

# 小麦胚芽抽出液を用いた無細胞タンパク質合成系とその応用技術

渋井 達郎

日本獣生命科学大学・応用生命科学学部・食品バイオテクノロジー教室

**要約** 小麦は古くから食品として利用されている。主に胚乳部分が小麦粉として食され、胚芽は古くは捨てられていた。最近胚芽部分に多くの栄養素が含まれていることからクッキーなどに入れられ利用されることが多くなってきている。

分子生物学や遺伝子工学の分野では、小麦胚芽抽出液を用いて遺伝子からタンパク質を合成する実験が1970年代から、盛んに行われるようになった。しかしながら、そのタンパク質の合成能は低く、合成したタンパク質は放射能標識を利用し検出するしか方法はなかった。

本総説では、近年タンパク質合成能力が著しく改善された小麦胚芽抽出液を用いた高効率なタンパク質合成系について解説し、それを応用した試験管内タンパク質ディスプレイ (*in vitro* protein display) 技術による、化学合成したヒト抗体遺伝子を用いたヒト抗体遺伝子の取得とその抗体の組み換え大腸菌による大量生産について解説する。

更に、高額な医療費負担が現在問題となっている抗体医薬に代わるワクチン（ミモトープワクチン）の *in vitro* protein display を用いた取得とそのワクチンとしての可能性に関する簡単な実験例についても解説したい。

**キーワード**：無細胞タンパク合成、抗体、ワクチン

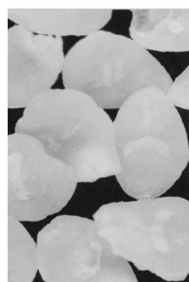
日獣生大研報 60, 1-15, 2011.

## 1. はじめに

発芽時、種子は短期間にタンパク質合成を行い、成長に必要な各種タンパク質・酵素等を作る必要がある。このタンパク合成に必要な道具は、種子の胚芽部分に通常備え付けられていると考えられる。小麦の場合、胚芽は比較的大きく、粒子状であり、胚乳（小麦粉）と分離しやすい（図1）。小麦粉をとったあとの胚芽は不要物として以前は捨てられていたが、栄養豊富なため、近年胚芽を含んだ様々な食品が流通している。小麦胚芽にもやはり発芽時に短期間



通常の胚芽



胚乳を除去した胚芽

図 1.

でタンパク合成を行うための装置（リボソームや tRNA 等）が蓄えられている。小麦胚芽より抽出した溶液に、生細胞より mRNA を抽出・調製し加えることで、その遺伝子がコードするタンパク質を合成し、確認するというような実験は、40 年ほど前から分子生物学・遺伝子工学分野では行われていた<sup>1)</sup>（図2）。しかし、合成されるタンパ

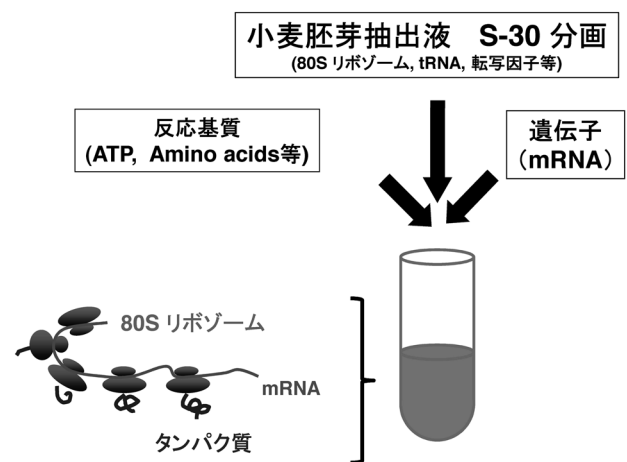


図 2. 小麦胚芽無細胞タンパク質合成系の概略

ク質の量は少なく、放射能等で標識したアミノ酸を系に添加し、タンパク質の合成をレントゲンフィルムのようなもので確認するという、極めて稚拙なものであった<sup>2)</sup>。

近年、小麦胚芽タンパク質合成系の生化学的解析がすすめられ、翻訳を阻害すると考え得る物質の存在が胚乳中にあると考えられるようになった。胚芽の周囲に付着している胚乳を徹底的に除去する(図1右)ことで、タンパク質の合成能力は飛躍的に向上した<sup>3,4)</sup>。

## 2. 無細胞タンパク質合成系の利点と欠点

無細胞タンパク質合成系の利点は、タンパク質合成が組換え体を培養せずに行えることである。よって、多種類のタンパク質を同時並行に扱えるようなロボットを作製<sup>5,6)</sup>して、タンパク質を合成しても、組み換え体が漏えいするようないリスクは皆無となる。さらに、生体内ではタンパク質合成時に様々な因子が働き、構造や機能が保たれていると考えられるが、そのような因子を個別に添加し、目的のタンパク質との関わりを調べることも可能である。また、細胞に毒性のあるタンパク質は、組換え体を用いて合成することは困難な場合が多く、無細胞タンパク質合成系でのみ合成できるといったタンパク質も存在する<sup>7,8)</sup>。

一方、無細胞タンパク質合成系のデメリットは、合成が細胞質抽出液のため分泌性のタンパク質では、分泌のシグナルペプチドはプロセスされない(N末端に読み出しメチオンが必要となり、プロセスされない可能性がある<sup>9)</sup>)。また、ジスルフィド結合も正しく形成されないことがある。更に翻訳後修飾(特に糖鎖)が正しく起こらない可能性もある。

## 3. 無細胞タンパク質合成系の種類と合成方法

現在利用されている無細胞タンパク質合成系は、原核細胞では大腸菌の溶菌液を用いたもの<sup>10)</sup>や大腸菌でのタンパク質合成に必要なコンポーネントを再構築した系<sup>11)</sup>、真核細胞ではウサギ網状赤血球抽出液、小麦胚芽抽出液、動物

細胞(CHO)抽出液、昆虫細胞(蚕)抽出液系などが開発され市販されている。

タンパク質合成反応には、アミノ酸以外にリボソームが mRNA 上を移動するためのエネルギー源も必要である。また、合成に伴う副反応物はタンパク質合成に阻害的に働くもの<sup>12)</sup>が予想される。よって、一般に細胞抽出液そのものでタンパク質合成反応を行なった場合は、1時間程度で反応が停止してしまう。タンパク質合成を持続して行うためには、アミノ酸・エネルギーを外部より供給し、反応により生じた副産物は系より取り除く必要がある<sup>13)</sup>。

この問題に対処するために現在二つの方法がとられている。重層法<sup>14)</sup>と透析法<sup>15)</sup>と呼ばれるものである(図3)。重層法は、抽出液の上にアミノ酸・エネルギーの入った緩衝液を約5倍量静かにのせ、自然拡散によりアミノ酸とエネルギーを徐々に供給するという方法である。この方法は、操作が単純なためロボットとマイクロタープレート(96ウェルや384ウェル)等により多品目のタンパク質を一度に合成できる利点がある<sup>5,6)</sup>。しかし、タンパク質合成に関わる因子(特にリボソーム)の濃度が拡散により徐々に薄まるため、タンパク質合成はこれら因子が薄まった時点で停止する。反応の継続時間は5-6時間程度である。透析法は、透析膜を利用しアミノ酸とエネルギー源を供給して、副産物を除去する方法である。タンパク質合成に関わるリボソーム等の因子は透析膜を通過しないため、細胞抽出液が薄まることはない。よって、アミノ酸とエネルギー源を十分加えれば、長時間のタンパク質合成が可能である。一般に24時間から48時間程度<sup>16)</sup>であるが、条件によっては、1週間程度合成が続くとされている。透析法の装置の概略を図4-1, 2に示す。

## 4. 無細胞タンパク質合成系に外部から供給する物質

無細胞タンパク質合成系で外部より供給されるアミノ酸は、通常コドンに対応している20種類のアミノ酸となる。水素、窒素や炭素の同位体で標識したアミノ酸もが利用可

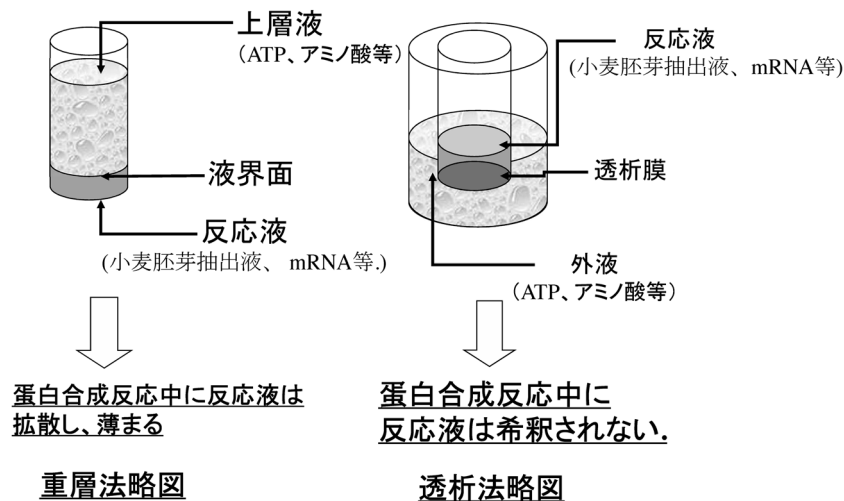


図 3.

