

201030040A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 磯田 勝広

平成23(2011)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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 磯田 勝広

平成23(2011)年 3月

## 平成22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	----- 11
近藤 昌夫	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 28
V. 研究成果の刊行物・別刷	----- 33

# 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 scFv ライブラリを用いて CL-1 binder のスクリーニングを行い、CL-1 に結合性を示す scFv ファージクローンから得たタンパク質の CL-1 への結合性を解析した。

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

## 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。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

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。平成21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。しかし、CL-1 binderのC型肝炎ウイルス阻害性は観察されなかった。今年度は、新たに一本鎖抗体（scFv）ライブラリーを構築し、CL-1に結合性を有すファージクローンを単離し、得られたscFv蛋白質のCL-1への結合性を解析した。

## B. 研究方法

### scFv蛋白質のELISA

96 well ELISA plate (Greiner Bio-One GmbH, Germany) に WT-BV 及び mCL-BV を 0.5  $\mu\text{g}/\text{well}$  で、4  $^{\circ}\text{C}$ 、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  $\mu\text{g}/\text{well}$  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、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 試薬 (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。

### L細胞

CL1 発現 L 細胞 (CL1/L 細胞: 京都大学大学院医学研究科分子細胞情報学 月田承一郎博士から供与) は、10% Fetal Bovine Serum (FBS, JRH Bioscience Inc., Kansas, USA), 20 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2 mM L-glutamine を含む EAGLE's MEM 培地 (NISSUI PHARMACEUTICAL CO., Ltd., Tokyo, Japan) に G418 (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を終濃度 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように添加した培地を用いて、37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下で培養した。

### CL1/L細胞におけるCL1発現確認

CL1 発現 L 細胞を氷冷 PBS (-) 1 ml により培養ディッシュからセルスクレーパーによって剥がし、細胞を回収した。氷冷 PBS (-) 1 ml を加え細胞を懸濁させ、4  $^{\circ}\text{C}$ 、3,000 rpm で 3 分間遠心分離を行い、細胞を洗浄した。さらにこの操作を 3 回繰り返した。遠心分離後、上清を取り除き lysis buffer (1% Triton X-100, 1% protease inhibitor cocktail 含有 PBS (-)) を加え、氷冷しながら超音波処理を 20 秒間、3 回を行い、4  $^{\circ}\text{C}$ 、15,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を回収し細胞溶解液を作製した。細胞溶解液に 4  $\times$  SDS buffer を加え 5 分間加熱し、泳動用サンプルとした。15% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE 後、TRANS-BLOTR SD SEMI-DRY TRANSEFR CELL によりゲル中のタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に転写した。転写後、PVDF 膜を 5% スキムミルク/TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸して、室温で 2 時間振とうし、ブロッキング操作を行った。TBS-T で 5 回洗浄後、抗 CL1 抗体と 2 時間反応させた。TBS-T で洗浄後、HRP 標識した 2 次抗体と 1 時間反応させた。検出には、ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, UK) を用い露光した X 線フィルム (KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC INC., TOKYO, JAPAN) を現像した。

### scFv蛋白質の FACS 解析

CL1 発現 L 細胞  $1 \times 10^5$  cells/well となるよう 1,000 rpm、2 分で遠心し調製した細胞に対して PBS または scFv 蛋白質を 10  $\mu$ g/100  $\mu$ l/sample となるよう添加、vortex した後、1 時間反応させた。1,000 rpm 2 分で遠心し、0.2% BSA-PBS-0.1%  $\text{NaN}_3$  を加えて 3 回洗浄し、mouse 抗 His-tag 抗体を 0.5  $\mu$ l/sample となるよう添加、vortex した後、さらに 1 時間反応させた。1,000 rpm 2 分で遠心後、0.2% BSA-PBS-0.1%  $\text{NaN}_3$  を加えて 3 回洗浄し、Goat-anti mouse IgG(H+L)-FITC を 500 倍希釈となるよう 30 分間遮光条件下で作用させた。1,000 rpm、2 分で遠心し調製した細胞のペレットに 0.2% BSA-PBS-0.1%  $\text{NaN}_3$  を加えて 3 回洗浄し 0.2% BSA-PBS-0.1%  $\text{NaN}_3$  200  $\mu$ l に溶解させたものを PI 2.5  $\mu$ l/300  $\mu$ l 0.2% BSA-PBS-0.1%  $\text{NaN}_3$  に対して添加、染色することで死細胞を染色・除去後、FACS Calibur により解析した。

### C. 研究結果

研究結果は D 項に併せて記載。

### D. 考察

#### CL1 結合性解析

scFv 蛋白質の CL1 結合性を CL1/L 細胞を用いた FACS 解析により検討した (Fig.1)。結果、ライブラリーより、得られたいずれの蛋白質も CL1 結合性が認められた。

### E. 結論

1. scFv ライブラリーから得られた scFv 蛋白質は CL-1 への結合性を有していた。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### G-1 論文発表

1. Itoh A. Itoh A., Isoda K., Kondoh M., Kawase M., Watari A., Kobayashi M., Tamesada M., Yagi K., 2010. Hepatoprotective effect of syringic acid and vanillic acid on CCl<sub>4</sub>-induced liver injury., *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 983-987.
2. Yagi K, Kawase M, Isoda K, Kondoh M. 2010. Development of novel culture system for regulation of hepatocyte function., *Yakugaku Zasshi.*, 130, 537-543.

