

## 創薬プロジェクトへの新しいハイスループットシステム—分子ディスプレイと コンビナトリアル・バイオエンジニアリングの集積・共役

植田 充美

### Novel High-Throughput System for Production of New Medicines—Integration and Combination with Molecular Display and Combinatorial Bioengineering

Mitsuyoshi UEDA

*Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,  
Kitashirakawa-oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan*

(Received June 17, 2009)

To demonstrate the practical use of a novel high-throughput screening system by single cells constructed by the molecular display method, a yeast cell chip microchamber array was developed. As applications, peptides, peptidases, and antibodies were examined. Neurolysin originally recognizes substrates with six-amino-acid-long residues, cleaving a peptide bond in the center position of the substrate amino acid sequence. To alter the recognition of the P2' amino acid of substrates by neurolysin, six residues of neurolysin which might be involved in the formation of the neurolysin S2' subsite were individually and comprehensively substituted by semirational mutagenesis coupled with the yeast molecular display system. The protein libraries of mutant neurolysin were displayed on the yeast cell surface and screening was carried out using two fluorescence-quenching peptides, the matrix metalloproteinase-2/9- and MMP-3-specific substrates. Among mutant neurolysin, one mutant neurolysin with a marked change in substrate specificity was successfully obtained. Furthermore, skillful display of antibodies (H and L chains) on the cell surface of yeast cells suggested the possibility of new approach for the creation of tailor-made proteases beyond limitations of the traditional immunization approach. Accordingly, the combination of the molecular display and combinatorial bioengineering would lead to produce novel medicines.

**Key words**—molecular display; high-throughput screening system; cell surface engineering; cell chip

#### 1. はじめに

近年医療分野において、タンパク質医薬品（生理活性ペプチド・抗体・ホルモン・血液因子・成長因子・インターフェロン）が注目されている。タンパク質医薬品は生体内において対象とする生理現象を制御することで病状の改善を図るものであり、主要なものとして、抗体やペプチドがある。ペプチドは生体内で生理活性ペプチドとしても働き、生理現象におけるシグナル伝達をも増強するものが存在する。一般に生理活性ペプチドは対応するペプチダーゼに分解されて不活性化されることから、ペプチダーゼもペプチドの生理活性を制御する能力を持つ

タンパク質医薬品分子として有用である。ペプチダーゼや抗体をタンパク質医薬品として使用するには、副作用の低減のためにも高い基質特異性を持っていることが重要である。しかしながら、数の限られている既存のペプチダーゼの中から目的のペプチドを認識する高い特異性を持つものを探索することは困難である。そこで、高い基質特異性を持つペプチダーゼや逆に、多様性を持つ抗体を人工的に効率よく創出する方法として、分子ディスプレイ法を用いた機能改変はその1つとして期待される。

ゲノム情報をタンパク質に変換していくタンパク質調製系として、多くの遺伝子由来するタンパク質を網羅的に、最少量、かつ迅速に（これは、ハイスループットとも呼ばれる）選択して機能解析するには、導入した個々のDNAから生まれてきた個々のタンパク質を個々の細胞の表層や細胞膜などの上に安定な形で提示（分子ディスプレイ）すると、分

京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻（〒606-8502 京都市左京区北白川追分町）

e-mail: miueda@kais.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第129年会シンポジウムS05で発表したものを中心に記述したものである。

子ディスプレイされた細胞を1つの支持体として、分子ディスプレイされたタンパク質をいつも生きたまま、必要ならいつでも増幅できるなど、その活性や機能解析が容易となる。さらに、タンパク質のアミノ酸配列分析をしなくても、PCR（遺伝子増幅）法などの併用により、導入されたDNAの配列から分子ディスプレイされたタンパク質のアミノ酸配列が決定できるというほかの方法論の追随を許さない、次世代シーケンシング時代に適応したメリットも創出される。こう言ったゲノム情報分子をタンパク質機能分子に変換する新しく、簡易で、迅速で、しかも、多くの組み合わせの（コンビナトリアル）分子ライブラリーから適合するものをシステムティックに選択することのできる手法として登場してきたのが、ニューバイオテクノロジーとしての「コンビナトリアル・バイオエンジニアリング」手法である。<sup>1,2)</sup>

