

用いて精製した。あらかじめ 2YT 培地で 0. 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、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、一晚培養してグリセロールストックを作製した。さらにアラニン置換により C-GPE の CL-4 結合性が上昇した Ser304、Ser305、Ser307、Asn309、Ser313、Lys318 などランダムなアミノ酸に置換したライブラリを上記と同様に作製した。

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 を用いイムノチューブおよび ELISA プレートに固相化することを確認した。

3. 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 · 1 と SuperScript III First-strand synthesis super mix (Invitrogen) を用いた RT-PCR により行った。次に cDNA 4 · L を鋳型として forward primer set 2 · 1、reverse primer set 2 · 1、PCR buffer 5 · 1、dNTP 5 · 1、MgSO₄ 2 · · 1、KOD-plus 1 · 1 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 · 1、VL 鎖 cDNA を 2 · 1、Not I サイトを有する Y15 primer (5' -ggccagcctttggagcctttttttggag attttcaacgtgaaaaattatttatttcgcaattccttttagttg ttctttcttatgcgccagccggccatggcc-3')、Nco I サイトを有する Y16 primer (5' -ttagtaaataaattttctgtatgaggtttt gctaaacaactttcaacagtctatgcgccagcggttccacgga tccggatacggcagcgccgacactgcgccgc-3')、PCR buffer 5 · 1、dNTP 5 · 1、MgSO₄ 2 · · 1、KOD-plus 1 · 1 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 · 1、scFv 遺伝子を 4 · 1 用いて 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 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 · g/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。

4. 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 で一晚培養した。その後、QIaprep[®] 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' - gtaaataaattttctgtatgagg-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

1. G-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 3.2×10^8 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 1.6×10^7 CFU であった。以上より、2種類の G-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 はイムノチューブおよび 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。

2. 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'に導入、エレクトロポレーションを行い、 2.5×10^5 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クアップし、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. G-CPE の CL-4 結合性が低下する 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1の作製に成功した。
2. G-CPE の CL-4 結合性が上昇した Ser304、Ser305、Ser307、Asn309、Ser313、Lys318 などアミノ酸をランダムなアミノ酸に置換したライブラリ2の作製に成功した。
3. 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。
4. CL-3 欠損マウスより 2.5×10^5 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. Shibata, H., Yoshioka, Y., Ohkawa, A., Minowa, K., Mukai, Y., Abe, Y., Taniai, M., Nomura, T., Kayamuro, H., Nabeshi, H., Sugita, T., Imai, S., Nagano, K., Yoshikawa,

- T., Fujita, T., Nakagawa, S., Yamamoto, A., Ohta, T., Hayakawa, T., Mayumi, T., Vandeenabeele, P., Aggarwal, BB., Nakamura, T., Yamagata, Y., Tsunoda S., Kamada, H., Tsutsumi, Y. Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist. *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007, 2008.
2. Sugita, T., Yoshikawa, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Imai, S., Nagano, K., Yoshida, Y., Shibata, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Kamada, H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. Comparative study of the protein transduction domains-mediated molecular transduction. *Br. J. Pharmacol.*, 153, 1143-1152, 2008.
 3. Yoshikawa, T., Sugita, T., Mukai, Y., Yamanada, N., Nagano, K., Nabeshi, H., Yoshioka, Y., Nakagawa, S., Abe, Y., Kamada, H., Tsunoda S., Tsutsumi, Y., Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus. *J. Mol. Biol.*, 380, 777-782, 2008.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
 13. 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.
 14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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- α , mTNF-K90R, is a novel candidate adjuvant for a mucosal vaccine against HIV. *Pharmazie*. 65, 254–256, 2010.
- G-2 学会発表
- 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 菱輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤康央: アンタゴニスト活性を有する I 型受容体指向性 TNF 変異体の評価: 関節リウマチモデルに対する治療効果および安全性の検討., 第 24 回 DDS 学会, 東京 2008 年 6 月.
 - 渡辺 光, 吉岡靖雄, 森重智弘, 鎌田春彦, 向 洋平, 角田慎一, 堤 康央, 岡田直貴, 中川晋作: フェージ表面提示法を用いた活性増強型リンフォトキシン・の創製とその特性評価., 第 8 回 日本蛋白質科学会年会, 東京, 2008 年 6 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
なし