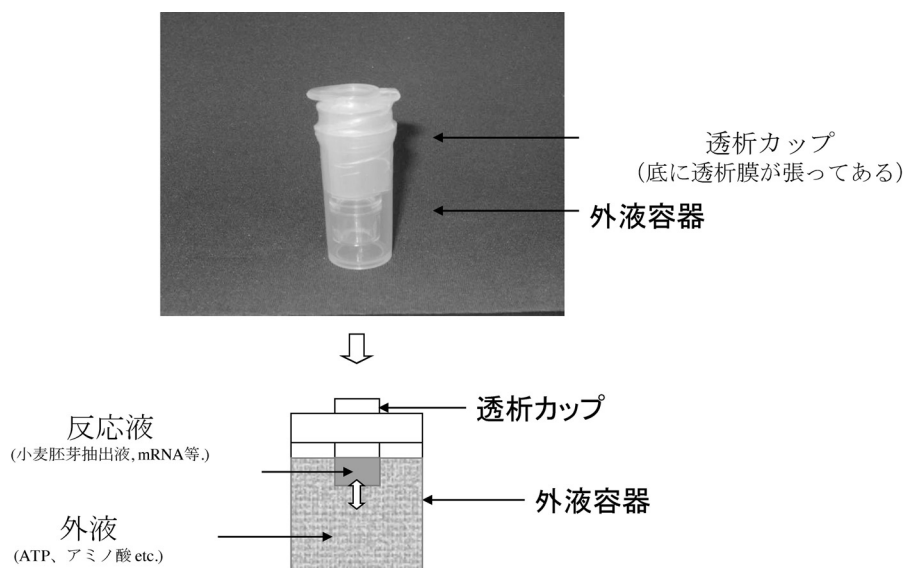


図 4-1. 小スケール (50 $\mu$ L) での小麦胚芽抽出液無細胞タンパク合成系略図

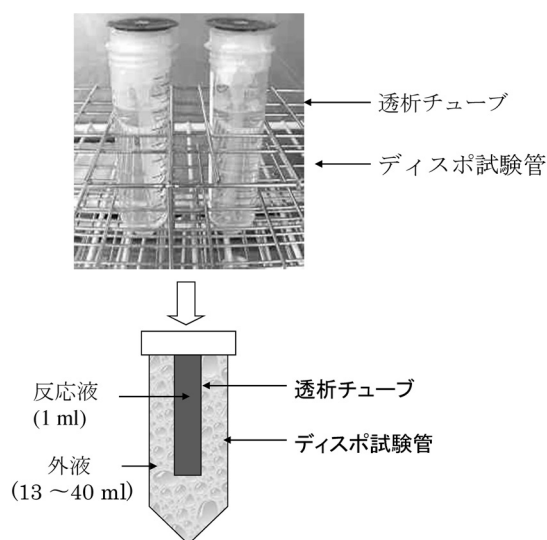


図 4-2. 大スケール (1 mL) での小麦胚芽抽出液無細胞タンパク合成系略図

能であるため、遺伝子のコードするタンパク質の特異的検出や、核磁気共鳴 (NMR)<sup>17)</sup> や結晶化による構造・機能解析には有効な手段である。ただし、細胞抽出液中にはアミノ酸合成に必要な酵素群も含まれており、アミノ酸特異的にタンパク質を標識するためには、標識をした目的のアミノ酸以外にその標識同位体が転移しないように合成・転移系の阻害剤等を入れる必要がある<sup>18)</sup>。

タンパク質合成に伴うエネルギー源としては、ATP (アデノシン三リン酸) と GTP (グアノシン三リン酸) が一般に必須である<sup>13)</sup>。ペプチド鎖の伸長は、mRNA にリボソームが結合し、コドンに対応したアミノアシル tRNA がリボソームに取り込まれ、合成されたペプチドのカルボキシ末端にコドンに対応したアミノ酸を結合させることにより進

む。その際、リボソームは mRNA 上をスライド移動していく。この移動に伴うエネルギー源としては GTP が用いられる。mRNA・リボソーム・アミノアシル tRNA 複合体にてタンパク質が合成される際に、アミノ酸 1 分子につき 2 分子あるいはそれ以上の GTP の加水分解エネルギーが必要とされている<sup>19)</sup>。この複合体の構成は原核細胞と真核細胞では多少違いがあるものの、GTP がタンパク質合成時のエネルギーとして必要なことは同様と考えられる。4.2 GTP の外部添加は必要なかった。

初期の無細胞タンパク合成系は大腸菌の溶菌液を使っており、この系では GTP をタンパク質合成時に添加する必要があった。著者ら<sup>16)</sup> は、新たに小麦無細胞タンパク質合成系にて GTP の添加至適濃度を検討したところ意外な結果が得られた。

先ずオワンクラゲの発光タンパク質 (Green Fluorescence Protein ; GFP) を小麦胚芽無細胞タンパク質合成系のレポータータンパク質として使い、添加する GTP 濃度と GFP の合成量の関係を調べた (図 5)。1 mM GTP 濃度の場合、合成された GFP の蛍光強度は 24 時間にて約 3000, 48 時間にて約 4500 であった。この蛍光強度は、添加 GTP 濃度が減少するに従い上昇する傾向にあり、GTP 無添加の場合が最も高く、24 時間にて約 4500, 48 時間で約 7200 になった (図 5B 下段)。GFP の蛍光は、pH や温度その他の条件により影響を受ける。GTP 濃度も影響する可能性があることから、実際に合成された GFP タンパク質の濃度を測定した (図 5B 上段)。合成された GFP タンパク質の濃度も蛍光強度と同様な傾向にあり、1 mM GTP の場合、GFP タンパク質濃度は 24 時間で約 1 mg/mL, 48 時間で 1.3 mg/mL であったが、添加する GTP 濃度が下がるに従い合成量は増加し、GTP 無添加の場合 24 時間で 1.5 mg/mL, 48 時間で 2 mg/mL に達していた (図 5A)。

これら結果より、小麦のタンパク質合成系では GTP が

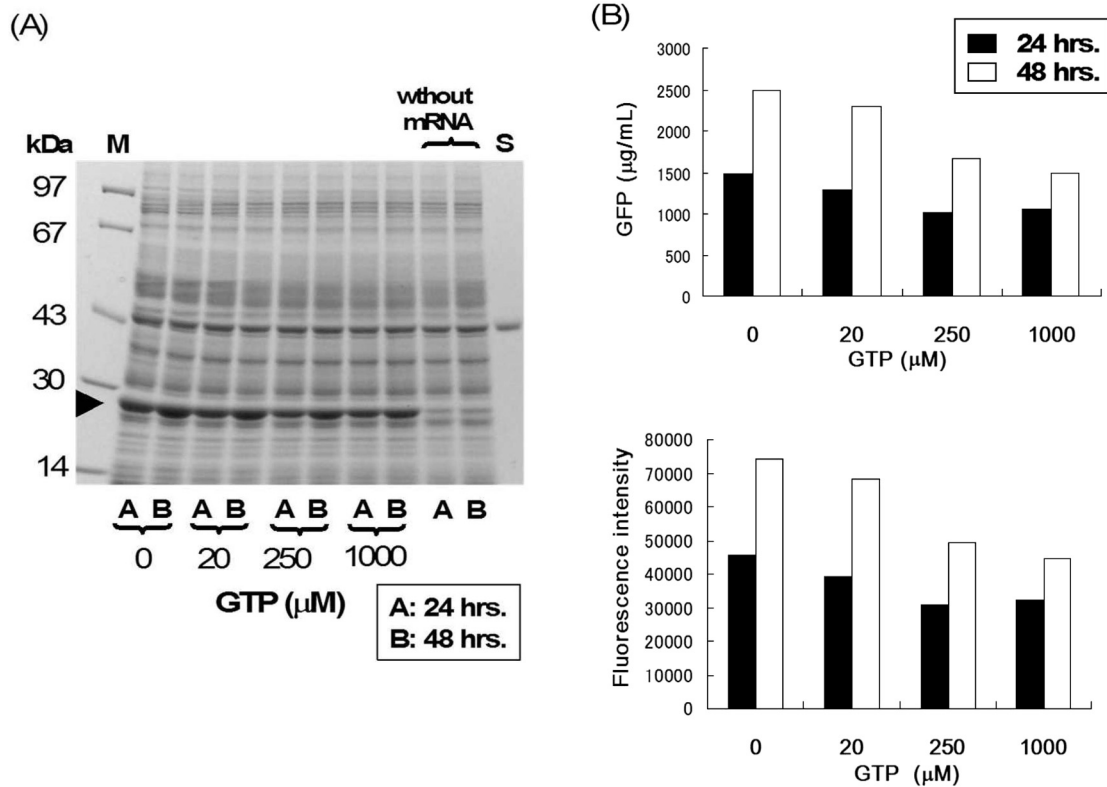


図 5. 反応液に添加する GTP の濃度と Green Fluorescent Protein (GFP) の生産性  
 (A) 反応液 1 $\mu$ L を SDS-PAGE に供し、クマジー染色したゲルの写真。▲: GFP  
 A: 合成反応 24 時間。B: 合成反応 48 時間  
 (B) GFP 生産量 (上) と蛍光強度 (下)  
 Koga et al., 2009. *Biotechnol Prog.*, **25**: 1322-1327

エネルギー源として使われていない可能性もあるが、これまでの生化学の常識としては考えにくい。GTP 無添加の状態で作成された GFP 量から計算して、約 20 マイクロモルのアミノ酸がタンパク質合成反応 1 リットル当たり反応したことになる。また、小麦胚芽抽出液を調整する段階でゲル濾過カラムを通しており、抽出液には GTP を含む低分子の物質はほとんど存在しないと考えられる。したがって、何らかの形で必要量の GTP が系に供給されているはずである。

