

培養 B 細胞株を用いる *In vitro* 抗体作製システムによる有用抗体の創製

金山直樹,\* 藤堂景史, 曲 正樹, 大森 齊

Creation of Valuable Antibodies by an *In Vitro* Antibody Generation System Using a Hypermutating B Cell Line

Naoki KANAYAMA,\* Kagefumi TODO, Masaki MAGARI, and Hitoshi OHMORI

Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-Naka Okayama 700-8530, Japan

(Received August 5, 2008)

Monoclonal antibodies (mAb) have recently proven to be excellent biopharmaceutical agents. The generation of hybridomas from antigen-stimulated B cells has been a key technology for obtaining mAbs; however, it is a laborious and time-consuming process, and sometimes mAbs for molecules conserved between species are difficult to obtain because of immunological tolerance. Thus, it is of great importance to develop *in vitro* technologies for generating useful Abs as drug candidates. We have been attempting to develop a novel *in vitro* antibody generation system using a chicken B cell line DT40, which displays Abs and mutates Ig genes during culture, thereby generating a useful Ab library for screening mAbs. First, we generated an engineered cell line DT40-SW whose mutation machinery can be reversibly switched on and off. The Ab generation system using DT40-SW is useful in the following ways: (1) mAbs for various model antigens including autoantigens can be obtained from the DT40-SW Ab library that is free from immunological tolerance; (2) the switching device of the mutation machinery enables fixing desirable Ig mutants by stopping mutation; (3) by repeated culture and sorting of clones bearing higher affinity for target antigens, affinity maturation can be mimicked *in vitro*. We have also genetically improved DT40-SW cells for mutation efficiency and Ab production. The Ab generation system will be applicable for obtaining valuable Abs such as antitumor Abs.

**Key words**—antibody; DT40; somatic mutation; affinity maturation

## 1. はじめに

抗体は抗原に対する高い結合特異性を持つことから、免疫組織化学、ELISA、ウエスタンブロットなど実験試薬、診断薬として重要であるばかりでなく、がん、自己免疫疾患、感染症などの難治性疾患の治療薬（いわゆる抗体医薬）としての開発が近年活発に展開されている。このため、抗体医薬のシーズとなる高特異性、高親和性のモノクローナル抗体を、効率よく迅速に取得する技術を開発することは益々重要となっている。この目的のために、われわれは免疫動物の代わりに培養 B 細胞株を用いる *in vitro* モノクローナル抗体作製システムを開発しているので、その原理と実際の抗体スクリーニングに

おける有用性について以下に紹介する。

## 2. 生体内で高親和性抗体が作られる機構と既存の抗体作製法の問題点

生体内では免疫後、産生される抗体の親和性が経時的に向上し、効率よく高親和性抗体が生み出される。この過程は親和性成熟と呼ばれている。<sup>1)</sup> 親和性成熟は、抗原刺激され胚中心に移行した B 細胞の抗体可変部 (V) 遺伝子に高頻度に突然変異が導入され、多様化した B 細胞集団の中から高親和性抗体を産生する B 細胞のみが厳密に選択されて生存し、他の不要な細胞は死滅することにより進行する。この巧妙なメカニズムは完全には解明されていないが、1つの理想的な分子進化システムである。

Köhler と Milstein によって報告されたモノクローナル抗体作製法では、<sup>2)</sup> 生体内での親和性成熟によって反復免疫により高親和性抗体を取得することが基本的には可能であるが、実用的観点からいくつかの問題がある。1つは、反復免疫と B 細胞とミ

岡山大学大学院自然科学研究科細胞機能設計学分野 (〒700-8530 岡山市津島中 3-1-1)

\*e-mail: nkanayam@cc.okayama-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 128 年会シンポジウム S14 で発表したものを中心に記述したものである。

