

Chie Miyazaki

# 要

旨

抗体や酵素は,特定の物質を非常に高い選択性 を持って確認できる機能,すなわちセンシング機 能を持つ蛋白質である。従って,その選択性を自 由に変換できればセンサや触媒等選択性を求む工 業分野への応用が大きく広がることになる。そこ で蛋白質機能変換方法として進化分子工学的手法 (試験管内生物進化)による2段階選抜法を提案 し,目的機能を最短で得ることを試みた。モデル ケースとして抗体分子を用い,抗原のステロイド 骨格の中で一カ所の水酸基の有無に対する認識能 の変換(11-Doxycortisol cortisol結合性)を行っ た。

抗体の分子認識能は,抗原結合ポケット周辺の

アミノ酸の種類によって決定されており,目的機 能を与えるためには抗原と相互作用できるアミノ 酸への入れ換え(変異)が必要である。ここで無 秩序に変異を入れると膨大な組合わせになるた め,第1段階では結合ポケットの立体構造を予測 し,キーとなるアミノ酸にのみ10<sup>8</sup>通りの変異を 入れた抗体集団(試験管内淘汰する母集団)か ら,少しでも新機能を示す抗体を選別した。次に, 得られた抗体のポケットの構造を最適化し新機能 を向上させることを目的に,そのポケット周辺に 無秩序な変異を入れた抗体集団からの選別を行っ た。コンピュータ立体構造モデリングにより,結 合特異性の変換を考察した。

#### Abstract

Antibodies and enzymes are bound to specific substrates, and are therefore called sensing functional protein. A technique of changing their specificity according to the need was required to apply proteins to biosensors or catalysts. Consquently, we proposed two-step strategies for the efficient conversion of the function of proteins using the directed evolution method. For a model case, the specificity for 11deoxycortisol of a monoclonal antibody was changed to the specificity for cortisol (CS), whose structures were almost identical, with the absence or presence of a hydroxy group at the 11th carbon of the steroid ring. Antigen specificity of an antibody was determined primarily by the sequences of the antigen binding pocket. As the first step, mutations were introduced at 14 amino acid that seemed to form the binding pocket. A clone, DcC16, was isolated from the resultant library which shown to have CS-binding activity. As the second step, mutations were introduced randomly into the region around the pocket of DcC16 clone to fine tune the binding pocket, and CS-specific mutants were selected. Structural models, constructed by computer simulation, indicated the probable molecular basis for these changes in specificity.

キーワード 抗体,エラープローンPCR,ファージディスプレイ抗体,ステロイド,立体構造モデル

集

抗体や酵素は目的分子に対して高い選択性を示 すことから工業分野への利用が試みられている が,蛋白質の安定性や機能が限定される等の理由 から成功例は多くない。中でも抗体1)は,生体が 細菌などの進入から自己防衛するための蛋白質で あり,優れた分子認識能や分子認識の多様性(天 然物質から人工化合物まで)などからセンシング 機能蛋白質として着目され, 各種バイオセンサへ の応用が進められている。同時に,抗体をセンシ ング素子として利用するために,使用目的にあっ た分子選択性の付与・高速反応性・安定性等が求 められている。また酵素では,産業用酵素への利 用等の試みが行われており,新たな選択性付与・ 目的にあった温度やpH領域での安定性等が求め られている。これらの問題点を解決するためには 目的にあった人工蛋白質の創製が必要であり,蛋 白質機能変換方法として進化分子工学による2段 階選抜(スクリーニング)法を提案した。

従来の機能改変技術では,一度に作製できる変 異蛋白質の種類は数十個/月程度であり,この中 から目的とする機能を付与された蛋白質が得られ る確率は低い。一方,進化分子工学は生物進化 (自然淘汰)を試験管内で人為的に加速させる手 法であり,10<sup>8-10</sup>通りの変異蛋白質集団(ライブラ リー)から目的の機能を有する個体のみを数ヶ月 で効率的に選抜する方法である<sup>2~4</sup>)。

