C で 1 時間振とう培養した。Titer check 用として、この大腸菌溶液のうち 50 µL を 100 µg/ml ampicillin sodium を添加した 2YTG (2YTGA) 培地で 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> 倍希釈し、ペトリフィルムに播き、37 °C で一晚培養後、コロニー数を計測することでライブラリのサイズを求めた。また、残り的大腸菌溶液を約 300 µL /プレート一枚となるように LAG 培地プレート 30 枚に播種した。翌日 2 mL LAG 培地/プレート 1 枚でセルスクレーパーを用いて大腸菌を回収し、終濃度 10%グリセロールを添加し-80 °C で保存した。

#### C-CPE mutant DNA ライブラリの多様性確認

エレクトロポレーションの際に播種したペトリフィルムからコロニーをランダムにピックアップし、LA 培地 3 mL で一晚培養した。その後、QIAprep<sup>®</sup> Spin miniprep Kit (150) (QIAGEN Science, USA) を用いて plasmid を精製した。精製した plasmid を、primer として pY03'-AS-1 を用い、ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) でサンプル調整後、Sequence ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で配列を解析した。

#### C-CPE 誘導体ファージライブラリの CL4-BV に対するパンニング

CL4-BV を 0.5 µg/100 µL in TBS でイムノチューブに添加し、4 °C で一晚静置することで固相化した。翌日、PBS でイムノチューブを 3 回洗浄した後、4% Block Ace 350 µL 添加し、常温で 2 時間ブロッキングした。また、ファージライブラリ 50 µL と 8% Block Ace 50 µL を混合し、4 °C で 1 時間ブロッキングした。ブロッキング後のイムノチューブを PBS で 3 回洗浄した後、ブロッキングしたファージライブラリ液

を 100  $\mu\text{L}$  添加し、常温で 2 時間静置した。その後、PBST、PBS でそれぞれ各 15 回ずつ洗浄し、100 mM HCl を 100  $\mu\text{L}$  添加、4  $^{\circ}\text{C}$ 、10 分間作用させることで mCL4-BV に結合しているファージを解離させた。1 M Tris-HCl 50  $\mu\text{L}$  を加えて HCl を中和し、ファージ溶液を回収した。ファージ溶液 100  $\mu\text{L}$  を大腸菌 TG1 ( $\text{OD}_{600} = 0.4-0.6$  に調整) 300  $\mu\text{L}$  と混合し、37  $^{\circ}\text{C}$  1 時間静置することでファージを感染させた。その後、LAG 培地プレート 2 枚に播種し一晚培養した。翌日 LAG 培地プレートから TG1 を、セルスクレーパーを用いて 2YTGA 培地で回収し、終濃度 10% のグリセロールと混合した後、-80  $^{\circ}\text{C}$  に保存した。さらに、冷凍保存した TG1 からファージを作製し、上記の作業を繰り返すことで 2nd、3rd パンニングを行なった。

#### パンニングの ratio 計算

パンニングで回収したファージ溶液 (output phage) 10  $\mu\text{L}$  を  $10^{-3}-10^{-6}$  倍に 2YT 培地を用いて希釈した。同様に、パンニング操作前のファージライブラリ溶液 (input phage) を  $10^{-8}-10^{-11}$  倍に希釈した。希釈ファージ 100  $\mu\text{L}$  を TG1 ( $\text{OD}_{600} = 0.4-0.6$  に調整) 300  $\mu\text{L}$  とそれぞれ混合後、37  $^{\circ}\text{C}$  1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600  $\mu\text{L}$  をさらに添加し、ペトリフィルムに播種し一晚 37  $^{\circ}\text{C}$  で培養した。翌日コロニー数を計測することで titer を算出し、パンニング ratio (output/input) を求めた。

