

ファージ・ディスプレイ法による抗体の分子進化とその応用

藤井 郁雄

Directed Evolution of Antibody Molecules in Phage-displayed Combinatorial Libraries

Ikuo FUJII

Department of Biological Science, Graduate School of Science, Osaka Prefecture University,
1-2 Gakuen-cho, Sakai City, Osaka 599-8570, Japan

(Received August 30, 2006)

Advances in methods for conformational prediction, structural analysis and site-directed mutagenesis of proteins and peptides have contributed to the understanding of their structure and function. However, with the exception of a few successes, the generation of practical functional molecules solely by rational design remains a difficult challenge. The aim of our study is to investigate molecular design relying on evolutionary processes, called as “directed evolution”, to generate a novel class of biofunctional molecules. This evolutionary approach consists of three steps; 1) constructions of protein/peptide libraries based on structural information, 2) expressions of the libraries on phage particles, and 3) selections with investigator-imposed selective pressures. In this work, we study on directed evolution with antibody libraries. We have succeeded in generating highly active catalytic antibodies in phage-displayed antibody (Fab) libraries. To evolve catalytic antibodies toward higher catalytic activity, we have mimicked an enzyme-evolutional process, in which an enzyme has evolved their ability to use binding energies for catalysis by increasing the affinity for the transition state of a reaction and decreasing the affinity for the ground state. Thus, phage-displayed libraries derived from an original catalytic antibody were selected against a newly-devised TSA, which was programmed to optimize the differential affinity for the transition state relative to the ground state, to provide variants with improved reaction rates (k_{cat}). The *in vitro* evolution has great potential for generating novel catalysts as well as for providing opportunities to examine the evolutionary dynamics of enzymes.

Key words—antibody; catalytic antibody; directed evolution; phage-displayed library; transition-state analog; hydrolysis

1. はじめに

20 種類のアミノ酸を使って、新しい機能を持つ人工タンパク質を自由自在に創り出すことは、化学・生物工学の最終目標の1つである。この20年の遺伝子工学や構造生物学のめざましい進展は、タンパク質の大量調製や部位特異的変異操作による修飾酵素の合成を可能にし、今や、タンパク質合成は対応するDNAを合成することで、遺伝子工学が機械的にやってくれるようになってきている。しかしながら、これまでの研究から分かるように、水素結合などのネットワークを考慮して機能発現に必要なアミノ酸を適切な部位に正確に並べることは難しい。研

究者はDNA合成機の前で「どのような設計図を書いたらいいのだろうか」と苦吟しているのが現状である。

それでは、生細胞のDNA上にあるすばらしいタンパク質の設計図は、どのようにして書かれたのだろうか？いまのところ、設計図はダーウィン進化の過程でDNA上に間接的に書き込まれたと考えられている。すなわち、生細胞は、長い年月をかけて突然変異を蓄積して分子多様性を発生させ、選別を繰り返して、酵素のような高度な機能を持つタンパク質を獲得する。最近、このような自然界における進化の過程「多様性の発生と選別」を人為的にコントロールして、機能性タンパク質の創出を目指すコンビナトリアル・バイオエンジニアリング（進化工学とも呼ばれるが、自然進化と区別するためにコンビナトリアル・バイオエンジニアリングと名付けた）が注目されている。多様な化合物を一挙に合成する「コ

大阪府立大学大学院理学系研究科生物科学専攻生体分子科学分野（〒599-8570 大阪府堺市中区学園町1-2）
e-mail: fujii@b.s.osakafu-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS23で発表したものを中心に記述したものである。

ンビナトリアル・ケミストリー」が知られているが、コンビナトリアル・バイオエンジニアリングでは、化学合成だけでなく、生物学的手法を組み合わせ、人工的な生体触媒や生理活性分子を創出することを狙っている。すなわち、免疫システム（抗体ライブラリー）やファージ・ディスプレイ法（ペプチドやタンパク質ライブラリー）により、多様な分子ライブラリーを効率的に構築し、目的とした機能を持つ生体分子を効率的にスクリーニングする。本稿では、免疫システムから生まれる抗体タンパク質を取り上げて、コンビナトリアル・バイオエンジニアリングによる人工酵素の創出について紹介する。

2. 免疫システム

免疫システムは、外から侵入してくる抗原に应答し、高い親和性と特異性を持つ抗体タンパク質を産生する。侵入してくる抗原は多種多様なので、それらに対応するためには特別な抗体産生の仕掛けが必要になる。抗体タンパク質は、「多様性の発生、提示、選別」の過程を経て創られている (Fig. 1)。すなわち、免疫システムは、生体がわれわれに与えたコンビナトリアル・バイオエンジニアリングであり、これを利用することで目的とした触媒活性を持つ人工酵素を手に入れることができる。

