

2013/8065B

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発

平成23-25年度 総合研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成26(2014)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発
に関する研究

平成23-25年度 総合研究報告書

研究代表者 渡利 彰浩

平成26（2014）年 5月

目 次

I. 総合研究報告

パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発に関する研究

渡利 彰浩

----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 66

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 70

「パイエル板指向性分子を利用した経口ワクチンの開発」

研究代表者 渡利 彰浩 大阪大学大学院薬学研究科 助教

研究要旨

昨今の新型インフルエンザの世界的流行でも明らかのように、依然として感染症は人類に立ちはだかる大きな脅威であり、感染症によって毎年 2000 万人の命が失われている。患者の生活の質・有効性・安全性を考慮すると、非侵襲性投与が可能であること、多くの感染性病原体の侵入門戸（粘膜面）における防御網を構築できること、生体内に侵入した病原体の排除活性をも有することから、『経口ワクチン』は理想的な感染予防法である。しかしながら、経口ワクチンが有効に機能するには、消化酵素による分解を回避しつつ、腸管粘膜免疫組織に抗原を効率良く送達する必要がある。以上の背景を踏まえ、本研究では腸管粘膜免疫組織パイエル板(PP)に claudin-4(CL-4)が高発現していることに着目し、CL-4 指向性分子を有効活用することで、初めてのパイエル板指向性経口ワクチンを開発することを目的とする。

パイエル板へ抗原を送達するキャリアとして CL-4 結合能および消化酵素耐性能を併せ持つ独自の CL-4 binder(C-CPE)を採用し、まずは高効率に抗原を送達するため、C-CPE の CL-4 結合能が向上した変異体を取得し、予備検討としてモデル抗原を用いた経鼻投与によるワクチン活性を解析した。その結果、新たに作製した CL-4 高結合性 C-CPE 変異体を用いた抗原送達法により、既存の C-CPE と比較して有意な免疫誘導能および腫瘍増殖抑制効果が観察された。新規 CL-4 binder の抗原送達能が向上したことから、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体を修飾したリポソームを複数作製し、本リポソームの中から CL-4 への結合性が高いリポソームを選別した。また、OVA を封入した C-CPE 変異体修飾リポソームも作製し、本リポソームにおいても CL-4 への結合性を確認した。続いて、本リポソームの *in vivo* におけるパイエル板への移行性について評価した結果、パイエル板への移行を確認した。さらに一部のリポソームが抗原の取り込みを担う M 細胞にも到達していることを確認した。従って、本研究により開発した CL-4 高結合性 C-CPE 変異体修飾リポソームは腸管粘膜免疫組織に抗原送達可能であることが示唆された。次に、C-CPE を利用した際の安全性評価の基盤となる C-CPE の体内動態を調べた結果、肝臓への蓄積性が確認された。今後は、CL-4 高結合性 C-CPE 変異体のリポソーム修飾条件などの最適化を試みることで、より高いパイエル板移行性リポソームを作製する予定である。また、本リポソームを用いたワクチン活性の検証を行い、さらなる改良を施すことで経口ワクチンに資する CL-4 binder 修飾リポソームの作製を推し進める。

研究分担者

鈴木 亮 帝京大学薬学部 准教授

A. 研究目的

インフルエンザウイルス、エイズウイルスなど感染性病原体の多くは粘膜面を介して生体内に侵入

することから、感染症対策の最重要基本戦略の第一は粘膜面に免疫防御網を構築し生体内への侵入を阻止すること、第二は粘膜面の防御網をすり抜け体内に侵入した病原体および感染細胞を排除するために全身系の体液性・細胞性免疫機構を構築することにある。ワクチンは感染症対策の切り札として期待

されているものの、現在汎用されている注射型ワクチンでは全身系体液性免疫の誘導に限局され、粘膜面における侵入防御網の構築活性を持たず感染予防効果を期待できない。一方、粘膜ワクチンは、粘膜系免疫と全身系体液性・細胞性免疫の活性化能を併せ持つことから、効果的な感染予防・治療法であると言える。なかでも経口ワクチンは、粘膜系免疫と全身系体液性・細胞性免疫の活性化能をもち、抗原分子の脳内移行の危険性が拭いきれない経鼻ワクチンと異なり、安全性も高いことを考慮すると理想的なワクチンと考えられる。しかしながら、消化酵素による分解を回避しつつ腸管粘膜免疫誘導組織パイエル板に抗原を効率的に送達するシステムが開発されていないことから、経口ワクチンの開発は立ち遅れている。

近年、粘膜免疫組織を覆う上皮組織に tight junction 構成タンパク質である claudin-4 (CL4) が高発現していることから、CL4 を標的とした粘膜ワクチン開発の可能性が示唆されている。そこで当研究グループはこれまでに CL4 binder として知られるウエルシュ菌毒素 C 末断片である C-CPE を利用し、CL4 を標的とした経鼻粘膜ワクチン開発を試みた。モデル抗原として卵白アルブミン OVA と C-CPE 融合タンパクを用いて検証した結果、CL4 を標的とした粘膜ワクチンの proof of concept の実証に成功した。

次に、腸管粘膜免疫誘導組織パイエル板を覆う上皮組織にも CL4 が高発現していることから、腸管粘膜免疫組織を標的とした経口粘膜ワクチンの開発を試みたが、抗体価の上昇は観察されなかった。この原因として、(1) 経口ワクチンは経鼻ワクチンに比べて 10 倍以上の抗原を粘膜免疫組織に送達する必要があるため抗原送達量が低かったこと、(2) 抗原が消化酵素分解により分解されることが考えられた。この解決法として、(1) 腸管粘膜免疫組織への抗原送達率を高めるため、既存の C-CPE よりも高い CL4 結合性を示す C-CPE 変異体の創出する、(2) 消化酵素耐性であるリポソームに抗原を封入することにより、抗原の分解を回避するという方法を考案した。

本研究で開発を試みるパイエル板への抗原送達システムは、従来まで注射による投与を余儀なくされ

ていたワクチンを経口投与化する技術であり、医師や看護師などの医療従事者が居なくても簡便に投与可能であり、利便性および汎用性を兼ね備えていること、多くの病原体の侵入門戸である粘膜面に感染防御網を構築できることから、少子高齢社会を迎えた我が国の健康寿命の延伸、特徴あるワクチン開発技術を用いた本邦ワクチン産業の育成など、厚生労働行政に多方面から貢献できると考えられる。