#### C-CPE 変異体モノクローン化ファージの作製

パンニング後のファージを感染させた TG1 のグリセロールストックを希釈し、LAG 培地プレートに播種、37  $^{\circ}\text{C}$  で一晚培養した。播種した LAG 培地プレートからコロニーをピックアップし、96 well plate (IWAKIGLASS, Co., Ltd, Japan) 2YTGA 培地 100  $\mu\text{L}$  で、37  $^{\circ}\text{C}$  一晚培養した。その際、同時に C-CPE 提示ファージ感染 TG1 と scFv 提示ファージ感染 TG1 のグリセロールストックも同様に 96 well plate で培養した。翌日、ディープウェル (Greiner Bio-One GmbH, Germany) 2YTGA 500  $\mu\text{L}$  に前培養大腸菌 10  $\mu\text{L}$  ずつ植え継ぎ、 $\text{OD}_{600} = 0.3\sim 0.6$  まで

10000 rpm 37  $^{\circ}\text{C}$  で培養後、M13K07 helper phage を添加した。37  $^{\circ}\text{C}$  1 時間静置した後、2500 rpm 15 分間遠心分離し、上清を除去、2YTAK 培地 1 mL/well を添加して 10000 rpm 25  $^{\circ}\text{C}$  で一晚培養した。翌日 2500 rpm 15 分間遠心分離した後、上清を回収し、これをモノクローン化ファージ溶液とした。

なお前培養のため 96 well plate で培養した大腸菌 TG1 のうち、植え継ぎに使用しなかった大腸菌は終濃度 10% でグリセロールを添加し、-80  $^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### B-4. CL-1 binder の作製

##### C-CPE mutant 発現 plasmid の作製

目的の C-CPE mutant 遺伝子がコードされている pY03'-C-CPE mutant を鋳型とし、forward primer として yama8、reverse primer として sait26、および KOD-plus を用いて、PCR により C-CPE mutant 配列を増幅した。PCR 産物を 2% agarose gel で電気泳動した後、GENECLEAN<sup>®</sup> II KIT (FUNAKOSHI, Co., Ltd, Japan) を用いて精製した。精製した PCR 産物を *Bam* HI (New England Biolabs., Inc.) を用いて 37  $^{\circ}\text{C}$  で 20 時間処理し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なった。次に *Nde* I (New England Biolabs., Inc.) で 37  $^{\circ}\text{C}$  20 時間処理し、再びフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行なった。同様に *Nde* I および *Bam* HI で 2 時間処理した pET-16b と T4 ligase を用いて 16  $^{\circ}\text{C}$  にて一晚ライゲーション反応を行なった。得られたライゲーション産物をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿した後、*Xho* I (New England Biolabs., Inc.) を用いて 37  $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間処理した。ライゲーション産物と大腸菌 DH5 $\alpha$  (TOYOBO, Co., Ltd, Japan) を氷上で 10 分間なじませた後、42  $^{\circ}\text{C}$  で 40 秒間ヒートショックを行い、氷上で 2 分間静置した。その後、SOC 培地 (TOYOBO, Co., Ltd, Japan) を添加し 37  $^{\circ}\text{C}$  にて 40 分間培養した後、LA 培地プレートに播き一晚培養した。翌日、1 コロニーずつ LA 培地 3 mL に植菌し一晚振盪培養した後、アルカリプレ

ップにより大腸菌から plasmid を精製した。Plasmid を *Xho*I で 2 時間処理した後、1% agarose gel で電気泳動して PCR 産物が挿入されていることを確認した。PCR 産物挿入が確認できた大腸菌を再び LA 培地 3 mL で一晩培養し、QIAprep<sup>®</sup> Spin miniprep Kit (150) を用いて plasmid を精製した。精製した plasmid を、primer として T7 terminator を用い、ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit でサンプル調整後、Sequence ABI PRISM 310 Genetic Analyzer で配列を解析した。目的の遺伝子配列と一致したものを変異型 C-CPE 発現 plasmid とした。