エローマ細胞との融合によって目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドマクローンを得るには、時間と多大な労力を必要とし、迅速性・効率性に問題がある。もう1つは、抗体医薬の標的となるヒトのタンパクの機能的に重要な抗原エピトープの多くは、種間での相同性が高く、免疫寛容のためにマウスを免疫しても高特異性抗体を得ることが困難な場合も多い。そこで、免疫寛容の制限を回避することが、高特異性抗体を作製するための重要な技術的課題となる。

### 3. *In vitro* 抗体作製システムの利点

理想的な抗体作製システムがあるとすれば、1) *in vitro* で迅速に抗体のスクリーニングが行えること、2) システム自身が高頻度変異機能を内包し、抗体遺伝子の変異と選択による親和性成熟が行えること、3) 抗体ライブラリーの形成時に免疫寛容の制限が加わらないこと、などの条件を充たすものであろう。このような要求を満足するものとして *in vitro* 抗体作製システムはいくつかの利点を持つ。

*In vitro* 抗体作製システムの代表的なものとしてファージディスプレイ法が開発されているが、<sup>3,4)</sup> これによる抗体取得の成否は、用いたファージライブラリーの質に依存している。また、このシステムには変異機能が備わっていないため、得られた抗体の機能を改良するためには、選択したクローンへの人工的変異導入、変異遺伝子の発現と機能評価といった一連の操作が必要であり、このプロセスには時間と労力を要する。

これらの技術的課題を克服するものとして、われわれは培養中に抗体遺伝子を自発的に変異・多様化し、十分な規模の抗体レパートリーを内包するような培養 B 細胞集団を抗体ライブラリーとして利用することを発案した。このような培養 B 細胞集団は、増殖過程で免疫寛容機構によるクローン除去を受け難いため、広範な抗体ライブラリーを形成することが期待できる。あらかじめ用意された十分な規模の培養 B 細胞集団から目的抗体を産生する細胞を選択できれば、迅速かつ効率的な *in vitro* 抗体作製システムとなる (Fig. 1)。

### 4. *In vitro* 抗体作製システムの開発：ニワトリ B 細胞株 DT40 の有用性

抗体遺伝子の高頻度変異機能を保持した培養可能な B 細胞株としては、ヒト、マウス、ニワトリ由

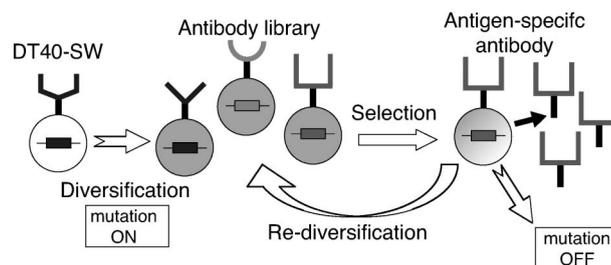


Fig. 1. *In vitro* Antibody Generation System Using a Chicken B Cell Line DT40-SW Whose Mutation Machinery Can Be Switched On and Off

来の B 細胞株がいくつか知られているが、ニワトリ B 細胞株 DT40 は、次のような優れた性質を持っている。<sup>5-7)</sup> 1) 培養中に抗体遺伝子に変異を高頻度に導入し、多様な抗体ライブラリーを形成できる、2) IgM 抗体を細胞表面に膜結合型として発現するとともに、一部を培養上清中に分泌している、3) 外来遺伝子を導入すると、動物細胞としては例外的に高い頻度で相同組換えされるので、遺伝子のノックアウトや特定部位への外来遺伝子の挿入による細胞機能の改変が容易に行える、4) 細胞増殖が非常に早いので細胞の育種やクローン選択が迅速に行える。特に、3) は他の細胞株にはない決定的に重要な特長である。

DT40 細胞は抗体遺伝子への変異導入に必須のタンパクである AID (activation-induced cytidine deaminase) を発現しており、AID 依存的に遺伝子変換や点突然変異によって培養中に抗体 V 遺伝子を多様化し続ける。<sup>8-10)</sup> AID 依存的な遺伝子改変は、活性化 B 細胞の抗体遺伝子座でのみ起こるが、特定の条件下では染色体転座の原因となり得ることも報告されている。<sup>11)</sup> しかし、AID の活性の特異性を決定する機構の詳細については解明されていない。<sup>12)</sup> 遺伝子変換は、ニワトリやウサギ、ウシなどにみられる抗体多様化機構であり、V 遺伝子の上流に存在する偽 V 遺伝子群の一部の配列が V 遺伝子