B. 研究方法

B-1. CL-BV の作製

B-1. 1. pFastBac-CL4 の作製

Claudin-4 の遺伝子を T-Easy Vector に挿入した pGTCL4 (神戸大学大学院医学研究科 古瀬幹夫博士より供与) を鋳型とし、KOD-plus-を用いて PCR を行った。なお、Forward primer として 5'-gctctagaatggattacaaggatgacgacgataagatggcgtctatggga ctacaggtcctgggaatctccttagca-3' (the underline indicates *Xba*I site) を、Reverse primer として 5'-ggggtagccttacacatagttgctggcggggacagacgggc-3' (the underline indicates *Kpn*I site) を用いた。得られた PCR 産物を PCR Purification Kit を用い精製後、*Xba*I および *Kpn*I を用い、37 °C にて一晚制限酵素処理した。あらかじめ *Xba*I および *Kpn*I 処理した pFastBac1 (東京大学先端科学技術研究センター 浜窪隆雄博士より供与) と T4 DNA ligase を用いて 16 °C にて一晚ライゲーション反応を行い、続いて *Xho*I を用いて制限酵素処理を行った。ライゲーション産物から第一章第一節に準じ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。

B-1. 2. Bacmid の作製

pFastBac-mCL4 をヒートショック法にて大腸菌 DH10Bac (Invitrogen) にトランスフォーメーションし、50 µg/ml kanamycin, 7 µg/ml gentamicin, 10 µg/ml tetracycline を含み、2% X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactoside) 100 µl および 50 mM IPTG 100 µl を塗布した LB 培地プレートに播種し、37 °C で 24 時間培養した。任意

の白コロニーをピックアップし、アルカリプレップにて大腸菌から bacmid を精製した。精製した bacmid に目的とする遺伝子が挿入されていることを PCR 法にて確認した。なお、Forward primer として 5′-gttttccagtcacgac-3′ を、Reverse primer として 5′-ggaaacagctatgacatg-3′ または 5′-ggggtaccttacacatagttgctggcggggacagagcgggc-3′ を用いた。目的とする遺伝子の確認がとれた bacmid をヒートショック法にて大腸菌 DH5α にトランスフォーメーションし、50 μg/ml kanamycin を含む LB 培地 (LK) プレートに播種し、37 °C で一晩培養し、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。

B-1. 3. Budded baculovirus (CL4-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-CL4 1 μg、血清も抗生物質も含まない Sf-900 培地 100 μl) を用意し、tube A と tube B とをよく混和して、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)。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)。

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。

2×10^6 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 protease inhibitor を含む TBS 250 μl で懸濁し、BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用いて蛋白質濃度を測定した。なお、検量線には BSA を用いた。

B-1. 4. CL4-BV の発現確認

蛋白質量として 5 μg を供し 15 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行った後、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間蛋白質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪しブロッキング操作を行った。T-TBS で 5 回洗浄し、T-TBS により 1/2000 に希釈した一次抗体: Mouse anti claudin-4 (ZYMED) と 2 時間反応させた。T-TBS で 5 回洗浄し、T-TBS により 1/3000 に希釈した二次抗体: Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 5 回洗浄した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、Image Quant LAS 4010 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp.,

USA)により claudin-1 蛋白質の検出を行った。

B-2. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A による免疫誘導

B-2. 1. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の免疫と各種サンプルの回収

週 1 回、計 3 回、BALB/c マウスに経鼻投与を行った。Ovalbumin (OVA, Sigma Aldrich Co.) 単独投与群、OVA-C-CPE 303 または OVA-C-CPE 194 投与群の 3 群とした(n=5)。すべての群において一匹、一回あたりの投与量は OVA として 5 μ g とし投与量が 10~15 μ l となるように PBS に溶解した。最終投与より一週間後、マウスより血清サンプルを回収した。

B-2. 2. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質による抗体価の測定

抗体価の測定に用いる各種サンプルは以下の方法で回収した。

・血清サンプル (serum sample)

マウスから眼底採血により血液を回収し、3000 \times g, 10 分にて遠心分離を行った。上清を PBS にて 10 倍に希釈し、 -20°C で保存した。

・鼻腔洗浄液 (nasal wash)

頸椎脱臼して安楽死処分したマウスに対し、気道より鼻腔にむけて 200 μ l の PBS を流し込み、その洗浄液を回収し、 -20°C で保存した。

・膣洗浄液 (virginal wash)

マウスの膣口に 50 μ l \times 2 の PBS を流し込み、10 回ピペッティングを行い回収し、 -20°C で保存した。

・糞便抽出液 (fecal extract)

マウスの糞便を回収し、糞便 10 mg につき 100 μ l の割合で PBS を加え、 4°C 、10 分にてボルテックスを行った。次に 3000 \times g, 10 分にて遠心分離を行い、上清を回収し、 -20°C で保存した。

前日に OVA が 10 μ g/ml となるように炭酸緩衝液 (pH 9.6, Na_2CO_3 0.19 M, NaHCO_3 1.67 M) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に 100 μ l/well で分注し、 4°C で保存した。翌日、T-TBS にてプレートを

3 回 wash し、4%ブロックエースを 200 μ l/well で添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 5 回 wash した。T-TBS (Tween 20-TBS) にて 10 倍希釈したブロックエース (sample diluent) を用いて検体を $1/10^{\sim}1/1000000$ 希釈 (血清)し、50 μ l/well にて添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 5 回 wash した。sample diluent にて HRP detection antibody (IgG, IgG1, IgG2a, IgA) (BETHYL Laboratories, Inc.) を $1/10000$ に希釈し、100 μ l/well にてプレートに添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、T-TBS にて 5 回 wash した。TMB solution を 100 μ l/well 添加し、20 分インキュベート後、2 M の硫酸を 100 μ l/well 加え、吸光度を測定した (450 nm, ref 595 nm)。

B-3. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A による免疫特性

B-3. 1. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の免疫と各種サンプルの回収

抗体価の測定に用いる各種サンプルは以下の方法で回収した。

・血清サンプル (serum sample)

マウスから眼底採血により血液を回収し、3000 \times g, 10 分にて遠心分離を行った。上清を PBS にて 10 倍に希釈し、 -20°C で保存した。

B-3. 2. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質による抗体価の測定

前日に OVA が 10 μ g/ml となるように炭酸緩衝液 (pH 9.6, Na_2CO_3 0.19 M, NaHCO_3 1.67 M) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に 100 μ l/well で分注し、 4°C で保存した。翌日、T-TBS にてプレートを 3 回 wash し、4%ブロックエースを 200 μ l/well で添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 5 回 wash した。T-TBS (Tween 20-TBS) にて 10 倍希釈したブロックエース (sample diluent) を用いて検体を $1/10^{\sim}1/1000000$ 希釈 (血清)し、50 μ l/well にて添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 5 回 wash した。sample diluent にて HRP detection antibody (IgG, IgG1,

IgG2a, IgA) (BETHYL Laboratories, Inc.) を 1/10000 に希釈し、100 μ l/well にてプレートに添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、T-TBS にて 5 回 wash した。TMB solution を 100 μ l/well 添加し、20 分インキュベート後、2 M の硫酸を 100 μ l/well 加え、吸光度を測定した (450 nm, ref 595 nm)。

