

201030040B

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

研究代表者 磯田 勝広

平成23(2011)年 3月

平成20年度～平成22年度 総合研究報告書 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	----- 17
角田 慎一	
III. 分担研究報告書	
Claudin-1 binder の創製に関する研究	----- 23
近藤 昌夫	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 49
V. 研究成果の刊行物・別刷	----- 57

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20年度～平成22年度 総合研究報告書

研究代表者 磯田 勝広

平成23(2011)年 3月

# 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 薬学部薬学科 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な貢献が期待できる。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する。HCV 治療では耐性ウイルスの出現が大きな課題となっており、インターフェロン、リバビリン療法では高ウイルスキャリアに対する著効率は著しく低い。現在までに HCV 感染受容体として CD81、SR-BI、LDL-R 等が同定され、これら宿主因子を標的とした HCV 感染阻害法の構築が試みられてきたものの、未だ有効な阻害法は確立されていない。本研究で開発する CL-1 binder は、既存の感染阻害法との組み合わせにより耐性ウイルス出現の抑制、高ウイルスキャリアに対する治療効果が期待され、国民の健康増進、我が国の医療費の抑制、バイオ製薬メーカーの育成、我が国の知的財産の確保等に多大な貢献が期待される。

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。申請者らは、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。また、創製した CL-1 アンタゴニストの CL-1 結合性を解析し、新規 C 型肝炎治療薬の開発を試みた。またペプチドライブラリーおよび scFv ライブラリーを構築し、CL への結合性を解析した。これらのことについて報告書をまとめる。

## B. 研究方法

### 1. 各種キメラ claudin 発現細胞の作製

構築したベクター-pGTCL1、pSKCL3、pGTCL4、または pGTCL5、pGTCL7 を template にして mPCR 法によりキメラ cDNA を調製した。キメラ cDNA を各種制限酵素で処理後、pcDNA3.1(-) または pFastBac1 と ligation した。Ligation した plasmid を大腸菌 (DH-5 $\alpha$ ) に transformation した。12 hr 後にシングルコロニーをピックアップし、

LB/Amp (100 mg/mL) 液体培地で 12 hr 培養後、アルカリ-SDS 法にてプラスミドを回収した。回収したプラスミドを *Xho*I で処理し、insert の確認を行った。Insert の確認できたサンプルのシーケンス解析を行った。次にトランスフェクションする前日に L 細胞 ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) を 24 穴プレートに播種した。次の日に、トランスフェクション試薬に lipofectamine (4  $\cdot$  L) と plus reagent (4 mL) を用い、プラスミド (0.3 mg、pcDNA3.1(-)、pcDNA-MsCL1/F、pcDNA-MsCL1/1<sup>st</sup>、pcDNA-MsCL3/F、pcDNA-MsCL3/1<sup>st</sup>、pcDNA-MsCL4/F、pcDNA-MsCL5/F、pcDNA-MsCL5/1<sup>st</sup>、pcDNA-MsCL7/F、および pcDNA-MsCL7/1<sup>st</sup>) をトランスフェクションした。48 時間培養後、細胞を回収し、cell lysates を調製した。調製した cell lysates を用いて western blot 法にて各種 claudin の発現を確認した。さらに Fig. 1 に従って安定株を樹立する。

### 2. claudin-1 または claudin-4 組み換えバキュロウイルスの構築

claudin-1 または claudin-4 のバキュロウイルスを構築するために各 claudin 発現プラスミドを構築した。方法は pGTCL1 または pGTCL4 を PCR 法にて mouse claudin-1 または claudin-4 の full length または 1<sup>st</sup> loop 部位を増幅し、それぞれ *Not*I/*Xho*I、*Pst*I/*Sma*I または *Kpn*I で処理後、pFastBac1 または pFastBac1-gp64 に組み込んだ。組み込んだ plasmid を *E. coli* (DH-5 $\alpha$ ) に transformation した。12hr 後にシングルコロニーをピックアップし、LB/Amp (100mg/mL) 液体培地で 12hr 培養後、アルカリ-SDS 法にて plasmid を回収した。回収した plasmid を *Xba*I または *Kpn*I 処理をし、insert の確認を行った。Insert (claudin-1) が入っていると思われる 4 サンプルを Mini prep し、シーケンスの解析を行った。次に構築したバキュロウイルス組換え claudin-1 または claudin-4 (BV-CL1 と BV-CL4) をそれぞれ MOI 5.0、2.5 で Sf9 細胞 (250 mL) に感染させ、3 日間培養した。培養上清から高速遠心 (4,000

×g) により budded baculovirus (BV) を回収した。回収した BV の蛋白定量をした後に、0.1mg/lane で SDS-PAGE に供し、転写後 anti-claudin-4 mAb にて claudin-4 の発現を確認した。なお、ポジティブコントロールとして CL4/L の lysate (2mg/lane) を用いた。