## 2. 分子ディスプレイ：アーミング技術によるタンパク質機能検索のハイスループット化

われわれは、酵母の細胞表面への分子ディスプレイ法—酵母の細胞表面工学—という新しいバイオテクノロジー分野を開拓してきた（Fig. 1）。<sup>1-4)</sup> 1999年ノーベル医学生理学賞を受賞した Blobel 教授の「タンパク質におけるシグナル説」で周知のごとく、細胞内のすべてのタンパク質は、個々に固有の「アドレス」を指定する情報を持ち、その情報に基づいて輸送され局在化し、そこで機能を発揮している。酵母を用いた分子ディスプレイでは、細胞表面で機

能を発揮しているタンパク質の「アドレス」を指定する遺伝子情報を用いた機能タンパク質の新しい発現手法として、【細胞表面工学（Cell Surface Engineering）】を考案した。最も単純でヒトの生活に既に密接に係わっている真核細胞であるパン酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた場合、この細胞表面最外殻に位置する  $\alpha$ -アグルチニンの分子情報を活用することによって種々の酵素やタンパク質を細胞表面にディスプレイすることが可能となってきた。 $\alpha$ -アグルチニンの分子構造は、分泌シグナル・機能ドメイン・細胞壁ドメイン（セリンとスレオニンに富むC末320アミノ酸残基）からなっており、このC末320アミノ酸残基のC末端に GPI アンカー付着シグナルが存在する。したがって、この分泌シグナルと機能ドメインを操作することによって、これまでに、異種由来の酵素や各種因子や受容体など分子サイズの大きいタンパク質を、単独で、あるいは、協奏的に細胞表面に発現提示させることに成功し（Fig. 2）、酵母がこれまで持たなかった機能を持った新機能酵母を創製してきた。<sup>1-4)</sup> このような細胞は、アメリカの Chemical & Engineering News [Vol. 75, p. 32 (1997)]でもいち早く取り上げられ、「アーミング酵母（Arming Yeast）」と命名されており、こう言った技術は「アーミング技術」として、ニューバイオテクノロジーを支える基盤技術となってきている。

## 3. 高速で簡便な網羅的タンパク質ライブラリーの作製

これまで、例えば、タンパク質の機能の解析には、目的とするタンパク質をコードする遺伝子を単離し、過剰発現する系を構築し、大量調製したそのタンパク質を結晶化し、X-線構造解析を行い、そのモデリングからランダム変異法や、特に、部位特異的変異法を用いて、構造と機能の相関を明らかにしたり、機能改善したりする研究が主流であった。ところが、ここで登場してきた細胞表面分子ディスプレイを基幹とする「コンビナトリアル・バイオエンジニアリング」技術により、これまでの「点での変異」による戦略から、「コンビナトリアルな変異」という狙ったアミノ酸残基やドメインを20種のアミノ酸で網羅的に変異をかけたタンパク質集団を作製し、そこから目的のものを直接的にハイスループットに選択して解析する戦略が可能となったのであ