金山直樹

岡山大学大学院自然科学研究科細胞機能設計学分野・准教授。1968年大阪府生まれ。京都大学工学部工業化学科卒業。京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻修了、博士(工学)。1998年岡山大学工学部助手、講師、2005年助教授、現在に至る。テーマ：抗体の親和性成熟機構の解明とその応用。

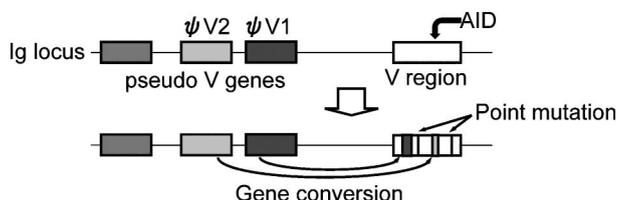


Fig. 2. Diversification of the V Gene by the AID-Dependent Gene Conversion and Point Mutation in the Rearranged Allele of the Chicken Ig Gene

上のコピーされることによって起こる (Fig. 2). したがって、長期培養した DT40 細胞集団では、抗体遺伝子への変異が蓄積して広範な抗原特異性を有する抗体ライブラリーが構成される. この DT40 ライブラリーには 2 つの重要な特長がある. 1) このライブラリー形成はニワトリ体内での B 細胞発生過程と全く同じ変異機構 (遺伝子変換と点突然変異) で進行するので、生体内と同等の多様性が獲得される, 2) 培養系では免疫寛容機構が働き難いため、自己抗体も含む広範な抗体ライブラリーが形成される. この集団から目的抗体産生細胞を単離できれば、免疫操作なしで、迅速かつ効率的に抗体産生細胞を取得することができる.

### 5. 変異機能の ON/OFF 制御可能な改変 DT40 株, DT40-SW の作製

上記の DT40 ライブラリーから目的抗体を産生するクローンを単離できたとしても、その変異機能が維持されていると、さらなる変異導入によってその抗原特異性は失われる危険性がある. これを回避するために、目的クローンを単離したら速やかに変異機能を OFF にして、抗体遺伝子を安定化することが必要である. この目的のために、われわれは変異導入に必須の AID の発現を可逆的に ON/OFF 制御できる仕組みを導入した新規細胞株 DT40-SW を樹立した.<sup>13)</sup>

DT40-SW では、2 つある AID 遺伝子の一方を標的相同組換えによりノックアウトしておき、もう一方の AID 遺伝子は、互いに逆向きに配置した loxP 配列で AID cDNA を挟んだコンストラクトで置き換えた [Fig. 3(A)]. これに Cre リコンビナーゼが働くと loxP 間の組換え反応により AID 遺伝子の向きが反転し、AID 遺伝子がプロモーターと同方向の場合は転写され AID が発現するが、逆方向の場合は転写が OFF となって発現が停止する [Fig. 3

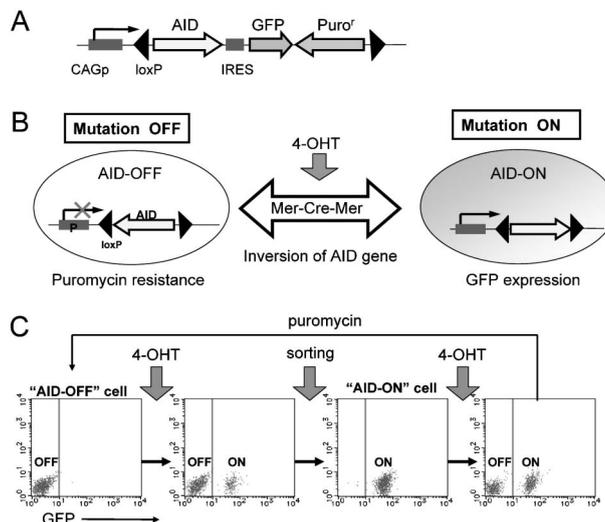


Fig. 3. Switching On and Off of Mutation Machinery in DT40-SW

A: The structure of the Cre-regulated AID expression construct. B: The AID gene is expressed when the direction is the same with that of the CAG promoter. C: Repeated switching of AID expression in DT40-SW cells.