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

| VL | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 | (G4S)3 |
|----------------|------------------------------------|--------------|---------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| Clone 1 | DIQMTQSQKFMS TSVGDRVSVTC | KASQNVGTNVA | WYQQKPG QSPKTVIY | SASYRYS | GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLADYFC | LQHWNYPLT | FGAGTKLEIKR | GGGSGGGGSSG GGGS |
| Clone 2 | DVLMTQSPASLA VSLGQRATIAC | RASESVDSYGN | WYQQKPG QPPKLLIY | RASILKS | GVPARFSGSGSRTDFTLTD PVEADDAATYYC | QQNNEDPLT | FGAGTKLEIKR | GGGSGGGGSSG GGGS |
| Clone 3 | DIVMTQSHKFMS TSVGDRVRIIC | KASQDVSTAVA | WYHQKPG QSPKLLIY | STSYRYT | GVPDRFTGSGSGTDFTFTIS SVQAEDLAVYYC | QQHYTTPLT | FGAGTKLEIKR | GGGSGGGGSSG GGGS |
| Clone 4 | DIVLSQSHKFMST SVGDRVSVTC | KASQNV DANVA | WYQQKPGQ SPKALVY | SASFRNS | GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLAEYFC | QQYNSYPLT | FGAGTKLEIKR | GGGSGGGGSSG GGGS |
| Clone 5 | DIVMTQSQKFMS TSVGDRVSIIC | KASQNVRTAVA | WYQQKPG QSPKALII | LASNPH | GVPDRFTGSGSGTDFTLTIS NVQSEDLADYFC | LQHWNYPLT | FGAGTKLEIKR | GGGSGGGGSSG GGGS |
| VH | FR1 | CDR1 | FR2 | CDR2 | FR3 | CDR3 | FR4 | |
| Clone 1 | QVQLQQSGAELVKPGASV KMSCKASGYTFT | SYWIT | WVKQRPG QGLEWIG | DIYPGSGSTN YNEKFKS | KATLTVDTSSTAYMQLSS LTSSEDAVYFCAR | NYGGYFDY | WGQGTTTLTVSS | |
| Clone 2 | QVHVKQSGPELVKPGASV KLSCKASGYTFR | SYGIS | WVKQRTG QGLEWIG | EIYPGSGSTN YNEKFKG | KATLTADKSSSTAYMELRSL TSEDAVYFCAR | TVVADWYFDV | WGTGTTTLTVSS | |
| Clone 3 | EVQLQQSGPELVKPGASV KMSCRASGYTFT | SYWIT | WVKQRPG QGLEWIG | DIYPGSGSTN YNEKFKG | KATLTVDTSSTAYMELHR LTSSEDAVYFCGG | GFDY | WGQGTTLQSSS | |
| Clone 4 | DVHRMESGAELVKPGASV KISCKASGYAFS | SYWMN | WVKQRPG KGLEWIG | QIYPGDGDTN YNGKFKG | KATLTADKSSSTAYMQLSS LTSSEDAVYFCAR | GATAYY YAMDY | WGQGTS VTVSS | |
| Clone 5 | QVQLQESGPELVKPGASV KISCKASGYAFS | NYWMN | WVKQRPGK LEWIG | QIYPGDGDTN YNGKFKG | KATLTADKSSSTAYMQLSSL TSEDAVYFCAR | ERDGY YAMDY | WGQGTS 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 α 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。平成 22 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。

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。平成 21 年度は、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、平成 22 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。

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。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、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。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 DH5 α にトランスフォーメーションし、50 μ g/ml kanamycin を含む LB 培地 (LK) プレートに播種し、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 でさらに一晩培養した。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 10⁶ 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 μ l、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地

(Invitrogen) 100 μ l) と tube B (bacmid-CL4 1 μ g、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 μ l) 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 μ l 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。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)。