抗体タンパク質の多様性は、抗体の抗原結合部位をコードする遺伝子セグメント (H鎖: V_H , D , J_H 遺伝子群, L 鎖: V_L , J_L 遺伝子群) の組み合わせ (コンビナトリアル) により生ずる。マウスの場合、 V_H 遺伝子群は 100 個以上の遺伝子があり、 D 遺伝子は約 15 個、 J_H 遺伝子は 5 個存在する。また、 L 鎖を形成する V_L 遺伝子群は 200—300 個、 J_L 遺伝子群は 5 個の遺伝子からなる。これらの遺伝子が、 B 細胞が骨髄中の幹細胞から成熟 B 細胞に分化・成熟する過程で再編成される。このような仕組みで生じた特異性の異なる抗体タンパク質 (10^8 種) は、 B 細胞表面に提示され、外来抗原の侵入に備えている。第 1 免疫応答では、抗原に親和性のある抗体を提示している B 細胞がプラズマ細胞あるいは記憶細胞へと分化・増殖を始める。この増殖の過程で体細胞高頻度変異が起こり、抗体の多様性がさらに増える。あるものは体細胞高頻度変異の結果、親和性が低下し、あるものでは親和性が向上する。そこで、第 2・第 3 免疫に应答して、親和性のより高い抗体を提示している B 細胞が選択され、分化・増

殖する (この過程をアフィニティー・マチュレーションと呼ぶ)。すなわち、免疫システムは、生体がわれわれに与えたコンビナトリアル・バイオエンジニアリングであり、これを利用することで目的とした結合活性を持つ生体機能分子を手に入れることができる。抗体タンパク質は、微量成分の検出やウイルス感染の中和などに汎用され、有用な生体機能分子の筆頭に挙げられる。

3. 酵素と抗体

酵素は、多様な分子の発生と適応による選択を繰り返し、長い年月をかけて進化してきた。まず、エクソン・シャフリングや遺伝子重複によって多様性が生まれ、活性のある初生の酵素が選択される。その後、突然変異の蓄積に伴ってさらに多様性を増やし、より適応した活性を持つ酵素が選択される。このように酵素の分子進化は多様性の発生と触媒効率に基づく選択によって起こる訳だが、免疫システムの抗体タンパク質の産生機構と比較したとき、Fig. 2 に示すように多くの類似点を見出すことができる。すなわち、免疫システムも酵素と同じ分子進化の仕組みを使って、目的とした抗原結合性の抗体タンパク質を産生する。抗体にしる酵素にしる、分子進化の原動力は多様性の発生と選択である。しかも、免疫システムの場合、2—3 週間で抗体タンパク質が産生するので、免疫システム自身をコンビナトリアル・バイオエンジニアリングの手法として利用することができる。

4. テーラーメイド人工酵素：抗体触媒

天然酵素は、長い年月をかけて突然変異を蓄積して選別を繰り返す、高度な触媒機能を獲得している。抗体も、先に述べたように、分子多様性の発生と選択により生み出されている。このような酵素と抗体の分子進化の類似性に注目して、抗体タンパク質を使って酵素の触媒機能を創出する試みがある。



藤井郁雄

大阪府立大学大学院理学系研究科・教授。1986 年九州大学院薬学研究所博士課程修了。薬学博士。1986 年九州大学薬学部助手。1988 年ロックフェラー大学 (米国) 博士研究員。1989 年～1991 年スクリプス研究所 (米国) にて、博士研究員として触媒抗体の開発に従事。

1991 年～2003 年タンパク工学研究所および生物分子工学研究所にて抗体工学に従事。2003 年 4 月より現職。現在の研究テーマ：「進化分子工学を基盤とする新規生体機能分子の設計と創出」。