(B)]. AID-ON の細胞は、IRES を挟んで AID 遺伝子と同方向に組み込んだ GFP を発現する. 一方、AID-OFF の細胞では、ピューロマイシン耐性遺伝子が発現するので、両状態の細胞を識別することができる. Cre は変異型エストロゲンレセプターとの融合タンパク質 (Mer-Cre-Mer) として DT40 細胞に発現させてあるので、エストロゲン誘導体 [4-ヒドロキシタモキシフェン (4-OHT)] を培地に添加すると Mer-Cre-Mer は核に移行して loxP に作用する.<sup>14)</sup> AID-OFF の細胞に 4-OHT を作用させると、GFP を発現した AID-ON 細胞が出現し、この細胞はセルソーターにより分離できる [Fig. 3(C)]. 一方、AID-ON 細胞に再び 4-OHT を作用させると GFP 陰性 (AID-OFF) 細胞が生じるが、これはピューロマイシン含有培地で培養することにより単離可能である. AID 遺伝子の反転は可逆的であり、変異機能の ON/OFF を繰り返し行うことができる.

### 6. DT40-SW 細胞を用いる *In vitro* 抗体作製システムによる抗体の取得

DT40-SW 細胞を AID-ON の状態で 2 ヶ月培養後では、ライブラリーでは半数のクローンに変異が導入されており、1 年後ではすべてのクローンに変異が複数個蓄積していた [Fig. 4(A)]. また、遺伝子変換が起こる部位、使用する偽 V 遺伝子に偏りが見られなかったことから DT40-SW 抗体ライブラ

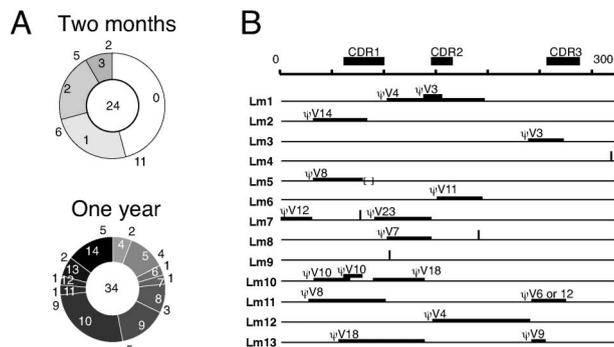


Fig. 4. Diversification of the L Chain Gene by Gene Conversion and Point Mutation in DT40-SW Cells

A: The frequency of mutation in the L chain genes in the AID-ON cells after two-months or more than one-year culture. The total number of analyzed L chain genes is indicated in the center of the pie chart. Segment sizes are proportional to the number of sequences (shown around the chart) that contained the indicated number of mutations (given within each segment). B: Mutated V region sequences in two-months cultured DT40-SW cells are illustrated. Thick lines indicate the sites of gene conversion in which assigned V pseudogene donors are indicated. Short vertical lines show the sites of point mutation.

