

平成 21 年 6 月 6 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006-2008

課題番号：18580340

研究課題名 (和文) 抗体重鎖可変領域イディオトープライブラリーを用いた整列ペプチド配列解析法の確立

研究課題名 (英文) Establishment of analysis on peptide sequencing using idiotopic libraries derived from immunoglobulin heavy chain variable regions

研究代表者

西 義介 (NISHI YOSHISUKU)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：40387957

研究成果の概要：

タンパク質のアミノ酸配列情報は新規性の確認に重要である。既存の化学的、物理的方法より簡便な方法の確立を目指した。抗体は抗原識別する際に、数個のアミノ酸の配列を認識している。重鎖部位遺伝子群をマウスとイヌザメから抽出し、ファージ（大腸菌感染ウイルス）上に提示することに成功した。これらを用いて、化学合成した3連アミノ酸（トリペプチド）のライブラリーに対して、パニングすることにより、結合する分子を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：機能分子設計

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム研究におけるプロテオミクスの中核的な研究課題の一つはタンパク質間の相互作用を明らかにすることであり、そのことを通して、細胞内でのタンパク質相互作用のネットワークを解明し、細胞の全体像を明らかにすることにある。ゲノム情報からヒトには22000個の遺伝子があると推定されているが、トランスクリプトバリエーション、翻訳後修飾違いなどを考慮に入れると、1つの種で約40

～50万個のタンパク質が存在していると推定される。

この現状を踏まえると、多数のタンパク質の相互作用と機能の解析のためのツールが依然として不足していると言わざるを得ない。特に多数のタンパク質の一次構造解析は重要な方法論である。我々はタンパク質の配列を直接 (*in situ*) に解析できる手段の重要性は依然として存在していると考えます。

タンパク質の配列解析には、従来から、化

学的方法としてのエドマン法、物理的な質量分析法 (MALDI-TOF MS/MS 法) などが存在するが、それぞれ簡便さなどの点で問題があり、プロテオミクスを視野に入れた網羅的、系統的な研究の目的には汎用性という観点から必ずしも適さず、さらに補完的で簡便な方法の確立が必要であると考えた。

## 2. 研究の目的

プロテオミクスを考慮に入れると、簡易型の「チップ解析法」は圧倒的に利便性がある。丁度、DNA 配列解析法において、DNA チップ上での遺伝子配列の解析を可能にした、Southern が考案した「ハイブリダイゼーションを用いた DNA 配列の解析法」に類比して考えることができる。この DNA チップに相当する配列解析プロテインチップは現存しない。本研究は DNA チップに匹敵する「タンパク質の配列解析をチップ上で可能にする」方法を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

抗体分子はタンパク質のループに存在するような数個 (4~5 残基) の線形アミノ酸配列を認識することが知られている。もしもアミノ酸配列 3 残基を特異的に認識する抗体のセット ( $20^3=8000$  通り) が全て揃えば、2 残基オーバーラップにより、ペプチドやタンパク質の配列解析が可能になる (但し、同じ 2 残基オーバーラップが起こり、間違える確率は 1/400)。この目的のために、アミノ酸配列エピトープに対するイディオタイプライブラリーの作製を行った。つまり、検出系は従来の抗体よりも小さな分子を考えた。これは大腸菌で発現させやすく、扱いやすいことなどである。ナイーブライブラリーから選択するために、レパートリーの豊富なマウスの  $V_H$  鎖と 1 本鎖で機能するサメの IgNAR をこの候補分子とした。さらに、これらの分子が識別する配列の確認用にペプチド提示ファージを作製した。

(1) アミノ酸連続配列 (整列) エピトープ・トリペプチドライブラリーの構築: ファージ提示重鎖抗体に対して、マイクロパニングを行うために、アミノ酸連続配列 (整列) エピトープ・トリペプチド (synthetic tripeptide: s-TRIP) を親水性ゲル上に合成した。合成は N- $\alpha$ -フルオレニルメトキシカルボニル (F-moc) 法により行った。親水性ゲルには Tenta Gel