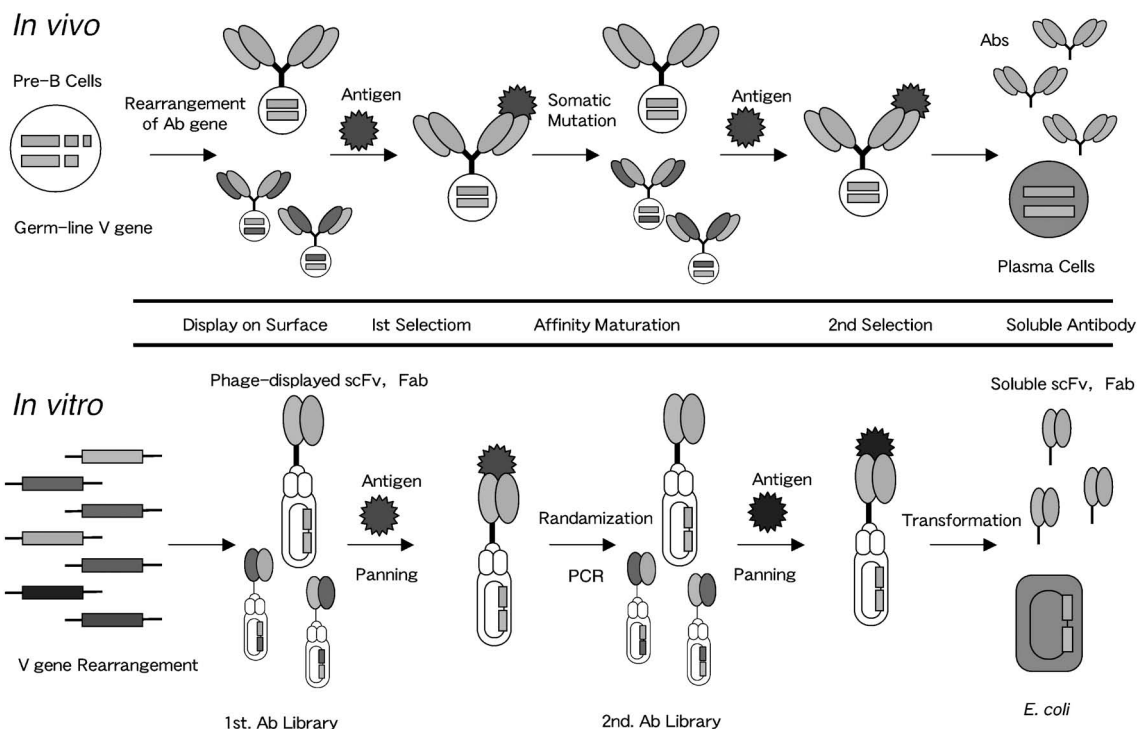


Fig. 1. Molecular Mechanism of Antibody Evolution
Upper: immune system, lower: phage-displayed antibody system.

Enzyme	Antibody
<ul style="list-style-type: none"> • Exon Shuffling • Mutation • Natural Slection 	<ul style="list-style-type: none"> • Ab gene (V, D, J) rearrangemet • Somatic Hypermutation • Clone Slection
(Catalytic Activity)	(Binding Affinity)
• Time: Few Billions of Years	• Time: Few Weeks

Fig. 2. Resemblance of Molecular Evolution Between Natural Enzymes and Antibodies

しかしながら、抗体と酵素とでは選択の基準が異なっている（酵素の選択が触媒効率に基づくのに対し、抗体では安定な抗原への親和性に基づき選択される）。そこで、酵素の触媒機能を抗体で再現するには、抗体の選択基準を工夫する必要がある。その1つは遷移状態アナログに対する親和性を基準として抗体を選択する方法である。すなわち、酵素が化学反応の遷移状態と結合し安定化することによって触媒機能を発揮しているように、遷移状態アナログに結合する抗体タンパク質は、化学反応の遷移状態と結合し触媒機能を獲得するようになる。このような触媒活性を持つ抗体を「抗体触媒」と呼ぶ。^{1,2)} 酵

素が何十億年という長い年月をかけて進化したのに対し、抗体の進化は数週間で起こるので、実験室で測定可能な時間内に分子進化の過程を再現して、テラーメイドの生体触媒を創ることができる。

4-1. 抗体触媒の作製 一般に化学反応の触媒現象は、エントロピー因子、酸-塩基触媒、静電的効果などの触媒因子の組み合わせによって起こるものと理解されている。これに対して酵素触媒反応の大きな特徴の1つは、酵素が化学反応の遷移状態に結合し、それを安定化することによって反応の活性化エネルギーを減少させ、化学反応を促進していることである (Fig. 3)。抗体触媒の触媒作用も、酵

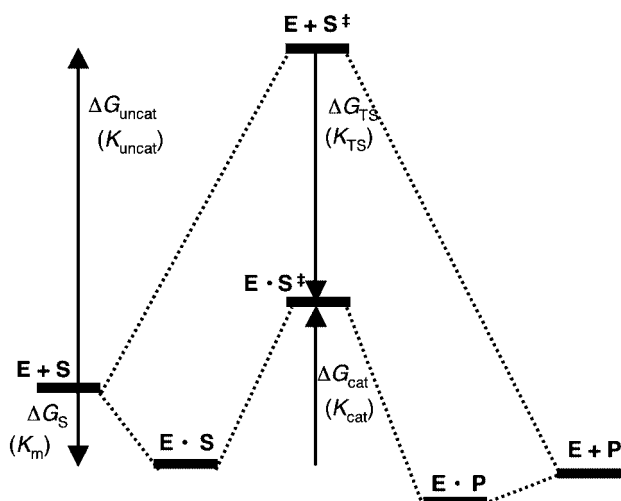


Fig. 3. Gibbs Energy Changes for Enzymatic and Uncatalyzed Reaction

素と同様に反応の遷移状態を安定化するというに基づいている。すなわち、反応の遷移状態と立体的かつ電子的によく似ている化合物「遷移状態アナログ」をハプテンとして免疫すると、得られた抗体は反応の遷移状態と結合し、安定化することによって反応を触媒する。ハプテンとは、それ自身では抗原性を持たない低分子化合物で、キャリアタンパク質（ウシ血清アルブミンなど）と結合させることにより抗原性を獲得する。