当所では抗体を利用した高機能免疫センサ開発 に着手しており,モデルケースとしてこの手法に よる抗体の分子認識能の効率的変換を行った<sup>5)</sup>。 抗体としてステロイドの1種である11-Deoxycortisol (11-DOC)に対する抗体 (SCET.M8.1<sup>6)</sup>) を用い,抗原認識能を11-DOCから元来結合性を ほとんど持たず(交差性0.2%<sup>6,7)</sup>),ステロイド 骨格の一カ所の水酸基の有無のみが異なるcortisol (CS; ストレス生化学指標)へ変換した。第1段階 では新機能付与を,第2段階では得られた機能の 向上をめざし,目的機能を最短で得ることを試み た。

試験管内でのスクリーニングでは,様々な変異 を導入したDNAライブラリーを蛋白質としてフ

ァージに生産させる必要があるが,正しい立体構 造をfolding(折りたたみ)できるかどうかがキー となっている。一般に活性部位(抗体では結合ポ ケット)以外の部分は,その蛋白質の構造を保持 するのに必要な部分であることが多く,この部位 への変異導入はライブラリー中の正しくfoldingさ れる蛋白質の割合を減らすことになる<sup>8)</sup>。更に, 蛋白質分子全体へのランダム変異の導入は膨大な 組合わせになることから,第1段階では結合ポケ ットの構造を予測し,ポケットを構成するアミノ 酸の内14個を選び10<sup>8</sup>通りの変異を導入したライ ブラリーから新機能(CS結合性)を示す抗体を選 別した。しかし,得られた機能を向上させるため にはポケット<br />
周辺の<br />
構造の<br />
fine-tuning (最適化) が必須であり,第2段階では新たに得た蛋白質の ポケット周辺の104個のアミノ酸ヘランダム変異 を導入したライブラリーからのスクリーニングを 行った。スクリーニングは, CS結合性が増加し, かつ元の抗原(11-DOC)結合性が低下もしくは失 われたクローンを得るために,11-DOCとの競合 下でパニングを行うことを検討した。

2. 実験方法

- 2.1 進化分子工学的手法
- 2.1.1 進化分子工学とは

自然界において,ある蛋白質中の1つのアミノ 酸が他のアミノ酸に置換される確率は,およそ1 回/1000万年であるといわれている。進化分子工 学とは,生物進化(自然淘汰)を試験管内で人為 的に急加速させる手法であり,自然界では何万年 とかかる進化(新機能獲得,機能向上等)を数ヶ 月で行わせることが可能である。

まず,試験管内で淘汰をさせる母集団として, 機能変換させたい元の蛋白質のアミノ酸を,10<sup>8-10</sup> 通りに入れ換えた抗体遺伝子ライブラリーを作製 した。淘汰方法としては,目的機能を持つクロー ンのみを効率的に得るための選択法として,ファ ージdisplay systemを用いた。

2.1.2 ファージdisplay system

糸状ファージ(M13ファージ)表面にはCpIIIと いう膜構成蛋白質が有り,C末ドメインを細胞内 にN末ドメインを細胞外に発現することが知られ

集

ている。この特徴を利用し, CpIIIのN末ドメイン 遺伝子を人工抗体遺伝子と入れ換えることにより ファージ表面に人工抗体を発現させた(Fig. 1)。 ファージ表面に蛋白質を発現させることにより, 蛋白化学的性質等により目的機能を有するクロー ンを選別することができる。また,ファージに導 入した1種類の遺伝子とそれにより生産される蛋 白質を同時に有することができることから,例え ば10<sup>8</sup>種類のライブラリーの中に目的とする蛋白 質をもつファージが1個含まれていれば,そのフ ァージを回収し増殖させることにより,目的蛋白 質とそれをコードする遺伝子を同時に得ることが 可能である。

2.2.2段階スクリーニング

2.2.1 材料

ファージの発現ベクターはpAAL-Fab<sup>9)</sup>を用い た。11-DOC抗体のセンシング部位近辺のみから なるFab人工抗体を作製し (pFCA-SCHL<sup>5)</sup>),出発 材料とした。

抗原の構造をFig. 2に示す。11-DOCとCSでは,  $\beta$ -face側の11位のOH基の有無が構造上の唯一の 違いである。これらの抗原は低分子であるため, 3位のOにOVA(ovalbumin)をconjugateして用いた。