S-NH<sub>2</sub> (130mm, 0.31mmol/g) を用いた。Tenta Gel S-NH<sub>2</sub> を DMF にて膨潤後、F-moc アミノ酸と縮合剤の 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBt)、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCDI) 及び DMF を加えて室温で 4~6 時間攪拌した。縮合の確認には、ニンヒドリン反応により行った。沸騰湯浴にて加熱し、樹脂が発色しないことを確認した。確認ゲルは DMF で洗浄し、25%ピペリジンでさらに洗浄した。縮合して得られた s-TRIP 樹脂の側鎖の脱保護を Reagent K (トリフルオエオ酢酸 82.5%、H<sub>2</sub>O 5%、フェノール 5%、チオアニソール 5%、1, 2 エタンジチオール 2.5%) を用いて行った。洗浄、乾燥後、冷蔵保存した。

(2) 抗 E-tag 抗体の調製: ファージディスプレイ  $V_H$  抗体の精製・検出用に E-tag (GAPVYPDPLEPR) ペプチドを用いた。そのために、マウス抗 E-tag モノクローナル抗体の調製を行った。①抗原の調製: キャリア蛋白質であるサイログロブリン (ThyroG) との架橋のため、N 末端に Cys を付加させた Cys-E-tag (Cys-GAPVYPDPLEPR) を合成した。合成は First Moc 0.25  $\Omega$  Mon Prev PK プログラムでアブライドバイオシステム社製 433A-ペプチドシンセサイザーを使用して行った。合成後、Reagent K (トリフルオエオ酢酸 82.5%、H<sub>2</sub>O 5%、フェノール 5%、チオアニソール 5%、トリイソプロピシラン 2.5%) にて脱保護を行った。その後、析出したペプチドを 0.1% TFA/H<sub>2</sub>O 1 ml に溶かし、HPLC で精製した。ThyroG 溶液と *M*-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS) 溶液を反応させ、常温で 30 分振とうし、ゲル濾過によって未反応の MBS を除去し、ThyroG-MBS を精製した。次に、ThyroG-MBS 溶液と E-tag 溶液を混合し、常温で 3 時間振とうして、ThyroG-MBS-E-tag を作った。②免疫: ThyroG-MBS-E-tag 溶液にアジュバンド (初回はフロイド完全アジュバンド、追加免疫はフロイド不完全アジュバンド (FIA)) を加え、総タンパク濃度 600 mg/100 ml になるよう調製した抗原溶液をマウス 1 匹あたり 100  $\mu$ l ずつ 5 匹に皮下投与した。14-17 日後に同濃度、同量の抗原を追加免疫した (但し、FIA で)。11 日後に 2 回目と同濃度、同量で 3 度目の免疫を行なった。13 日後に 2 回目と同濃度、同量で 4 度目の免疫を行なった。抗体価が上がったマウスに同濃度、同量で腹腔内に最終免疫を行った。最終免疫から 3 日後に脾臓を取り出し、細胞融合を行った。抗体価の測定はマウスの尾静脈から採血した血清で ELISA にて行った。③細胞融合: ミエローマ細胞 (PA1) を 10%FCS TIL Media I 培地で、CO<sub>2</sub> インキュベーターで 5%CO<sub>2</sub>、100%湿度、37°C で  $3.6 \times 10^7$  になるように継代培養した。抗原感作マウスから脾臓を摘出し、無菌的に DMEM 10 ml で 2 度洗い、新しいシャーレに移し、DMEM 10 ml をシリンジで脾臓に穴を開けながら脾臓内