#### G-2 学会発表

1. 清水芳実、磯田勝広、永井優子、油布朋子、大野まき、手塚雅勝、石田功：ナノポリスチレン粒子と薬物・化学物質の相互作用に関する検討。、フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー、東京、2010 年 9 月。
2. 清水芳実、磯田勝広、手塚絵梨子、羽澤一雄、林利彦、守隆夫、手塚雅勝、石田功：粒径によるナノポリスチレンの薬物相互作用の解析、日本薬学会 第 131 年会、静岡、2011 年 3 月。
3. 手塚絵梨子、磯田勝広、清水芳実、羽澤一雄、矢野眞吾、土屋静子、手塚雅勝、石田功：粒子径 30nm と 50nm のナノシリカの化学物質・薬物相互作用に関する検討。、日本薬学会 第 131 年会、静岡、2011 年 3 月。

### 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**

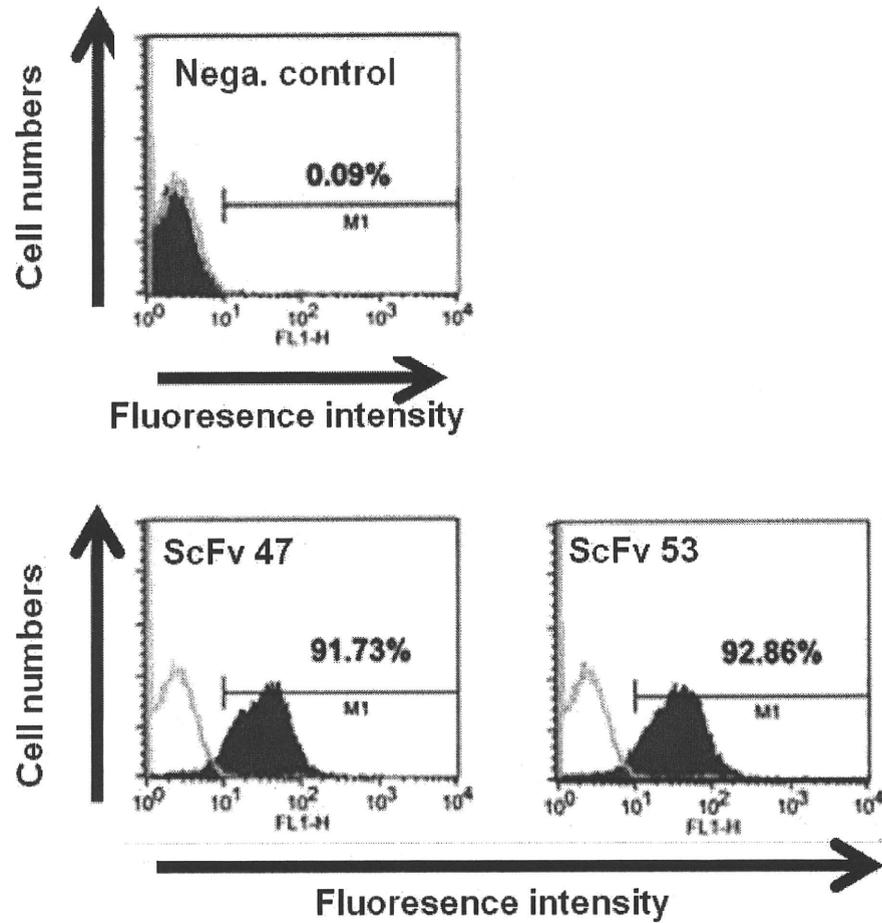
なし

**I. 研究協力者**

八木清仁(大阪大学大学院薬学研究科 教授)

**H-3 その他**

なし



**Figure.1 Interaction of scFv proteins with CL1/L cells.**  
 CL1/L cells were incubated with the scFv, followed by FACS analysis using FITC-labeled antibody

## 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。本年度は、Claudin-3 欠損マウスから単利した脾臓より、一本鎖抗体ライブラリー (scFv) を作製した。

### C. 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。平成 20 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。平成 21 年度は、C-CPE 構造変異体ライブラリを作製し、このライブラリーより 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した。今年度は Claudin-3 欠損マウスから単利した脾臓より、一本鎖抗体ライブラリー (scFv) を作製した。

### D. 研究方法

#### scFv ファージライブラリの作製

マウスをエーテル麻酔し、脾臓を摘出し、TRIzol reagent (Invitrogen) に溶解させ total RNA を得た。total RNA から mRNA Purification kit (GE Health Care) を用いて mRNA を精製し、cDNA 合成に供した。cDNA 合成は mRNA 60  $\mu$ l と SuperScript  $\beta$  First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用いた RT-PCR により行った。次に cDNA 4  $\mu$ L を鋳型として forward primer set 2  $\mu$ l、reverse primer set 2  $\mu$ l、PCR buffer 5  $\mu$ l、dNTP 5  $\mu$ l、MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、