小麦胚芽無細胞タンパク質合成系には、タンパク質合成とは別に mRNA を合成し精製して、添加する必要がある。この mRNA は、T7 や SP6 といった細菌のファージ由来の RNA 合成酵素を用い、目的遺伝子の DNA を鋳型に ATP, GTP, CTP, UTP といったリボ核酸の入った反応液にて合成される。合成後、高分子の mRNA は分子篩い (ゲル濾過) カラムにより、反応基質や合成酵素と分離され精製される。調製された GFP の mRNA に GTP が含まれている可能性は否定できないことから、合成された GFP mRNA 溶液中のリボ核酸を分析したが、GTP の存在は確認されなかった。

また、GFP に何らかの活性があり、GTP がその合成に

必要ない可能性も否定できないため、GFP 以外のタンパク質 (ヒトプロテインキナーゼホスファターゼ 1B) を用い、同様な実験を行なった (図 6)。結果は GFP の場合と同様で、1 mM GTP 添加の場合 24 時間、48 時間ともに 2 mg/mL の生産が確認され、無添加の場合 24 時間で 2.5 mg/mL、48 時間で 3.5 mg/mL の合成が確認された。これらの結果より、GFP タンパク質に特異的に GTP 無添加の状態が最も合成量が高くなるわけではないことが判明した。

そこで、抽出液と mRNA を入れない反応液 (抽出液に ATP, 20 種のアミノ酸等を加え、26°C 10 分放置したもの) の GMP, GDP, GTP の分析を行なった (図 7)。抽出液は生成過程でゲル濾過カラムを通していているものの、極微量の GMP, GDP が抽出液では検出された。しかし、GTP は検出されなかった。一方、反応液では、GDP が検出されず、GTP が検出された (図 7 (C))。GTP のピークの大きさから、反応液に検出された GTP の濃度は約 35  $\mu$ M と計算された (表 1)。これは、小麦胚芽抽出液では何らかの経路で GTP が合成されたことを示唆している。小麦胚芽抽出液中に存在する mRNA を解析した結果、抽出液にはヌクレオチド二リン酸キナーゼの存在が示唆され、この酵素

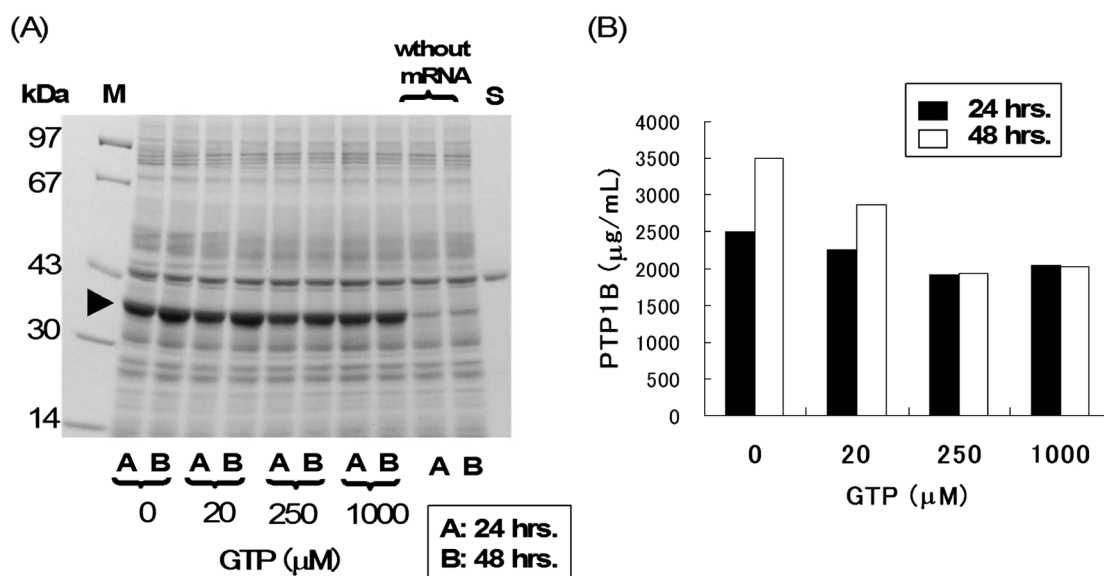
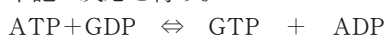


図 6. 反応液に添加する GTP の濃度とヒト protein tyrosine-phosphatase 1B (PTP1B) の生産性  
 (A) 反応液 1 μL を SDS-PAGE に供し、クマジー染色したゲルの写真。▲: PTP1B  
 A: 合成反応 24 時間。B: 合成反応 48 時間  
 (B) PTP1B 生産量  
 Koga et al., 2009. *Biotechnol Prog.*, 25 : 1322-1327

は下記の反応を行う。



また、この反応の  $K_{eq}$  は 1 である。よって、小麦胚芽抽出液系ではタンパク質合成に必要な GTP が系に添加された大過剰の ATP と微量に存在する GDP から合成されている可能性がある。図 7 (C) で検出された GTP 量は、先に示した量のアミノ酸を結合し GFP を合成するには少し少ないが、GDP から GTP が再生すると考えると、合成反応が充分に行い得ると考えられる。

いずれにしても、小麦胚芽抽出液を利用した場合には、GTP を系に添加しないでタンパク質合成反応を行なった方が効率は良いと言える。これは、他の無細胞タンパク質合成系では確認されていない現象である。また、無細胞タンパク質合成系に関する特許の多くは反応液に少なくとも ATP, GTP, アミノ酸を加えてタンパク質を合成することが明記されており、既存の特許の多くを回避しタンパク質合成を小麦胚芽抽出液にて行える発見となった。

## 5. 小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた応用技術

前述のように、無細胞タンパク質合成系は組換え体によるタンパク質合成ではないため、特別な設備を必要としないで簡単にタンパク質が合成できる一方、大量のタンパク質を調整する方法としては適切でない。この小麦胚芽抽出液タンパク質合成系の特徴を生かし、低分子抗体を取得し、組換え大腸菌にて大量生産した例を紹介する。

### 5.1 抗体分子について

抗体は、抗原に結合する能力の他、様々な機能がある。

最も代表的な機能は ADCC (抗体依存性細胞傷害) や CDC (補体依存性細胞傷害) 活性である。1970 年代に開発されたハイブリドーマによるモノクローナル抗体作製法<sup>20-22)</sup>により、それまで集団 (ポリクローナル) でしか扱うことができなかった抗体が、個々の抗体分子として扱えるようになった。図 8 にヒトの血液中に最も多く存在する IgG1 抗体の模式図を示す。IgG1 の場合、2 本の軽鎖 (L 鎖) と 2 本の重鎖 (H 鎖) がジスルフィド結合で結合したヘテロ 4 量体となっている。分子量は約 150 kDa である。可変領域 (V 領域) のアミノ酸が変化することで、多様な抗原に結合することができるようになる。定常領域 (C 領域) は抗体の種類により一定の配列となっており、ヒト IgG1 の場合 CH1-3 の 3 ドメインに分けられる。CH1 と CH2 ドメインの間にはヒンジ領域があり、抗原と抗体の結合に柔軟性を与えている。この H 鎖定常領域のヒンジ領域を含みそのカルボキシ末端側までを Fc と呼ぶ。Fc は上述の ADCC や CDC 活性に関わる領域となっている。

IgG1 をタンパク質分解酵素のパパインで切断すると、Fc と結合部分が 1 価の断片 Fab が分離される。また、ペプシンで切断すると結合部分が 2 価の断片 F (ab')<sub>2</sub> が分離される (Fc 部分は分解されバラバラになる)。Fab 及び F (ab')<sub>2</sub> 断片は抗原への結合能力は元の抗体と同様であり、古くから低分子抗体として調製されていた。更に、抗体によってはトリプシンで限定分解すると L 鎖と H 鎖が会合したまま V 領域のみが分離されることがある。これを Fv と呼ぶ。Fv 断片の抗原への結合は元の抗体と同様であるが、L 鎖 (VL) と H 鎖 (VH) はタンパク質間の相互作用で会合しているだけのため、ちょっとした刺激で分離してし

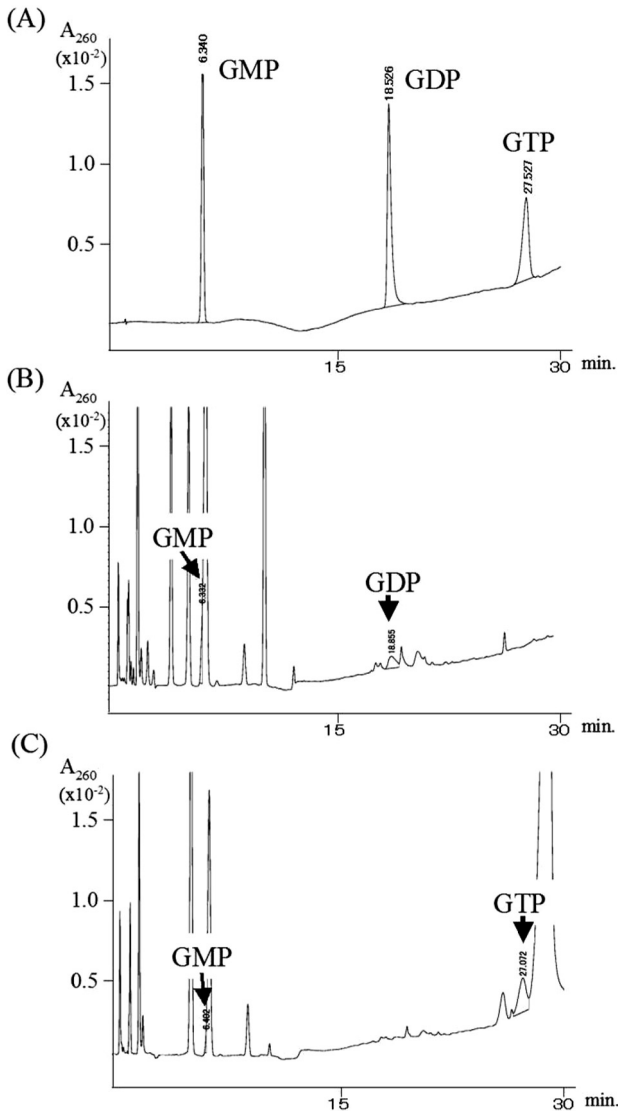


図 7. 抽出液, 反応液中の GMP, GDP, GMP  
(A) 標準品のパターン, (B) 抽出液のパターン,  
(C) mRNA 入れずに調製した反応液; 室温 10 分後  
のパターン

