

## P409

### C1027 から生成する常磁性中間体

(東北大・反応研) 秋山公男

【序】C1027-蛋白複合体およびクロモフォア-コア-モデル系で生成する常磁性種を、2次元パルス EPR 法および高周波 EPR 法により研究した。観測結果をもとに常磁性中間体の帰属を確定した。また、発光分光法および時間分解 EPR 法により、エンジンモデル化合物の励起状態の電子構造について明らかにした。

【結果と考察】C1027 蛋白複合体・クロモフォア-コア-モデル系では、数種(少なくとも3種)の常磁性中間体が存在している。これらの種をスペクトル上で分離して観測するために、電子スピンエコー検出2次元ニューテーション法が有用であること示した。この手法では、スピン多重度 ( $S=1/2$  および  $1$ ) の異なる種が Nutation 周波数域で区別されて観測されるが、その信号強度は C1027 複合体を単離した後の保存環境に依存して変化する。最近、入手した試料では、 $S=1$  の種の信号が強く観測された。 $S=1$  の種が活性発現と密接に関わっていることを考慮すると、C1027 の活性を維持する上で、クロモフォア-コアと蛋白との結合状態とともに、外的因子が関与していることが示唆された。

図1に、C1027 蛋白複合体で観測された高周波 EPR (95GHz) の結果を示した。X-band ではブロードな線形として観測された信号がよく分離されて観測される。主たる成分は、 $g$ -値から一部運動が凍結された peroxy ラジカルであると確認された。これは、先の帰属を支持する結果である。3354T 付近に観測される信号は、マイクロ波強度に依存して変化する。この挙動は、通常のラジカル種とは明らかに異なり、種の帰属のための有力な情報を抽出できるものと解析を進めている。また、高周波 EPR により、不均一系の信号がよく分離されて観測されるので、実際の、活性発現過程で生成する常磁性種の挙動を明らかにする手掛かりを得た。



図1. C1027 蛋白複合体で観測された w-band EPR スペクトル (マイクロ波強度 0.05 (a) および 0.0025mW (b), \*は、Mn 由来の信号)

## P410

### ファージディスプレイ法を用いた抗シガトキシン抗体の作製

東北大・医病薬剤 〇富岡佳久、林 克弘、加藤芳徳、Lilian R. Tsuruta、水柿道直

東北大院理 大栗博毅、田中慎一郎、南雲陽子、新藤由美、大石徹、平間正博

【目的】シガトキシンは、温度感覚異常を主症状とするシガテラ中毒を引き起こす原因毒素で、熱帯地方で毎年多数の中毒例が報告されている。我々は、ハイスループット・高感度・高選択・高便益のシガトキシン検出測定系を開発する目的で、シガトキシンに対するモノクローナル抗体を作製し、遺伝子工学的に complementarity determining region 領域を改変し、抗体結合特性の機能改変を試みている。まずはじめに最も毒性の強いシガトキシン 1B の ABC 環を認識するモノクローナル抗体を作製し、そのアミノ酸配列を解析した (CTX4H2, CTX6F12)。今回、CTX3C の部分合成ハプテン (3C-ABC 環モデル、3C-ABCD 環モデル) と pComb3-ファージディスプレイ法を用いた抗体調製を行った。

【方法】有機合成化学的に調製した 3C-ABC 環および 3C-ABCD 環を常法に従って KLH 及び BSA と結合させ、コンジュゲートを作製した。コンジュゲートをアジュバントとし、マウスに頻回免疫を行った。各コンジュゲートとの反応性を ELISA にて確認した後、マウスから脾臓を摘出し、脾細胞の一部をミエローマ SP2/0 あるいは NS-1 細胞と PEG 法にて細胞融合した。また、残りの脾細胞から総 RNA を抽出し、それぞれ cDNA ライブラリーを作製した。次に、抗体の変異部遺伝子を PCR 法にて増幅し、pComb3 ベクターに重鎖と軽鎖のコンビナトリアルライブラリーを作製したのち、ファージディスプレイライブラリーに変換し、リコンビナント抗体をファージ表面に提示させた。リコンビナント抗体ファージライブラリーをコンジュゲートを用いてバイオパンニングし、シガトキシン 3C と反応性を有するファージを濃縮し、そのアミノ酸配列を解析中である。

【結果・考察】3C-ABC 環モデルコンジュゲートは、抗体価の高い免疫源となった。そのマウス抗血清中には、3C-ABC 環モデルとの反応性に加え、3C-ABCD 環モデルと反応する抗体が含まれていたことから、天然のシガトキシン 3C との反応性が十分期待された。3C-ABCD 環モデルを用いた試験的な阻害 ELISA 評価系では、20 nM-10  $\mu$ M (約 25-76%阻害) の範囲ではほぼ定量的に測定可能であった。そこで、現在、反応性を有する抗体の単離をハイブリドーマ法及びファージディスプレイ法により行っており、その結果について報告する。