細胞破壊した後、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 10⁶ 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。細胞破壊し、得られた沈殿を protease inhibitor を含む TBS 250 μ l 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 μ g 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、ブロッキングし、一次抗体を添加し、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 $\mu\text{g}/\text{well}$ で、4 $^{\circ}\text{C}$ 、一晩固相化した。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、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 $^{\circ}\text{C}$ 、一晩培養し、翌日 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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 $\text{OD}_{600} = 0.05\text{--}0.1$ となるように添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ で $\text{OD}_{600} = 0.4\text{--}0.6$ まで培養した。次に M13K07 helper phage を $\text{OD} \times 8 \times 10^8$ (cells/mL) $\times 25$ (mL) $\div 10^{11}$ (CFU/mL) となるように添加し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間静置した。さらに 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 分間 250 rpm で培養した後に、1000 $\times g$ で 10 分間遠心し、ペレットを回収した。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicilin sodium, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 、250 rpm で振盪培養した。6 時間後 1000 $\times g$ で 10 分間遠心分離し、その上清を回収し、さらに 15660 $\times g$ 、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 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間静置した。次に再び 15660 $\times g$ 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 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ TBS/well で、WT-BV および mCL4-BV を 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $10^9, 10^{10}, 10^{11}$ CFU に調整したものを、終濃度 0.32% Block Ace で 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{L}/\text{well}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 μ L と各濃度の Block Ace 50 μ L を混合し、4 $^{\circ}$ 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 μ L 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 μ L 添加、4 $^{\circ}$ 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 μ L 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 μ L を 10^{-3} - 10^{-6} 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^{-8} - 10^{-11} 倍に希釈した。希釈ファージ 100 μ L を大腸菌 TG1 ($OD_{600} = 0.4-0.6$ に調整) 300 μ 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 μ L 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 $^{\circ}$ C で培養した。翌日コロニーを milliQ 30 μ L にピックアップし、95 $^{\circ}$ 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'-caggaacagctatgac-3')、pY03'-AS-1 (5'-gtaaatagaattttctgtatgagg-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. GL 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-H₁₀PER (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'-catgccatggccgatataaaaaagaatccttgatttagctgctt-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 $^{\circ}$ 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 *Nod* (New England Biolabs., Inc.) で 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 μ 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 $^{\circ}$ C で保存し、C-CPE mutant DNA ライブラリとした。

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 で一晩培養した。その後、QIAprep \oplus 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 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ in 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 Ace350 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 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 μL 添加し、4 °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 μL 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 μL を大腸菌 TG1 ($\text{OD}_{600} = 0.4\text{--}0.6$ に調整) 300 μL と混合し、37 °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% のグリセロールと混合した後、-80 °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。

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 °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) 2YTGA 培地 100 μL で、37 °C 一晩培養した。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 μL に前培養大腸菌 10 μL ずつ植え継ぎ、 $\text{OD}_{600} = 0.3\sim 0.6$ まで 10000 rpm 37 °C で培養後、M13K07 helper phage を添加した。37 °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 °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。

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 °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[®] 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 °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 °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 °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 °C で 2 時間処理した。ライゲーション産物と大腸菌 DH5 α (TOYOBO, Co., Ltd, Japan) を氷上で 10 分間なじませた後、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 (TOYOBO, Co., Ltd, Japan) 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。翌日、1 コロニーずつ LA 培地 3 mL に植菌し一晩振盪培養した後、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[®] 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 μ L を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) 10 μ 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 μ 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- β -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 μ 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 μ L を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) 10 μ 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 MgCl₂, 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 μ L に 4 \times SDS buffer を 6.7 μ 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 NiSO₄ 500 μ L、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 μ L に 4 \times SDS buffer を 6.7 μ L 加え、95 $^{\circ}$ 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。

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 μ g/ml にて調整した。その溶液 20 μ l に 4 \times SDS を 6.7 μ l を加え、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱しサンプルとした。サンプルは 20 μ l (蛋白質量として 5 μ g) 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。

B-5. 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 $^{\circ}$ C 一晚培養した。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 $^{\circ}$ C で一晚振とう培養した。翌日 TERRIFIC BROTH (Invitrogen, Co, LTD)/Ampicillin (TA) 液体培地 4 l に培養液を移し、37 $^{\circ}$ C で 3 時間振とう培養後、1 M IPTG を 1120 μ l 添加し、さらに 3 時間振とう培養した。その後 4 $^{\circ}$ C、4,000 rpm で 5 分間遠心分離