に注入し、ピンセット等を使って脾臓細胞を搾り出し、これを 1000 rpm, 10 分間遠心、上清除去し、溶血バッファー 2 ml を加え室温、20 秒間静置し、DMEM 20 ml を加え、1000 rpm, 10 分間遠心した。DMEM 20 ml に再懸濁し、新たに 50 ml 遠沈管を用意し、そこにセルストレイナーを乗せ、そこに脾臓細胞の含まれている懸濁液を通して、組織片を除去した。それを 1000 rpm, 10 分間遠心して、DMEM 10 ml に再懸濁し、細胞数をカウントした。上記の作業と同時進行で、T150 フラスコで培養したミエローマ細胞 (PAI) をセルスクレイパーを用いて、剥がし取り、50 ml 遠沈管 4 本に移し、800 rpm, 5 分間遠心して、上清を除去し、DMEM を適量加えて、50 ml 遠沈管 1 本に纏め、800 rpm, 5 分間遠心して、DMEM 40 ml に再懸濁した。800 rpm, 5 分間遠心して、DMEM 20 ml に再懸濁し、細胞数をカウントした。PAI ( $1.08 \times 10^7$ ) : 脾臓 ( $5.4 \times 10^7$ ) = 1 : 5 で混合し、これを 1000 rpm, 7 分間遠心して、上清を除去した。そこに 50% PEG (Merck) 溶液 0.5 ml を 2.5 min かけてゆっくり加えた。DMEM 5 ml を 3.5 min でゆっくり加え、DMEM 35 ml をさらに加えて、室温で 5 分静置した。静置後に 8 ml と 32 ml に分け、1000 rpm, 5 分間遠心して上清を除去した。8 ml に分注していた細胞は HFCS/10%FCS/ TIL Media I 培地 50 ml に再懸濁し、96well plate 5 枚 (96well plate ①、②、③、④、⑤) に 100 ml/well でまいた ( $2.2 \times 10^4$  spleen cells/well)。32 ml に分注していた細胞は 10% FCS/ TIL Media I 培地 30 ml に再懸濁し、96well plate 3 枚 (96well plate ⑥、⑦、⑧) に 100 ml/well で播いた ( $1.44 \times 10^5$  spleen cells/well)。細胞融合から培養 24 時間後に HAT ( $\times 1$ )/10%FCS/ TIL 培地を well 当たり 100 ml 加え、それから 3 日毎に HAT ( $\times 1$ )/10%FCS/ TIL を用いて培地の半量交換を行った。培養した融合細胞 (ハイブリドーマ) の抗体価を ELISA にてチェックした。抗体価が高いものを 24 well plate に移し、再度 ELISA でスクリーニングを行なった。うち抗 E-tag 抗体を産生している細胞について、抗体のサブクラスを調べた。IgG だったもの 2 種類 (6D②、2H②) についてクローニングを行い、サブクラスの再確認後、スケールアップ培地を無血清 RPMI1640 に交換し、インテグラを用いてさらに培養した。④抗体の精製：培地を回収、遠心して上清を取得し、0.45 mm フィルターに通した。MAbTrap<sup>TM</sup> Kit を用いて抗体の精製を行った。まずカラムに 4 ml の滅菌 MilliQ 水を通し、次に 4 ml の結合バッファーを通してから、フィルターを過した培養上清を通した。そして、4 ml の溶出バッファーで溶出し、あらかじめ中和バッファーを 50 ml 入れておいた試験管へ 500 ml ずつ分取して、それぞれ 280nm での吸光度を測定した。抗体が溶出していると考えられるフラクションについて、PBS

で一晩透析を行い、翌日に 280nm での吸光度を測定して抗体の濃度を求め、 $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。37.5 ng/well で E-tag を固相化して、既成品と精製した抗 E-tag 抗体を 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml, 63 mg/ml, 31 mg/ml, 16 mg/ml, 7.8 mg/ml, 3.8 mg/ml に調製して比較 ELISA を行った。方法は抗体価測定での方法に準拠して行った。⑤アルカリフォスファターズコンジュゲート (ALP-conjugate) 抗 E-tag 抗体の調製：抗 E-tag 抗体を 1mg/ml に調製し、100ml のサンプル溶液と Solution A 100ml を Filtration Tube に加えた。ピペッティングにより混合した後、 $8000 \times g$   $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心した。この操作を 2 回繰り返して、Solution A 150ml を Reducing Agent に加え、ボルテックスで混合し溶解させた。この溶液 100ml を抗体が濃縮されている Filtration Tube のメンブレン上に加えた。ピペッティングにより抗体と混合した後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間反応した。Solution B を 100ml 加え  $8000 \times g$   $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間遠心し、ろ液を捨てた後、Solution B 200ml を加え再び遠心した。Reaction Buffer 50ml を SH-Reactive Alkaline phosphatase に加え、ピペッティングにより溶解した。この溶液を Filtration Tube のメンブレン上にマイクロピペットで加えた。ピペッティングにより混合した後、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間反応した。Storage Buffer 150ml を加え、ピペッティングにより標識基質を溶解させた。溶液をマイクロチューブに移し、 $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。ALP コンジュゲート抗 E-tag 抗体の濃度は Protein Assay Rapid Kit を使用し、吸光度 (595nm) をプレートリーダーで測定した。アルカリフォスファターゼの発色による検討を行った。F-moc 法により合成した E-tag 樹脂 (Cys-GAPVPYDPLEPR) を DMF で  $37^{\circ}\text{C}$  520r/min で 4 時間膨潤した。溶液を吸引ろ過マニホールドで除去し、 $10 \times \text{TBS}$  で 1min  $\times 10$  回洗浄した。次に Anti E-tag ALP conjugated antibody (0.6ng/ml) を 100ml/well 加え、 $37^{\circ}\text{C}$  300r/min で 1.5 時間 インキュベートした。ブロッキング洗浄 Buffer<sup>※3</sup> で 3 回洗浄後、BCIP (500ng/ml) を 100ml/well 加え、 $37^{\circ}\text{C}$  300r/min で 15 分間遮光しながらインキュベートした。その後、発色を確認した。