Figure 4 にエステル結合の加水分解反応の例を示した。エステルの加水分解はカルボニル基の酸素原子上に負の電荷を持つ高エネルギーな四面体遷移状態 (A) を経て進行する。この四面体遷移状態 (A) に立体的かつ電子的に相補的な抗原結合部位を持つ抗体は、反応の活性化自由エネルギーを減少させ、加水分解反応を触媒する。現在、遷移状態アナログとしてリン酸エステル (B) が使われており、これを免疫することによってエステル加水分解を触媒する抗体の作製が行われている。³⁾ これまでに筆者らは、独自の遷移状態アナログ設計により立体選択的反応⁴⁻⁶⁾ や位置選択的反応など⁷⁻⁹⁾ を触媒する抗体の作製に成功している。

4-2. 抗体触媒によるプロドラッグ医薬品の活性化 免疫システムを利用して、プロドラッグ医薬品を特異的に活性化する人工酵素を作製することができる。^{10,11)} プロドラッグとは、医薬品の物性の改善や毒性軽減を目的として化学修飾された化合物で

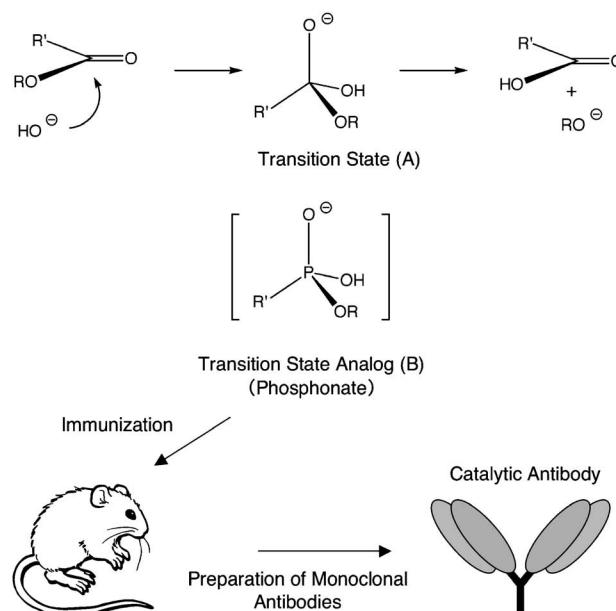


Fig. 4. Generation of Catalytic Antibodies for Ester Hydrolysis by Immunization with the Transition-state Analogs

あり、それ自身は薬理活性を示さないが、投与後生体の酵素や pH の変化により元の医薬品（親化合物）に変換されて薬理作用を発揮するものである。もし、生体内の天然酵素に対して安定なプロドラッグをテーラーメイドの抗体触媒で活性化することができれば、病巣特異的なドラッグ・デリバリーが可能になる。そこで、モデル医薬品として抗生物質であるクロラムフェニコール (1) を取り上げ、そのプロドラッグであるエステル (2) を加水分解する抗体を作製した (Fig. 5)。¹¹⁾

エステル (2) の加水分解反応の遷移状態アナログであるリン酸エステル (3) を合成した。これをキャリアタンパク質 (KLH) と縮合後、抗原としてマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作製してハプテンに結合活性を持つ 12 種類の抗体を得た。この抗体について、エステル (2) の加水分解活性を検討したところ、6 種類の抗体に顕著な触媒活性が観測された。もっとも活性の高かった抗体 (6D9) は、抗体のない場合に比べて反応を 800 倍以上加速した (Table 1)。

4-3. 抗体触媒の問題点 遷移状態アナログ (3) の免疫から得られた抗体の結合活性と触媒活性を Table 1 に示す。抗体触媒の反応速度論量を比較することによって、遷移状態アナログに対して高い親和性を持つ抗体が、かならずしも高い触媒活性を