### 3. claudin-4 binder を利用したスクリーニング系の構築

CL4 提示ファージを用いて、BV-CL4 と CL4 発現細胞による提示ファージ濃縮系の構築を試みた。CL4 発現細胞によるファージライブラリー濃縮系の作製方法は、作製した Library 1 および library 2 より定法により phage を作製した。作製した phage を 2% BSA (in serum-free MEM) を用い、4 °C で 1 時間ブロッキングした。その後、予めブロッキングしておいた L 細胞に添加し、37 °C で 2 時間インキュベーションした。さらに、その上清を予めブロッキングしておいた CL4/L 細胞に添加し、37 °C で 2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、細胞を回収し、50 mM HCl に懸濁し、4 °C で 10 分間インキュベーションすることにより phage を乖離させた。回収した phage を大腸菌 TG1 (O.D. = 0.3- 0.6) に感染させ、グリセロールストックの作製と titer check を行った。次に BV-CL4 によるファージライブラリー濃縮系の作製方法は、BV-CL4 (0.5, または 1.0 · g/ /well or tube) を 4 °C で一晩インキュベーションすることで ELISA プレートまたはイムノチューブに固相化した。翌日、40% 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、あらかじめ 8% BlockAce でブロッキングした aTac phage と C-CPE phage の混合溶液を添加した。室温で 2 時間反応後、100 mM HCl で phage を乖離させ、phage を回収した。回収した phage を大腸菌 TG1 (O.D. = 0.3- 0.6) に感染させ、クローンディスクに播種し、titer check を行った。さらにクローンディスク上の任意のクローンをピックアップし、ダイレクト PCR により C-CPE phage の濃縮の有無を検討した。

### 4. ペプチドライブラリーを用いた CL1 結合性ファージのパンニング及び CL-1 結合解析

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ー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 回繰り返す。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ー溶液 (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。

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。

### 5. scFv 蛋白質の FACS 解析

scFv ライブラリーより、CL-1 発現細胞を用いて採取した scFv タンパク質の CL-1 への結合性を解析した。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 μg/100 μl/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 μl/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  $\mu\text{l}$  に溶解させたものを PI 2.5  $\mu\text{l}$ /300  $\mu\text{l}$  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

結果は D 項にまとめて記載。

### D. 考察

#### 1. 各種キメラ claudin 発現細胞の作製

Fig. 2 と Fig. 3 に claudin-1、claudin-3、claudin-4、claudin-5、claudin-7 の Full Length および 1st ループをトランスフェクションし、発現をウエスタンブロットで観察した結果を示した。各種キメラ claudin 発現細胞の Full Length のバンドが確認できた。claudin-1、claudin-3、claudin-4、claudin-5、claudin-7 を細胞膜に発現する L 細胞の作製ができたと考えられる。さらに、さらに Fig. 1 に従って安定株を樹立をおこなっている。

#### 2. claudin-1 または claudin-4 組み換えバキュロウイルスの構築

Claudin-1、claudin-4 発現バキュロウイルスを作製するために claudin-1 full length と、claudin-1 1<sup>st</sup> loop を組み換えたプラスミドを Fig. 4 (A) に示した。次にこれらの claudin-1 の発現チェックを行った。

Mouse claudin-1 full length を組み込んだ pFastBac1 は 7 サンプル、claudin-1 1<sup>st</sup> loop (*PstI/SmaI* version) を組み込んだ pFastBac1-gp64 は 8 サンプル、insert の確認が

できた (Fig. 4(B)、(C))。なお、claudin-1 1<sup>st</sup> loop (*KpnI* version) は 3 回行ったが insert は確認できなかった。これらのうち、4 サンプルについてシーケンスの解析を行ったところ、claudin-1 full length を組み込んだ pFastBac1 は 4 サンプル、claudin-1 1<sup>st</sup> loop (*PstI/SmaI*) を組み込んだ pFastBac1-gp64 は 2 サンプルシーケンスの配列が正しかった。

次に claudin-4 バキュロウイルスの発現を確認した。250 mL の培養液から BV-WT は 6.1 mg/mL、BV-CL4 は 5.6 mg/mL のものが 250  $\cdot$  L ずつ回収できた。さらに western blot 法により claudin-4 の発現を確認したところ BV-CL4 にのみ claudin-4 の発現が確認できた (Fig. 5)。

#### 3. claudin-4 binder を利用したスクリーニング系の構築

Library 1 および library 2 を用いたファージ表面提示法による Claudin-4 発現 L 細胞を用いたパンニング結果を Fig. 6 に示した。Library 1 は 2nd で大幅な ratio の上昇が認められたのに対して、library 2 では 4th round で ratio の上昇が認められた。これらのことより、Claudin-4 発現 L 細胞はファージ濃縮スクリーニング系に有効であると考えられる。

次に Library 1 および library 2 を用いたファージ表面提示法による BV-CL4 を用いたパンニング結果を Fig. 7 に示した。Library 1 および 2 において CL4 指向性クローンが濃縮された。これらのことより、BV-CL4 はファージ濃縮スクリーニング系に有効であると考えられる。

#### 4. 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及び CL-1 結合解析

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. 8)。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. 9)。

#### 5. scFv 蛋白質の FACS 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.10)。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. claudin-1、claudin-3、claudin-4、claudin-5、claudin-7 を発現する L 細胞の作製ができた
2. claudin-1 または claudin-4 組み換えバキュロウィルスが作製できた。
3. Claudin-4 発現 L 細胞と BV-CL4 を用いたスクリーニング系の構築ができた。
4. CL1-BV を用いたファージライブラリー濃縮系を作製した。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。
5. 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. Isoda, K., Kagaya, N., Akamatsu, S., Hayashi, S., Tamesada, M., Watanabe, A., Kobayashi, M., Tagawa, Y., Kondoh, M.,

Kawase, M., Yagi, K., Hepatoprotective effect of vitamin B12 on dimethylnitrosamine-induced liver injury. *Bio. Pharm. Bull.*, 31, 309-311, 2008.