KOD-plus 1  $\mu$ lの割合で混合したものをアニーリング温度 50°C で 1 分間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 35 サイクルの PCR 反応に供し、それぞれ VH 鎖、VL 鎖の cDNA を得た。この PCR 産物を PCR purification kit で精製し、次の PCR による VH、VL の連結、増幅 (assembly PCR) に供した。VH 鎖 cDNA を 6  $\mu$ l、VL 鎖 cDNA を 2  $\mu$ l、*Not*I サイトを有する Y15 primer (5'-ggccagcttggagcctttttttggagattttcaacgtgaaaaattttatttcgcaattccttagttgttccttctatgcgcccccagccggccatggcc-3')、*Nco*I サイトを有する Y16 primer (5'-ttagtaaatgaattttctgtatgaggtttgctaaacaactttcaacagtctatgcggcacgcggttccacggatccggatacggcaccggcgcacctgcccgc-3')、PCR buffer 5  $\mu$ l、dNTP 5  $\mu$ l、MgSO<sub>4</sub> 2  $\mu$ l、KOD-plus 1  $\mu$ l の割合で混合したものをアニーリング温度 65°C で 1 分間、伸長反応 68°C で 1 分間に設定した 18 サイクルの条件に設定し assembly PCR を行った。PCR 産物を PCR purification kit を用いて精製し、scFv 遺伝子とした。scFv 遺伝子を *Nco*I、*Not*I で 37 °C、20 時間処理し、切り出し精製を行った。同様に *Nco*I、*Not*I で 2 h 処理し、切り出し精製した pY03' を 1  $\mu$ l、scFv 遺伝子を 4  $\mu$ l 用いて T4 ligase (Promega, Corp., USA) を用いて 16 °C にて一晩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 PCR Purification Kit 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導入した。その後、100  $\mu$ g/ml ampicilin 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。一晩培養後大腸菌のコロニーをセルスクレーパーにより LAG 培地で回収した。この大腸菌溶液を終濃度 10% となるようにグリセロール (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) を添加して -80 °C で保存し、scFv ライブラリとした。

### ライブラリサイズの測定

TG1 をグリセロールストックから 2YT (2-YT BROTH, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 2 ml で一晩培

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% のグリセロールを含む SP 水 (Fuso, Co., Ltd, Osaka) で懸濁した。TG1 溶液 50  $\mu$ l とライゲーション産物 1  $\mu$ l (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。その後、終濃度 2% D-glucose を添加した 2YT (2YTG) 培地 950  $\mu$ l 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  $\mu$ l を 100  $\mu$ g/ml ampicilin 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 (3M Microbiology Products, co., USA.) に播き、37 °C で一晩培養後、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。

### scFv ファージ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 で一晩培養した。その後、QIAprep<sup>®</sup> Spin miniprep Kit (QIAGEN Science, USA) を用いて plasmid を精製した。精製した plasmid を鋳型として、primer として pY03'-AS-1 (5'-gtaaataatgaattttctgtatgagg-3') を用い、ABI PRISM BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) で PCR を行いサンプル調整後、Sequence ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で配列を解析した。

### C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

## D. 考察

### scFv ライブラリの作製

抗体産生確認後のマウスから回収した脾臓より total RNA を抽出後、mRNA の精製、既に当研究グループにおいて確立した反応条件を基に cDNA を合成した。さらに、cDNA を鋳型に重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変領域 (VL) を PCR で増幅し、ファージミドベクター-pY03<sup>2</sup>に導入、エレクトロポレーションを行い、 $2.5 \times 10^5$  CFU の titer を有するライブラリの作製に成功した。ファージをランダムにピッキングアップし、モノクローン化したファージクローンのシーケンスを解析したところ、約半数のクローンで scFv 提示ファージであることが確認され、いずれも異なる配列を有していた (Table 1)。

通常、免疫ライブラリは  $10^5 \sim 10^6$  CFU 程度のライブラリサイズを有していること、CDR3 領域の多様性が保たれていたことから、本ライブラリは CL1 binder のスクリーニングソースとして利用可能であると考えられた。そこで、本ライブラリを分担研究者近藤が実施する CL1 結合分子のスクリーニングに供した。

## E. 結論

1. CL-3 欠損マウスより  $2.5 \times 10^5$  CFU の titer を有する scFv ライブラリーの構築に成功した。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1 論文発表

1. Nagano Yoshioka Y., Watanabe H., Morishige T., Yao X., Ikemizu S., Nagao C., Ahmad S., Mizuguchi K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N. and Nakagawa S. Creation of lysine-deficient mutant lymphotoxin- $\alpha$  with receptor selectivity by using a phage display system. *Biomaterials*. 31, 1935-1943,

2010.