(3) マウス VH-half body library の構築：ファージディスプレイ系としては pCANTAB-5E ベクター系を用いた (図-1)。また、方法の概略を図-2 に示した。8 週齢の自己免疫マウス *MRL/lpr/lpr* の雌の脾臓を無菌的に摘出し、液体窒素で凍結した組織から、total RNA を抽出、mRNA を精製した。mRNA から、1<sup>st</sup> strand 合成用のキットを用いて、random hexamer 及び oligo dT を primer として、cDNA を調製した。独自に

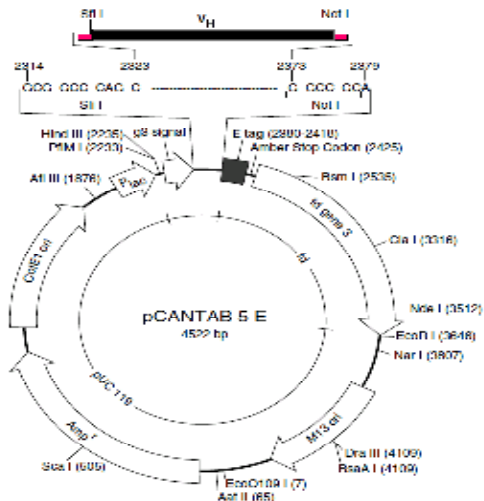


図-1. pCANTAB-5E ベクター

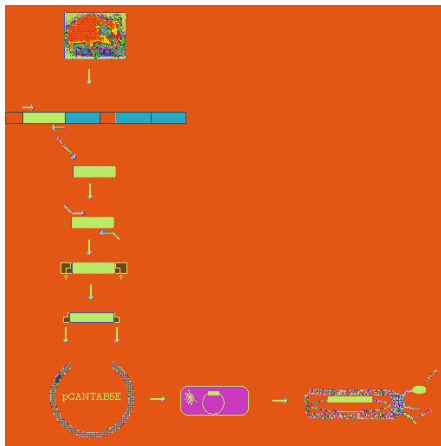


図-2. V<sub>H</sub> 鎖レパートリーのクローニングの概略図

設計した V<sub>H</sub>鎖用プライマーを用いて、V<sub>H</sub>領域を増幅した。V<sub>H</sub>に相当する 400bp 付近のバンドを切り取り、DNA 抽出を行った。次いで、SfiI と NotI の制限酵素サイトを持った縮重 primer (2<sup>nd</sup> primer FWD, 2<sup>nd</sup> primer REV)を用いて、PCR を行った。PCR 反応液を 1.2%アガロースゲル/TAE、100V で泳動後、V<sub>H</sub>に相当する 400bp 付近のバンドを切り取り、DNA 抽出を行った。増幅断片を SfiI/NotI で切断後、同様に SfiI/NotI で切断した pCANTAB-5E に組み込んだ。前もって調製しておいた、TG-1 のコンピテント細胞に電気穿孔法で組換えプラスミドを導入した。アンピシリンプレートに細胞を播き、耐性コロニーを計数した。1回の ligation で、対照コントロールが 10<sup>9</sup> 個/μg (pUC18) 以上であり、この条件で組換え体が 10<sup>5</sup> 個以上のコロニーが出現することが確認できた場合、これをライブラリーに組み入れた。生えたコロニーの中から無作為に複数のシングルコロニーをピックアップし、LB-amp 液体培地で 37°C で培養し、Sfi I と Not I サイトのそれぞれ外側にある S6 と R1 プライマ