2. 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.
3. 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.
4. Nishimori H., Kondoh M., Isoda K., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Yagi K., Silica nanoparticles as hepatotoxicants. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 72, 496-501, 2009.
5. 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 CCl4-induced liver injury., *Biol. Pharm. Bull.*, 33, 983-987.
6. 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. 佐伯理恵, 角谷秀樹, 吉田孟史, 深坂昌弘, 磯田勝広, 鈴木亮, 近藤昌夫, 渡邊善照, 丸山一雄, 八木清仁: ウエルシュ菌エンテロトキシン断片を利用した claudin-4 ターゲッティング法の開発., 日本薬学会 第 128 年会,



横浜, 2008 年 3 月.

2. 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.
3. 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.
4. 手塚絵梨子、磯田勝広、清水芳実、羽澤一雄、矢野真吾、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

### H-3 その他

なし

## I. 研究協力者

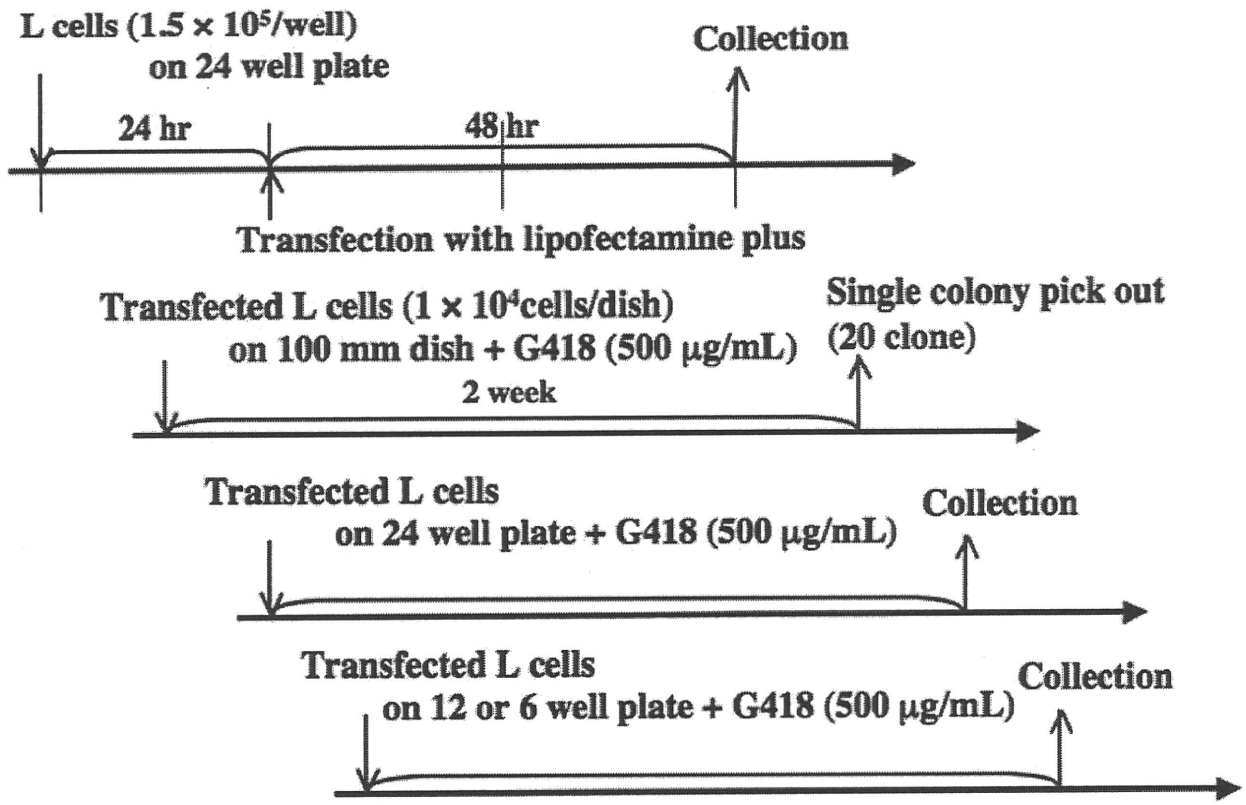
八木清仁

角谷秀樹

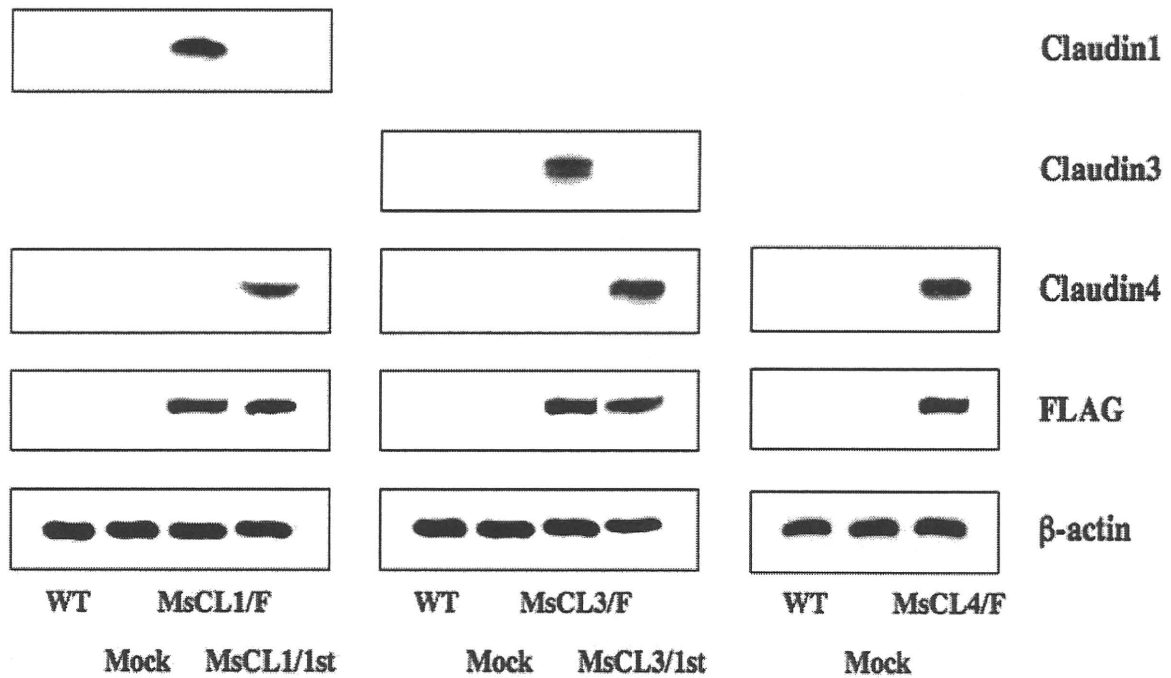
佐伯理恵

松久幸司

山浦利章

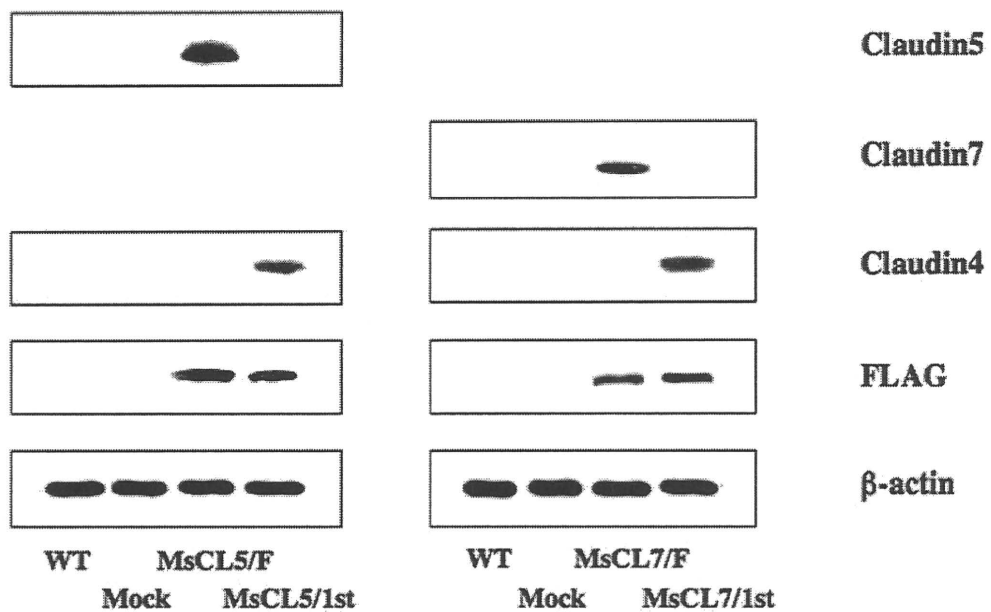


**Fig. 1 The Strategy to Establish Stable Clone.**



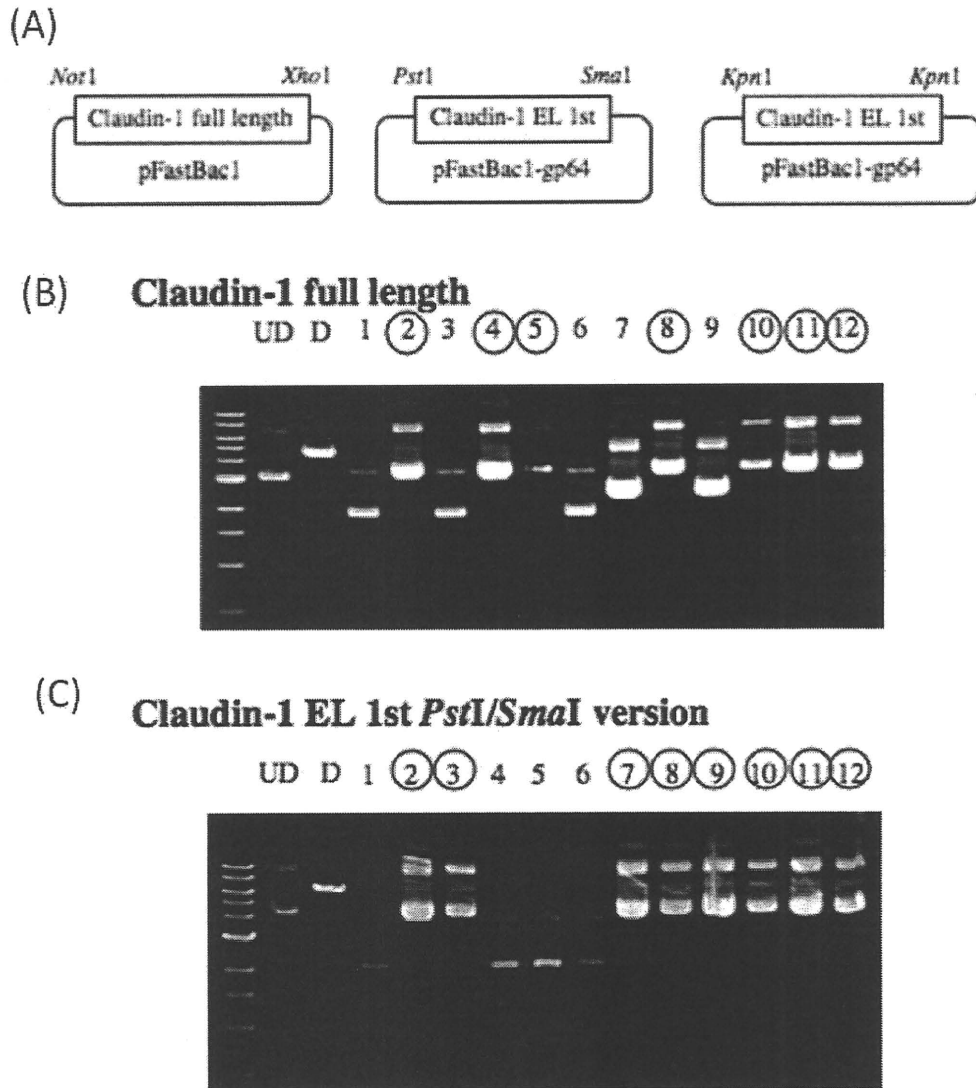
**Fig. 2** Transiently Expression of Mouse Claudin in Mouse Fibroblast L Cells.

L cells were tranfected with pcDNA3.1(-) inserted with several mouse claudin cDNA. After 48 hr, cell lysates were prepared. WT; wild type L cells, MsCL1/F; mouse claudin-1 full length, MsCL1/1st; mouse claudin-1 EL 1<sup>st</sup>-mouse claudin-4 chimeras, MsCL3/F; mouse claudin-3 full length, MsCL3/1st; mouse claudin-3 EL 1<sup>st</sup>-claudin-4 chimeras, MsCL4/F; mouse claudin-4 full length.



**Fig. 3 Transiently Expression of Mouse Claudin in Mouse Fibroblast L Cells.**

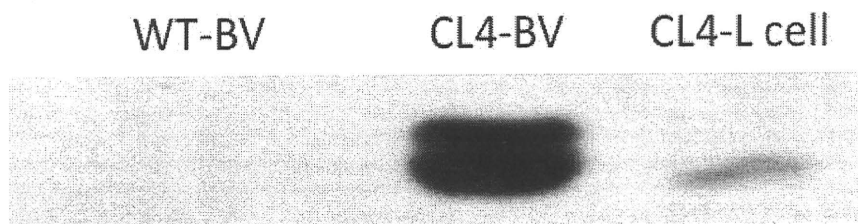
L cells were tranfeccted with pcDNA3.1(-) inserted with several mouse claudin cDNA. After 48 hr, cell lysates were prepared. WT; wild type L cells, <sup>st</sup>-claudin-4 chimeras, MsCL4/F; mouse claudin-4 full length, MsCL5/F; mouse claudin-5 full length, MsCL5/1st; mouse claudin-5 EL 1<sup>st</sup>-claudin-4 chimeras, MsCL7/F; mouse claudin-7 full length, MsCL7/1st; mouse claudin-7 EL 1<sup>st</sup>-claudin-4 chimeras.



**Fig. 4** Mouse claudin-1 expression plasmid.

**(A):** Design of full length or 1<sup>st</sup> loop of mouse claudin-1 expression plasmid.

**(B), (C):** The results of the plasmid digested with restriction enzyme. pFastBac1 inserted full length of mouse claudin-1 was digested with *XbaI* (B). pFastBac1-gp64 inserted 1<sup>st</sup> loop of mouse claudin-1 was digested with *KpnI* (C).