B-3. 3. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質による各種サイトカインの測定

週 1 回、計 3 回、BALB/c マウスに経鼻投与を行った。最終投与より 1 週間後に、BALB/c マウスを安楽死させ、消毒用アルコールで消毒し、無菌的に脾臓を回収した。5 ml の注射筒を用いて、70 μ m のセルストレイナー (FALCON) 上で脾臓をホモジナイズし、50 ml チューブに回収した。2,000 rpm で 5 分間遠心し、ペレットに氷冷した ACT 溶液 (15 M NH_4Cl , 1 mM KHCO_3 , 1 mM EDTA) を加えよく懸濁し、氷中で 5 分間インキュベートした。その後、さらに 10% FBS を含む RPMI1640 (NISSUI) 5 ml を添加し、セルストレイナーを通して別の 50 ml チューブに移した。2,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を除去後、10% FBS を含む RPMI1640 で再懸濁した。懸濁した脾臓細胞を 96-well plate (FALCON) に 1×10^6 cells/well で播種し、1 mg/ml OVA 溶液存在下もしくは非存在下、37 $^{\circ}\text{C}$ で 24 時間培養し、培養上清を回収し、-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

回収した培養上清をサイトカインアッセイキット (R&D SYSTEMS) を用いて測定した。測定方法はキットのプロトコルに従った。

B-4. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A によるワクチン活性

B-4. 1. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A の免疫

6 週齢の雌性 C57BL/6 マウスに週 1 回、計 3 回、OVA、OVA-C-CPE 194、もしくは OVA-C-CPE 303 を経鼻投与した。なお、マウス 1 匹、1 回当たりの投与量は OVA として 5 μ g とし、投与量が 10-15 μ l となるように PBS に溶解した。最終投与より 1 週間後に、背中に E.G7-OVA 細胞 (1×10^6 cells/mouse) を皮下移植した。その後、3 日毎に腫瘍径を測定し、腫瘍

の大きさを算出した。なお、腫瘍の大きさは長径 \times 短径 \times 短径 / 2 により算出した。

B-4. 2. V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A の作製

V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A 発現 plasmid の作製

2 つの相補的なオリゴ (Fuka-11:5'-tcgaaggtaccocgggactagtagtaattaagt-3', Fuka-12:5'-tcgaacttaattaactagtagccgggtacct-3') をハイブリダイズさせて作製した、マルチクローニングサイトと両端に Xho I binding サイトを持つ pET16b-MCS を作製した。

C-CPE 194 N309A/S313A の遺伝子を特異的なプライマー (suzu-52: 5'-ttaattaaggtggaggcggttcagcgggaggtggctctggcggtatagaaaaagaaatc-3', suzu-53: 5'-agatctttaaattttgaaataatattgcataagggtatgctcc-3') を用いて増幅させ、PCR 産物を Bgl II および Pac I (New England Biolabs., Inc) にて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、20 時間処理し、同様に Bgl II および Pac I にて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 分間処理した、pET16b-MCS に T4 DNA ligase (New England Biolabs., Inc) を用いて 16 $^{\circ}\text{C}$ にて一晩ライゲーション反応を行った。

また、相補的なオリゴをハイブリダイズさせて作製した、V3 を Bgl II および Pac I (New England Biolabs., Inc) にて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、20 時間処理し、同様に Bgl II および Pac I にて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 分間処理した、pET16b-MCS- C-CPE 194 N309A/S313A に T4 DNA ligase (New England Biolabs., Inc) を用いて 16 $^{\circ}\text{C}$ にて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、ライゲーション産物と大腸菌 DH5 α (TOYOBO, Co., Ltd, Japan) を氷上で 15 分なじませた後、42 $^{\circ}\text{C}$ で 40 秒 heat shock を行い、氷上で 3 分間静置した。その後 SOC 培地を添加し 37 $^{\circ}\text{C}$ にて 50 分培養した後、100 μ g/ml ampicilin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地 (LA 培地) プレートに播種し一晩培養した。LA 培地 を 3 ml 分注した Sterile Culture Tubes (IWAKIGLASS, Co., Ltd) に 1 コロニーずつピックアップし、一晩振盪培養した後、

遠心分離し大腸菌を回収した。QIA prep Spin Miniprep kit (50) (QIAGEN Science, USA) にて大腸菌より plasmid を精製した。得られた plasmid をシーケンス解析し、目的の遺伝子配列と一致したものを得た。

B-4. 3. V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の作製確認

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種し一晩培養した。LA 培地 3 ml を分注した Sterile Culture Tubes に 1 コロニーをピックアップし、37°C で一晩振盪培養し翌日 LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes を 4 本用意し、大腸菌培養液を 200 μ l ずつ加え、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, WaKo Pure Chemicals Ind., 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 時間振とう培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μ l の 1 \times SDS (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 20 秒 \times 3 回行い大腸菌を破碎した。4 °C, 14000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 99°C で 5 分間加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて 30 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB (Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し MilliQ で脱色した後、19.2 kDa 付近の V3-C-CPE 194 N309A/S313A が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種し一晩培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 50 ml

に移し、37°C で一晩培養した (少量培養)。翌日 TA (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し 37°C で 3 時間振とう培養した (大量培養) 後、10,000 rpm で 1 分間遠心分離し大腸菌を回収した。

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 は精製条件の検討に用いた。100 ml culture の大腸菌を buffer A (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 に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 40 秒を 3 回行い大腸菌を破碎した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し上清を回収後、沈殿に 2% TrironX-100 含有 buffer A を 1 ml 加え超音波処理を行った。遠心分離後沈殿に 8 M Urea 含有 buffer A 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 buffer A を 1 ml 加え超音波処理を行い懸濁させた。それぞれの溶液画分 20 μ l に 4 \times SDS を 6.7 μ l 加え、99°C で加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い CBB 染色した後、V3-C-CPE 194 N309A/S313A が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21 10 μ l に加え、氷上で 15 分間なじませ、45 秒間 heat shock を行い 15 分間氷上で静置したのち、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し一晩培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 100 ml に移し、37°C で一晩培養した。翌日 TA 培地 1 リットルに大腸菌培養液すべてを移し、37°C で 2 時間振とう培養した後、最適濃度の IPTG を添加し 37°C で 3 時間振とう培養した。その後 10,000 rpm で 1 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-20°C で凍結保存した。

大腸菌を氷上で溶解した後、可溶化条件の検討結果に従い、buffer A を用いて V3-C-CPE 194 N309A/S313A の可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音

波処理を 3 回行った後、14000 rpm , 15 分にて遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA , MilliQ , NiSO₄ , buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) にサンプルを流し、V3-C-CPE 194 N309A/S313Aを吸着させた。100 μm の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、400 μM の imidazol 溶液 10 ml で V3-C-CPE 194 N309A/S313A を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A が溶解している buffer を PBS (-) (137 mM NaCl , 2.68 mM KCl , 8.14 mM Na₂HPO₄ , 1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いた。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 で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 μl ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、V3-C-CPE 194 N309A/S313A タンパク質の濃度を算出した。