して大腸菌を回収し、-80 $^{\circ}$ 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 MgCl₂, 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 $^{\circ}$ 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 NiSO₄ 50 μ 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 μ l に 4 \times SDS buffer を 6.67 μ 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。

12

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 μ 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 BCATM 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 μ l に 4 \times SDS buffer を 6.67 μ 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-SafeTM 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-6. HCVpv 感染阻害実験

Huh 7 細胞を 96 well plate (Becton, Dickinson and Company, USA) 2×10^4 cells /well で播種し、 37°C 、5% CO_2 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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加した。24 時間細胞に作用させた後、HCV pseudovirus (HCVpv) を 50 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加し、 37°C 、5% CO_2 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 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加後、 37°C 、5% CO_2 の条件下で 24 時間培養した。その後、Steady-GloR Luciferase Assay Substrate (Promega Co., Ltd.) 10 $\mu\text{l}/\text{well}$ を添加し 5 分間室温で振盪後、蛍光強度を測定した。

B-7. 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 にて一晚制限酵素処理した。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 にて一晚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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 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、アルカリプレートにて 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 DH5 α にトランスフォーメーションし、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ kanamycin を含む LB 培地 (LK) プレートに播種、 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 で一晚培養した。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 2×10^6 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 培地で洗淨後、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、 2×10^6 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 2×10^6 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 Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) 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 × 10⁶ 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 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-8. 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-9. 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' ファージミ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 OD₆₀₀ = 0.05-0.1 となるように添加し、37 °C で OD₆₀₀ = 0.4-0.6 まで培養した。次に M13K07 helper phage (Invitrogen, Co., Ltd.) を OD = 8 × 10⁸ (cells/mL) × 25 (mL) ÷ 10¹¹ (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、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 μl 添加、4 °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 μl 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 μl を大腸菌 TG1 (OD₆₀₀ = 0.4-0.6 に調整) 300 μl と混合し、37 °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 °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。

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 °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 (IWAKI GLASS, Co., Ltd, Japan) に 2YTGA 培地 100 μl で、37 °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 μl に前培養した大腸菌を 10 μl ずつ植え継ぎ、OD₆₀₀ = 0.3-0.6 まで 10000 rpm、37 °C で培養後、M13K07 helper phage (Invitrogen) を添加した。37 °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 °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 °C で保存した。

scFv 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、CL1-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 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 °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 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、5,000 倍希釈した anti M13-HRP mAb (Invitrogen) 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 100 μl を添加し、約 10 分間反応後、2M H₂SO₄ 100 μl 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 °C で一晩培養した。その後、Qia prep [®] Spin

miniprep Kit (QIAGEN Science, USA) を用いて plasmid を精製し、sequence 解析を行った。

B-10. 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'-TATGCTAACCATGGGCTAGCCCCGGGCGGCCGCG *Nde* I binding site is under lined) と reverse oligonucleotide (5'-GATCCGCGGCCGCCCCGGGCTAGCCCATGGT TAGCA -3', *Bam*HI binding site is under lined) を 100 μ M (in TE buffer) となるように調製し、TE buffer 30 μ l に 15 μ 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、*Xhd* を用いて 37 $^{\circ}$ Cで 2 時間処理した。

次に大腸菌 DH5 α (TOYOBO CO., Osaka, Japan) にライゲーション産物を加え、氷上で 30 分放置しなませた後、42 $^{\circ}$ Cで 30 秒間 heat shock を行い、氷上に 3 分間設置した。200 μ l の SOC 培地を加えた後 37 $^{\circ}$ Cで 50 分間培養し、100 μ 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[®] Spin Mini prep Kit

(QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてプラスミド精製を行い、50 μ 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、*Xhd* を用いて 37 $^{\circ}$ Cで 2 時間処理した。次に大腸菌 DH5 α (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 μ 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[®] Spin Mini prep Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いてプラスミド精製を行い、50 μ 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 μ l を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) 10 μ 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晚培養した。1 コロニーを LA 培地 3 ml で 37 $^{\circ}$ C、一晚振盪培養した。翌日 LA 培地を 2 mL を 6 本に分注し、50 μ l ずつ前培養した大腸菌液を加え 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 μ 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 $^{\circ}$ 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 μ l を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd.) 10 μ 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晚培養した。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 $^{\circ}$ C で一晚振盪培養した。翌日 2YTA 培地 30 ml に大腸菌培養液を 0.75 ml 植え継ぎ、37 $^{\circ}$ C で 2 時間振盪培養した。その後、IPTG を添加し、さらに 37 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 μ m 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 HPTM 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 を流して平衡化しておき、HisTrap™ Kit で得た溶出液を 1 ml 流し、その後 500 μ l 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 scFv 蛋白質の濃度を求め、残りの溶液を -80 $^{\circ}$ C で保存した。