2. Yamashita T., Utoguchi N., Suzuki R., Nagano K., Tsunoda S., Tsutsumi Y. and Maruyama K. [Development of anti-tumor blood vessel antibodies by phage display method]. *Yakugaku Zasshi*. 130, 479-485, 2010.
3. Shibata H., Abe Y., Yoshioka Y., Nomura T., Sato M., Kayamuro H., Kawara T., Arita S., Furuya T., Nagano K., Yoshikawa T., Kamada H., Tsunoda S. and Tsutsumi Y. Generation of mouse macrophages expressing membrane-bound TNF variants with selectivity for TNFR1 or TNFR2. *Cytokine*. 50, 75-83, 2010.
4. 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. and Tsutsumi Y. Creation of an improved mutant TNF with TNFR1-selectivity and antagonistic activity by phage display technology. *Pharmazie*. 65, 93-96, 2010.
5. Nagano K., Imai S., Nakagawa S., Tsunoda S. and Tsutsumi Y. [From disease proteomics to biomarker development-establishment of antibody proteomics technology and exploration of cancer-related biomarkers]. *Yakugaku Zasshi*. 130, 487-492, 2010.
6. Mukai Y., Nakamura T., Yoshikawa M., Yoshioka Y., Tsunoda S., Nakagawa S., Yamagata Y. and Tsutsumi Y. Solution of the Structure of the TNF-TNFR2 Complex. *Sci Signal*. 3, ra83, 2010.
7. Morishige T., Yoshioka Y., Tanabe A., Yao

- X., Mizuguchi H., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N. and Nakagawa S. Comparison of the anti-tumor activity of native, secreted, and membrane-bound LIGHT in mouse tumor models. *Int Immunopharmacol.* 10, 26-33, 2010. なし
8. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N. and Nakagawa S. Creation of a LIGHT mutant with the capacity to evade the decoy receptor for cancer therapy. *Biomaterials.* 31, 3357-3363, 2010. H-3 その他
9. Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N. and Nakagawa S. Creation of a lysine-deficient LIGHT mutant with the capacity for site-specific PEGylation and low affinity for a decoy receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 393, 888-893, 2010. なし
10. Kayamuro H., Abe Y., Yoshioka Y., Katayama K., Yoshida T., Yamashita K., Yoshikawa T., Kawai Y., Mayumi T., Hiroi T., Itoh N., Nagano K., Kamada H., Tsunoda S. and Tsutsumi Y. Mutant TNF- $\alpha$ , mTNF-K90R, is a novel candidate adjuvant for a mucosal vaccine against HIV. *Pharmazie.* 65, 254-256, 2010.

## G-2 学会発表

## 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

**Table .1 Amino acid sequences of ScFv phage clones in the library .**

<b>VL</b>	<b>FR1</b>	<b>CDR1</b>	<b>FR2</b>	<b>CDR2</b>	<b>FR3</b>	<b>CDR3</b>	<b>FR4</b>	<b>(G4S)3</b>
<b>Clone 1</b>	DIQMTQSQKFMS TSVGDRVSVTC	KASQNVGTNVA	WYQQKPG QSPKTVIY	SASYRYS	GVPDRFTGSGSGTDFLTIS NVQSEDLADYFC	LQHWNYPLT	FGAGTKLEIKR	GGGSGGGGSG GGGS
<b>Clone 2</b>	DVLMTQSPASLA VSLGQRATIAC	RASESVDSYGN	WYQQKPG QPPKLLIY	RASILKS	GVPARFSGSGSRTDFLTID PVEADDAATYYC	QQNNEDPLT	FGAGTKLEIKR	GGGSGGGGSG GGGS
<b>Clone 3</b>	DIVMTQSHKFMMS TSVGDRVRITC	KASQDVSTAVA	WYHQKPG QSPKLLIY	STSYRYT	GVPDRFTGSGSGTDFFTIS SVQAEDLAVYYC	QQHYTTPLT	FGAGTKLEIKR	GGGSGGGGSG GGGS
<b>Clone 4</b>	DIVLQSQSHKFMST SVGDRVSVTC	KASQNV DANVA	WYQQKPGQ SPKALVY	SASFRNS	GVPDRFTGSGSGTDFLTIS NVQSEDLAEYFC	QQYNSYPLT	FGAGTKLEIKR	GGGSGGGGSG GGGS
<b>Clone 5</b>	DIVMTQSQKFMS TSVGDRVSVTC	KASQNVRTAVA	WYQQKPG QSPKALYI	LASN RHT	GVPDRFTGSGSGTDFLTIS NVQSEDLADYFC	LQHWNYPLT	FGAGTKLEIKR	GGGSGGGGSG GGGS
<b>VH</b>	<b>FR1</b>	<b>CDR1</b>	<b>FR2</b>	<b>CDR2</b>	<b>FR3</b>	<b>CDR3</b>	<b>FR4</b>	
<b>Clone 1</b>	QVQLQSGAELVKPGASV KMSCKASGYTFT	SYWIT	WVKQRPG QGLEWIG	DIYPGSGSTN YNEKFKS	KATLTVDTSSSTAYMQLSS LTSSEDAVYFCAR	NYGGYFDY	WGQGTTLVSS	
<b>Clone 2</b>	QVHVKQSGPELVKPGASV KLSCKASGYTFR	SYGIS	WVKQRTG QGLEWIG	EIYPGSGSTN YNEKFKG	KATLTADKSSSTAYMELRSL TSEDAVYFCAR	TVVADWYFDV	WGQGTTLVSS	
<b>Clone 3</b>	EVQLQSGPELVKPGASV KMSCRASGYTFT	SYWIT	WVKQRPG QGLEWIG	DIYPGSGSTN YNEKFKG	KATLTVDTSSSTAYMELHR LTSSEDAVYFCGG	GFDY	WGQGT LQSSS	
<b>Clone 4</b>	DVHRMESGAELVKPGASV KISCKASGYAFS	SYWMN	WVKQRPG KGLEWIG	QIYPGDGDTN YNGKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSS LTSSEDAVYFCAR	GATAYY YAMDY	WGQGT VTVSS	
<b>Clone 5</b>	QVQLQESGPELVKPGASV KISCKASGYAFS	NYWMN	WVKQRPGK LEWIG	QIYPGDGDTN YNGKFKG	KATLTADKSSSTAYMQLSSL TSEDAVYFCAR	ERDGY YAMDY	WGQGT VTVSA	