リーは十分多様なライブラリーを形成していると考えられる [Fig. 4 (B)]. 連続的に大量培養することにより得た細胞集団から目的抗体を産生しているクローンを単離する。単離法としては、抗原を結合した磁気マイクロビーズとライブラリーの細胞 (約  $10^8$  個) を反応させ、磁気ビーズの結合した細胞を磁石により分離する方法 [Fig. 5 (A)], 蛍光標識した抗原を結合した細胞をセルソーターによって単離する方法 [Fig. 5 (B)] などがある。高性能のセルソーターを用いると単一細胞レベルで迅速に目的クローンを単離することができる。単離されたクローンを培養し、培養上清に分泌された抗体を ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) で定量したり、細胞表面に発現した抗体を FACS (Fluorescence activated cell sorter) で評価したりすることにより産生抗体の特異性を確認する [Fig. 6 (A), 6 (B)].<sup>15)</sup> この一連の操作は約 2 週間で完了する。今回取得されたハプテン 4-hydroxy-3-nitrophenylacety (NP) に対する抗体の親和性は、 $KD=100$  nM 程度であったが、一次スクリーニングで十分な親和性の抗体が得られなくても、さらに培養を続けて変異導入と選択を繰り返すことにより、親和性成熟の原理に基づいて、高親和性抗体が得られることも実証している。最終的に得られたクローンは AID を OFF にすることにより変異を停止させ、その形質を安定化させることができた [Fig. 6 (C)].<sup>15)</sup> この

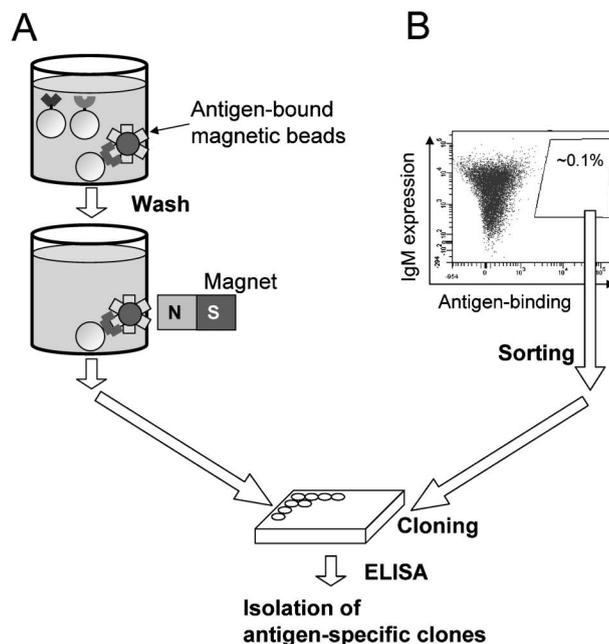


Fig. 5. Isolation of Antigen-Specific Clones from DT40-SW Library

A: DT40-SW library is incubated with biotin-conjugated antigen. Antigen-bound clones are enriched by absorption with avidin-conjugated magnetic beads. B: Cells bound to fluorescence-labeled antigen are sorted by FACS. Specificity of isolated clones is estimated by ELISA.

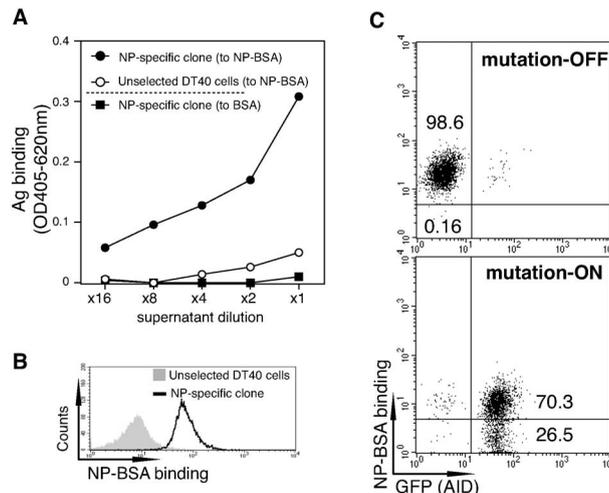


Fig. 6. Screening of Clones Producing Anti-NP mAbs from DT40-SW Library

A and B: NP-specificity of a representative clone was examined by ELISA (A) and FACS (B). C: The specificity of an NP-specific clone was fixed in the AID-OFF state, but not in the AID-ON state. Both types of cells were analyzed for NP specificity by FACS after two-months culture.