ーを用いて、PCR を行い 1.2%アガロースゲル/TAE、100V で泳動を行った。目的インサートが入っていれば、理論値の約 600bp 付近にバンドが認められる。さらにこれらのインサートの配列を確認し、ストップコドンの少ない、V<sub>H</sub>インフレームの多いトランスフォーメーションをライブラリーに加えた。10 数回のトランスフォーメーションにより、2.62×10<sup>7</sup> のライブラリーを作製した。このライブラリーをさらにスケールアップした。液体培養で大腸菌株 TG1 を 2.0×10<sup>11</sup> の cell/L まで増幅した。これを 1ml ずつに分注し、2×10<sup>9</sup> cell/ml のグリセロールストックとして保存した。

(4) イヌザメ IgNAR library の構築: single chain の抗体の候補として、ラクダ類の V<sub>H</sub> とサメの IgNAR がある。我々は single chain 抗体分子の第 2 の候補として、海洋動物のペットショップで入手可能なテンジクザメ目のイヌザメの IgNAR の library 作製を試みた。IgNAR は 2 分子

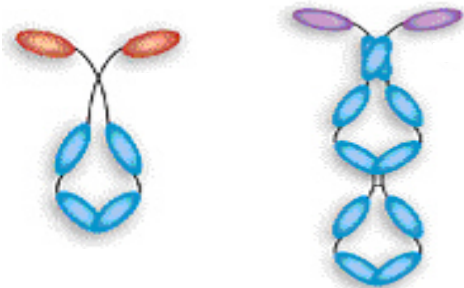


図-3. ラクダ V<sub>H</sub> 抗体 (左) とサメ IgNAR (右) の模式図

が S-S 結合して出来ているが、可変領域は single chain であり、ラクダに似ている (図-3) IgNAR の遺伝子の増幅には既に報告のあるアメリカテンジクザメとクモハダオオセの抗体配列から我々が独自にプライマーを設計した。手に入った幼体のイヌザメの脾臓を摘出し、(3) で述べた方法論にほぼ準拠して、ライブラリーの作製を行った。

(5) マウス V<sub>H</sub>鎖ライブラリーによるマイクロパニング: パニングを行う際に用いるヘルパーファージ (M13K07) の増殖を行った。2YT-tetracycline 培地 1L に大腸菌株 XL1-blue を植菌し、OD600=0.3 まで培養後、M13K07 (GE healthcare) を感染させ kanamycin 選択下で 37°C、8 時間培養した。その後上清を取り、PEG 沈殿により濃縮した。ライブラリーのグリセロールストックとヘルパーファージを用いて、s-TRIP ビーズに対してパニングを行った。ライブラリーのグリセロールストックに対して MOI=1:20 で M13K07 を感染させ (phage rescue)、PEG 沈殿後のファージを V<sub>H</sub>

提示ファージとした。パニング操作の前後で Titer check を行い、in/out の比により  $V_H$  提示ファージの濃縮を確認した。S-TRIP 配列としては His-Pro-X (X は Cys 以外の 19 アミノ酸) を使い、1 回のパニングに 1mg 分の s-TRIP ビーズをミックスしたものを使用した。1<sup>st</sup> round のみ、トリペプチドを結合させていない樹脂に対して吸着させ、吸着していない  $V_H$  提示ファージをビーズに対してパニングした。各 round の panning の詳細は以下の通りである。(1) PBS で膨潤した sTRIP ビーズにファージを吸着し、PBS/tween20、PBS で洗浄後 100mM の HCl で溶出した。中和するために 1M の Tris-HCl (pH7.4) を入れ、20ml の TG1 (OD600=0.5) に感染させた。一部を取って titer check しこれを out put titer とした。残りは rescue し、PEG 沈殿後のファージ titer を in put titer とした。

(6) イヌザメ IgNARno フレームワークをスキヤフォールド (scaffold) として利用した任意化ライブラリーの構築: イヌザメ IgNAR の可変領域の配列を詳しく解析したところ、ライブラリーのバラエティーが極端に少ないことが判明した。そこで、この配列の中で、最も多く出現しているフレームをスキヤフォールドとして利用して人為的にバラエティーを導入することにした。今回は IgNAR 中の CDR 領域全域 (14 残基) 中、CDR の構造保持に必要な Cys 残基 2 個を残した 12 残基をランダム化した。方法の概略は図-4 に示した。連続する (NNK)<sub>12</sub> を入れた Mutation Primer と Primer2 で挟んで PCR を行った。また、Primer1 と Primer3 で挟んで PCR を行った。これらの 2 つの配列をアニールして、Primer1 と Primer2 で PCR を行い、最終断片を制限酵素 (*SfiI* と *NotI*) で切断して、pCANTAB-5E に組み込んだ。これを TG-1 に電気穿孔法によりトランスフォームして、ランダムライブラリーを得た。