## 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。さらに、平成 21 年度に、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。本年度は、CL-1 binder の HCV 感染阻害活性を解析すると同時に CL 欠損マウスを用いた CL-1 binder 創製系の構築を試みた。

### E. 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、平成 21 年度に本系を用いて CL-1 結合分子の創出を試み、CL-1 結合性を有する C-CPE 変異体の創製に成功した。本年度は、新規 CL-1 結合分子につ

いて HCV 感染阻害活性を解析した。

さらに、出芽バキュロウイルス発現系および CL 欠損マウスを用いた CL binder 創製系の構築も試みた。

## F. 研究方法

### B-1. C-CPEm19 の作製

#### 蛋白質の作製

C-CPE 発現 plasmid pET-CPE03、C-CPEm19 発現 plasmid pET-C-CPEm19 を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) に transformation し、LB (Invitrogen, Co, LTD)/Ampicillin (LA) plate 上、37 °C一晩培養した。翌日コロニーを 10 個程度ピックアップし LA 液体培地 400 mlにて 37 °Cで一晩振とう培養した。翌日 TERRIFIC BROTH (Invitrogen, Co, LTD)/Ampicillin (TA)液体培地 4 l に培養液を移し、37 °Cで 3 時間振とう培養後、1 M IPTG を 1120  $\mu$ l 添加し、さらに 3 時間振とう培養した。その後 4 °C、4,000 rpm で 5 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-80 °Cで凍結保存した。

凍結保存した大腸菌を氷上で溶解し、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) に溶解し、氷冷しながら超音波処理を 40 秒間、3 回行い大腸菌を破碎した後、4 °C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収した。その後、上清より C-CPE, C-CPEm19 を AKTA prime (GE Healthcare Bio-Sciences AB, U.K.) を用いて精製した。あらかじめ 6 M guanidine/EDTA 10 ml、0.1 M NiSO<sub>4</sub> 50  $\mu$ l、MilliQ 5 ml、bufferA 10 ml を順に流し平衡化しておいた HiTrap Chelating HP (GE Healthcare Bio-Sciences AB, U.K.) に上清をアプライし、C-CPE 蛋白質をカラムに吸着させた。Buffer A を 15 ml 流した後、100 mM imidazole を含有する BufferA により大腸菌由来タンパク質の非特異的吸着を除き、imidazole 濃度を 40 mM/ml の速度で 500 mM まで増加させつつ溶出液を 1 ml ずつ分取した。各画分 20  $\mu$ l に 4 $\times$  SDS buffer を 6.67  $\mu$ l 加え 5 分間沸騰水にて加熱して泳動用サンプルに供

した。15% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、CBB 染色し、蛋白質精製を確認した。

C-CPE, C-CPEm19 溶液のバッファーを PBS (-) に置換するために PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, U.K.) を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行った。あらかじめ PD-10 column に PBS (-) を 30 ml 流して平衡化しておき、HiTrap Chelating HP より得られた溶出画分を 1 ml 流し、その後 PBS (-) を流して溶出液を 500  $\mu$ l ずつ分取した。次にウシ血清アルブミンを標準液として BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (PIERCE Chemical Co., Rockford, IL., USA) を用いて、バッファー置換して得た C-CPE N 末欠損変異体の濃度を 560 nm における吸光度から測定した。

サンプル 20  $\mu$ l に 4 $\times$  SDS buffer を 6.67  $\mu$ l 加えて 5 分間加熱し、泳動用サンプルとした。15%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE 電気泳動を行った。電気泳動後のポリアクリルアミドゲルを MilliQ 水で洗浄後、Bio-Safe<sup>TM</sup> Coomassie (Bio-Rad Laboratories, Inc., C.A., U.S.A.) を用いて coomassie brilliant blue (C.B.B.) 染色を行い、MilliQ 水で脱色した。