Koga et al., 2009. *Biotechnol Prog.*, **25**: 1322-1327

まうという難点がある。

### 5.2 タンパク質ディスプレイについて

1980 年代に入り遺伝子工学の進展にともない, VL と VH をペプチドリンカーでつないだ一本鎖抗体 (scFv) が開発された<sup>23)</sup>。これは, VL と VH のコーディング領域 (遺伝子) の間に 15 アミノ酸程度長さのペプチドを読み取りフレームがずれないように導入し, 一つのタンパク質として VL, VH を生産する画期的なものであった。scFv は様々な生物の表面にディスプレイできることから, タンパク質ディスプレイ技術を用いた抗体遺伝子の取得が盛んに行われるようになった<sup>24)</sup>。

生細胞を使用したタンパク質ディスプレイには, フェージディスプレイ<sup>25,26)</sup>, 大腸菌ディスプレイ<sup>26)</sup>, 酵母ディスプレイ<sup>27)</sup> などの様々な方法がある。いずれも細胞の外側に出ているタンパク質に目的タンパク質を融合した形でディスプレイさせ, 所望の活性のあるタンパク質がディスプレイされている個体を分離し, その個体から所望タンパク質の遺伝子を回収することによりクローニングするという方法である。

ディスプレイできるタンパク質のライブラリーサイズは, 形質転換効率に依存する。実際に作製可能なライブラリーサイズは, 大腸菌で  $10^{8-9}$  であり, それを宿主とするフェージでも同じサイズとなる。酵母やほかの系では  $10^5$  程度となる。

動物細胞から遺伝子をクローニングする場合, 使用する細胞数は  $10^{5-6}$  程度である。仮に抗体を産生する B 細胞を  $10^5$  個使用したとすると, 抗体は L 鎖と H 鎖があるため, scFv でディスプレイ法によりスクリーニングした場合,  $10^{10}$  以上のライブラリーサイズがないと抗体の遺伝子は網羅できないことになる。よって, 生細胞にタンパク質をディスプレイした場合, 抗体に関しては十分なスクリーニングは行い難い。

### 5.3 無細胞タンパク質合成系を利用したタンパク質ディスプレイ法

タンパク質は mRNA 上の遺伝子配列がリボソームにより翻訳されることで合成される。原核生物では, リボソームはリボソームに含まれる RNA (ribosomal RNA) と相

表 1. 抽出液及び反応液中の GTP, GDP, GMP の濃度

	GTP	GDP	GMP ( $\mu\text{M}$ )
小麦胚芽抽出液	<1	18	19
翻訳反応液*	35	<1	1

\*mRNA 入れずに調製した反応液を 10 分後に分析

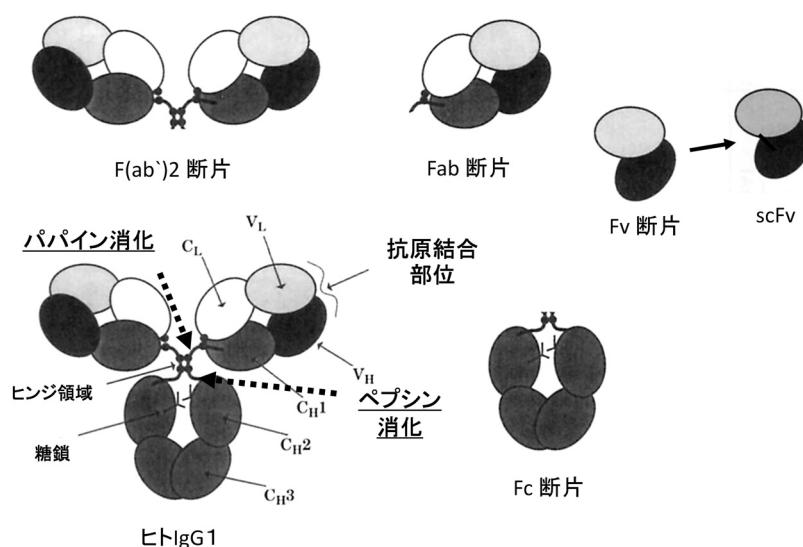


図 8. 抗体と低分子化抗体名称

補的な配列を認識し mRNA に結合し、その 3' 側にあるメチオニンコドン（読み出しメチオニン）からタンパク質合成を開始する。開始効率は、リボソームの結合する場所から読み出しメチオニンまでの距離と近傍の塩基配列により変化することが知られている<sup>28)</sup>。真核生物では、リボソームは mRNA の 5' Cap 構造を認識し mRNA に結合した後、3' 側にスライドし、最初に出会ったメチオニン（読み出しメチオニン）コドンから翻訳が通常開始される。近年、ウィルスの研究から真核生物においても 5' Cap 構造非依存的に、mRNA の途中でもリボソームが結合しタンパク質合成が開始できる配列（Internal Ribosome Entry Sequence ; IRES）が報告された<sup>29)</sup>。この場合は、IRES の 3' 側の最初のメチオニンコドンからタンパク質合成が始まる。原核生物、真核生物ともに、翻訳はストップコドンで停止し、それぞれのストップコドン（アンバー、オーカー、オパール）に対応したリリースング因子（releasing factor ; RF）がリボソームに取り込まれ、生成したタンパク質はリボソームより外れる。

ストップコドンの手前で遺伝子が終わるような mRNA を調製して無細胞タンパク質合成系に加えると、タンパク質合成は最後のアミノ酸まで行われ、ストップコドンがないため RF はリボソームに取り込まれず、生成したタンパク質はリボソームから乖離できない状態になる。更に、リボソームは mRNA と結合した状態であるため、合成されたタンパク質はリボソームを介してそれをコードする mRNA に結合した状態になっている。これは mRNA 上の遺伝子がリボソームを介してタンパク質としてディスプレイされたもので、このようなタンパク質ディスプレイ法をリボソームディスプレイ<sup>30)</sup>と呼ぶ。この方法では、系に存在するリボソームの数がディスプレイライブラリーのサイズの限界となる。通常  $10^{10}$  程度のサイズのライブラリーが作製可能である。しかし、mRNA・リボソーム・タンパ

ク質の会合体は、熱や pH、塩濃度等により容易に乖離するため、ディスプレイライブラリーのスクリーニング条件が限られるという難点がある。リボソームディスプレイのこのような問題点を克服するため、ピューロマイシンを用いた mRNA ディスプレイ技術が開発された。

#### 5.4 mRNA ディスプレイ

ピューロマイシンは tRNA と類似な構造の化合物で、タンパク質合成阻害による抗生剤として使われている。作用機序は、アミノアシル tRNA と競合してリボソームに取り込まれ、合成されつつあるポリペプチドの C 末端に共有結合し、正常なタンパク質合成が阻害されるというものである。リボソームディスプレイの場合と同様に mRNA 上の遺伝子からストップコドンを取り除き、その 3' 末端にケミカルリンカーを介してピューロマイシンの結合した mRNA を調製する。これを無細胞タンパク質合成系にて翻訳する。タンパク質合成反応は遺伝子の最後のコドンまで進み、リボソームディスプレイの場合と同様にリボソームはそこで停止する。このリボソームの近傍には mRNA の 3' 端にリンカーを介して結合されたピューロマイシンの分子があり、停止したリボソームにピューロマイシンは取り込まれ、合成されたタンパク質の C 末端に共有結合する。つまり、合成されたタンパク質は C 末端にてピューロマイシンを介してそれをコードする mRNA に共有結合で連結される。キレート剤にて反応液より 2 価のイオン ( $Mg^{2+}$ ) を除くことにより、mRNA・リボソーム・タンパク質の複合体からリボソームは乖離し、mRNA とタンパク質が共有結合した分子が得られる。このようなタンパク質のディスプレイ法を mRNA ディスプレイと言う<sup>31,32)</sup>。生成した mRNA・タンパク質複合体は共有結合しているため、リボソームディスプレイ法で形成された複合体よりも安定で、スクリーニング条件のより幅広い設定が可能となる。ライブラリーサイズは、系に導入した mRNA の分