CBB 染色による scFv の発現確認

上記の操作により得た、PBS に溶解した scFv 蛋白質を 50 μ g/ml に調整した。その溶液 20 μ l に 4 \times SDS を 6.7 μ l を加え、95 $^{\circ}$ C で 5 分間加熱しサンプルとした。サンプルは 20 μ l (蛋白質量として 5 μ g) 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、coomassie brilliant blue (CBB, Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し milliQ で洗浄した後、30 kDa 付近に存在する scFv 蛋白質を確認した。尚、本蛋白質を研究代表者磯田が実施した CL-1 結合解析に供した。

C. 研究結果

研究結果は D 項に併せて記載。

D. 考察

D-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、DH5 α にトランスフォーメーションした。シークエンス

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-CPE₃₀₃ 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思われる。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難な分子であったため、CL 蛋白質と CL binder の直接的相互作用を解析するためには pull down 法等の煩雑な手法を選択せざるを得なかった。今回作製した CL-BV は CL binder スクリーニング系への応用のみならず、CL binder と CL 蛋白質との直接的相互作用を ELISA 法という簡便な解析方法に適用できる点においても有用であると思われる。

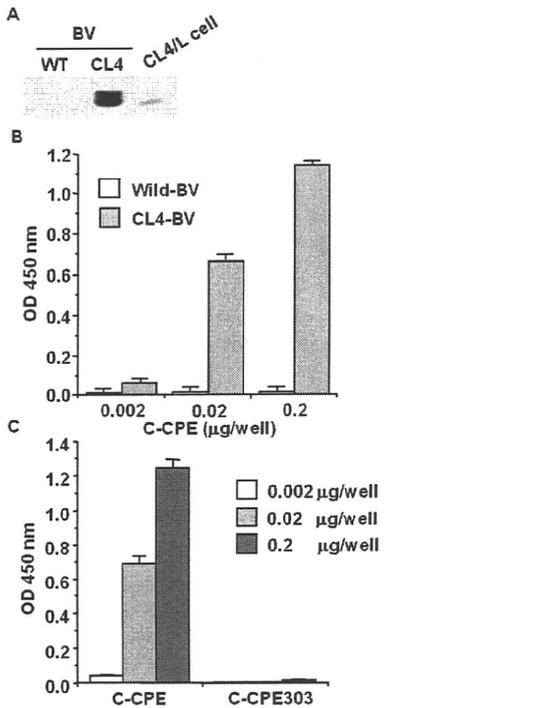


Figure 1 Preparation of CL4-displaying BV
 A) Western blot analysis. Mock-BV and CL4-BV (0.1 µg/lane) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis with anti-CL4 Ab. The lysate of CL4-expressing L (CL4/L) cells was used as a positive control. B, C) Interaction of a CL4 binder with CL4-BV. Immunotubes were coated with the mock-BV or CL4-BV, and C-CPE (B) or mutated C-CPE (C) was added to the BV-coated immunotubes at the indicated concentration. C-CPE bound to the BV-coated tubes was detected by ELISA with an anti-his tag Ab. Data are means \pm SD (n=4).