### B-2. HCVpv 感染阻害実験

Huh 7 細胞を 96 well plate (Becton, Dickinson and Company, USA) 2 $\times$ 10<sup>4</sup> cells /well で播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養した。培地を除去した後に、C-CPE もしくは C-CPE mutant 19 を最終濃度 0, 10, 50, 100  $\mu$ g/ml となるように 50  $\mu$ l/well で添加した。24 時間細胞に作用させた後、HCV pseudovirus (HCVpv) を 50  $\mu$ l/well で添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 2 時間培養した。その後、ウイルスを含む培地を除去し、新しい DMEM 培地を 50  $\mu$ l/well で添加後、37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養した。その後、Steady-GloR Luciferase Assay Substrate (Promega Co., Ltd.) 10  $\mu$ l/well を添加し 5 分間室温で振盪後、蛍光強度を測定した。

### B-3. CL-BV の作製

#### pFastBac-CL の作製

各種 CL 発現プラスミドを鋳型とした PCR により CL 遺伝子をクローニング後、PCR Purification Kit を用い精製 CL 遺伝子断片を精製した。本断片を *Xba* I および *Hind* III を用い、37 °C にて一晩制限酵素処理した。あらかじめ *Xba* I および *Hind* III 処理した pFastBac1 と T4 DNA ligase を用いて 16 °C にて一晩ライゲーション反応を行い、インサート確認およびシーケンス解析により pFastBac-CL の作製を確認した。

#### Bacmid の作製

pFastBac-CL 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 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。次に、bacmid を大腸菌 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、37 °C で一晩培養し、コロニーをピックアップ後、LK 培地 100 ml で一晩培養した。大腸菌を回収し、QIAfilter™ plasmid Midi kit (QIAGEN) を用いて bacmid-CL を精製した。

#### Budded baculovirus (CL-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-CL 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、 $800 \times g$  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。

$2 \times 10^6$  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  $800 \times g$  で 10 分間遠心することで回収した。回収した培養上清を  $10,000 \times g$  で 25 分間さらに遠心した。得られた沈殿を PBS で懸濁後、 $800 \times g$  で 10 分間遠心し、上清をさらに  $10,000 \times g$  で 25 分間遠心した。得られた沈殿を PBS 200 µl で懸濁し、BCA™ Protein Assay Kit 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。

### B-4. scFv ライブラリの作製

#### CL ノックアウトマウス

神戸大学医学系研究科古瀬幹夫博士より供与し

ていただいた CL ノックアウトマウスを実験に供した。

### CL-BV の免疫

CL ノックアウトマウスに初回 CL-BV 1 mg を PERTUSSIS TOXIN A PROTMER (LIST BIOLOGICAL Inc.) 100 ng と共に皮下投与した。2 週間後から週 1 回、3 週間にわたり用時調整した CL-BV 500 µg を皮下投与し、最終免疫から 1 週間後の 35 日目に血液を眼底採血により回収し、3000×g で 10 分間遠心し、上清を血清として採取し、PBS にて 10 倍に希釈して -20 °C で保存した。

### 抗 CL 抗体産生確認

CL 発現 BV (5 µg) を SDS-PAGE 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。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 anti CL antibody (ZYMED)、T-TBS により 1/10000 に希釈した血清と 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 HRP 標識した二次抗体 (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、CL 蛋白質の検出を行った。抗 CL 抗体の産生が観察されたマウスから脾臓を回収し、分担者角田による scFv ライブラリ作製に供した。

### B-5. CL binder のスクリーニング

#### scFv ライブラリ提示ファージ作製

scFv をコードした cDNA を組み込んだ pY03' ファ

ージドベクターを用いて形質転換した TG1 のグリセロールストックを 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 (Invitrogen, Co., Ltd.) 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 ampicilin, 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 0.45 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。

### scFv ファージライブラリの CL1-BV に対するパンニング

CL1-BV を 0.5 µg/100 µl TBS でイムノチューブに添加し、4 °C で一晩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 (DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) 350 µl を添加し、常温で 2 時間静置しブロッキングした。また、scFv 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溶液を 100 µl 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  $\mu$ l 添加、4  $^{\circ}$ C、10 分間作用させることで CL1-BV に結合しているファージを解離させた。1 M Tris-HCl 50  $\mu$ 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  $\mu$ l を大腸菌 TG1 ( $OD_{600} = 0.4-0.6$  に調整) 300  $\mu$ l と混合し、37  $^{\circ}$ 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 枚に播種し一晩培養した。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% となるようにグリセロールと混合した後、-80  $^{\circ}$ 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 ratio の算出

パンニングで回収したファージ溶液 (output phage) 10  $\mu$ 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  $\mu$ l を大腸菌 TG1 ( $OD_{600} = 0.4-0.6$  に調整) 300  $\mu$ l とそれぞれ混合後、37  $^{\circ}$ C、1 時間静置した。その後、2YTGA 培地 600  $\mu$ l をさらに添加し、クローンディスクに播種し 37  $^{\circ}$ C で一晩培養した。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。