抗体作製システムにより、各種タンパク質、低分子量のハプテンやペプチド、DNA などの非タンパク性抗原といった種々の抗原に対する抗体の取得が可能であることを確認している。ニワトリにとっての

自己抗原である卵白アルブミンやリゾチーム, ssDNA などに対する抗体も得られているので, このシステムでは免疫寛容もかなり回避できていると考えられる。

### 7. DT40-SW 細胞のさらなる高機能化

以上述べたように, DT40-SW 細胞は, *in vitro* 抗体作製システムに利用できる有用な細胞株である。さらに, DT40 細胞の遺伝子操作による機能改変の容易さを利用して, このシステムをより高機能化することが可能である。現在までに次のような DT40-SW の機能改変が達成されている。

**7-1. 抗体産生能の増強** DT40 細胞の抗体産生量はマウスハイブリドーマに比べて 1/2-1/10 程度であるので, 抗体産生能を増強することは意味がある。われわれは, 取得した抗原特異的抗体産生細胞の抗体産生量を簡便かつ安定的に増強するために, B 細胞の分化を制御している転写因子 Paired box gene 5 (Pax5) の遺伝子発現を部分的に抑制することを試みた。B 細胞の発生に必須な転写因子 Pax5 は, 未感作 B 細胞では, 抗体産生細胞への分化に重要な転写因子である X-box binding protein 1 (XBP-1) や B-lymphocytes-induced mature protein 1 (Blimp1) を抑制するが, 抗体産生細胞では Pax5 の発現が低下してその抑制が解除される。<sup>16)</sup> Pax5 をノックアウトした DT40 は, XBP-1 や Blimp1 の発現が増大して抗体産生量は増大するものの細胞増殖が非常に悪いことが報告されており,<sup>17)</sup> さらに, Pax5 遺伝子が存在する第 2 番染色体はトリソミーであるため, Pax5 のノックアウトを簡便に行うことはできない。そこで, Pax5 の対立遺伝子の 1 つを破壊することによってその発現量を部分的に抑制することを検討したところ, 細胞増殖に影響を与えることなく抗体産生量を 2-3 倍程度高めることができることが明らかになった (論文印刷中)。他の細胞株を用いた物質生産では, 培養条件を最適化することによって生産量を高める方法が一般的に用いられているので, 従来技術と組み合わせることによってさらに抗体産生量を強化できると考えられる。

**7-2. 変異頻度の向上** 迅速にライブラリーを作製したり, 得られたクローンを親和性成熟させたりするには, 変異頻度が高いほうが効率的である。AID は核内 DNA 鎖上のシトシンをウラシルに変換することによって変異導入を開始すると考えられ

ているが,<sup>18)</sup> その AID の機能発現の制御に C 末端に存在する核からの輸出シグナル配列が関与することが報告されている。<sup>19)</sup> われわれは, AID の核内での活性の増大を期待して, この部分を欠失させた変異 AID 遺伝子を DT40-SW の AID 遺伝子と置き換えた細胞株 DT40-SWΔC を樹立した。変異機能を ON にして軽鎖への変異導入効率を評価したところ, DT40-SW と比べて 3 倍程度増加することが明らかとなった (論文作成中)。また, DT40-SW と同様に V 遺伝子上に偏りなく変異が導入されており, DT40-SWΔC において抗体遺伝子の多様化の能力が強化されたと考えられる。別の方法としては抗体遺伝子座特異的な転写因子 E2A の大量発現や抗体遺伝子の組換えを誘導するトリコスタチン A の添加が変異頻度を増大させるとの報告があるが,<sup>20-22)</sup> 導入される変異に偏りが生じる場合があることが分かっている。<sup>23)</sup> 抗体の作製システムにおいては変異頻度の向上のみならず生み出される抗体ライブラリーの多様性が重要であることから, 今回, われわれが試みた変異頻度の向上方法は, 抗体の多様化の促進方法として有効であると考えられる。