**Fig. 5 Expression of claudin-4 in BV-CL4.**

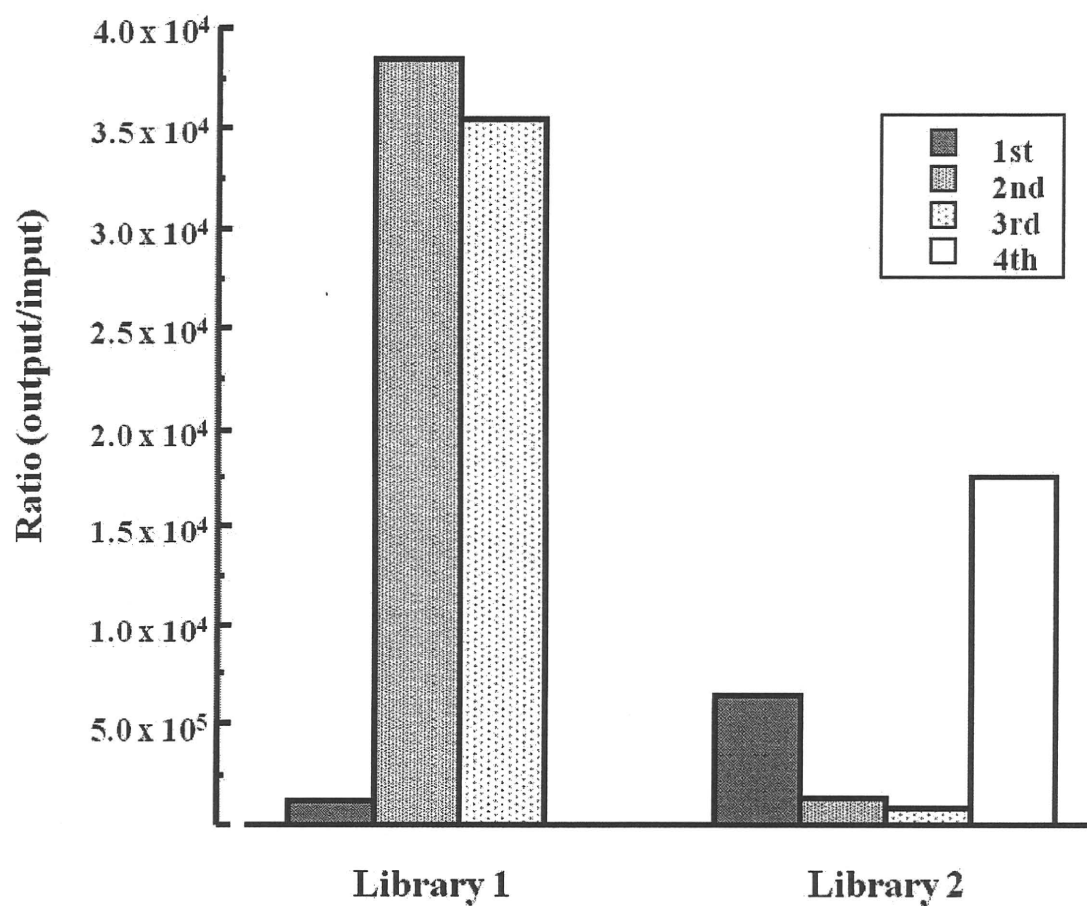


Fig. 6 . Enrichment of phage clone by claudin-1 expression L cell biopanning.