#### モノクローン化 scFv 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  $^{\circ}$ C で一晩培養した。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) に 2YTGA 培地 100  $\mu$ l で、37  $^{\circ}$ C 一晩培養した。翌日、ディープウェル (Greiner Bio-One GmbH, Germany) に添加した 2YT-GA 500  $\mu$ l に前培養した大腸菌を 10  $\mu$ l ずつ植え継ぎ、 $OD_{600} = 0.3-0.6$  まで 10000 rpm、37  $^{\circ}$ C で培養後、M13K07 helper phage (Invitrogen) を添

加した。37  $^{\circ}$ 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 を添加して 10000 rpm、25  $^{\circ}$ C で一晩培養した。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。

尚、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  $^{\circ}$ C で保存した。

#### scFv ファージを用いた BV ELISA

96 well ELISA plate に 0.5  $\mu$ g/50  $\mu$ l TBS/well で、WT-BV、CL1-BV を 4  $^{\circ}$ 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 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モノクローン化ファージを 1/100 倍希釈し、終濃度 0.32% Block Ace で 4  $^{\circ}$ 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モノクローンファージを 50  $\mu$ l /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、5,000 倍希釈した anti M13-HRP mAb (Invitrogen) 溶液を 100  $\mu$ l 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 100  $\mu$ l を添加し、約 10 分間反応後、2M  $H_2SO_4$  100  $\mu$ l を加えて反応を停止した。その後、450 nm で吸光度を測定した。

#### scFv ファージの sequence 解析

モノクローン化ファージを作製した際に保存した大腸菌 TG1 のグリセロールストックから、LA 培地 3 mL で各モノクローン化ファージ感染大腸菌を 37  $^{\circ}$ C で一晩培養した。その後、Qia prep <sup>®</sup> Spin miniprep Kit (QIAGEN Science, USA) を用いて plasmid を精製し、sequence 解析を行った。

#### B-6. scFv 蛋白質の精製および結合性評価

##### pET-MCS の組み換え

まず、his-tag 融合蛋白質作製用プラスミド pET-16b (Novagen Inc., W.I., U.S.A) にマルチクローニングサイト (MCS) を組み込み、pET-MCS を

作製した。MCS は合成オリゴ forward oligonucleotide (5'-TATGCTAACCATGGGCTAGCCCCGGGCGGCCG CG *Nde* I binding site is under lined) と reverse oligonucleotide (5'-GATCCGCGGCCGCCCCGGGCTAGCCCATGGT TAGCA -3', *Bam*HI binding site is under lined) を 100  $\mu$ M (in TE buffer) となるように調製し、TE buffer 30  $\mu$ l に 15  $\mu$ l ずつ加えて 10 分間沸騰後、室温にて冷却することで、hybridize した DNA 断片を調整した。pET-16b を *Nde* I、*Bam*HI (New England Biolabs. Inc., M.A., U.S.A) にて 37  $^{\circ}$ C、90 分間制限酵素処理した後に、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。制限酵素処理を行ったベクターと MCS 断片とを T4 DNA ligase (New England Biolabs. Inc., M.A., U.S.A) を用いて、16  $^{\circ}$ 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フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿した後に、*Xho*I を用いて 37  $^{\circ}$ Cで 2 時間処理した。

次に大腸菌 DH5 $\alpha$  (TOYOBO CO., Osaka, Japan) にライゲーション産物を加え、氷上で 30 分放置しなじめさせた後、42  $^{\circ}$ Cで 30 秒間 heat shock を行い、氷上に 3 分間設置した。200  $\mu$ l の SOC 培地を加えた後 37  $^{\circ}$ Cで 50 分間培養し、100  $\mu$ g/ml ampicilin (SIGMA Aldrich Japan Co., Ltd.) を添加した LB 培地 (LA 培地) プレートに培養液を播き、37  $^{\circ}$ Cで一晩培養した。滅菌済みチューブに LA 培地 3 ml を分注し、コロニーをピックアップし、一晩振とう培養した。培養液を 1.5 ml チューブに回収し、5,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を取り除き大腸菌を回収した。QIA prep<sup>®</sup> Spin Mini prep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてプラスミド精製を行い、50  $\mu$ L の超純水で溶出した。次に、ベクターに MCS が組み込まれたことを確認するため、精製したプラスミドを *Xho*I 処理後、1%アガロースゲルを用いて電気泳動し、*Xho*I により切断されなかったものを、MCS が組み込まれたサンプルであると判断した。MCS の組み込みが確認されたサンプルについては GeneDesign, Inc. にシーケンス解