D-2. CL binder スクリーニング系の構築

ファージディスプレイ法はターゲット分子に対する結合分子を網羅的かつ迅速に同定できる技術とし

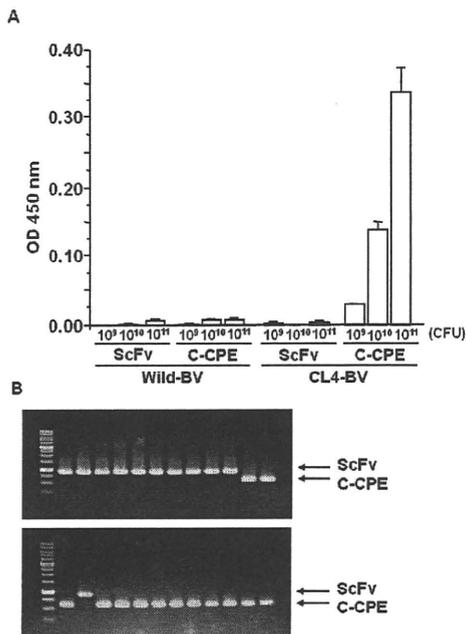


Figure 2 Selection of C-CPE-displaying phage by using the CL4-BV system. A) Interaction of C-CPE-displaying phage with CL4-BV. Mock-BV or CL4-BV was coated on an immunoplate, and then scFv-displaying phage or C-CPE-displaying phage was added to the BV-coated immunoplate at the indicated concentrations. The BV-bound phages were detected by ELISA with anti-M13 Ab. Data are means \pm SD (n=3). B) Enrichment of C-CPE-displaying phage by the BV system. A mixture of scFv-phage and C-CPE-phage (mixing ratio of scFv-phage to C-CPE-phage = 2:10) was incubated with a CL4-BV-coated immunotube, and the bound phages were recovered. Each phage clone was identified by PCR amplification, followed by agarose gel electrophoresis. Upper and lower pictures are before and after the selection, respectively. The putative sizes of the PCR products are 856 and 523 bp in scFv and C-CPE, respectively.

て開発され、抗体や機能性人工蛋白質の創出に現在広く応用されており、ファージディスプレイ法を用いたスクリーニングにより、CL binderを創出する可能性が示唆される。実際、近年になってLingらが12 mer peptideライブラリとCL4発現細胞を用いてCL4 結合ペプチドを取得した例も報告されている。そこで、ファージディスプレイライブラリをCL binderスクリーニング系へ応用することを考慮して、CL4 binderであるC-CPEをファージ表面に提示させたC-CPEファージとCL4-BVの相互作用をELISA法により解析した。

C-CPEファージは濃度依存的にCL4-BVに結合性を示し、WT-BVには結合性を示さなかった。またCL4の非結合性分子である一本鎖抗体scFvを提示させたscFvファージはCL4-BV, WT-BVの双方に結合性を示さなかった (Fig. 2A)。以上のことからC-CPEファージはCL4-BVへの特異的な結合性を保持しており、CL-BVを利用することでCL 結

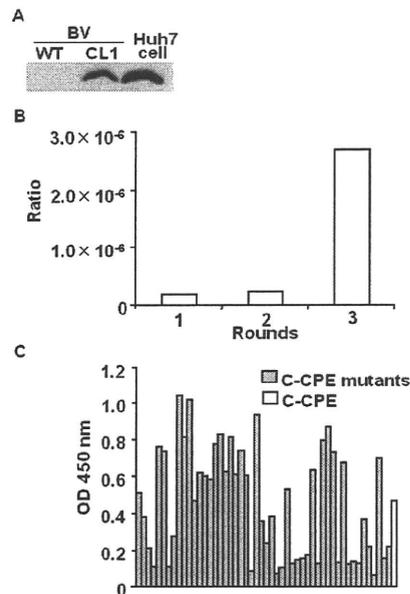


Figure 3 Screening of a CL1 binder.

A) Preparation of CL1-BV. Wild-BV and CL1-BV (0.1 µg/lane) were subjected to SDS-PAGE, followed by immunoblot analysis with anti-CL1 Ab. The lysate of Huh7 cells was used as a positive control. B) Enrichment of phages with affinity to CL1-BV. CL1-BV coated on immunotubes were incubated with the C-CPE-derivative phage library at 3.2×10^{12} CFU titer (1st input phage). The phages bound to CL1-BV were recovered (1st output phage). The CL1-BV-binding phages were subjected to two additional cycles of the incubation and wash step, resulting in 2nd, 3rd output phage. The ratio of output phage to input phage titers was calculated. C) Monoclonal analysis of C-CPE mutant phage. CL1-BV-bound phage clones were isolated from the 3rd output phages, and the interaction of the monoclonal phage with CL1-BV was examined by ELISA with HRP-anti-M13 Ab as described in Materials and methods. The most right column indicates C-CPE-phage.