B-4. 4. V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の発現確認

上記の操作により得た、PBS に溶解した V3-C-CPE 194 N309A/S313A 蛋白質を 100 μg/ml にて調整した。その溶液 20 μl に 4×SDS を 6.7 μl を加え、99 °Cで 5 分間加熱しサンプルとした。サンプルは 20 μl (タンパク質量として 1 μg) アプライした。一方分子量マーカーとして Broad Range (BIO-RAD Laboratories, Inc., USA) を用いた。12 % 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 で脱色した後、19.2 kDa 付近に存在する V3-C-CPE 194 N309A/S313A 蛋白質を確認した。

B-4. 5. V3 融合 C-CPE194 N309A/S313A の GL4 結合性

96 穴 ELISA plate (Greiner Bio-One GmbH,

Germany) に BV-mClaudin-4 (ネガティブコントロールとして wild BV および BV-mClaudin-1) を 0.5 μg/well の条件で、4°Cで一晩インキュベーションすることで固相化した。翌日、PBS(-)で 3 回洗浄後、1.6 % ブロックエース(DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で室温、2 時間ブロッキングし、PBS(-) で 3 回洗浄した。続いて、C-CPE タンパク質量として 0.02 μg/well の条件で各種タンパク質を添加し、室温で 2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、0.05% tween-PBS(-) (T-PBS) で 3 回洗浄後、1.6% ブロックエースで 3,000 倍に希釈した Mouse anti His-tag Ab (Zymed Laboratories Inc., Co, USA) を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、T-PBS で 3 回洗浄後、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、室温で 1 時間反応させた。反応後、T-PBS で 5 回洗浄後、TMB solution (Thermo Scientific, Rockford, IL) を加えた。20 分インキュベート後、2 M の硫酸を 100 μl/well 加え、吸光度を測定した。(450 nm , ref 595 nm)

B-5. V3 融合 C-CPE 変異体タンパク質による免疫賦活化作用の検討

B-5. 1. V3 融合 C-CPE 変異体タンパク質の作製

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μl を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 10 μl に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い、3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μl を加え、37°Cで 1 時間培養し、LA プレートに播種した後、一晩培養した。LA 培地 3 ml を分注した Sterile Culture Tubes に 1 コロニーをピックアップし、37°Cで一晩振盪培養し、翌日 LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes を 4 本用意し、大腸菌培養液を 200 μl ずつ加え、37 °Cで 3 時間振とう培養した。その後、isopropyl-β-D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, WaKo Pure Chemicals Ind., 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 時間振とう培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μl の 1×SDS (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 20 秒×3 回行い、大腸菌を破碎した。4 °C, 14000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 99°C で 5 分間加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて 30 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB (Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し、MilliQ で脱色した後、19.2 kDa 付近の V3-C-CPE 194 N309A/S313A が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 µl を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd) 10 µl に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い、3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 µl を加え 37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種した後、一晚培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 50 ml に移し、37°C で一晚培養した (少量培養)。翌日 TA (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し、37°C で 3 時間振とう培養した (大量培養) 後、10,000 rpm で 1 分間遠心分離し大腸菌を回収した。

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 は精製条件の検討に用いた。100 ml culture の大腸菌を buffer A (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 に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 40 秒を 3 回行い、大腸菌を破碎した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収後、沈殿に 2% TrironX-100 含有 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理を行った。遠心分離後沈殿に 8 M Urea 含有 buffer A 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 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理を行い懸濁させた。それぞれの溶液画分 20 µl に 4×SDS を 6.7 µl 加え、99°C で加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色した後、V3-C-CPE 194 N309A/S313A が

可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 µl を BL21 10 µl に加え、氷上で 15 分間なじませ、45 秒間 heat shock を行い、15 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 µl を加え 37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し、一晚培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 100 ml に移し、37°C で一晚培養した。翌日 TA 培地 1 リットルに大腸菌培養液全てを移し、37°C で 2 時間振とう培養した後、最適濃度の IPTG を添加し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後 10,000 rpm で 1 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-20°C で凍結保存した。

大腸菌を氷上で溶解した後、可溶化条件の検討結果に従い、buffer A を用いて V3-C-CPE 194 N309A/S313A の可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm, 15 分にて遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA, MilliQ, NiSO₄, buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) にサンプルを流し、V3-C-CPE 194 N309A/S313A を吸着させた。100 µm の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、400 µM の imidazol 溶液 10 ml で V3-C-CPE 194 N309A/S313A を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

V3-C-CPE 194 N309A/S313A が溶解している buffer を PBS (-) (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いた。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 で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 µl ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、V3-C-CPE 194 N309A/S313A タンパク質の濃度を算出した。

B-5. 2. V3-C-CPE 194 N309A/S313A および

V3-C-CPE303 タンパク質の経鼻投与と各種サンプルの回収

週 1 回、計 4 回、BALB/c マウスに経鼻投与を行った(n=5)。すべての群において一匹、一回あたりの投与量は V3 量として 5 μ g とし投与量が 10~15 μ l となるように PBS に溶解した。最終投与より一週間後、マウスより下記に示す方法により各種サンプルを回収した。また、同様にコレラトキシン(CT)を V3 融合タンパク質に混合したのもマウスに経鼻投与した。

・血清サンプル (serum sample)

マウスから眼底採血により血液を回収し、3000 \times g、10 分にて遠心分離を行った。上清を PBS にて 10 倍に希釈し、 -80°C で保存した。

B-1. 3. V3-C-CPE 194 N309A/S313A タンパク質の経鼻投与に伴う V3 特異的抗体価の測定

前日に V3 が 50 μ g/ml となるように V3-KLH を炭酸緩衝液 (pH 9.6, Na_2CO_3 0.19 M, NaHCO_3 1.67 M) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に 100 μ l/well で分注し、 4°C で保存した。翌日、T-TBS (0.05% Tween20-TBS) にてプレートを 3 回洗浄し、4%ブロックエースを 200 μ l/well で添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 3 回洗浄した。T-TBS にて 0.4%に調整したブロックエース (sample diluent) を用いて血清を 1/10 ~ 1/100000 希釈し、50 μ l/well にて添加した。室温にて 2 時間インキュベートした後、T-TBS で 5 回洗浄した。sample diluent にて HRP detection antibody (IgG) (BETHYL Laboratories, Inc.) を 1/10000 に希釈し、100 μ l/well にてプレートに添加した。室温で 1 時間インキュベートした後、T-TBS にて 5 回洗浄した。TMB solution を 100 μ l/well 添加し、20 分インキュベート後、2M 硫酸を 100 μ l/well 加え、吸光度を測定した (450 nm, ref 595 nm)。

B-6. PspA 融合 C-CPE 変異体タンパク質の作製

B-6. 1. PspA および PspA-C-CPE 変異体 plasmid の作製

卵白アルブミン OVA と各種 C-CPE の cDNA を

pET16b に組み込んだ pET16b-OVA-C-CPE を Pac I および Kpn I (NEB)にて 37°C 、2 時間処理し、アガロース電気泳動によりフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。