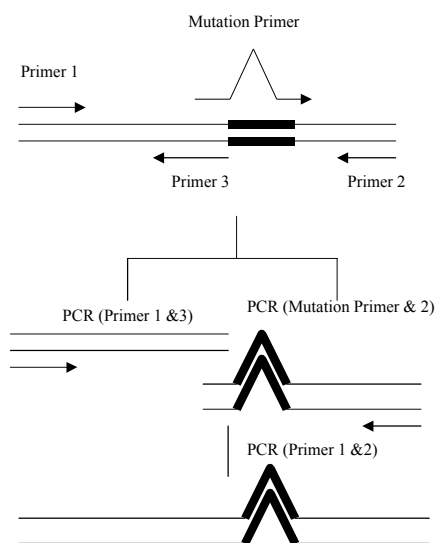


図-4. イヌザメ IgNAR のフレームを利用した CDR3 領域任意化抗体レパートリーの作製法

(7) ランダムペプチドライブラリーの構築: 抗体分子が認識した配列の確認のために、ランダムペプチド発現用に、M13KE を用いる Ph.D. ペプチド発現クローニングシステムを用いた。ランダム配列 (NNK)<sub>n</sub> を g3p の N 末端とリーダー配列の間に挿入した。今回は  $V_H$  鎖によるマイクロパニングのターゲットを His-Pro-X (X は Cys 以外の 19 アミノ酸、但し C 末端が His) としたために、Gly と Cys で挟んだ配列 |GGN|TGY|GGN|GGN|NNK|NNK|CAY|GGN|GGN|TGY|GGN| (Gly-Cys-Gly-X-X-His-Gly-Gly-Cys-Gly) を挿入した。方法はサプライヤーのプロトコルに従って行った。なお、ベクター M13KE はヘルパーで rescue できない。ファージの RFI I form で回収するために、クロラムフェニコールによって、ファージタンパク質の合成を抑制して、回収する工夫をした。

#### 4. 研究成果

(1) アミノ酸連続配列 (整列) エピトープ・トリペプチドライブラリーの構築: ファージディスプレイ発現型の抗体として得られたナイブ抗体レパートリーがどんなトリペプチドライブラリーを認識しやすいかは分かっていない。そのため、側鎖の大きさ、構造の複雑さ、極性、酸性か塩基性か、親水性や疎水性の割合などを考慮し、イディオトープが反応性をより高く示しそうなアミノ酸を選択した。基本となるアミノ酸 3 残基を 4 パターン決定したところで、それぞれの 3 残基のうち 2 残基を固定し、残った 1 残基を他の 18 種類のアミノ酸に置き換えていき合計 220 種類のトリペプチドライブラリーを合成する事が出来た。合成は続行する予定である。

H-P-X <sub>1</sub> (X <sub>1</sub> =19AA, but not C)	: 19
H-X <sub>2</sub> -M (X <sub>2</sub> =18AA, but not C, P)	: 18
X <sub>3</sub> -P-M (X <sub>3</sub> =18AA, but not C, H)	: 18
P-Q-X <sub>1</sub> (X <sub>1</sub> =19AA, but not C)	: 19
P-X <sub>4</sub> -Y (X <sub>4</sub> =18AA, but not C, Q)	: 18
X <sub>5</sub> -Q-Y (X <sub>5</sub> =18AA, but not C, P)	: 18
W-Q-X <sub>1</sub> (X <sub>1</sub> =19AA, but not C)	: 19
W-X <sub>6</sub> -H (X <sub>6</sub> =18AA, but not C, Q)	: 18
X <sub>7</sub> -Q-H (X <sub>7</sub> =18AA, but not C, W)	: 18
D-F-X <sub>1</sub> (X <sub>1</sub> =19AA, but not C)	: 19
D-X <sub>8</sub> -L (X <sub>8</sub> =18AA, but not C, F)	: 18
X <sub>9</sub> -F-L (X <sub>9</sub> =18AA, but not C, D)	: 18