#### C-CPE mutant の発現誘導条件の検討

C-CPE mutant 発現 plasmid 1  $\mu$ L を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) 10  $\mu$ L に加え、氷上で 30 分間静置し、42 °C で 40 秒間ヒートショックを行い、氷上で 2 分間静置した。その後、SOC 培地を添加し 37 °C にて 40 分間培養した後、LA 培地プレートに播き一晩培養した。1 コロニーを LA 培地 3 mL で 37 °C、一晩振盪培養した。翌日 LA 培地を 2 mL ずつ 6 本に分注し、50  $\mu$ L ずつ前培養した大腸菌液を加え 37 °C で 2 時間振盪培養した。その後、isopropyl- $\beta$ -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, Wako Pure Chemicals Inc., Japan) を終濃度 0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.8, 1.0 mM となるように添加し 37 °C で 3 時間振盪培養した。10000 rpm 1 分間遠心分離することで大腸菌を回収後、200  $\mu$ L の 1 $\times$  SDS buffer (62.5 mM Tris-HCl, 5% 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) に懸濁し、氷冷しながら超音波処理を行い、大腸菌を破碎した。95 °C、5 分間で加熱処理後、14000 rpm 15 分間遠心分離し、その上清をサンプルとした。15% polyacrilamide gel を用いて 0.03 A/枚で電気泳動を行い、milliQ で洗浄後、coomassie brilliant blue (CBB, Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で染色した。MilliQ で洗浄した後、C-CPE mutant 蛋白質が最も多く産生されている IPTG 濃度を蛋白質の誘導条件とした。

#### C-CPE mutant の可溶化条件の検討

C-CPE mutant 発現 plasmid 1  $\mu$ L を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) 10  $\mu$ L に加え、氷上で 30 分間静置し、42 °C で 40 秒間ヒートショックを行い、氷上で 2 分間静置した。その後、SOC 培地を添加し 37 °C にて 40 分間培養した後、LA 培地プレートに播き一晩培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 100 mL に植菌し、37 °C で一晩振盪培養した (少量培養)。翌日 TA 培地 (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 500 mL に大腸菌培養液を 50 mL 植え継ぎ、37 °C で 2 時間振盪培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し、さらに 37 °C で 3 時間振盪培養した (大量培養)。10000 rpm、2 分間で大腸菌を回収した。500 mL の大腸菌培養液のうち 100 mL を可溶化条件の検討に用い、400 mL は溶出条件検討に用いた。まず、100 mL 分の大腸菌に bufferA (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 400 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM phenylmethane sulfonyl fluoride, 1 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol) 1 mL を加え、氷冷しながら超音波処理 (40 秒間を 3 回) を行なった。14000 rpm、15 分間遠心分離した後、上清を回収し、沈殿に 2% TritonX-100 含有 bufferA を 1 mL を加え超音波処理を行った。遠心分離後、沈殿に 8 M Urea 含有 bufferA を 1 mL 加え超音波処理をした。遠心分離後、上清を回収し、沈殿に bufferA を 1 mL 加え超音波処理により懸濁した。それぞれの溶液画分 20  $\mu$ L に 4 $\times$  SDS buffer を 6.7  $\mu$ L 加え、95 °C、5 分間加熱しサンプルを調製した。15% polyacrilamide gel を用いて 0.03 A/枚で電気泳動を行い、milliQ で洗浄後、CBB で染色した。MilliQ で洗浄した後、C-CPE mutant 蛋白質が最も多く可溶化した画分の buffer を可溶化 buffer に決定した。

#### C-CPE mutant の溶出条件の検討

可溶化条件検討で集菌した 400 mL culture 分の大腸菌に bufferA 4mL を加え、氷冷しながら超音波処理 (40 秒間で 3 回) を行なった。14000 rpm、15 分間遠心分離を行い、上清を回収した