一方、PspA の cDNA を鋳型とし、10 x PCR buffer for KOD plus 2 μ l、2.5 mM MgSO_4 1 μ l、2.5 mM dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1.6 μ l、滅菌精製水 10.4 μ l、5 U/ μ l Takara kod plus 0.4 μ l を混合し PCR を行った。PspA クローニング用プライマーは、forward primer (5'-AGggtaccGAAGAATCTCCCGTAGCC-3')、reverse primer (5'-GCttaattaaTTCTGGGGCTGGA GTTTC-3')を用いた。PCR の条件は 94°C 、2 min の後、 94°C 、15 sec、 66°C 、30 sec、 72°C 、1 min を 30 サイクル、 72°C 、5min を 1 サイクル行った。PCR 産物をアガロース電気泳動により、分離、精製を行い、Pac I および Kpn I により切断した。Pac I および Kpn I により切断した pET16b-OVA-C-CPE および PspA と T4 DNA ligase (New England Biolabs., Inc) を用いて 16°C にて一晚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、大腸菌 DH5 α (TOYOBO, Co., Ltd, Japan) を氷上で 15 分なじませた後、 42°C で 40 秒 heat shock を行い、氷上で 3 分間静置した。その後、SOC 培地を添加し 37°C にて 50 分培養した後、100 μ g/ml ampicilin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地 (LA 培地) プレートに播種し、一晚培養した。LA 培地 を 3 ml 分注した Sterile Culture Tubes (IWAKIGLASS, Co., Ltd) に 1 コロニーずつピックアップし、一晚振盪培養した後、遠心分離し大腸菌を回収した。QIA prep Spin Miniprep kit (50) (QIAGEN Sience, USA) にて大腸菌より plasmid を精製した。得られた plasmid を Pca I および Kpn I で処理し、アガロース電気泳動により PspA のバンドが認められたクローンに関してシーケンス解析し、目的の遺伝子配列と一致したクローンを得た。

一方、PspA 発現 plasmid に関しては、まず PspA の cDNA を鋳型とし、10 x PCR buffer for KOD plus 2 μ l、2.5 mM MgSO_4 1 μ l、2.5 mM dNTP mix 2 μ l、10 μ M primers 1.6 μ l、滅菌精製水 10.4 μ l、5 U/ μ l

Takara kod plus 0.4 μ l を混合し PCR を行った。PspA クローニング用プライマーは、forward primer (5' -atgatgatgCATATGgaagaatctcccgtagc c-3'), reverse primer (5' -GCGgggatccTTATTctg gggctggagtcc-3') を用いた。PCR の条件は 94°C, 2 min の後、94°C, 15 sec, 59°C, 30 sec, 72°C, 1 min を 30 サイクル、72°C, 5min を 1 サイクル行った。得られた PCR 産物をアガロース電気泳動により分離、精製を行い、Nde I および BamH I により処理した。また、pET16b も Nde I および BamH I により処理し、フェノール/クロロホルム抽出した。Nde I および BamH I で処理した PspA cDNA および pET16b を 4 DNA ligase (New England Biolabs., Inc) を用いて 16°C にて一晚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、Xho I 処理により plasmid を self cut した。得られた plasmid をフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿し、plasmid と大腸菌 DH5 α (TOYOBO, Co., Ltd, Japan) を氷上で 15 分なじませた後、42°C で 40 秒 heat shock を行い、氷上で 3 分間静置した。その後、SOC 培地を添加し 37°C にて 50 分培養した後、100 μ g/ml ampicilin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地 (LA 培地) プレートに播種し一晚培養した。LA 培地 を 3 ml 分注した Sterile Culture Tubes (IWAKIGLASS, Co., Ltd) に 1 コロニーずつピックアップし、一晚振盪培養した後、遠心分離し大腸菌を回収した。QIA prep Spin Miniprep kit (50) (QIAGEN Science, USA) にて大腸菌より plasmid を精製した。得られた plasmid を Nde I および BamH I で処理し、アガロース電気泳動により PspA のバンドが認められたクローンに関してシーケンス解析し、目的の遺伝子配列と一致したクローンを得た。

B-6. 2. PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の作製

PspA および PspA-C-CPE 変異体発現 plasmid 1 μ l を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 5 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 50 μ l を加え、

37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し、一晚培養した。LA 培地 3 ml を分注した Sterile Culture Tubes に 1 コロニーをピックアップし、37°C で一晚振盪培養し、翌日 LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes を 4 本用意し、大腸菌培養液を 200 μ l ずつ加え、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, WaKo Pure Chemicals Ind., 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。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μ l の 1 \times SDS (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 20 秒 \times 3 回行い大腸菌を破碎した。4°C, 14000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 99°C で 5 分間加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて 30 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB (Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し MilliQ で脱色した後、PspA および PspA-C-CPE 変異体発現が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

PspA および PspA-C-CPE 変異体発現 plasmid 1 μ l を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 5 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い、3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 50 μ l を加え 37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し、一晚培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 50 ml に移し、37°C で一晚培養した。翌日 TA (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し、37°C で 3 時間振とう培養した後、10,000 rpm で 2 分間遠心分離し、大腸菌を回収した。

500 ml の大腸菌培養液のうち 3 ml を可溶化条件の検討に用い、497 ml は精製条件の検討に用いた。3 ml culture の大腸菌を buffer A (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) 300 μ l に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 40 秒を 3 回行い、大腸菌を破碎した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収後、沈殿に 2 % TrironX-100 含有 buffer A を 300 μ l 加え、超音波処理を行った。遠心分離後沈殿に 8 M Urea 含有 buffer A を 300 μ l 加え、超音波処理をしたそれぞれの溶液画分 20 μ l に 4 \times SDS を 6.7 μ l 加え、100°C で加熱しサンプルとした。10 % polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い CBB 染色した後、PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

大腸菌を氷上で溶解した後、可溶化条件の検討結果に従い、buffer A を用いての可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm, 15 分にて遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA, MilliQ, NiSO₄, buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) にサンプルを流し、PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質を吸着させた。100 μ m の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、400 μ M の imidazol 溶液 10 ml で PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質が溶解している buffer を PBS (-) (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いた。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 で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 μ l ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の濃度を算出した。

B-6. 3. PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質

の発現確認

上記の操作により得た PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質を 1 μ g/13.4 μ l になるよう PBS で調整した。その溶液 13.4 μ l に 4 \times SDS を 6.6 μ l を加え、100°C で 5 分間加熱しサンプルとした。サンプルは 20 μ l (タンパク質量として 1 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。10 % 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 で脱色した後、PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質を確認した。

また、上記と同様に SDS-PAGE を行い、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間タンパク質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5 % スキムミルク (BD Laboratories, Inc.) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪し、ブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、Canget 1 (TOYOBO) により 2000 倍に希釈した一次抗体: Mouse anti His-tag antibody (ZYMED) と 21 時間反応させた。T-TBS で 3 回洗浄し、Canget 2 により 2000 倍に希釈した二次抗体: Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 3 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、ImageQuant LAS 4000 により PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の検出を行った。