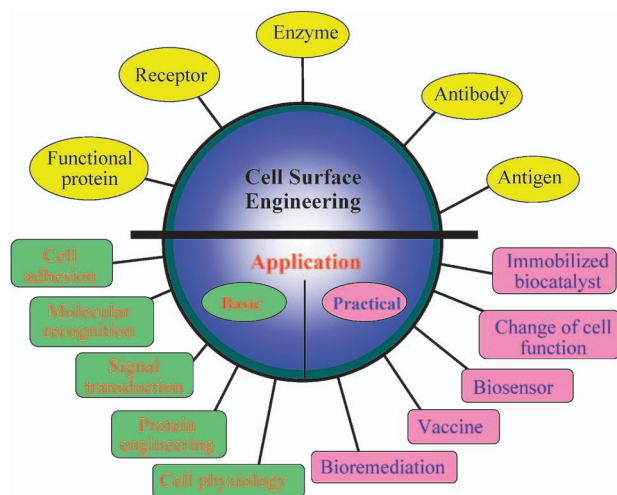


Fig. 1. Cell Surface Engineering and Its Application

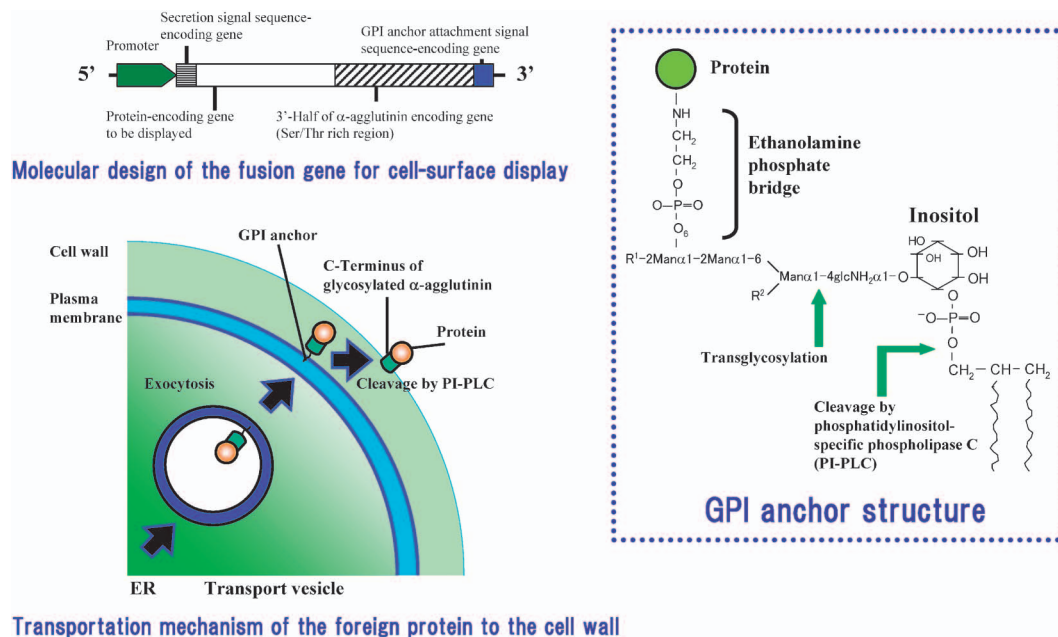


Fig. 2. Mechanism of Cell Surface Engineering (Molecular Display)

る。酵母の場合，導入した遺伝子型とその発現された表現型が対応関係になっているので，導入したプラスミドの挿入部位近傍のプライマーを用意しておくだけで，ディスプレイした，例えば，変異タンパク質の分子配列を DNA 配列分析から決定できる。また，それぞれのコンビナトリアルな変異タンパク質を個々に煩雑な精製をする必要なく，細胞ごと変異タンパク質として扱え，まさに，タンパク質に増殖性と保存性を持たせた革命的な方法論を提供するものである。この手法は，特に，タンパク質の機能評価や SNPs 対応タンパク質（一塩基変異に起因する）の活性評価（ポスト SNPs 研究）において (Fig. 3)，革新的な，あるいは，ブレイクスルー的手法となり，まさにタンパク質機能解析への真の新しい視点を提供することになるであろう。<sup>5)</sup>

#### 4. ペプチド

モデルとして，ラット脳由来のマトロペプチダーゼであるニューロライシン (EC3.4.24.16) を用いた。ニューロライシンの基質は血管作用性生理活性ペプチドであるニューロテンシンが有名であるが，特異性については不明な点が多い。そこで，最初に野生型ニューロライシンの基質特異性を調査するために，ニューロライシンを酵母の細胞表面にディスプレイして調査したところ，野生型ニューロライシンは 2 種類の認識モチーフを持つことが明らかにな