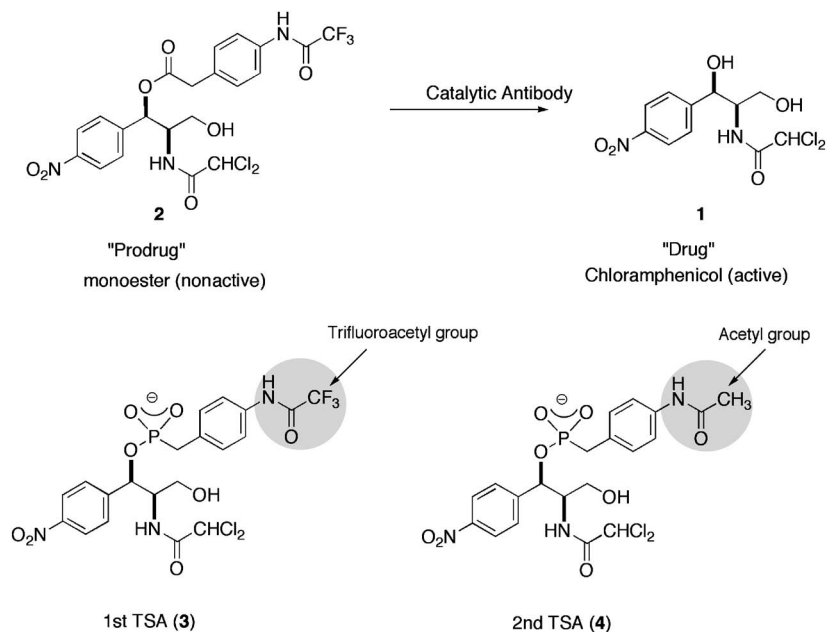


Fig. 5. Prodrug Activation by Catalytic Antibodies

Table 1. Kinetic Parameters of Catalytic Antibodies Generated against a Single Transition-state Analog

Antibodies	k_{cat} (min^{-1})	K_{m} (μM)	k_{i} (nM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$	$K_{\text{m}}/K_{\text{i}}$
6D9	0.129 ± 0.006	61.4 ± 8.4	68.5	2,101	935	895
4B5	0.032 ± 0.001	3.7 ± 0.3	17.4	8,525	230	214
8D11	0.034 ± 0.002	2.6 ± 0.6	19.9	12,863	244	132
9C10	0.008 ± 0.000	0.9 ± 0.1	14.3	9,038	56	60
3G6	0.006 ± 0.000	1.3 ± 0.2	42.5	4,943	47	31
7C8	0.115 ± 0.005	3.8 ± 0.3	310.0	30,263	833	12

示すとは限らないということが判明した。¹²⁾ 最も親和性の高い抗体 (抗体 9C10: $K_{\text{TSA}} = 0.014 \mu\text{M}$) は最も触媒活性 ($k_{\text{cat}} = 0.008 \text{ min}^{-1}$) が低く、また高活性の抗体 6D9 ($k_{\text{cat}} = 0.129 \text{ min}^{-1}$) は中程度の親和性 ($K_{\text{TSA}} = 0.068 \mu\text{M}$) を示す (Fig. 6(A)). 一方、反応加速 ($k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$) と基質の基底状態と遷移状態に対する結合活性の差 ($K_{\text{m}}/K_{\text{TSA}}$) に相関性が観測された。抗体 6D9 を始めとして 8D11, 4B5, 9C10, 3G6 の 5 種の抗体では、 $k_{\text{cat}}/k_{\text{uncat}}$ 値と $K_{\text{m}}/K_{\text{TSA}}$ 値がほぼ一致した (Fig. 6(B)).

この解析から、触媒作用の発現するために重要なことは、遷移状態に対する強い結合と基底状態への弱い結合であり、親和性の差の大きい抗体が高い触媒活性を持つことが判明した。すなわち、抗体触媒に高い活性を付与するためには、遷移状態への結合だけでなく、遷移状態と基底状態との親和性の差が

最大になるような抗原結合部位を構築する必要がある。

5. ファージ・ディスプレイ法

繊維状ファージは、大腸菌に感染する非常に単純なウイルスであり、遺伝子工学において様々な用途がある。このような繊維状ファージを利用することによって、免疫システムにおける抗体産生の過程を試験管の中で再現し、抗体タンパク質の機能を改良することができる。¹³⁾

ファージディスプレイを用いた抗体分子の選択は、基本的には、Fig. 1 に示したような生体内の免疫系の働きである「多様性の発生」「提示」「選別」を模倣している。すなわち、1) 多様性を持つ抗体遺伝子を増幅する、2) ファージを抗体産生 B 細胞になぞらえ提示する、3) 目的とする機能で選択するの 3 段階をすべて試験管内で行うことになる。様