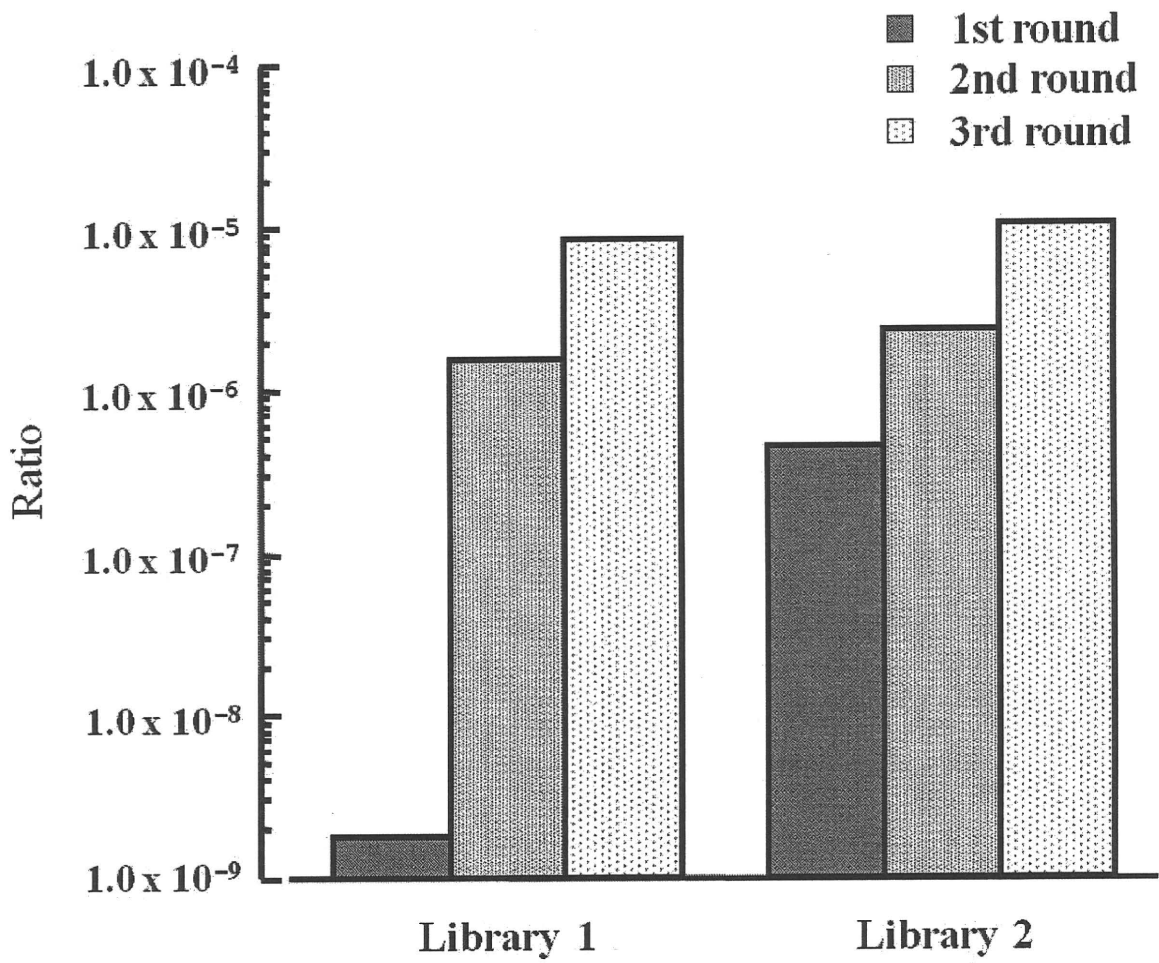
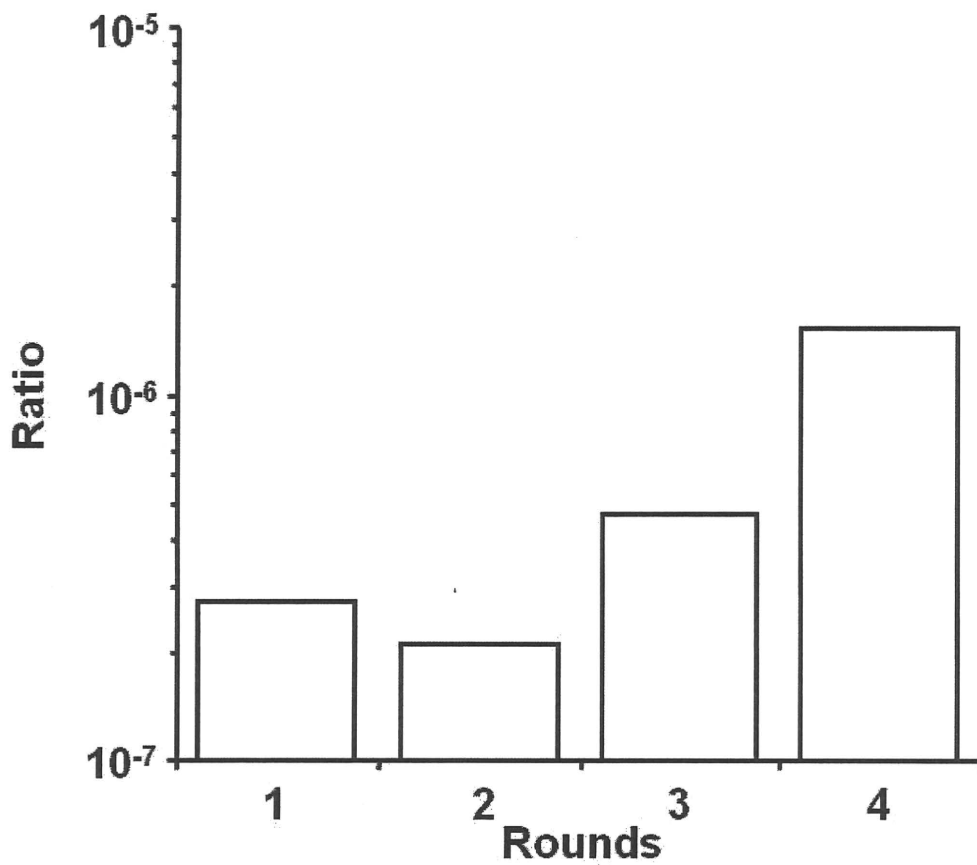