B-6. 4. PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の mCL-4 結合性 (ELISA)

96 穴 ELISA plate (Greiner Bio-One GmbH, Germany) に mCL-4-BV (ネガティブコントロールとして wild type BV および mCL-5-BV) を 0.5 μ g/well の条件で 4°C、一晚インキュベーションし、

固相化した。翌日、PBS(-)で 3 回洗浄後、1.6 % ブロックエース(DS PHARMA BIOMEDICAL, Japan) で室温、2 時間ブロッキングし、PBS(-) で 3 回洗浄した。続いて、C-CPE 変異体タンパク質量として 0.02 $\mu\text{g}/\text{well}$ の条件で各種タンパク質を添加し、室温で 2 時間インキュベーションした。インキュベーション後、0.05% tween-PBS(-) (T-PBS) で 3 回洗浄後、0.4% ブロックエースで 3,000 倍に希釈した Mouse anti His-tag Ab (Zymed Laboratories Inc., Co, USA) を加え、室温で 2 時間反応させた。反応後、T-PBS で 3 回洗浄後、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、室温で 1 時間反応させた。反応後、T-PBS で 5 回洗浄後、TMB solution (Thermo Scientific, Rockford, IL) を加えた。5 分間インキュベート後、2 M 硫酸を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 加え、吸光度を測定した。(450 nm , ref 595 nm)

B-6. 5. PspA および PspA-C-CPE 変異体タンパク質の mCL-4 結合性 (FACS)

mCL-4、-5 発現 L 細胞を 5.0×10^5 cells/sample となるように 96 well plate に播種し、1% BSA-PBS にて希釈した各種タンパク質を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて 1/200 に希釈した Mouse anti-His tag 抗体(Thermo)を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて 1/1500 に希釈した Goat anti-mouse IgG(H+L) -FITC 抗体(ROCKLAND)を添加、攪拌した後、氷上で遮光し、30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 3 回洗浄後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B-7. C-CPE 変異体修飾リポソームの作製

B-7. 1. C-CPE 変異体修飾リポソームの準備

リポソーム凍結乾燥品に超純水 500 μl を加え、緩やかに混和した。

B-7. 2. C-CPE 変異体修飾リポソームの mCL4 結合性

mCL4 発現 L 細胞を 5.0×10^5 cells/sample となるように 96 well plate に播種し、1% BSA-PBS にて希釈した各種リポソームを添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Mouse anti-His tag 抗体(Thermo)を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Goat anti-mouse IgG(H+L) -FITC 抗体(ROCKLAND)を添加、攪拌した後、氷上で遮光し、30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 3 回洗浄後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となつように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B-7. 3. OVA 封入 C-CPE 変異体修飾リポソームの作製

リポソーム凍結乾燥品に 15 mg/ml となるように調整した卵白アルブミン溶液を 500 μl 添加し、緩やかに混和した。

前日に Rabbit-anti-OVA antibody を 10 μg となるように炭酸緩衝液 (pH 9.6.) に溶解し、96 穴 NUNC Immuno plate に 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で分注し、4°C で保存した。翌日、PBS にて 4 回洗浄後、4% ブロックエースを 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加した。室温にて 90 分間インキュベートした後、PBS にて 4 回洗浄した。検量線コントロールとして PBS にて種々の濃度に希釈した OVA 溶液、PBS にて希釈した OVA 封入修飾リポソームおよび 1% T-PBS (Tween 20-PBS) にて希釈し、60°C で 5 分間煮沸することでリポソームを破壊した溶液をそれぞれプレートに 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加した。室温で 90 分間インキュベート後、PBS で 4 回洗浄した。T-PBS にて 0.4% に調整したブロックエース (sample diluent) を用いて mouse-anti-OVA antibody を 1/3000 に希釈し、100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加した。室温で 90 分間インキュベート後、PBS で 4 回洗浄した。sample diluent にて 1/1000 に希釈した Goat-anti-mouse IgG(H+L) -HRP antibody(xxx) を 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ で添加した。室温で 1 時間インキュベート後、PBS で 5 回洗浄した。

TMB solution を 100 μ l/well で添加し、10 分間インキュベート後、2M 硫酸 100 μ l/well で加え、反応停止後、吸光度を測定した(450 nm , ref 595 nm)。

B-7. 4. OVA 封入 C-CPE 変異体修飾リポソームの mCL4 結合性

mCL4 発現 L 細胞を 5.0×10^5 cells/sample となるように 96 well plate に播種し、1% BSA-PBS にて希釈した各種リポソームを添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Mouse anti-His tag 抗体 (Thermo) を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗浄後、1% BSA-PBS にて希釈した Goat anti-mouse IgG (H+L) -FITC 抗体 (ROCKLAND) を添加、攪拌し、氷上で遮光した後、30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 3 回洗浄後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 μ g/mL となつように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B-8. C-CPE タンパク質の作製

B-8. 1. C-CPE タンパク質の精製

C-CPE 194 発現 plasmid 1 μ l を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い、3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え、37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種した後、一晚培養した。LA 培地 3 ml を分注した Sterile Culture Tubes に 1 コロニーをピックアップし、37°C で一晚振盪培養し、翌日 LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes を 4 本用意し、大腸菌培養液を 200 μ l ずつ加え、37 °C で 3 時間振とう培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, WaKo Pure Chemicals Ind., 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 時間振とう培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μ l の 1 \times SDS (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 20 秒 \times 3 回行い、大腸菌

を破碎した。4 °C, 14000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 99°C で 5 分間加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて 30 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB (Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し、MilliQ で脱色した後、19.2 kDa 付近の C-CPE 194 タンパク質が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

C-CPE 194 発現 plasmid 1 μ l を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い、3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種した後、一晚培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 50 ml に移し、37°C で一晚培養した (少量培養)。翌日 TA (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し、37°C で 3 時間振とう培養した (大量培養) 後、10,000 rpm で 1 分間遠心分離し大腸菌を回収した。

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 は精製条件の検討に用いた。100 ml culture の大腸菌を buffer A (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 に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 40 秒を 3 回行い、大腸菌を破碎した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収後、沈殿に 2% TrironX-100 含有 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理を行った。遠心分離後沈殿に 8 M Urea 含有 buffer A 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 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理を行い懸濁させた。それぞれの溶液画分 20 ml に 4 \times SDS を 6.7 μ l 加え、99 °C で加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色した後、C-CPE 194 タンパク質が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

C-CPE 194 発現 plasmid 1 μ l を BL21 10 μ l に

加え、氷上で 15 分間なじませ、45 秒間 heat shock を行い、15 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し、一晚培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 100 ml に移し、37°C で一晚培養した。翌日 TA 培地 1 リットルに大腸菌培養液すべてを移し、37°C で 2 時間振とう培養した後、最適濃度の IPTG を添加し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後 10,000 rpm で 1 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-20°C で凍結保存した。