2.2.2 抗体の抗原認識部位

抗体の抗原結合部位は,可変領域(Variable region;H鎖ではVH,L鎖ではVK)と呼ばれるド メインにある。その中に特異性を決定する領域 (相補性決定領域,Complementarity determining region:CDR 1~3)があり,抗原に対する選択性 はこの部位のアミノ酸の組合せが抗体によって著 しく異なっていることによるものである<sup>10,11</sup>。

VH及びVKドメインには3本のループ構造があ リ,CDR1~3はそれぞれループ構造の先端部分 に当たり,6本のループの先端で囲まれるように 抗原結合ポケットが形成されている。従って,抗



Fig. 1 Expression of the Fab on the surface of the M13 phage.

原結合性はCDR1~3のアミノ酸との相互作用により決定されるといえる<sup>12</sup>。

また,CDR以外の部分(framework)は,結合ポ ケットの構造を保持するための部分で,抗体のサ ブクラスによってほぼ同じ構造をとるといわれて いる。

2.2.3 1次スクリーニング

抗11-DOC抗体の抗原結合ポケットを,既知の 類似ステロイド抗体(DB3<sup>13,14)</sup>:抗progesterone 抗体,SCETと同じVH9 family)のX線結晶構造解 析データを参考に推定した。11-DOCとCSの構造 上唯一の違いである11位のOH基と最も近いと推 測されるアミノ酸(VH50番目のTyp:W50H)を 中心に,結合ポケットを形成すると考えられる VHのCDRの14カ所のアミノ酸を選び,5×10<sup>7</sup>通 りの変異を導入した遺伝子ライブラリーを作製し た。ライブラリーの変異導入部位及びアミノ酸配 列をTable 1に示す。変異の導入はmix primerを用 いたPCR法(Fig. 3)により行った<sup>5)</sup>。今回用いた 抗原は低分子であり,結合ポケットを形成するの は主にVHのCDRであるため,変異の導入はVH のみとした。

遺伝子ライブラリーをファージで発現させ,フ ァージdisplay抗体ライブラリー(1×10<sup>8</sup>通り)を 作製した。CS-OVAを抗原としてパニング(CSへ の結合反応 溶出 ファージの増殖)を5回繰り 返し,CS結合性ファージを濃縮した。ファージ を ク ロ ー ン 化 し , ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)法による抗原結合性とアミ ノ酸配列を調べた。

2.2.4 2次スクリーニング

1次スクリーニングで得られたCS結合性抗体の VH全域にランダム変異を導入し,ファージ



Fig. 2 Structure of 11-deoxycortisol and cortisol.

displayライブラリー(5×10<sup>7</sup>通り)を作製した。 ランダム変異の導入は, Mn添加によるTaq DNA polymeraseの塩基取り込み間違いを利用したerror prone PCR法<sup>15</sup>を用い,VH遺伝子(312塩基)当

Antibody	CDR1	CDR2	CDR3
SCET DB3	31 NYGMN V-	50 52a 60 WMDWINTYTGEPTYADDFKG GI	100 ab GNVRVYAMDY -DYVNWYF-V
library	NYGMN SD T H Y R S	WMDWINTYTGEPTYADDFKG LGY TN N VNF YI S SS S Y D V A	GNVRVYAMDY WTFS F Y N S S Y L P H
DcC16	NYGMN	WLGYINNYTGEPYYADDFKG	GNVRVYAMDY

Table 1 Amino acid sequences of V<sub>H</sub> CDRs.



Fig. 3 Schematic representation of the method used for introduction of mutations into three CDRs of the VH gene. DNA of plasmid pFCA-SCHL, which encoded the mAb SCET, was used as the template. Two PCRs were performed with primers HISa plus HISb and HIISa-1 or -2 plus HIISb-1 or -2. Wavy portions of respective primers indicate the presence of degenerate codons. After the products of the first PCRs had been combined, they were subjected to the second PCR with primers HIIISa and SHBst. Since the products of the second PCR included fragments in which diversification of CDR2 had not occurred, they were removed by digestion with NdeI and PstI. Circles indicate the positions of NdeI and PstI sites. Abbreviations: Ps, PstI; Sn, SnaI; Nd, NdeI; Bs, BstPI; and PA, proteinA.