った。このモチーフに当てはまる生理活性ペプチドを検索したところ，摂食行動の制御に係わる **Orexin B**, **Neuromedin B**, **Urocortin** の 3 つのペプチドを同定できた。このことから，ニューロライシンは生体内において，摂食行動の制御に係わることも示唆された。<sup>6)</sup> 一方，ニューロライシンはがんの浸潤・転移に関与するマトリックスメタロプロテアーゼ-2 あるいはマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (以下，**MMP-2/9**) に特異的な基質を効率よく切断することが分かった。結晶構造を比較すると，ニューロライシンは，**MMP** 群の活性ドメインと同じ **3-Layer Sandwich** 構造を持ち，**MMP-2/9** とよく似た基質特異性を持つことが明らかになり，また，基質認識に重要ないくつかの残基を推定することができた。<sup>7)</sup> また，**MMP-2/9** を特異的に阻害する活性阻害剤はニューロライシンの活性も効果的に阻害することが明らかになり，ニューロライシンをディスプレイした酵母を用いて抗がん剤となる **MMP-2/9** 阻害剤の網羅的スクリーニングによる評価ができることも分かった。

ところで，野生型ニューロライシンは **MMP-2/9** 特異的ペプチドを効率よく切断するが，**MMP-3** 特異的ペプチドに対してはあまり活性を示さない。これらのペプチド配列はほとんど同じだが，**P1'** と **P2'** 部位のアミノ酸が異なる (**MMP2/9** 特異的ペ

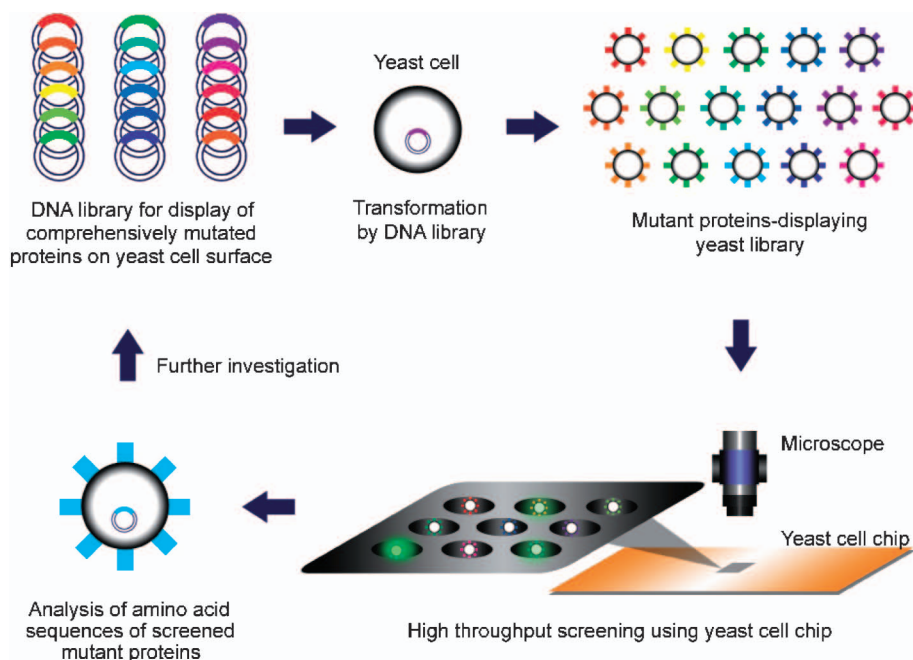


Fig. 3. Screening System for Target Cells and Proteins by the High-Throughput Method Coupled with Molecular Display and Yeast Cell Chip

プチドの P1' はチロシン, P2' はアラニンだが, MMP-3 特異的ペプチドではそれぞれバリンとグルタミン酸). そこで, ニューロライシンが MMP-3 に特異的なペプチドを切断するように改変タンパク質を作成するために, 既存の基質認識残基の情報と, よく似た基質特異性を持つ MMP-2/9 との構造比較により, P1' と P2' 部位の認識残基を推定して 6 つの残基を選び, それぞれを網羅的にほかの 19 種類のアミノ酸に置換した合計 120 種類からなる変異体ライブラリーを作製した. このライブラリーの中から MMP-3 に対する活性が高い変異体をスクリーニングしたところ, アルギニン 470 あるいはチロシン 610 に変異が導入された変異型ニューロライシンが得られた. 最も特異性が変化した Y610L 変異体については, 反応速度論的解析を行うとともに, その解析を基にして基質認識ポケットの構造変化を予測した. このように, 分子ディスプレイ法を利用して, 望む特異性を持つペプチダーゼを迅速に創出することもできた.<sup>8)</sup>

### 5. 抗体分子の創出

分子ディスプレイの高速な改変タンパク質創出性を利用して, 哺乳類の免疫系を使うことなしに試験管内で迅速に抗体酵素の作成あるいは機能解析に, 実際にこのシステムを用いて, モデル抗体酵素を創

出し解析した例について述べる.