大腸菌を氷上で溶解した後、可溶化条件の検討結果に従い、buffer A を用いて C-CPE 194 の可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm、15 分にて遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA、MilliQ、NiSO₄、buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) にサンプルを流し、C-CPE 194 タンパク質を吸着させた。100 mM の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、400 mM の imidazol 溶液 10 ml で C-CPE 194 タンパク質を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

C-CPE 194 タンパク質が溶解している buffer を PBS (-) (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いた。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 で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 μ l ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、C-CPE 194 タンパク質の濃度を算出した。

B-8. 2. C-CPE N306A/S315A (C-CPE mutant) タンパク質の精製

CL への結合性が低下した C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant) の発現 plasmid 1 μ l

を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い、3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え、37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種した後、一晚培養した。LA 培地 3 ml を分注した Sterile Culture Tubes に 1 コロニーをピックアップし、37°C で一晚振盪培養し、翌日 LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes を 4 本用意し、大腸菌培養液を 200 μ l ずつ加え、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, Wako Pure Chemicals Ind., 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 時間振とう培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μ l の 1 \times SDS (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 20 秒 \times 3 回行い、大腸菌を破碎した。4°C、14000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 99°C で 5 分間加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて 30 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB (Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し、MilliQ で脱色した後、19.2 kDa 付近の C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant) タンパク質が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant) 発現 plasmid 1 μ l を BL21 (DE3) (Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い、3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種した後、一晚培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 50 ml に移し、37°C で一晚培養した (少量培養)。翌日 TA (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し、37°C で 3 時間振とう培養した (大量培養) 後、10,000 rpm で 1 分間遠心分離して大腸菌を回収した。

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 は精製条件の検討に用いた。100 ml culture の大腸菌を buffer A (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 に懸濁し、氷冷しながら超音波処理 40 秒を 3 回行い、大腸菌を破碎した。4°C, 14,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を回収後、沈殿に 2% TrironX-100 含有 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理を行った。遠心分離後沈殿に 8 M Urea 含有 buffer A 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 buffer A を 1 ml 加え、超音波処理を行い懸濁させた。それぞれの溶液画分 20 ml に 4×SDS を 6.7 μl 加え、99°C で加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて SDS-PAGE を行い、CBB 染色した後、C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク質が可溶化した画分の buffer を可溶 buffer とした。

C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)発現 plasmid 1 μl を BL21 10 μl に加え、氷上で 15 分間なじませ、45 秒間 heat shock を行い、15 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μl を加え 37°C で 45 分間培養し、LA プレートに播種し、一晚培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 100 ml に移し、37°C で一晚培養した。翌日 TA 培地 1 リットルに大腸菌培養液すべてを移し、37°C で 2 時間振とう培養した後、最適濃度の IPTG を添加し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後 10,000 rpm で 1 分間遠心分離して大腸菌を回収し、-20°C で凍結保存した。

大腸菌を氷上で溶解した後、可溶化条件の検討結果に従い、buffer A を用いて C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク質の可溶化を行った。buffer A を 1 ml/100 ml culture の割合で添加し、40 秒間の超音波処理を 3 回行った後、14000 rpm, 15 分にて遠心分離を行い、上清を回収した。予め 6 M guanidine/EDTA, MilliQ, NiSO₄, buffer A を順に流して平衡化しておいた HiTrap™ Chelating HP (GE Healthcare) にサンプルを流し、C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク

質を吸着させた。100 mm の imidazol 溶液 10 ml で洗浄した後、400 mM の imidazol 溶液 10 ml で C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク質を溶出させ、溶出液を 1 ml ずつ分取した。

C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク質が溶解している buffer を PBS (-) (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.14 mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄) に置換するため PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いた。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 で得た溶出液 1 ml を流した。PBS を 500 ml ずつ流して PD-10 column から溶出液を分取した。次にウシ血清アルブミン (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を標準液として BCA™ Protein Assay Kit (PIERCE Biotechnology Inc., USA) を用い、560 nm における吸光度を測定し、C-CPE 194 N306A/S315A (C-CPE mutant)タンパク質の濃度を算出した。

B-8. 3. C-CPE タンパク質の発現確認

上記の操作により得た C-CPE および C-CPE mutant タンパク質を 1 mg/13.4ml になるよう PBS で調整した。その溶液 13.4 μl に 4×SDS を 6.6 ml を加え、100°C で 5 分間加熱しサンプルとした。サンプルは 20 μl (タンパク質量として 1 μg) アプライした。一方分子量マーカーとして Broad Range (BIO-RAD Laboratories, Inc., USA) を用いた。10% 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 で脱色した後、各種 C-CPE タンパク質を確認した。

また、上記と同様に SDS-PAGE を行い、TRANS-BLOT® SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) により polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜上に 240 mA, 20 分間タンパク質を転写した。転写後、PVDF 膜を 5% スキムミルク (BD Laboratories, Inc.,) 含有 T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M NaCl, 0.05% Tween 20) に浸し、室温で 2 時間振盪し、ブロッキング操作を行った。T-TBS (10 mM Tris-HCl (PH 8.0), 0.1 M

NaCl, 0.05% Tween 20) で 3 回 洗淨し、Canget 1 (TOYOBO) により 2000 倍に希釈した一次抗体: Mouse anti His-tag antibody (ZYMED)と 21 時間反応させた。T-TBS で 3 回 洗淨し、Canget 2 により 2000 倍に希釈した二次抗体: Goat anti-Mouse IgG HRP conjugated (Millipore, Carrigwohill, Co., Cork, Ireland) と 1 時間反応させた。次に T-TBS で 3 回洗淨した後、ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., USA) を用いて発光させ、ImageQuant LAS 4000 により各種 C-CPE タンパク質の発現検出を行った。

B-9. C-CPE の体内動態解析

B-9. 1. 細胞培養

マウス線維芽細胞由来 L 細胞は 10% FBS, 20 mM NaHCO₃, 2 mM L-glutamine を含む Eagle's MEM 培地 (MEM 培地), 各種 CL 発現 L 細胞は MEM 培地にさらに 500 mg/ml G418 を加えて用いて 37 °C, 5% CO₂ 条件下で培養した。

B-9. 2. C-CPE の蛍光標識体の作製

XenoLight CF™ 蛍光標識キット (Caliper) のプロトコールに準じて、C-CPE または C-CPE mutant のリジン残基を CF750 で化学修飾することで蛍光標識体を作製した。1 mg の C-CPE または C-CPE mutant に対し 900 µL の PBS を加え調製し、1 M Sodium bicarbonate (pH 8.3) を加えた。DMSO で溶解した 0.05 µmole の CF750 12 µL と混合し、常温で 1 h 遮光反応させた。混合物を 10kD MWCO ultrafiltration vial に添加し、14,500 rpm、4°C で遠心を行い、CF750 標識 C-CPE を vial のフィルターにトラップすることで分子量の小さい非標識 CF750 を除去した。チューブに 600 µL の PBS を添加し、遠心により CF750 標識 C-CPE を三回 wash した。1 mL の PBS をチューブに添加・ピペティングし、CF750 標識 C-CPE を回収した。さらに 0.22 µm のフィルターで濾過し、無菌にした。最後に吸光度法により OD 280 nm および OD 755 nm の吸光度を測定し、プロトコールにある公式に準じてタンパク質濃度を計算した。