合性ファージのスクリーニングが行えるものと推察される。

そこで次に、C-CPE 及びCL4 をそれぞれCL

binder、CL のモデルとして用い、CL-BV を利用したCL binderスクリーニング系が機能するかを検討した。CL4 非結合分子であるscFv ファージとCL4 binderであるC-CPEファージを10:2の割合で混合したファージ溶液を調整した (Input)。mCL4-BVを固相化したイムノチューブに調整したファージ溶液を添加し、洗浄、溶出操作を行った後に結合したファージクローンを回収し (Output)、選別操作前後のscFvファージおよびC-CPEファージの存在比をCD-PCR法により解析した。

選別操作前には 12 クローン中 2 クローンであった C-CPE ファージは選別操作後 12 クローン中 11 クローンに増加しており (Fig. 2B)、BV を用いた CL binder スクリーニング系が機能することが示唆された。

D-3. CL-1 結合性ファージのスクリーニング

当研究グループでは C-CPE の C 末端 16 アミノ酸のアラニンスキャンにより、CL-4 結合に関与するアミノ酸を複数同定している。そこで、本機能アミノ酸をランダムに変異させた C-CPE 誘導体ライブラリを作製した (尚、特許の関係で配列情報は示さず)。pET-H10PER に導入された C-CPE を鋳型として NNS 配列を導入したプライマーを用いて PCR 反応を行い、PCR 産物を 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) にライゲーションした後、本 plasmid を用いて大腸菌 TG-1 に形質転換しライブラリを作成した。さらにライブラリの多様性を確認するために任意のクローンを選択しシーケンス解析を行った。

シーケンス解析の結果、いずれのクローンも野生型と異なる配列を有しており、ライブラリが多様性を有していることが示された (data not shown)。またライブラリサイズは 1.4×10^7 CFU であり、理論値である 6.4×10^7 CFU に近い多様性を有するライブラリを作製することができた。そこで、次に、本ライブラリを用いた CL1 binder スクリーニングを試みた。

パンニングのラウンドを重ねるごとに濃縮率 (ratio) の向上が観察され、CL1-BV に親和性を有

するクローンが濃縮されたことが示唆された (Fig. 3A and 3B)。以前に CL 非発現細胞であるマウス繊維芽細胞に CL を導入した発現細胞を用いて C-CPE 誘導体ライブラリをパンニングしたが、このような段階的な ratio の向上は観察されなかったため (data not shown)、本結果は CL-BV を用いることで CL binder が効率的にスクリーニングできたものと推察される。

パンニングにより濃縮率の向上が認められ、CL1 に親和性を持つファージが濃縮された。そこで CL1 親和性分子を同定するためにパンニング後のファージ群を個々にモノクローン化し、ELISA 法によって各クローンの CL1 結合性を解析した。3rd round 後のファージクローンを解析した結果、数多くの CL1 親和性クローンが観察された (Fig. 3C)。

さらに、シーケンス解析により、配列の異なる 2 つの CL1 結合性ファージクローン (A、B) の取得に成功した (特許の関係上、配列データは示さず)。

D-4. CL1 binder の作製

目的の C-CPE mutant A/B 遺伝子がコードされているファージミドベクター、pY03-C-CPE mutant を鋳型とし、制限酵素サイトとして *NdeI/BamHI* を持つ primer を用いて、PCR により C-CPE mutant 配列を増幅した。制限酵素処理後、His-tag 融合蛋白質発現ベクターである pET-16b に組み込み、*XhoI* 処理によって目的組換え産物以外を消化した。シーケンス確認を行い目的の組換え plasmid の作製を確認した。次に、A および B の蛋白質発現誘導条件、可溶化条件、蛋白質溶出条件を設定し、蛋白質の精製を行ったところ、推定される分子量に CBB 染色像が観察された (Fig. 4A)。

次に、CL1-BV を用いた ELISA により CL1 結合性を解析したところ、C-CPE では CL1-BV にほとんど結合性が観察されなかったのに対して、C-CPE mutant A/B は共に CL1-BV にのみ結合性が観察された (Fig. 4B)。