近年, 病巣特異的なドラッグデリバリーシステムを実現するために, プロドラッグ (薬となる物質の安定な前駆体化合物) を投与し, 病巣で酵素的に活性化して機能させることが試みられている. この方法でポイントになってくるのは, 病巣以外で活性化されないようにプロドラッグを設計することと, プロドラッグを活性化する酵素が病巣に存在することである. しかし, 活性化に都合のよい酵素が存在することはほとんどなく, 高いプロドラッグ特異性と望ましい触媒活性を持つ酵素を人工的に作成して用いる必要がある. そこで触媒活性を持つ抗体 (抗体酵素あるいは触媒抗体と呼ばれる) が注目されている. 抗体酵素は化学反応を触媒する抗体であり, 酵素と同様に反応の遷移状態と結合して安定化することで触媒能力を持つ. 構造は通常の抗体と同じなので可変領域の多様性によって高い基質特異性を持つものが得られやすい反面, 望ましい触媒活性を持つように変異体を作成しても活性が弱いことが多い. そのためハプテンの設計を工夫したり, ファージディスプレイシステムによってより高い活性を持つ変異型抗体を作成したりすることが必要になる.

本来, 抗体酵素とは人工的に作られたものを指していたが, ヒトの体内でも特定の疾患の原因分子と



していくつか見い出されてきている。例えば血管作動性小腸ペプチド (VIP: Vasoactive Intestinal Peptide) を特異的に分解する抗体酵素<sup>9)</sup> (VIPase と呼ばれる) や DNA に結合して分解する抗体酵素<sup>10)</sup> が、それぞれ喘息患者あるいは全身性エリテマトーデス患者から発見されている。これらの場合は治療薬のターゲット分子として重要である。

通常、人工的に抗体酵素を作るには哺乳類の免疫系を利用し、目的とする反応の遷移状態を模した物質 (遷移状態アナログ) を投与してこの遷移状態アナログに結合する抗体を作らせる。しかし、この作成方法では抗体ができるまでに数ヵ月かかる上に血清からモノクローナル抗体を精製する必要があり時間と手間がかかる。アミノ酸配列の決定、酵素活性の測定、基質特異性の解析などはさらに大変である。そのため、上記の問題点を一掃できる酵母分子ディスプレイシステムを抗体酵素の作成と機能解析に利用してきている。

実際に抗体分子の Fab (Antigen Binding Fragment) 断片を酵母細胞表面にディスプレイすることを試みた。Fab 断片は「軽鎖」と「Fd 断片 (重鎖の定常領域と可変領域で構成される)」の 2 つのサブユニットがジスルフィド結合でつながっているヘテロダイマーであり、全長の抗体分子と同様に抗原結合能を持つ。そこで、それぞれを別々のベクターに組み込んで軽鎖と Fd 断片を生産させることにした

(Fig. 4)。軽鎖をディスプレイするために、分泌シグナルをコードする遺伝子、軽鎖をコードする遺伝子、 $\alpha$ -アグルチニンの細胞壁ドメインをコードする遺伝子をこの順に融合させた。これを酵母内で発現させると軽鎖と  $\alpha$ -アグルチニンの融合タンパク質は分泌シグナルによって細胞表面へ輸送され、表面最外殻に固定化される。一方、Fd 断片の遺伝子も同じ分泌シグナルの下流に置かれ、これを発現させると軽鎖と同じ経路で細胞表面へ輸送される。これら 2 つのベクターを酵母の染色体に組み込んで発現させたところ、軽鎖と Fd 断片は細胞表面に輸送される過程でジスルフィド結合を形成し、Fab として酵母の細胞表面にディスプレイされ、抗原への結合活性も保持していた。<sup>11)</sup> このように抗体分子を本来の活性を保った状態で酵母の細胞表面へディスプレイできたことにより、哺乳類の免疫系に依存せずに酵母の細胞表面、すなわち試験管内で抗体を作成することが可能になった。