### 7-3. 遺伝子変換型から点突然変異型への転換

ニワトリでは, B 細胞発生段階において V(D)J 遺伝子再編成や遺伝子変換のような組換え反応により多様な抗体遺伝子が生成されて初期 B 細胞レパートリーが形成されるが, 活性化 B 細胞の親和性成熟の過程では点突然変異が主に起こるようになる。<sup>24)</sup> DT40 では遺伝子変換が優位で点突然変異の頻度は低い, 生体内でみられる抗体の多様化機構の転換を *in vitro* で実現することは, 一次スクリーニングで単離したクローンの抗体をさらに親和性成熟させる場合に有利である。遺伝子変換は相同組換え機構に依存していることから, 相同組換えに関与する Rad51 パラログの 1 つをノックアウトすると点突然変異優位になる。<sup>25, 26)</sup> Rad51 パラログノックアウト株は点突然変異型の細胞株として有用であるが,<sup>27)</sup> この細胞は増殖速度が低く,<sup>28, 29)</sup> 点突然変異のみでは抗体の多様化には不利であることから, 変異と選択の繰り返しや初期ライブラリー構築において効率が落ちることが想定される。われわれは Rad51 パラログの 1 つである XRCC3 遺伝子の一方の対立遺伝子を破壊し, 発現を低下させるだけで, 点突然変異優位となることを見出した (論文作成

中). この方法は簡便かつ細胞増殖に影響を与えないことから, 必要に応じて変異様式を転換する方法として有用である. 以上の機能改変により, この抗体作製システムをより高性能なものに改良することができた.

#### 8. 今後の展開

DT40-SW を用いた抗体作製システムは, 培養細胞を用いた *in vitro* 系であるために免疫寛容の制限を受けず, 従来の方法では取得が困難であった標的に対する抗体の取得に利用可能であると考えられる.

DT40 の高い増殖性により目的クローンの単離と評価を簡便かつ効率的に行えるので, 標的に対する抗体探索をハイスループットに行うことができる. また, 動物を使用しない技術開発は, 労力, 時間, コストの面でのメリットがあるだけでなく, 近年の「動物愛護の精神」にもかなう方向性の研究の1つである. ここで紹介した抗体作製システムを用いて, 現在いくつかの標的を設定して抗体医薬の候補を探索しつつある. また, DT40 において高頻度に遺伝子ターゲティングできることを利用して, ニワトリ IgM 産生型からヒト IgG 産生型への改変や, 既存の抗体を親和性成熟するシステムの開発を進めており, 有用抗体の作製システムとしてより実用性の高いものに拡張していく予定である. これとは別にわれわれは, DT40-SW 細胞の抗体 L 鎖遺伝子座に非抗体タンパクの遺伝子を導入すると, それが AID の標的となって変異を受けることを報告している.<sup>30)</sup>したがって, DT40-SW 細胞は, 抗体作製のみならず種々のタンパク分子の遺伝子レベルでの機能改変を行うための道具としても大きな利用価値がある. この細胞の機能をさらに拡張し, 目的に応じた高度の機能を持つ細胞へ進化させることは興味ある研究テーマである.

**謝辞** 本研究の一部は, 科学研究費補助金, NEDO 産業技術研究助成, JST シーズ発掘試験などの支援を受けて実施されました. 本研究の成果は, 岡山大学大学院自然科学研究科細胞機能設計学分野で得られたものであり, 池田美香研究員, 梶田真道君, 金広優一君をはじめこれまで本研究に関与してきた研究室メンバーに感謝いたします.