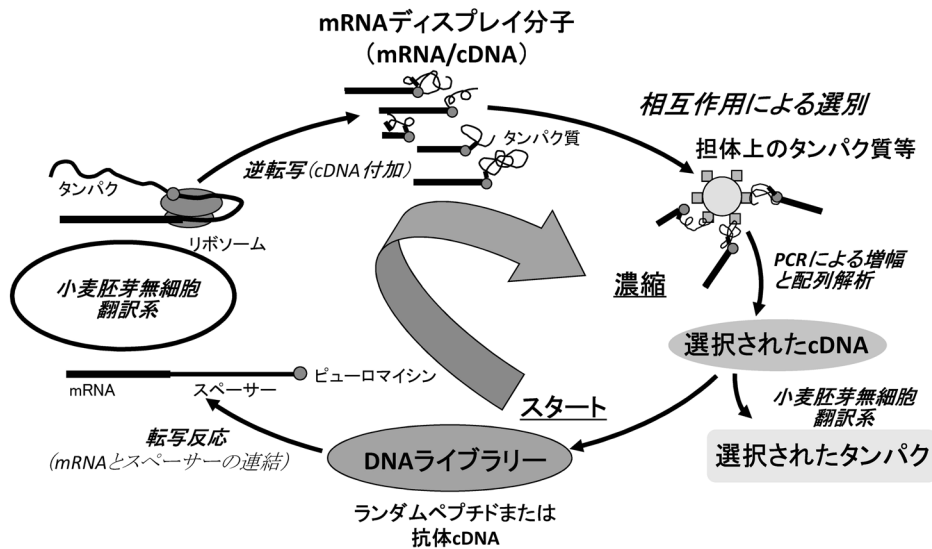


図 9. mRNA ディスプレイスクリーニング概略

子数が限界となる。通常系に加える mRNA の分子数は、約  $10^{12-13}$  であり、mRNA タンパク質複合体の形成効率、10% 程度であることから、 $10^{11-12}$  の多様性を持ったタンパク質ディスプレイライブラリーの作製は可能である<sup>33)</sup>。mRNA ディスプレイライブラリーのスクリーニング法略図を図 9 に示す。

### 5.5 抗体遺伝子のクローニング

小麦胚芽抽出液無細胞タンパク質合成系にて、mRNA ディスプレイ法を用い低分子抗体 scFv ライブラリーを作製、*in vitro* スクリーニングし、同系により *in vitro* 合成を行いさらに組換え大腸菌にて大量生産した例について、ここでは紹介する。

#### 5.5.1 抗体遺伝子ライブラリーの作製

まずヒト抗体の遺伝子であるが、古くはヒトリンパ球から遺伝子クローニングにより取得し抗体ライブラリーとして用いていた。しかし、ヒト試料を扱う潜在的危険性と倫理的問題より、ヒト試料を用いることなく、遺伝子情報と工学的手法により化学合成した DNA から小麦胚芽無細胞タンパク質合成系にて mRNA ディスプレイが実施できるようなライブラリーを設計、作製した。作製の概略を図 10 に示す。

抗体可変領域には、抗体の種類により配列がほぼ一定の部分 (フレームワーク ; FR) と結合特異性に伴い変化する超可変領域 (CDR) がある。これまでの抗体工学の研究から、安定な抗体とやや不安定な (失活等し易い) 抗体のフレームワークの種類が分かっており<sup>34)</sup>、フレームワークとして安定性の高いとされる H 鎖 3 種類 (H2, H3, H6), L 鎖 5 種類 ( $\kappa 1, \kappa 2, \kappa 4, \lambda 2, \lambda 3$ ) を選んだ。また、CDR 部分はアミノ酸配列をヒト抗体のデータに基づき変化させた。設計したライブラリーの多様性 (理論値) は、H 鎖、L 鎖ともに  $10^{23}$  を超えるものであり、mRNA ディスプレイのディスプレイできる多様性をはるかに超えるものと

なった。

実際に作製したライブラリーの H 鎖及び L 鎖のフレームワークの組み合わせを調べてみたところ、全ての組み合わせが一様にディスプレイされているわけではなく、H3 $\kappa$ 1 の組み合わせが多くなっていた (表 2)。これは、フレームワークの組み合わせ及びアミノ酸配列により、立体構造等がうまく取れない分子はディスプレイ分子として存在できなかったためと考えられる。いずれにしても現在のタンパク質ディスプレイ技術では、mRNA ディスプレイによる  $10^{12}$  分子の多様性を保持したディスプレイが限界であり、今回設計したライブラリーの多様性を充分発揮させることはできていない。

#### 5.5.2 抗ヒト抗原ヒト抗体の取得

ヒト RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B) を抗原とし、作製したライブラリーを用い図 9 に示すような工程のスクリーニングを 6 サイクル行なった。ライブラリーは RANK 特異的に濃縮されていた (図 11)。mRNA ディスプレイ分子は、mRNA 部分が分子量的に 95% 以上を占めるため、RNA 部分の親水性により可溶性率が高いと一般に考えられる。実際のタンパク質部分 (scFv) を小麦胚芽抽出液無細胞タンパク質合成系にて合成し、可溶性の度合いを調べた。一部は不溶性になるものの、大部分は可用性であった (図 12)。

小麦胚芽抽出液無細胞タンパク質合成系でのタンパク質調製では、10 mL 程度のスケールの合成が限界であり、数 mg 程度のタンパク質しか調製できない。よって、グラム単位の試料を作製するにはやはり組換え体を用いるほかない。市販の大腸菌宿主ベクター系にて取得遺伝子を発現させたところ、フラスコ培養で 50-100 mg/L の生産が見られた。生産物は全て不溶化していたが、容易に巻き戻すことができ (図 13)、小麦胚芽系にて生産したものと同等の活性を示した (図 14)。



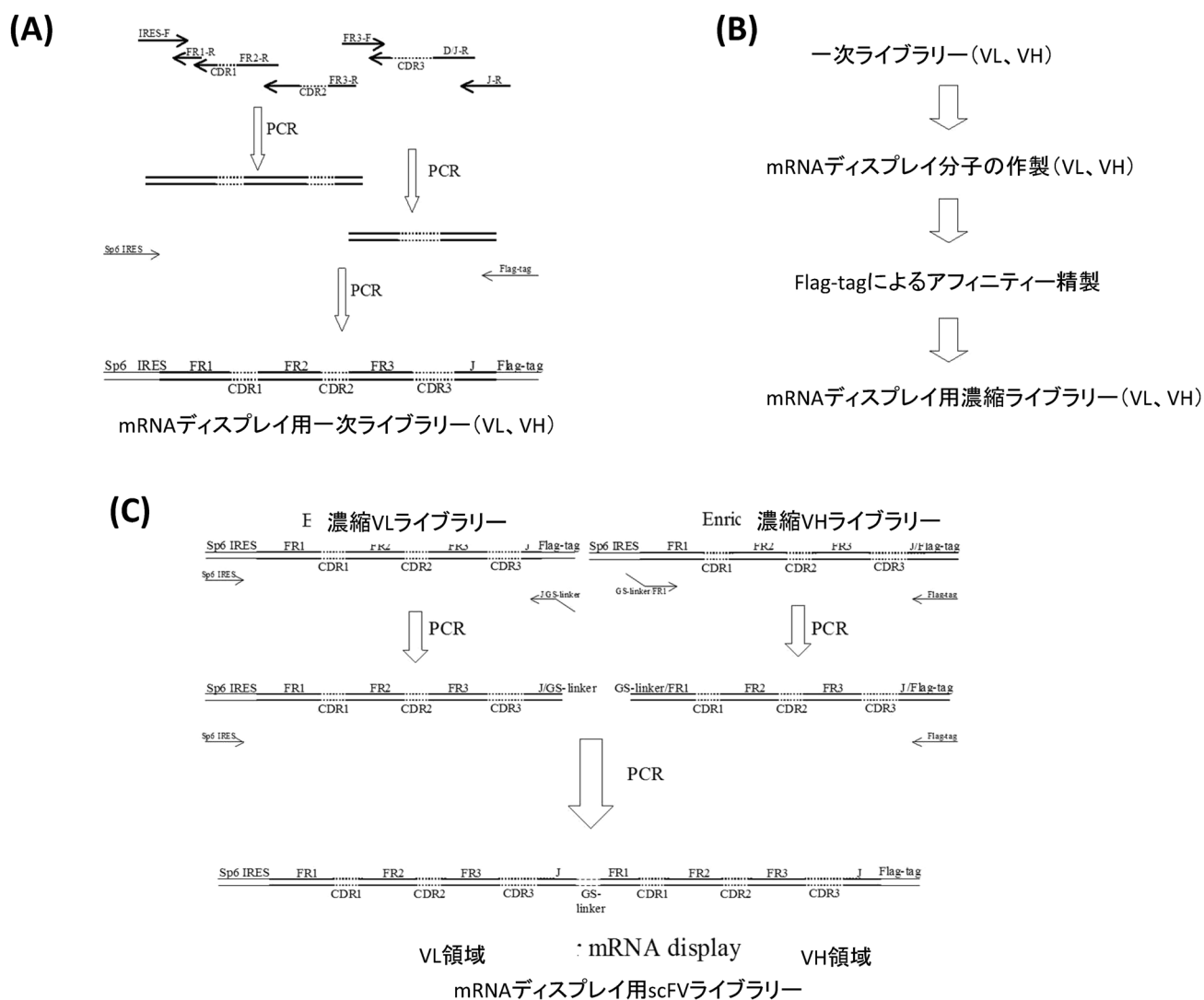


図 10. mRNA ディスプレイ用抗体 scFv ライブラリー構築の略図  
 Sp6 ; Sp6 プロモーター, FR ; 抗体フレームワーク, CDR ; 抗体超可変領域  
 Shibui et al., 2009. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **84** : 725-7320

表 2. 作製した mRNA ディスプレイ用 scFv ライブラリーの抗体フレームワーク

	K1	K2	K4	$\lambda_2$	$\lambda_3$	計	%
H2	1	0	1	2	1	5	4
H3	76	6	6	22	9	119	90
H6	1	1	1	5	0	8	6
計	78	7	8	29	10	132	
%	59	5	6	22	8		