試験管内で、酵母ディスプレイシステムを用いる場合には抗体ライブラリーの中から反応速度を指標に活性が高い抗体を細胞のまま直接スクリーニングすることが可能であり、アミノ酸配列は対応する DNA 配列を調べることで容易に決定できる。この時に使用する抗体ライブラリーも、抗体分子をコードする遺伝子をライブラリー化するだけでよいので、生体内と同じように可変領域がランダムになっ

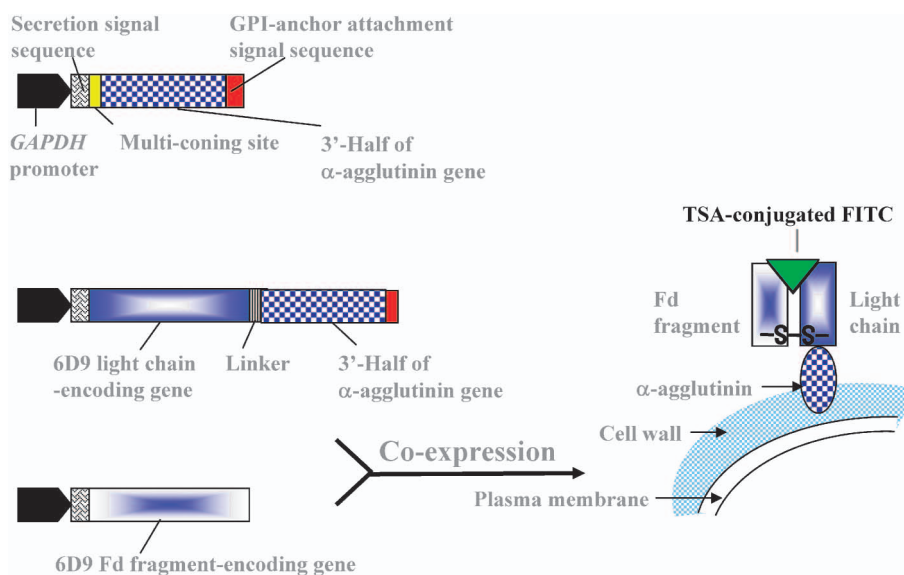


Fig. 4. Illustration of Display of Fab Fragment on the Cell Surface of the Yeast Cell

ているものを始め、定常領域をランダム化したものの、アミノ酸を挿入・欠損させたものなど自由に設計できる。このことは抗体ライブラリーの多様性を非常に大きくすることが人為的に自由にできることを意味しており、哺乳類の免疫系ではアポトーシスにより消滅させられる抗体や作成不可能な抗体や抗体酵素などが取得できるような抗体の多様性を実現できる可能性が高いと考えられる。

喘息患者の血清から発見された抗体酵素 VIPase<sup>9)</sup>のように、プロテアーゼ活性を持つ抗体酵素については既にいくつか報告されている。<sup>12-14)</sup> これらの抗体酵素においては、軽鎖中の3つの残基 Asp1, Ser27a, His93 が触媒トライアドを形成すると考えられている。触媒トライアドは加水分解酵素に多くみられる触媒中心を形成する構造モチーフであり、プロテアーゼにおいてはセリンプロテアーゼによくみられる。そこでこれらの知見を基に、部位特異的変異法によって触媒トライアドを導入した軽鎖を酵母細胞表面にディスプレイし、迅速に簡便にプロテアーゼ機能の解析を行った。モデル抗体として、もともとプロテアーゼ活性を持たない抗体軽鎖断片を用いた。プロモーターの下流に分泌シグナルをコードする遺伝子、軽鎖遺伝子、 $\alpha$ -アグルチニンの細胞壁ドメインをコードする遺伝子をこの順に組み込み、軽鎖を細胞表面へディスプレイするベクターを構築した(野生型軽鎖)。軽鎖断片にプロテアーゼ活性を付与するために、構築した軽鎖(野生型軽鎖)をディスプレイするベクターを鋳型にして、Asp1, Ser27a, His93 となるように部位特異的変異法により変異を導入した(変異型軽鎖)。これらのベクターを宿主酵母に導入して野生型軽鎖及び変異型軽鎖を細胞表面へディスプレイした。作成した抗体軽鎖ディスプレイ酵母(野生型軽鎖, 変異型軽鎖)のプロテアーゼ活性は非常に簡便に測定することができた。具体的にはこれらの酵母を定常期まで培養し、集菌と洗浄を行ったのちに、エッペンドルフチューブ内で緩衝液に懸濁した。そこに蛍光基質を加えて反応を開始し、24時間後に反応液の上清の蛍光強度を測定した。基質は様々なアミノ酸配列を持つ8種類の蛍光ペプチドを使用した。その結果、いくつかの蛍光ペプチド基質に対し変異型軽鎖ディスプレイ酵母は野生型軽鎖ディスプレイ酵母よりも高い加水分解活性を示し、特に、Suc-Gly-Pro-Leu-