#### REFERENCES

- 1) Rajewsky K., *Nature*, **381**, 751–758 (1996).
- 2) Köhler G., Milstein C., *Nature*, **256**, 495–497 (1975).
- 3) Smith G. P., *Science*, **228**, 1315–1317 (1985).
- 4) McCafferty J., Griffiths A. D., Winter G., Chiswell D. J., *Nature*, **348**, 552–554 (1990).
- 5) Buerstedde J. M., Reynaud C. A., Humphries E. H., Olson W., Ewert D. L., Weill J. C., *EMBO J.*, **9**, 921–927 (1990).
- 6) Kim S., Humphries E. H., Tjoelker L., Carlson L., Thompson C. B., *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 3224–3231 (1990).
- 7) Buerstedde J. M., Takeda S., *Cell*, **67**, 179–188 (1991).
- 8) Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai Y., Honjo T., *Cell*, **102**, 553–563 (2000).
- 9) Arakawa H., Hauschild J., Buerstedde J. M., *Science*, **295**, 1301–1306 (2002).
- 10) Harris R. S., Sale J. E., Petersen-Mahrt S. K., Neuberger M. S., *Curr. Biol.*, **12**, 435–438 (2002).
- 11) Ramiro A., Jankovic M., Eisenreich T., Difilippantonio S., Chen-Kiang S., Muramatsu M., Honjo T., Nussenzweig A., Nussenzweig M. C., *Cell*, **118**, 431–438 (2004).
- 12) Odegard V., Schatz D. G., *Nat. Rev. Immunol.*, **6**, 573–583 (2006).
- 13) Kanayama N., Todo K., Reth M., Ohmori H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 70–75 (2005).
- 14) Zhang Y., Riesterer C., Ayrall A. M., Sablitzky F., Littlewood T. D., Reth M., *Nucleic Acids Res.*, **24**, 543–548 (1996).
- 15) Todo K., Miyake K., Magari M., Kanayama N., Ohmori H., *J. Biosci. Bioeng.*, **102**, 478–481 (2006).
- 16) Shapiro-Shelef M., Calame K., *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 230–242 (2005).
- 17) Nera K., Kohonen P., Narvi E., Peippo A., Mustonen L., Terho P., Koskela K., Buerstedde J. M., Lassila O., *Immunity*, **24**, 283–293 (2006).
- 18) Di Noia J. M., Neuberger M. S., *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 1–22 (2007).
- 19) Ito S., Nagaoka H., Shinkura R., Begum N.,

- Muramatsu M., Nakata M., Honjo T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 1975–1980 (2004).
- 20) Seo H., Masuoka M., Murofushi H., Takeda S., Shibata T., Ohta K., *Nat. Biotechnol.*, **23**, 731–735 (2005).
- 21) Conlon T. M., Meyer K. B., *Eur. J. Immunol.*, **36**, 139–148 (2006).
- 22) Schoetz U., Cervelli M., Wang Y. D., Fiedler P., Buerstedde J. M., *J. Immunol.*, **177**, 395–400 (2006).
- 23) Lin W., Hashimoto S., Seo H., Shibata T., Ohta K., *Genes Cells*, **13**, 255–268 (2008).
- 24) Arakawa H., Buerstedde J. M., *Dev. Dyn.*, **229**, 458–464 (2004).
- 25) Sale J. E., Calandrini D. M., Takata M., Takeda S., Neuberger M. S., *Nature*, **412**, 921–926 (2001).
- 26) Hatanaka A., Yamazoe M., Sale J., Takata M., Yamamoto K., Kitao H., Sonoda E., Kikuchi K., Yonetani Y., Takeda S., *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 1124–1134 (2005).
- 27) Cumbers S., Williams G., Davies S., Grenfell R., Takeda S., Batista F., Sale J., Neuberger M., *Nat. Biotechnol.*, **20**, 1129–1134 (2002).
- 28) Takata M., Sasaki M. S., Sonoda E., Fukushima T., Morrison C., Albala J. S., Swagemakers S. M., Kanaar R., Thompson L. H., Takeda S., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6476–6482 (2000).
- 29) Takata M., Sasaki M. S., Tachiiri S., Fukushima T., Sonoda E., Schild D., Thompson L. H., Takeda S., *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 2858–2866 (2001).
- 30) Kanayama N., Todo K., Takahashi S., Magari M., Ohmori H., *Nucleic Acids Res.*, **34**, e10 (2006).