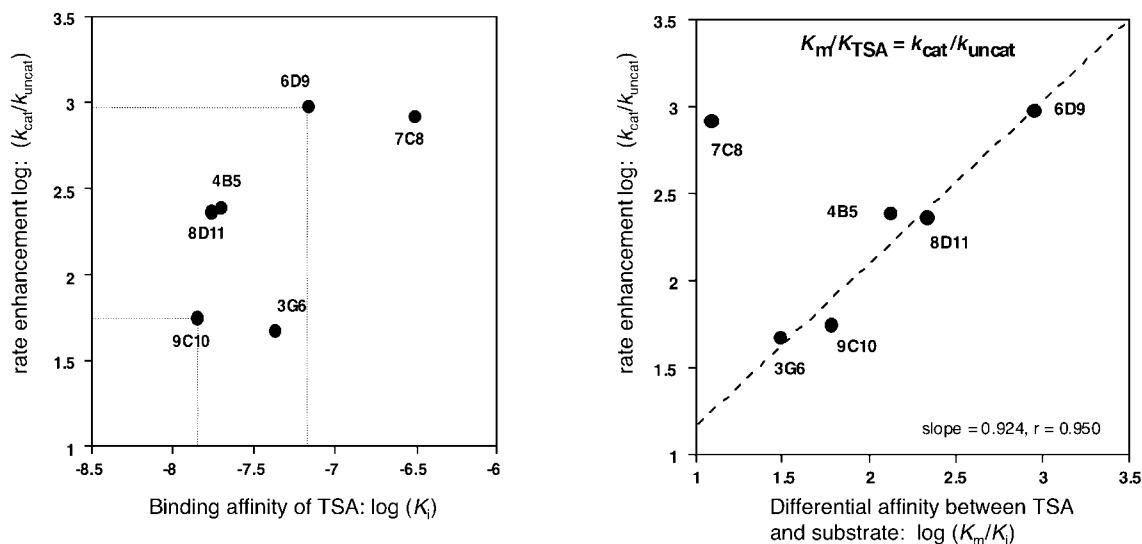


Fig. 6. Transition-state Analysis of Catalytic Antibodies
Correlation between rate enhancement and binding affinity for transition-state analog.

々な特異性を有する分子を分子毎に表面にディスプレイすることで、コンビナトリアルなライブラリーを作り出し、ディスプレイされた抗体タンパク質が持つ機能に基づいて、新しい分子を選択することができる訳である。この手法により、実験動物の免疫化を経ることなく抗体分子を手にすることが可能になっているほか、免疫化が困難で取得が困難であった抗体の選択・調製が可能となり、様々な応用に成功を収めている。ここでは、ファージ・ディスプレイ法を利用した抗体触媒の機能改変について述べる。^{14,15)}

5-1. 抗体酵素の高活性化 先に述べたプロドラッグ医薬品を特異的に活性化する抗体触媒 (6D9) の高活性化に際して、ファージ・ディスプレイ法を利用した。^{15,16)} この方法により免疫法では取得することのできない高い活性を持つ抗体触媒の作製が可能になる。

酵素などの生体触媒の活性発現に重要なことは、遷移状態に対する強い結合と基底状態への弱い結合である。抗体触媒の場合にも、高い活性を得るためには、遷移状態への結合だけでなく、遷移状態と基底状態との親和性の差が最大になるような抗原結合部位を構築する必要がある。ところが、抗体産生のメカニズムを考えると、一度の免疫で2つの分子種 (遷移状態と基底状態) の情報を持つ抗体を作製することは不可能である。そこで、抗体産生の過程をファージ抗体を用いて試験管内で再現し、遷移状態

と基底状態との親和性の差を最大にさせるように抗体の分子認識を最適化した。この方法は、従来の免疫法とは異なり、抗体遺伝子に任意に変異を導入したり、また多種の抗原で何度もスクリーニングできることから、自由自在に抗原への親和性や抗原特異性を変化させることができる。

5-2. 抗体ファージ・ライブラリーの作製 先に述べたように、高い活性を獲得するためには、遷移状態への親和性を最適化するのではなく、遷移状態と基底状態との親和性の差を最適化することが重要である。そのためには、ハプテン分子全体よりも遷移状態を模しているリン酸エステル部分 (四面体構造) に強く結合する抗体を選択する必要がある。そこで、第1遷移状態アナログ (3) のトリフルオロアセチル基をアセチル基に変換した第2遷移状態アナログ (4) を合成し、これを使ってファージ抗体ライブラリーのスクリーニングを行った (Fig. 5)。遷移状態アナログ (3) のトリフルオロアセチル基は重要なエピトープなので、アセチル基に変換することで抗体の親和性が弱められる。こうすることで、一旦、抗原全体への親和性を下げ、リン酸エステルの四面体構造部分により強い結合を持つようになった抗体を選別する。X線構造解析や部位特異的変異実験から、抗体6D9のL鎖CDR1のHis (L27d) が触媒残基として働いていることが判明している (Fig. 7)。^{17,18)} そこで、活性中心のHis残基は固定し、その周辺のアミノ酸6残基に対してラン

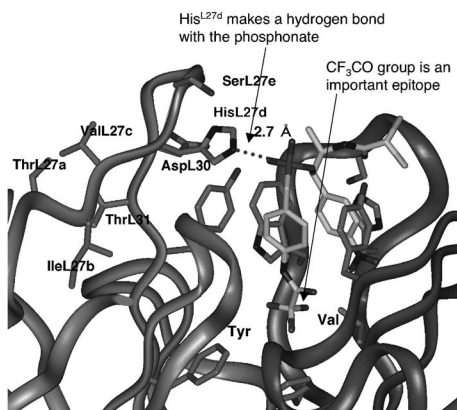


Fig. 7. Crystal Structure of Catalytic Antibody 6D9 (Fab)
Light chain (light grey) and heavy chain (dark grey).