Gly-Pro-MCA [Suc: スクシニル基, MCA: 4-メチルクマリル-7-アミド基(蛍光基)]に対する加水分解活性は顕著に増加していた。この活性はセリンプロテアーゼ阻害剤である DFP (ジイソプロピルフルオロリン酸)を加えることで完全に消失した。つまり、変異型軽鎖はセリンプロテアーゼ型の活性を示し、また Suc-Gly-Pro-Leu-Gly-Pro-MCA を特異的に切断することからこの変異型軽鎖はコラゲナーゼのような基質特異性を持つことが示唆された。<sup>15)</sup> これまでに報告されているプロテアーゼ活性を持つ抗体酵素において、VIPase は Lys や Arg の C 末端側を好んで切断し、i41SL1-2-Lc は CDRL-1 という16残基からなるペプチドを Arg-Ser の間で切断し、<sup>13)</sup> ECL2B-2-Lc は CCR-5 という22残基からなるペプチドを Arg-Ser, Tyr-Ser, Phe-Trp, Thr-Leu など複数の部位で非特異的に切断する。<sup>14)</sup> 今回作成した変異型軽鎖はどの抗体酵素とも違う基質特異性を持ったことから、これらの軽鎖のアミノ酸残基の種類の違い、立体構造の局所的な違いを比較していけば、軽鎖をベースとしたプロテアーゼ型抗体酵素の基質特異性を決定しているメカニズムを明らかにすることができるのではないかと期待できる。

実際に抗体ライブラリーからスクリーニングする時にはスクリーニング手段が重要になってくるが、われわれは、現在、酵母細胞チップ(日本板硝子社製)の開発も行っている(Fig. 5)。酵母細胞チップ

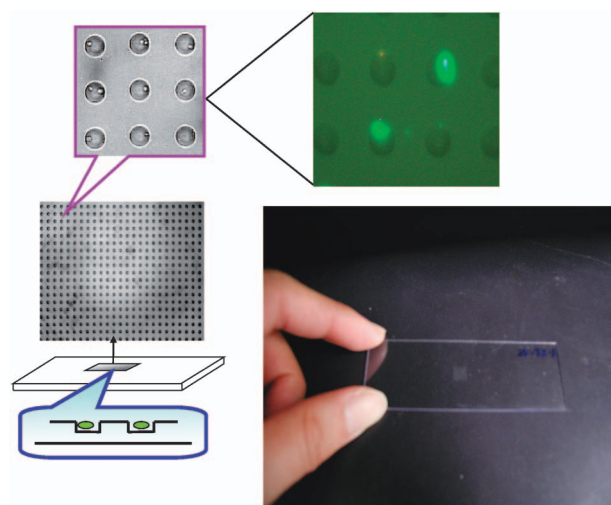


Fig. 5. Yeast Cell Chip and Its Application to Screen the Target Cell

The chip has  $100 \times 100 = 10000$  microchambers (Nippon Itagarasu) on its face. One microchamber is  $20 \mu\text{m}$  diameter and  $8 \mu\text{m}$  depth.