作製した scFv ライブラリーからランダムに抽出した 132 クローンにつき、L鎖フレームワーク ( $\kappa 1, 2, 4, \lambda 2, 3$ ) と H鎖フレームワーク (H23, 6) の組み合わせを解析した。数字はクローン数と出現率 (%)

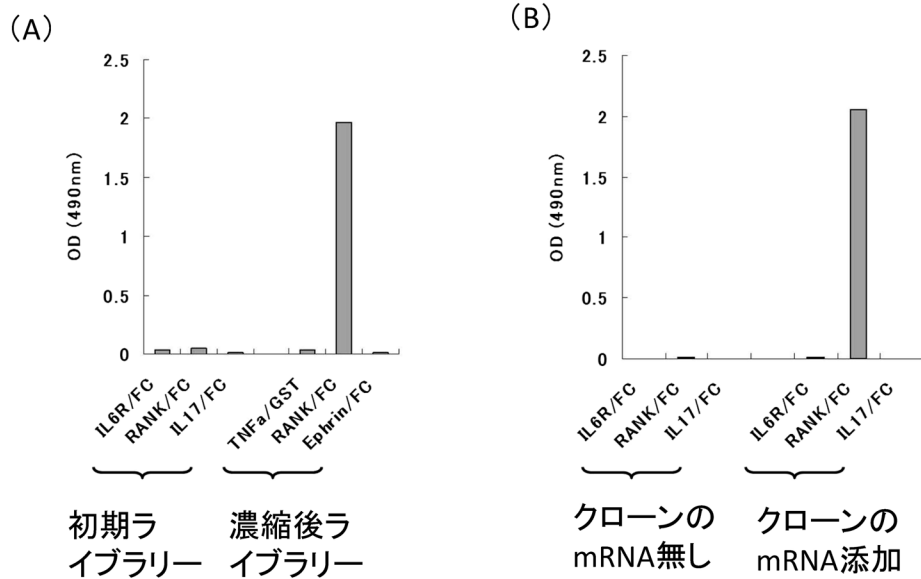


図 11. RANK に対し濃縮されたライブラリーとそのクローン #10 の反応性  
 IL6R/Fc ; IL6 受容体 Fc 融合タンパク質。  
 RANK/Fc ; RANKFc 融合タンパク質。  
 TNF $\alpha$ /GST ; TNF $\alpha$ Fc 融合タンパク質。IL17R/Fc ; IL17 受容体 Fc 融  
 合タンパク質。  
 Ephrin/Fc ; EphrinFc 融合タンパク質。  
 (A) 初期ライブラリーと濃縮後のライブラリー  
 (B) 分離クローンの反応性 (小麦胚芽抽出液無細胞タンパク質合成系  
 により合成)  
 クローンの mRNA 添加 (右) 無添加 (左)  
 Shibui et al., 2009. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **84** : 725-7320

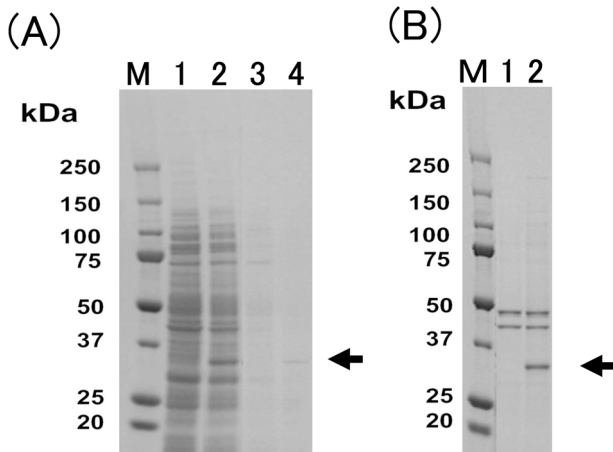


図 12. 単離した抗ヒト RANKscFv の小麦胚芽抽出液タンパク合成系 (50 $\mu$ L) による合成  
 (A) 反応液 1 $\mu$ L を SDS-PAGE により解析した。1 ; mRNA 無し (上清画分), 2 ; scFvmRNA 有り (上清画分), 3 ; mRNA 無し (沈殿画分), 4 ; scFvmRNA 有り (沈殿画分)  
 (B) 合成した scFv をアフィニティーカラムにて精製したもの  
 1 ; mRNA 無し (上清画分), 2 ; scFvmRNA 有り (上清画分)。  
 上方 2 本のバンドは、小麦胚芽由来の不純物  
 矢印 : scFv  
 Shibui et al., 2009. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **84** : 725-7320

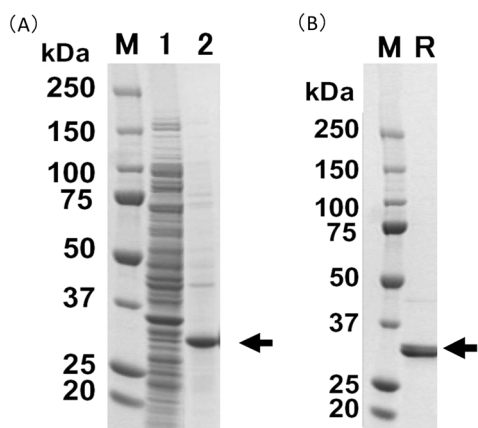


図 13. 単離した抗ヒト RANKscFv の大腸菌による合成  
 (A) 菌体 (1  $\mu$ L 培養相当) を SDS-PAGE により解析した。1; 破碎液上清画分, 2; 破碎沈殿画分  
 (B) R; 沈殿画分の scFv をリフォールドし, アフィニティーカラムにて精製したもの  
 矢印: scFv  
 Shibui et al., 2009. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 84 : 725-7320

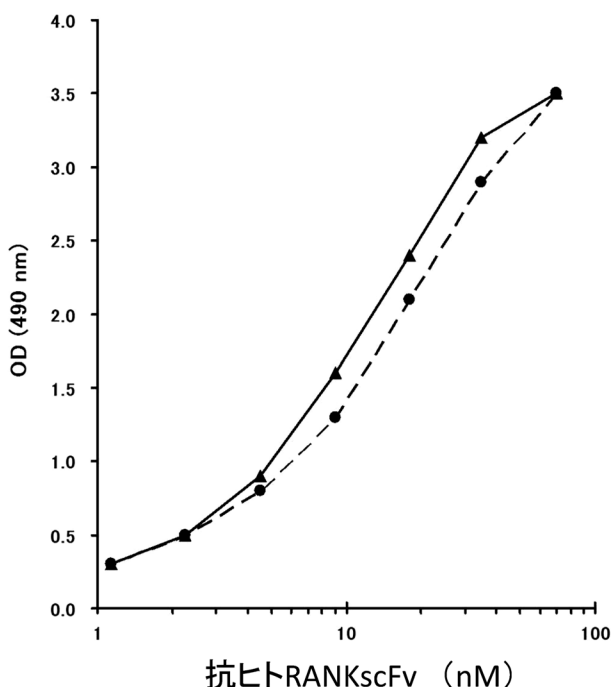


図 14. 合成した抗ヒト RANKscFv の抗原結合性  
 ●: 小麦胚芽抽出液無細胞タンパク質合成系にて合成したもの  
 ▲: 大腸菌にて合成しリホールドしたもの  
 Shibui et al., 2009. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 84 : 725-7320

これらの結果より, ヒトの試料を使用することなく化学合成したヒト抗体遺伝子より mRNA ディスプレイ法を用い, ヒト抗原に対するヒト抗体及びその遺伝子を取得し, 小規模では, 無細胞合成系にて, 大規模では組換え大腸菌にてサンプルを調製できることが示された。

更に, 無細胞タンパク質合成系では, 遺伝子に容易に変異を導入し, スクリーニングが可能のため, 取得した抗体の親和性や安定性等の向上も可能である。

#### 5.6. 小麦胚芽無細胞タンパク質合成系を用いた mRNA ディスプレイ法によるペプチドワクチンの開発

##### 5.6.1 ミモトープ

抗体が認識・結合する抗原上の場所をエピトープと呼ぶ。抗体は, 抗原がタンパク質の場合アミノ酸一次配列を認識して結合することもあるが, 多くの場合立体構造 (表面構造) を認識して結合する。ランダムペプチドライブラリーを用いて, 抗体のエピトープ探索を行うと抗原のアミノ酸配列とは全く違った配列のペプチドが取れる場合がある。特に立体構造を認識する抗体では, 取得された抗体結合ペプチドのアミノ酸配列は抗原のアミノ酸配列のどこにも一致しないことが多い。このようなペプチドはエピトープをミミックするものとして, ミモトープペプチドと呼ばれる<sup>35)</sup>。ミモトープペプチドは, 抗原がアミノ酸以外のもの, 例えば糖鎖やハプテント等を認識する抗体についても取得される場合があり, ペプチドが糖鎖やハプテント等の抗体結合部位を模倣できる点は大変興味深い。また, ミモトープペプチドを免疫すると元の抗体の抗原に反応する抗体が生体に惹起される場合があり (概念図を図 15 に示す), ペプチドワクチンとして使用できる可能性が示唆されている。

##### 5.6.2 抗体医薬の代替

がん及び自己免疫疾患等の重篤な疾患では, 治療に抗体医薬が使用され, 成果を上げてきている。抗体医薬の問題点は費用である。1クールの投与で平均 70 万円程度かかる。多くの場合年間 2-3 クール投与され, 医療費も莫大なものとなる。この高額な費用の最も大きな原因は生産コストである。現在, 抗体医薬は動物細胞を用いて遺伝子工学的に生産されている。生産細胞の改良及び培養法, 培地の改善がなされ, 生産コストは年々下がっているが, 医薬品として製造法を一旦確立して申請してしまうとその後の変更は難しく, 抗体医薬の薬価は当面高い状態が続くと考えられる。