表-1. 合成したトリペプチド (アミノ酸は 1 文字表記した。但し、C 末端を左側にして表示)

(2) 抗 E-tag モノクローナル抗体の調製：2 回の免疫実験により、総計 6 個の抗 E-tag モノクローナル抗体を取得することが出来た。これらの抗体は VH-half body や IgNAR の発現確認や精製のツールとして用いることが出来る。

(3) マウス VH half-body library を用いたマイクロパニングの結果：マイクロパニングの結果：パニングを 5 回繰り返した結果を表 1. に示す。次に、5round 後のファージを用いて、19 種類ミックスではなく His-Pro-X (X= Met, Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Phe, Pro, Arg) の 9 種類に対してパニングを 2round 行った。Titer check により His-Pro-Arg に対するファージが他に対するファージよりも 100 倍多く得られたため、His-Pro-Arg に対して再度パニングを 5round 行った。結果を表 2. に示す。5round 後に得られたコロニーからのプラスミド配列を解析することにより、V<sub>H</sub> 提示ファージが選択されているかどうかを確認した。インサートチェックの結果を図-5 に示した。16 個のコロニーについてインサートチェックを行ったところ、8 個について、VH half-body 配列が含まれていることが確認できた。配列の確認と結合の確認実験を今後行い、特異性を詰める。

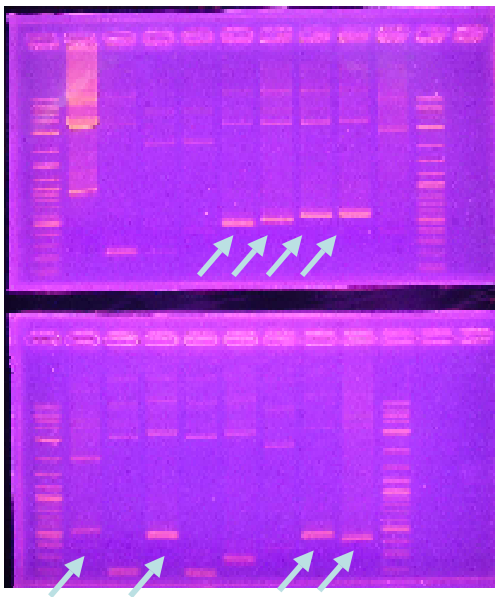


図-5. マイクロパニング後の VH half-body 提示ファージに挿入されているインサートの確認上の図、左からレーン 1, 11, 2-log ladder; レーン 2, pCANTAB-5E control insert; レーン 3-10, パニングにより回収されたアンピシリン耐性コロニーの insert; 下の図、左からレーン 1, 10, 2-log ladder; レーン 2-9, パニングにより回収されたアンピシリン耐性コロニーの insert

(4) イヌザメ IgNAR 抗体のレパートリーチェックとランダムマイゼーション： $2 \times 10^7$  個からなるトランスフォーマントを得ることが出来た。これらの配列にはストップコドンほとんど認められなかったものの、配列間に極めて類似性が高いことが判明した。この原因として、1) 我々が用いた IgNAR の Vnar 領域増幅用プライマーがレパートリーをカバーできていないこと、2) イヌザメが幼体であるために、レパートリーが少なかったかの 2 つが考えられた。そこで、single chain として機能している有用性を考慮して、CDR3 領域にランダム変異を導入することを考えた。これらの設計はうまくいき、 $3 \times 10^8$  個のライブラリーが現在出来た。20 個以上のコロニーから PCR でインサートチェックを行い、その配列を調べたら、ほとんど全てのクローンに CDR 領域で任意化が起きていることが判明した。実験は現在ここまでであるが、パニングに持ち込む予定である。

(5) ランダムペプチドライブラリーの構築：得られた抗体分子のエピトープを簡便に判別するために、g3p にトリペプチドを発現したファージを調製することが出来た。これを用いて、パニングで選択されたクローンのエピトープの確認を行う予定である。

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

西 義介 (NISHI YOSHISUKU)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授  
研究者番号：40387957

### (2) 研究分担者

向井 秀仁 (MUKAI HIDEHITO)

京都薬科大学・薬品化学分野・研究員  
研究者番号：20251027