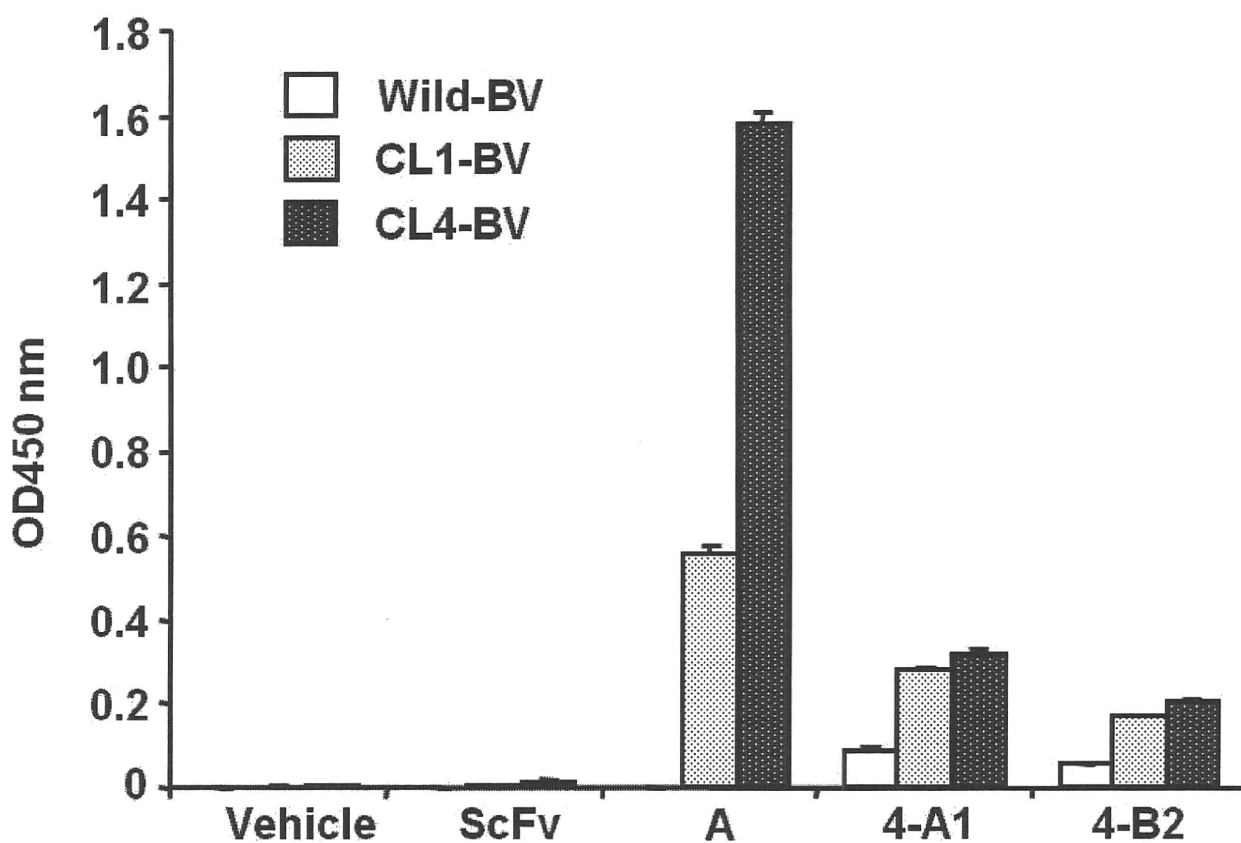
Fig. 7 . Enrichment of phage clone by BV-CL4 biopanning.



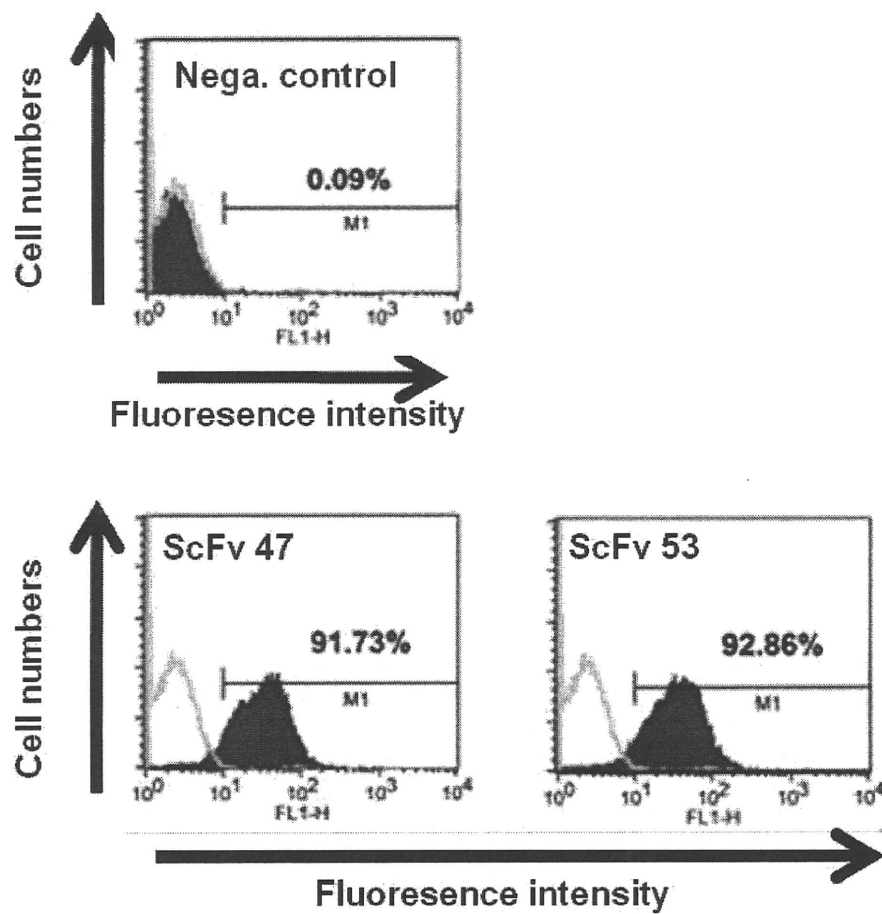


**Figure 8 Enrichment of phages with affinity to CL1-BV.**

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 9 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).



**Figure.10** 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。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と 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。

### 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。そこで本研究は、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を試みた。

### B. 研究方法

#### 1. 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、Tyr306、Tyr310、Tyr312、Leu315 など 5 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。方法は上記の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。これによって、C-CPE の 5 カ所または 7 カ所のアミノ酸をコードする配列を NNS に置換した。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