もし仮に, ミモトープペプチドを用い, これら抗体医薬と同等の抗体が生体に惹起できるとすると医療費の大幅な削減につながる可能性がある。ここでは, 小麦胚芽抽出液無細胞タンパク質合成系を用い, mRNA ディスプレイによりランダムペプチドディスプレイライブラリーを作製し, アバスタチン (Bevacizumab, 抗ヒト VEGF 抗体; 大腸がん治療) 及びアービタックス (Cetuximab, 抗ヒト EGF 受容体抗体; 大腸がん治療) に対するミモトープペプチドを取得した結果とそのワクチンとしての応用の可能性につ

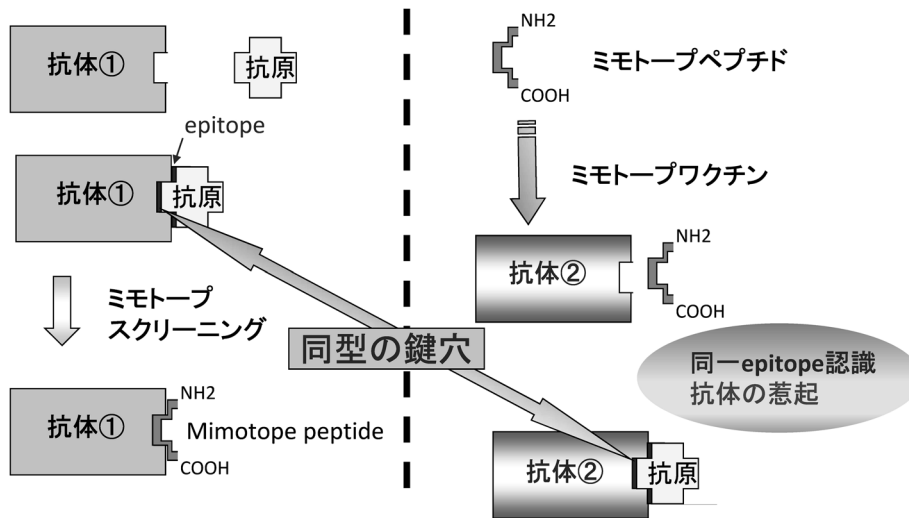


図 15. ミモトープペプチド及びそのワクチンのイメージ  
抗体①と類似の結合能力をもった抗体②が惹起される

いて解説する。

### 5. 6. 3 mRNA ディスプレイランダムペプチドライブラリー

抗体のエピトープ結合部位（パラトープ）にはまりこむペプチドの長さは、通常 6-10 アミノ酸である。これに対応できるようにランダムにアミノ酸変異を導入した直鎖状及び環状の 10 及び 20 アミノ酸からなる以下のようなランダムペプチドライブラリーを作製した。

RL10aPL (直鎖状 10 アミノ酸)；

MGXXXXXXXXXXGGSGGDYKDDDDKGGSSSGRGAAG

RL20aPL (直鎖状 20 アミノ酸)；

MGXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXGGSGGDYKDDDDKGGSSSGRGAAG

RC10aPL (環状 10 アミノ酸)；

MGCXXXXXXXXXXCGSGGDYKDDDDKGGSSSGRGAAG

RC20aPL (環状 20 アミノ酸)；

MGCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCGSGGDYKDDDDKGGSSSGRGAAG

X はランダムアミノ酸の部分。それ以外のアミノ酸配列は小麦胚芽無細胞系にて mRNA ディスプレイを行うのに必要なアミノ酸配列。

Cetuximab には上記 4 種のライブラリーを、Bevacizumab には上記 2 種の直鎖状ライブラリーを用いてスクリーニングを行なった。

ディスプレイ法によるペプチドライブラリーはファージによるものが市販されている。前述のように、ライブラリーサイズは最大で 109 程度である。mRNA ディスプレイでは 1012 のサイズのペプチドライブラリーをディスプレイできることから、抗体のパラトープに対しファージディスプレイでは取得できないような親和性の高いペプチ

ドが取得できる可能性がある。

### 5. 6. 3 ミモトープペプチドの取得とワクチンとしての利用

Cetuximab, Bevacizumab それぞれに対して、ライブラリーをスクリーニングした。濃縮された mRNA ディスプレイ分子を約 200 分子ずつ遺伝子クローニングしてその配列を調べた。その結果、表 3 および 4 に示すような配列のミモトープペプチド (Cetuximab に対し 4 本, Bevacizumab に対し 3 本) が取得された。

これら取得されたペプチドは化学合成後、KLH (key-hole limpet hemocyanin) に連結した。これをウサギに免疫し、それぞれのミモトープの結合する抗体のオリジナル抗原に反応する抗体が惹起されるかを調べた。

図 16 および 17 に示すように、Cetuximab から取得されたミモトープペプチドからは EGF 受容体に特異的に結合する抗体が、Bevacizumab から取得されたミモトープペプチドからは、VEGF に特異的に結合する抗体が、免疫したウサギで惹起されていた。

これらの結果より、小麦胚芽抽出液無細胞タンパク合成系により作製した mRNA ディスプレイランダムペプチドライブラリーから、ペプチドワクチンとして抗体医薬の代替となりうるミモトープペプチドの取得が確認された。

今後、ヒトへのワクチン応用としては、元の抗原に対する抗体を惹起するのに必要最小限のペプチド配列の特定と抗原提示細胞へいかに効率よくミモトープペプチドを取り込ませるかが課題となる。また、投与形態として通常の皮下注射の他、鼻腔粘膜や腸管からの免疫方法も考えられる。特に腸管免疫では、IgG に比べ細胞傷害活性が高いとされる IgE 抗体の惹起が報告されており<sup>36)</sup>、実現されれば現在の抗体医薬 (組換え IgG) に比べ効果の高い抗体が体内に作られることになる。よって、胃での消化を回避した形で投与形態 (食品に添加する等) の検討が、今後のミ

表 3. Cetuximab に対し単離されたミモトープ

クローン名	アミノ酸配列	出現頻度(%)
M076_A08	CADMKRHIRHWSMGTRRIVVTC	4
M076_F04	MEGCLRTWSLFDRLKCMVG	3
M077_A02	CYDVNGVWIRLRNPHTAGIRFC	80
M077_D03	CLFSLSTRRLDC	3

Shibui et al., 2011. *Int J Pept Res Ther.*,17:69-74

表 4. Bevacizumab に対し単離されたミモトープ

クローン名	アミノ酸配列	出現頻度(%)
M074_D12	WLEMHWPAHS	68
M074_F02	KLEMHFPSHVISVADGWSLF	5
M075_A10	RDLRHCESSWHKLVDYFCYT	27

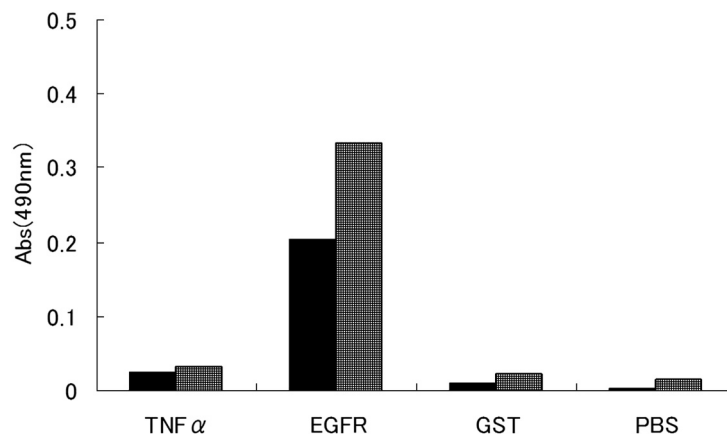
Kobayashi et al., 2011. *Advances in Biosciences and Biotechnology.*,2:96-101

図 16. Cetuximab に対し単離されたミモトープを免疫したウサギに惹起された抗体の抗原との反応性

■ M76\_F04 と M77\_D03 を免疫したウサギ血清

▨ M77\_A02 を免疫したウサギ血清

Shibui et al., 2011. *Int J Pept Res Ther.*, 17 : 69-74

モトープワクチン利用の鍵となる可能性が高く、機能性食品（経口医薬品）の今後の有力な候補のひとつと考えられる。

また、一昨年発生した新型インフルエンザウィルスや H5 N1 型インフルエンザウィルスについては、幅広い型のウィルスを中和できるマウスモノクローナル抗体が報告されている。このようなモノクローナル抗体に対するミモトープを取得し、経口ミモトープワクチンを作製すれば、毎年発生するウィルス型を予想し予防注射を行う必要はなくなり、医療経済的にも大きく貢献できることが期待される。

## 6. ま と め

小麦胚芽抽出液無細胞タンパク質合成系に用いる胚芽を選択精製することにより、タンパク質合成能力は近年著しく向上し、反応液 1 mL 当たり数 mg のタンパク質が合成できるようになった。これに伴い、小麦胚芽抽出液無細胞タンパク質合成系を用いたタンパク質の機能解析、構造解析、改変が容易に行われるようになってきており、これらの分野での今後さらなる応用が期待される。