B-9. 3. C-CPE の各種 L/CL 細胞への結合性確認

mCL-1、-2、-3、4、-5 発現 L 細胞を 5.0×10^5 cells/sample となるように 96 well plate に播種し、1% BSA-PBS にて希釈した蛍光標識 C-CPE および C-CPE mutant を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗淨後、1% BSA-PBS にて 1/200 に希釈した Mouse anti-His tag 抗体 (Thermo) を添加、攪拌し、氷上で 1 時間静置した。0.2% BSA-PBS にて 2 回洗淨後、1% BSA-PBS にて 1/1500 に希釈した Goat anti-mouse IgG (H+L)-FITC 抗体 (ROCKLAND) を添加、攪拌した後、氷上で遮光し、30 分静置した。0.2% BSA-PBS にて 3 回洗淨後、0.2% BSA-PBS にて終濃度 5 mg/mL となるように希釈した PI (Miltenyi Biotec) を加え、FACSCalibur にて測定し、CellQuestPro にて解析を行った。

B-9. 4. 正常マウスにおける C-CPE の体内分布

BALB/c マウス (雌性、8 週齢) に CF750-C-CPE または CF750-C-CPE mutant を 2 µg/mouse となるように調製し、尾静脈内投与した。投与 10 min、30 min、1 h、3 h、6 h、24 h、48 h、72 h、96 h 後、体重を測定し、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、甲状腺、胃、腸、脳、精巣を単離した。また、血液を心採血により 100 µL 収集した。イメージング装置 (Maestro™ EX) にて蛍光強度を測定し、ソフトウェア Maestro 2.10.0 にて解析した。各臓器の蛍光強度は %ID (%Injected dose) の標記で求めた。血液に関して、マウス体重の 8% に相当する量で計算した。

B-10. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A 発現 plasmid の作製

C-CPE 194 N309A/S313A の遺伝子を pET16b に組み込んだ pET-C-CPE 194 N309A/S313A プラスミドを用いた。pET-C-CPE 194 N309A/S313A を Nde I (New England Biolabs., Inc) にて 37°C、120 分処理し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。一方、2 つの相補的なオリゴ (Fuka-25:5' -tataggtacccgggactagttaattaaggaggaggaggatctggaggaggaggatctggaggagc-3' , Fuka-26 : 5' -tagctcctccagatcctcctcctccagatcctcctcctcccttaa

ttaactagtcccggtaccta-3') をハイブリダイズさせて作製した、マルチクローニングサイトと両端に *Nde* I binding サイトを持つ DNA を作製した。双方を T4 DNA ligase (New England Biolabs., Inc) を用いて 16°C にて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 *Nde* I を用いて 37 °C、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 15 分なじませた後、42°C で 40 秒 heat shock を行い、氷上で 3 分間静置した。その後 SOC 培地を添加し 37°C にて 50 分培養した後、100 μ g/ml ampicilin sodium (SIGMA aldrich Japan Co., Ltd) を添加した LB 培地 (LA 培地) プレートに播種し一晩培養した。LA 培地を 3 ml 分注した Sterile Culture Tubes (IWAKIGLASS, Co., Ltd) に 1 コロニーずつピックアップし、一晩振盪培養した後、遠心分離し大腸菌を回収した。QIA prep Spin Miniprep kit (50) (QIAGEN Sience, USA) にて大腸菌より plasmid を精製した。得られた plasmid をシークエンス解析し、目的の遺伝子配列と一致することを確認した。

上記の操作で得たプラスミドに対し *Kpn* I, *Pac* I (New England Biolabs., Inc) にて 37°C、120 分制限酵素処理し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。一方、OVA-C-CPE plasmid を精製し、*Kpn* I, *Pac* I を用いて 37°C、120 分処理し、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行った。1% TAE ゲルにて電気泳動を行い、目的の OVA のバンドを切り出し、精製を行った。双方の DNA を T4 DNA ligase を用いて 16 °C にて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 *Spe* I (New England Biolabs., Inc) で 37°C、120 分処理した。ライゲーション産物を大腸菌 DH5 α にトランスフォーメーションし (方法は前段落と同様)、大腸菌を回収した。QIA prep Spin Miniprep kit (50) にて大腸菌より plasmid を精製した。得られたサンプルについてシークエンス解析し、His-OVA-C-CPE 194 N309A/S313A をコードしたプラスミドを得た。

B-11. OVA 融合 C-CPE194 N309A/S313A タンパク質の精製

OVA-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種し一晩培養した。LA 培地 3 ml を分注した Sterile Culture Tubes に 1 コロニーをピックアップし、37°C で一晩振盪培養し翌日 LA 培地を 2 ml ずつ分注した Sterile Culture Tubes を 4 本用意し、大腸菌培養液を 200 μ l ずつ加え、37 °C で 3 時間振とう培養した。その後、isopropyl- β -D (-) thiogalactopyranoside (IPTG, WaKo Pure Chemicals Ind., Japan) を終濃度 0、0.25、0.5、1.0 mM となるように添加し、30 または 37°C で 3 時間振とう培養した。遠心分離により大腸菌を回収後、200 μ l の 1 \times SDS (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 20 秒 \times 3 回行い大腸菌を破碎した。4 °C、14000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収して 99°C で 5 分間加熱しサンプルとした。10% polyacrylamide gel を用いて 30 mA で電気泳動 (SDS-PAGE) を行い、CBB (Bio-Rad laboratories, Inc., USA) で 1 時間染色し MilliQ で脱色した後、62 kDa 付近の OVA-C-CPE 194 N309A/S313A が多く産生されている IPTG 濃度を最適なものとした。

OVA-C-CPE 194 N309A/S313A 発現 plasmid 1 μ l を BL21(DE3)(Novagen, Co., Ltd) 10 μ l に加え、氷上で 15 分なじませ、40 秒間 heat shock を行い 3 分間氷上で静置した後、SOC 培地 100 μ l を加え 37°C で 1 時間培養し、LA プレートに播種し一晩培養した。大腸菌 10 コロニー程度を LA 培地 50 ml に移し、37°C で一晩培養した (少量培養)。翌日 TA (TERRIFIC BROTH/amp, Invitrogen, Co., Ltd) 培地 500 ml に大腸菌培養液全てを移し、37°C で 3 時間振とう培養した。その後、決定した発現誘導条件に従い IPTG を添加し 37°C で 3 時間振とう培養した (大量培養) 後、10,000 rpm で 1 分