Fig. 6. Single Cell Picking-up Machine (Fujitsu)

プとは、直径  $20\ \mu\text{m}$  程度で深さ  $8\ \mu\text{m}$  程度のマイクロチャンバーからなり、1枚のチップ上に  $100 \times 100 = 10000$  穴のマイクロチャンバーを有する。このチャンバー内には1-2個の酵母細胞を浸漬することができ、それぞれのチャンバー内で直接一細胞反応を行い、それを顕微鏡で観察し、目的の酵母細胞をピックアップし、ダイレクトPCR及びそれに続くDNAシーケンシングあるいは培養することができる (Fig. 6, 富士通社製, シングルセルピックアップ装置)<sup>16,17)</sup> これは、1枚の小さなチップ上にて従来の膨大なスクリーニング作業を集積化できることを意味する。さらに、酵母細胞表面にディスプレイされた抗体は容易に回収もできる。すなわち抗体と $\alpha$ -アグルチニンの細胞壁ドメインとの間にプロテアーゼの認識配列を挿入しておけば、抗体がディスプレイされた酵母細胞を培養・集菌した後にプロテアーゼを作用させることによって抗体だけを細胞表面から切り出すことも可能である。<sup>18)</sup> 今後、この開発した酵母分子ディスプレイシステムと酵母細胞チップの共役システムにより、個体免疫系では作れない有用な抗体や抗体酵素の創出と機能解析の展開が期待できる。

以上のように、酵母分子ディスプレイを利用することで、タンパク質の機能の解析と改変設計や、さらには、アゴニストやアンタゴニストのスクリーニングなどを簡便に効率よく行えるようになってきている。将来的には様々なタンパク質を用途に合わせて改変設計したタンパク質医薬品が創出され、次世

代医療に貢献できるであろう。また、現在、疾患や薬の効果にみられる個人差の1つの要因として、SNPs (一塩基多型) から生じるタンパク質多型が注目されている。われわれの方法を使えば、それぞれの多型タンパク質を簡便に作成し、機能変化を調査することで、個人に最適な治療法 (オーダーメイド医療) を提供することも可能になると期待している。

## REFERENCES

- 1) Ueda M., Kondo A., "Kagaku Frontier," Vol. 9, Kagaku Dojin, Kyoto, 2003.
- 2) Ueda M., "Frontier of Combinatorial Bioengineering," CMC, Tokyo, 2004.
- 3) Ueda M., *Bioscience and Industry*, **55**, 275-278 (1997).
- 4) Ueda M., *Kagaku To Seibutsu*, **35**, 525-532 (1997).
- 5) Ueda M., *Bionics*, **27**, 31-35 (2007).
- 6) Kadonosono T., Kato M., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1353-1360 (2007).
- 7) Kadonosono T., Kato M., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 1285-1291 (2007).
- 8) Kadonosono T., Kato M., Ueda M., *Protein Eng. Des. Sel.*, **21**, 507-513 (2008).
- 9) Paul S., Volle D. J., Beach C. M., Massey R. J., *Science*, **244**, 1158-1162 (1989).
- 10) Gabibov A. G., Gololobov G. V., Makarevich O. I., Schourov D. V., Chernova E. A., Yadav R. P., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **47**, 293-

- 302 (1994).
- 11) Lin Y., Tsumuraya T., Wakabayashi T., Shiraga S., Fujii I., Kondo A., Tanaka A., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 226–232 (2003).
  - 12) Gololobov G., Sun M., Paul S., *Mol. Immunol.*, **36**, 1215–1222 (1999).
  - 13) Hifumi E., Kondo H., Mitsuda Y., Uda T., *Biotechnol. Bioeng.*, **84**, 485–493 (2003).
  - 14) Mitsuda Y., Hifumi E., Tsuruhata K., Uda T., *Biotechnol. Bioeng.*, **86**, 217–225 (2004).
  - 15) Okochi N., Kato M., Kadonosono T., Ueda M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 597–603 (2007).
  - 16) Fukuda T., Shiraga S., Kato M., Morita Y., Tamiya E., Hori T., Suye S., Ueda M., *Nanobiotechnology*, **1**, 105–111 (2005).
  - 17) Fukuda T., Shiraga S., Kato M., Suye S., Ueda M., *Biotechnol. Prog.*, **22**, 944–948 (2006).
  - 18) Maeda H., Nagayama M., Kuroda K., Ueda M., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 753–755 (2009).