また、同系を用いた mRNA ディスプレイ法には、 $10^{12}$

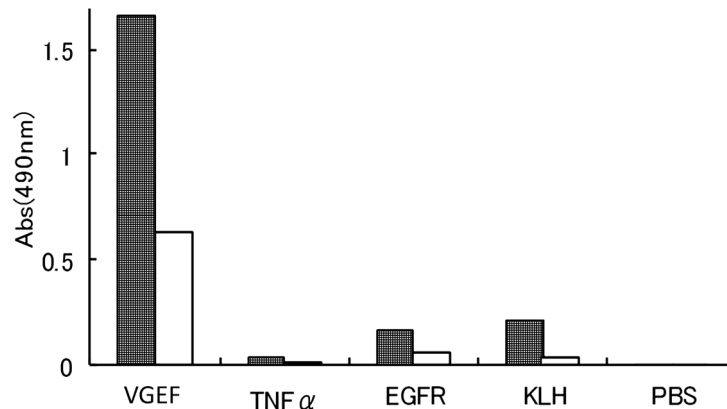


図 17. Bevacizumab に対し単離されたミモトープ M74\_D12 を免疫したウサギに惹起された抗体の抗原反応性  
ペプチドカラムにて精製した抗体 1/10 希釈 (■), 1/50 (□)  
Kobayashi et al., 2011. *Advances in Biosciences and Biotechnology.*, **2** : 96-101

以上の多様性を持った大きなサイズのライブラリー作製が可能であり、抗体分子のクローニングからペプチドワクチンのスクリーニングまで幅広く応用され、優れた医薬品・機能性食品などの開発につながる可能性が示されている。

#### 引用文献

- MARCUS, A., EFRON, D. and WEEKS, D. P. (1974). The wheat embryo cell-free system. *Methods. Enzymol.*, **30**, 749-54.
- KURZCHALIA, T.V., WIEDMANN, M., BRETER, H., ZIMMERMANN, W., BAUSCHKE, E. and RAPOPORT, T.A. (1988). tRNA-mediated labelling of proteins with biotin. A nonradioactive method for the detection of cell-free translation products. *Eur. J. Biochem.*, **172**, 663-8.
- ENDO, Y., OTSUZUKI, S., ITO, K. and MIURA, K. (1992). Production of an enzymatic active protein using a continuous flow cell-free translation system. *J. Biotechnol.*, **25**, 221-30.
- MADIN, K., SAWASAKI, T., OGASAWARA, T. and ENDO, Y. (2000). A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **97**, 559-64.
- SAWASAKI, T., MORISHITA, R., GOUDA, M.D. and ENDO, Y. (2007). Methods for high-throughput materialization of genetic information based on wheat germ cell-free expression system. *Methods. Mol. Biol.*, **375**, 95-106.
- SAWASAKI, T., OGASAWARA, T., MORISHITA, R. and ENDO, Y. (2002). A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **99**, 14652-7.
- HIRANO, N., OHSHIMA, H., SAKASHITA, H. and TAKAHASHI, H. (2007). The Ser176 of T4 endonuclease IV is crucial for the restricted and polarized dC-specific cleavage of single-stranded DNA implicated in restriction of dC-containing DNA in host *Escherichia coli*. *Nucleic. Acids. Res.*, **35**, 6692-700.
- HIRANO, N., OHSHIMA, H. and TAKAHASHI, H. (2006). Biochemical analysis of the substrate specificity and sequence preference of endonuclease IV from bacteriophage T4, a dC-specific endonuclease implicated in restriction of dC-substituted T4 DNA synthesis. *Nucleic. Acids. Res.*, **34**, 4743-51.
- KANNO, T., KITANO, M., KATO, R., OMORI, A., ENDO, Y. and TOZAWA, Y. (2007). Sequence specificity and efficiency of protein N-terminal methionine elimination in wheat-embryo cell-free system. *Protein Expr. Purif.*, **52**, 59-65.
- KIGAWA, T. and YOKOYAMA, S. (1991). A continuous cell-free protein synthesis system for coupled transcription-translation. *J. Biochem.*, **110**, 166-8.
- SHIMIZU, Y., INOUE, A., TOMARI, Y., SUZUKI, T., YOKOGAWA, T., NISHIKAWA, K. and UEDA, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751-5.
- SZYBIAK, U. and LEGOCKI, A.B. (1983). Control of protein synthesis in a wheat germ cell-free system. *Acta. Biochim. Pol.*, **30**, 255-63.
- SPIRIN, A.S., BARANOV, V.I., RYABOVA, L.A., OVODOV, S.Y. and ALAKHOV, Y.B. (1988). A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science*, **242**, 1162-4.
- SAWASAKI, T., HASEGAWA, Y., TSUCHIMUCHI, M., KAMURA, N., OGASAWARA, T., KUROITA, T. and ENDO, Y. (2002). A bilayer cell-free protein synthesis system for high-throughput screening of gene

- products. *FEBS Lett.*, **514**, 102-5.
- 15) SHIROKOV, V.A., KOMMER, A., KOLB, V.A. and SPIRIN, A.S. (2007). Continuous-exchange protein-synthesizing systems. *Methods Mol. Biol.*, **375**, 19-55.
  - 16) KOGA, H., MISAWA, S. and SHIBUI, T. (2009). A wheat embryo cell-free protein synthesis system not requiring an exogenous supply of GTP. *Biotechnol. Prog.*, **25**, 1322-7.
  - 17) KOHNO, T. and ENDO, Y. (2007). Production of protein for nuclear magnetic resonance study using the wheat germ cell-free system. *Methods Mol. Biol.*, **375**, 257-72.
  - 18) KIGAWA, T., MUTO, Y. and YOKOYAMA, S. (1995). Cell-free synthesis and amino acid-selective stable isotope labeling of proteins for NMR analysis. *J. Biomol. NMR*, **6**, 129-34.
  - 19) MONNIER, A., BELLE, R., MORALES, J., CORMIER, P., BOULBEN, S. and MULNER-LORILLON, O. (2001). Evidence for regulation of protein synthesis at the elongation step by CDK1/cyclin B phosphorylation. *Nucleic. Acids Res.*, **29**, 1453-7.
  - 20) BUSSARD, A.E. and PAGES, J. (1978). Establishment of a permanent hybridoma producing a mouse autoantibody. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **26**, 167-79.
  - 21) GECKELER, W.R., RASCHKE, W.C., DIPALI, R. and COHN, M. (1978). Mouse lambda 1 hybridomas. *Curr. Top Microbiol. Immunol.*, **81**, 140-1.
  - 22) SHULMAN, M., WILDE, C.D. and KOHLER, G. (1978). A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature*, **276**, 269-70.
  - 23) SMITH, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, **228**, 1315-7.
  - 24) SMITH, G.P. and SCOTT, J.K. (1993). Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.*, **217**, 228-57.
  - 25) SIDHU, S.S., LI, B., CHEN, Y., FELLOUSE, F.A., EIGENBROT, C. and FUH, G. (2004). Phage-displayed antibody libraries of synthetic heavy chain complementarity determining regions. *J. Mol. Biol.*, **338**, 299-310.
  - 26) LEE, S.H., CHOI, J.I., PARK, S.J., LEE, S.Y. and PARK, B.C. (2004). Display of bacterial lipase on the Escherichia coli cell surface by using FadL as an anchoring motif and use of the enzyme in an antioselective biocatalysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 5074-80.
  - 27) SIEGEL, R.W. (2009). Antibody affinity optimization using yeast cell surface display. *Methods Mol. Biol.*, **504**, 351-83.
  - 28) SHINE, J., HUNT, J.A. and DALGARNO, L. (1974). Studies on the 3'-terminal sequences of the large ribosomal ribonucleic acid of different eukaryotes and those associated with "hidden" breaks in heart-dissociable insects 26S ribonucleic acid. *Biochem. J.*, **141**, 617-25.
  - 29) JANG, S.K., KRAUSSLICH, H.G., NICKLIN, M.J., DUKE, G.M., PALMENBERG, A.C. and WIMMER, E. (1988). A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J. Virol.*, **62**, 2636-43.
  - 30) LIPOVSEK, D. and PLUCKTHUN, A. (2004). In-vitro protein evolution by ribosome display and mRNA display. *J. Immunol. Methods*, **290**, 51-67.
  - 31) NEMOTO, N., MIYAMOTO-SATO, E., HUSIMI, Y. and YANAGAWA, H. (1997). In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. *FEBS Lett.*, **414**, 405-8.
  - 32) MIYAMOTO-SATO, E., NEMOTO, N., KOBAYASHI, K. and YANAGAWA, H. (2000). Specific bonding of puromycin to full-length protein at the C-terminus. *Nucleic. Acids Res.*, **28**, 1176-82.
  - 33) FUKUDA, I., KOJOH, K., TABATA, N., DOI, N., TAKASHIMA, H., MIYAMOTO-SATO, E. and YANAGAWA, H. (2006). In vitro evolution of single-chain antibodies using mRNA display. *Nucleic. Acids Res.*, **34**, e127.
  - 34) KNAPPIK, A., GE, L., HONEGGER, A., PACK, P., FISCHER, M., WELLNHOFER, G., HOESS, A., WOLLE, J., PLUCKTHUN, A. and VIRNEKAS, B. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J. Mol. Biol.*, **296**, 57-86.
  - 35) RIEMER, A.B., KLINGER, M., WAGNER, S., BERNHAUS, A., MAZZUCHELLI, L., PEHAMBERGER, H., SCHEINER, O., ZIELINSKI, C.C. and JENSEN-JAROLIM, E. (2004). Generation of Peptide mimics of the epitope recognized by trastuzumab on the oncogenic protein Her-2/neu. *J Immunol* **173**, 394-401.
  - 36) KNITTELFELDER, R., RIEMER, A.B. and JENSEN-JAROLIM, E. (2009). Mimotope vaccination--from allergy to cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.*, **9**, 493-506.