(大腸菌溶解液)。あらかじめ 6 M guanidine/EDTA 5 mL、milliQ 10 mL、0.1 M NiSO<sub>4</sub> 500 μL、bufferA 10 mL で平衡化しておいた HiTrap Chelating HP column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) に大腸菌溶解液を流し C-CPE mutant を吸着させた。BufferA を 15 mL 流した後、100, 200, 400, 600, 800, 1000 mM imidazole (Sigma Aldrich Co., USA) 溶液を 5 mL ずつ流し、溶出液を 1 mL ずつ分取した。それぞれの溶出液 20 μL に 4×SDS buffer を 6.7 μL 加え、95 °C、5 分間加熱しサンプルを調製した。15 % polyacrilamide gel を用いて 0.03 A/枚で電気泳動を行い、milliQ で洗浄後、coomassie brilliant blue (CBB, Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で染色した。MilliQ で洗浄した後、C-CPE mutant を洗浄、溶出する際の imidazole 濃度を決定した。

#### C-CPE mutant の buffer 置換

Buffer を PBS に置換するために PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いてゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行なった。予め PD-10 column に 30 mL の PBS を流して平衡化しておき、HisTrap™ Kit で得た溶出液を 1 mL 流し、その後 500 μL ずつ PBS を流し溶出液を分取した。次に BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、buffer 置換した C-CPE mutant 蛋白質の濃度を求め、残りの溶液を -80 °C で保存した。

#### CBB 染色による C-CPE mutant の発現確認

上記の操作により得た、PBS に溶解した C-CPE mutant 蛋白質を 333 μg/ml に調整した。その溶液 20 μl に 4×SDS を 6.7 μl を加え、95 °C で 5 分間加熱しサンプルとした。サンプルは 20 μl (蛋白質量として 5 μg) アプライした。一方分子量マーカーとして Broad Range (BIO-RAD Laboratories, Inc., USA) を用いた。15% polyacrylamide gel を用いて 20 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB で 1 時間染色し milliQ で洗浄した後、15 kDa 付近に存在する

C-CPE mutant 蛋白質を確認した。

### C. 研究結果

#### C-1. CL-BV の作製

CL4 の遺伝子を T-Easy vector に挿入した pGTCL-4 を鋳型とし、制限酵素サイト (*Xba* I/*Kpn* I) を付加したプライマーを用いて DNA 鎖を増幅した。増幅した配列を pFastBac に組み込んだ後、DH5α にトランスフォーメーションした。シーケンス確認後、CL4 の遺伝子配列と一致したものを pFastBac-CL4 とし、これを DH10Bac と相同組換えさせ bacmid をえた。

培養用 6 ウェルプレートに Sf9 細胞を播種し、cellfectin を用いて CL4-Bacmid をトランスフェクションした。培養後の上清を Sf9 細胞に感染させて高力価の BV を生成する過程を繰り返し、TBS 溶液に懸濁させた CL4-BV を得た。

WT-BV と CL4-BV を供した Western Blot による CL4 の発現解析を行った結果、目的の位置 (23 kDa) にバンドが確認された。なお、コントロールとして CL4 発現 L (CL4/L) 細胞を用いた (Fig. 1B)。

C-CPE の受容体結合領域である C 末側 30 アミノ酸を欠損させた C-CPE289 および 16 アミノ酸を欠損させた C-CPE303 では CL4 との結合性が消失していたことから C-CPE の C 末側 16 アミノ酸領域が CL4 への結合に影響を与えることが示唆されている。そこで、C-CPE および C-CPE303 と CL4-BV の相互作用を ELISA 法により解析することで CL4-BV が立体構造を保持した CL4 を提示しているかどうかを検討した。

C-CPE は CL4-BV とのみ結合性を有し、WT-BV とは結合しなかった (Fig. 1B)。さらに mCL4-BV と C-CPE<sub>303</sub> に相互作用は観察されなかった (Fig. 1C)。このことから C-CPE と CL4-BV は CL4 結合領域 C 末 16 アミノ酸を介して相互作用しており、CL-BV は機能及び立体構造を保持した CL を提示しているものと推察され、CL binder スクリーニング系に利用できると考えられる。また CL 蛋白質は疎水性が高く精製蛋白質を得ることが困