析を依頼し、目的の遺伝子配列と一致したもの (pET-MCS) を得た。

#### pET-scFv の組み換え

pET-MCS と pY03'-scFv を *Nco* I、*Not* I にて 37  $^{\circ}$ C、90 分間制限酵素処理した後に、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。制限酵素処理を行ったベクターと scFv 断片を T4 DNA ligase (New England Biolabs. Inc., M.A., U.S.A) を用いて、16  $^{\circ}$ 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フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿した後に、*Xho*I を用いて 37  $^{\circ}$ Cで 2 時間処理した。次に大腸菌 DH5 $\alpha$  (TOYOBO CO., Osaka, Japan) にライゲーション産物を加え、氷上で 30 分静置後、42  $^{\circ}$ Cで 30 秒間 heat shock を行い、さらに氷上に 3 分間静置した。200  $\mu$ l の SOC 培地を加えた後 37  $^{\circ}$ Cで 50 分間培養し、LA 培地プレートに培養液を播き、37  $^{\circ}$ Cで一晩培養した。滅菌済みチューブに LA 培地 3 ml を分注し、コロニーをピックアップし、一晩振とう培養した。培養液を 1.5 ml チューブに回収、5,000 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を取り除き大腸菌を回収した。QIA prep<sup>®</sup> Spin Mini prep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてプラスミド精製を行い、50  $\mu$ l の超純水で溶出した。次に、ベクターに scFv が組み込まれたことを確認するため、精製したプラスミドを *Xho* I 処理後、1%アガロースゲルを用いて電気泳動し、*Xho* I により切断されなかったものを、scFv が組み込まれたサンプルであると判断した。scFv の組み込みが確認されたサンプルについては GeneDesign, Inc. にシーケンス解析を依頼し、目的の遺伝子配列と一致したもの (pET-scFv) を得た。

#### scFv の発現誘導条件の検討

scFv 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  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ 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 を 6 本に分注し、50 µl 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-β-D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, Wako Pure Chemicals Inc., Japan) を終濃度 0, 0.25, 0.5, 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 µl の 1 × 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。SDS-PAGE 後、CBB 染色により、scFv 蛋白質を検出した結果を踏まえ、IPTG 誘導条件を設定した。

#### scFv 蛋白質の精製

scFv 発現 plasmid 1 µl を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) 10 µl 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 2YTA 培地(2YT BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 3 ml に植菌し、37 °C で一晩振盪培養した。翌日 2YTA 培地 30 ml に大腸菌培養液を 0.75 ml 植え継ぎ、37 °C で 2 時間振盪培養した。その後、IPTG を添加し、さらに 37 °C で 3 時間振盪培養後、大腸菌を回収した。回収した大腸菌のペレットに TES buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、40 mM EDTA (pH8.0)、250 mM NaCl) 18 ml を添加しソニケーションにより完全に懸濁した。その後 lysozyme (Wako Pure Chemicals Ind., Osaka, Japan) (5 mg/ml in TES buffer) 0.84 ml を加え常温で 1 時間振盪培養した。5 M NaCl 2.4 ml を添加して激しく振った後に 25% TritonX-100 (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) を 2.4 ml 添加し常温で 1 時間振盪培養した。12,000 rpm、30 分遠心して得られたペレットに対して、18 ml の TES

buffer を添加しソニケーションして完全に懸濁し 5 M NaCl 2.4 ml 添加して激しく振盪した後に 25% TritonX-100 2.4 ml を添加し常温で 1 時間振盪培養して 12,000 rpm 30 分遠心する操作を 2 回繰り返した。次に得られたペレットに対して 21 ml の TES buffer を添加しソニケーションして完全に懸濁し 12,000 rpm 30 分遠心する操作を 3 回繰り返した。得られたペレットの重量を測定し、ペレット 1.8 g に対して 10 ml の GTE (6 M guanidine-HCl, 100 mM Tris HCl (pH8.0)、2 mM EDTA (pH8.0))を加えてソニケーションにより懸濁したものを常温で 2 時間反応後、12,000 rpm、40 分遠心して上清を回収しタンパク定量を行った。タンパク質 100 mg に対して DTE を 100 mg 添加し常温で 4 時間静置し Refolding buffer (1 M L-arginine-HCl (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto)、100 mM Tris HCl (pH8.0)、2 mM EDTA (pH8.0)) に参加型グルタチオン (NACALAI TESQUE, Inc., Kyoto) を 551 mg/l となるよう調製した溶液で 100 倍希釈し 4 °C 30 時間静置した。その後透析チューブ(スペクトラポア RC 透析チューブポア 6 MW15000, Wako Pure Chemicals Ind., Osaka, Japan) に溶液を添加し 20 倍量の dialysis buffer (140 mM Urea, 20 mM Tris-HCl) 中、4 °C で透析を行い、12 時間ごとに計 3 回 dialysis buffer を交換した。その後得られた溶液を 0.45 µm ポアの PVDF フィルターでろ過し、AKTA prime plus (GE healthcare) を用いてあらかじめニッケルを吸着させた Hitrap chelating HP™ に流すことで scFv をカラムに吸着させた。その後、100 mM imidazole で非特異的に吸着した蛋白質を洗い流し、さらに imidazole 濃度を徐々に 500 mM まで上昇させることにより scFv をカラムより遊離させ、280 nm の吸光度に上昇が見られたフラクションを scFv 溶液として分取し、buffer 置換に供した。

#### scFv 蛋白質の buffer 置換

Buffer を PBS に置換するために PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いたゲル濾過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