ダム変異を行い、抗体ライブラリーを作製した (Fig. 8). そして、第2遷移状態アナログ (4) に対して、この抗体ライブラリーを8回パンニングし、ハプテン結合性の抗体を選別した。

5-3. 免疫システム VS フェージ・システム
得られた変異体は野生型 (6D9) に比べて高い活性を示し、変異体 (8Hg) では20倍以上強い触媒活性を獲得していた (Table 2). 従来の免疫法から得られた抗体触媒が、無触媒反応に比べ50—1000倍程度の反応加速を示すのに対し、フェージ抗体ライブラリーからは反応加速が6000—20000倍の抗体触媒を得ることに成功した (Fig. 9). 変異体の分子モデルを作成したところ、His (L27d) の隣に触媒残基としてTyr (L27e) が導入されたことが判明した。すなわち、野生型ではHis (L27d) が遷移状態

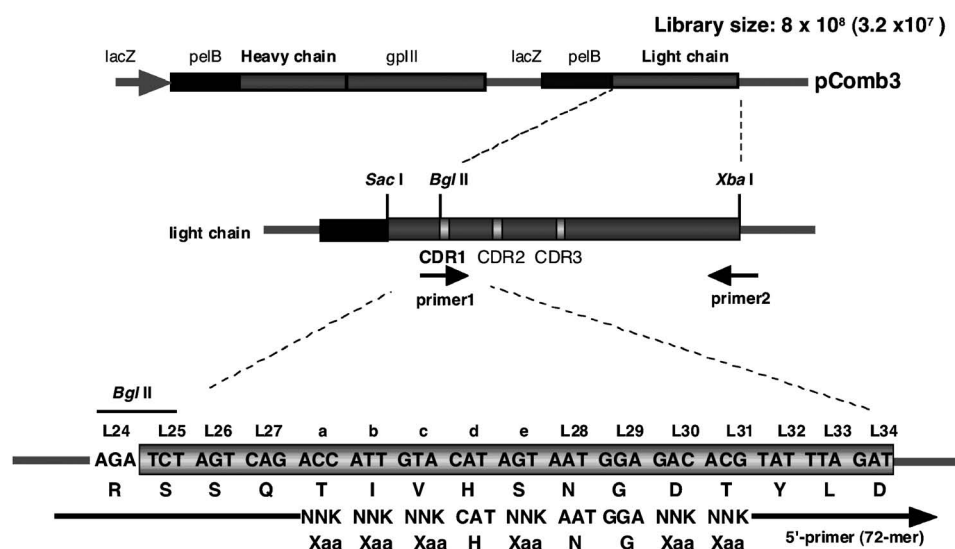


Fig. 8. Construction of a Phage-displayed Library of Catalytic Antibody 6D9-L (CDR1)

Table 2. Amino Acid Sequence, Catalytic Activity, and Binding Affinity of Evolved Catalytic Antibodies in Phage-displayed Libraries

Abs	Sequences (LCDR1)														k_{cat} (min^{-1})	K_m (μM)	K_{TSA} (nM)	k_{cat}/k_{uncat}	K_m/K_{TSA}		
	24	25	26	27	a	b	c	d	e	28	29	30	31	32						33	34
8Ha	R	S	S	Q	P	L	V	H	Y	N	G	E	V	Y	L	D	1.358 ± 0.099	367.5 ± 48.4	29.0	9,841	12,672
8Hf	R	S	S	Q	P	I	V	H	Y	N	G	G	I	Y	L	D	2.264 ± 0.275	141.5 ± 41.8	8.8	16,406	16,080
8Hg	R	S	S	Q	P	I	V	H	Y	N	G	D	I	Y	L	D	2.593 ± 0.152	283.5 ± 31.0	12.6	18,791	22,500
8Hh	R	S	S	Q	P	V	V	H	Y	N	G	E	V	Y	L	D	0.760 ± 0.044	154.6 ± 21.0	40.1	5,507	3,855
6D9 (Wild type)	R	S	S	Q	T	I	V	H	S	N	G	D	T	Y	L	D	0.129 ± 0.006	61.4 ± 8.4	68.5	935	896

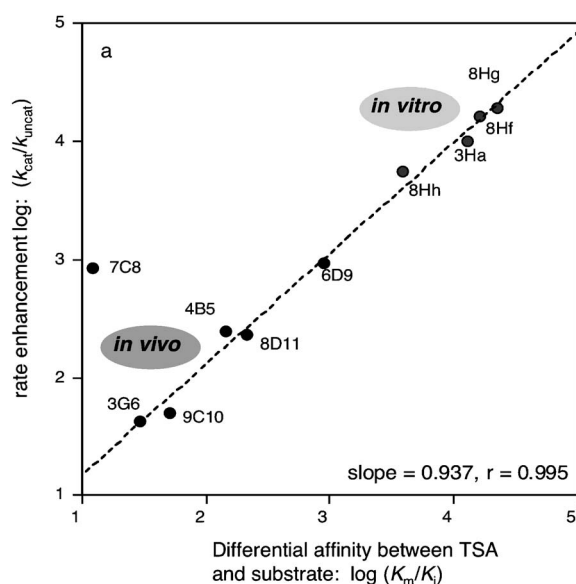


Fig. 9. Transition-state Analysis of Catalytic Antibodies Generated by Immune System (*in vivo*) and Phage-display Method (*in vitro*)

Correlation between rate enhancement and binding affinity for transition-state analog.

と水素結合を形成し安定化させ、一方、変異体では His (L27d) とともに新しく導入された Tyr (L27e) とで 2 つの水素結合を作り、より強く遷移状態を安定化する。さらに、アミノ酸配列の比較により、ファージ・ディスプレイ法の有用性が示された。Tyr (L27e) は Ser から変異したものであるが、Ser (AGT) から Tyr (TAT, TAC) への変異には核酸レベルで隣り合った 2 つの変異が起こることが必要である。このような突然変異は抗体産生の過程 (体細胞変異による親和性成熟) では起こり難い。すなわち、得られた高活性抗体触媒を従来の免疫法で得ることは困難であり、ファージ・ディスプレイ法の有用性が示された。

6. おわりに

ファージの外被タンパク質をコードする遺伝子に、目的のタンパク質をコードする遺伝子を融合させ、ファージ表面に提示させる手法 (ファージ・ディスプレイ法) が開発され、コンビナトリアル・バイオエンジニアリングの強力な手法の 1 つとして利用されている。^{13,19)} これより、実験動物の免疫を行うことなく抗体分子を手にすることが可能になり、ヒト化抗体医薬の開発などに威力を発揮している。

自然界が突然変異を蓄積し選別を繰り返すことによって、酵素のような高度な生体機能分子を獲得し

てきたことを考えると、多様性の発生と選別を試験管の中で再現し生体機能分子を創出することは、最も合理的なアプローチかもしれない。試験管内では、選択圧 (スクリーニング法) を自由に変化させることができるので、自然界にはない新しい機能を持つ人工タンパク質の創出が可能になるだろう。

REFERENCES

- Schultz P. G., Lerner R. A., *Science*, **269**, 1835–1842 (1995).
- Fujii I., *Farumashia*, **35**, 695–699 (1999).
- Teraishi K., Saito M., Fujii I., Nakamura H., *Tetrahedron Lett.*, **33**, 7153–7156 (1992).
- Fujii I., Lerner R. A., Janda K. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 8527–8528 (1991).
- Tanaka F., Kinoshita K., Tanimura R., Fujii I., *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2332–2339 (1996).
- Tanaka F., Oda M., Fujii I., *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5057–5060 (1998).
- Iwabuchi Y., Miyashita H., Tanimura R., Kinoshita K., Kikuchi M., Fujii I., *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 771–772 (1994).
- Iwabuchi Y., Kurihara S., Oda M., Fujii I., *Tetrahedron Lett.*, **40**, 5341–5344 (1999).
- Kurihara S., Tsumuraya T., Suzuki K., Kuroda M., Liu L., Takaoka Y., Fujii I., *Chem. Eur. J.*, **6**, 1656–1662 (2000).
- Kakinuma H., Fujii I., Nishi Y., *J. Immunol. Methods*, **269**, 269–281 (2002).
- Miyashita H., Karaki Y., Kikuchi M., Fujii I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5337 (1993).
- Fujii I., Tanaka F., Miyashita H., Tanimura R., Kinoshita K., *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 6199–6209 (1995).
- H. R. Hoogenboom, *Trends Biotechnol.*, **15**, 62 (1997).
- Fujii I., Fukuyama S., Iwabuchi Y., Tanimura R., *Nat. Biotechnol.*, **16**, 463–467 (1998).
- Takahashi N., Kakinuma H., Liu L., Nishi Y., Fujii I., *Nat. Biotechnol.*, **19**, 563–567 (2001).
- Takahashi-Ando N., Kakinuma H., Fujii I., Nishi Y., *J. Immunol. Methods*, **294**, 1–14 (2004).
- Kristensen I. O., Vassilyev D. G., Tanaka F., Morikawa K., Fujii I., *J. Mol. Biol.*, **281**, 501–511 (1998).

-
- 18) Miyashita H., Hara T., Tanimura R., Fujii I.,
J. Mol. Biol., **267**, 1247–1257 (1997).
- 19) Nagumo Y., Oguri H., Tsumoto K., Shindo
Y., Hiramata M., Tsumuraya T., Fujii I.,
Tomioka T., Mizugakie M., Kumagai I., *J.*
Immunol. Methods, **289**, 137–146 (2004).