豊田中央研究所 R&D レビュー Vol. 34 No. 3 (1999. 9)

集

たり平均3個の変異が入るように調整した。スク リーニングは, CS-OVAを抗原として11-DOCとの 競合によるパニングを4回繰り返した。得られた クローンのCS及び11-DOC結合能とVHのアミノ 酸配列を調べた。

2.3 立体構造モデリング

各抗体及び抗原のモデリングと,抗体+抗原の ドッキングシュミレーションを行った。抗体のモ デリングはホモロジーモデリング法(Genemine, look & segmod モジュール<sup>16)</sup>)により行い,DB3 <sup>13,14)</sup>を参照蛋白質として抗体の主鎖( $\alpha$ 炭素) の立体構造を構築した。抗原の構築はInsight II 97.0.(Molecular simulations Inc.,USA, Biopolymer モジュール)で行った。抗体-抗原complexの最安 定化構造を,Discover 3.0.0.(Molecular simulations Inc., USA)による分子力学・分子動力学計算から 求めた。

3. 結果と考察

3.1 新機能(新規結合性)の付与

1次スクリーニングにより得られたファージク ローンの中から,任意に20個選びCS結合性を調 べた結果,新たにCS結合性を獲得したクローン (DcC16)を得た。しかし,DcC16では元の抗原で ある11-DOCに対する結合性も残存していた(Fig. 4)。

DcC16のVHのCDRのアミノ酸配列は,11-DOC とCSの構造上の唯一の違いである11位のOH基と 最も近づくと推測されたW50Hを中心にしたアミ ノ酸のみ(5カ所)が変異していることがわかっ た(Table 1)。 3.2 抗原結合能の向上

2次スクリーニングにより得られたファージク ローンを任意に24個選び, ELISA法によるCS結 合能 / 11-DOC結合能の比 (Fig. 5) とVHのアミノ 酸配列 (Table 2) を調べた。

これらのクローンはアミノ酸配列の違いから6 種類にグループ分けでき,そのうちの3つでCS結 合能が向上していることがわかった。これら3タ イプのクローン(cc53, cc96, cc118)のBIAcore<sup>17,18)</sup> (Pharmacia社製)によるSPR (surface plasmon resonance)を測定し,抗原に対する結合定数を求 めた(Table 3)。これら3クローンでは,CS結合能 は1.6~3.8倍上昇し,11-DOC結合能は10~60%低 下していることがわかった。また,CS結合能/ 11-DOC結合能の比は4.1~4.5倍に上昇していた。

更に,競合パニングの効果を調べるために,CS を抗原として11-DOC共存下でのELISAを行った (Fig. 6)。DcC16では1µg/mlの11-DOCの存在によ りCS結合性は90%阻害されたが,cc53では40%程 度であり,競合パニングの効果は有効であること がわかった。

3.3 立体構造予測と機能解析

3.3.1 抗体の立体構造モデリング

元の抗体 (11-DOC抗体: SCET) とDcC16, cc53, cc96, cc118のホモロジーモデリングを行った。 SCETと構造が既知の類似ステロイド抗体(DB3<sup>13,1</sup>) <sup>14)</sup>)の主鎖 (α炭素)を重ね合わせた結果, CDR 以外の部分 (framework) の構造はほぼ一致してお り,抗体の基本骨格は保持されていることがわか った。残りの4抗体についても同様な傾向が認め



Fig. 4 Results of the ELISA. Immunoplates were coated with CS-OVA (a) and with 11-DOC-OVA (b). Samples were the Fab-PP of SCET ( ) and that of DcC16 ( ).

### られた。

また,DB3ではステロイドの21位を先頭にして 結合ポケットに入り込んでおり,α-face側の W50Hとβ-face側のW100Hにより両側からはさむ 形でしっかり保持されていることが知られている 。今回モデリングした抗体-抗原complexでも同様 な結果が得られており,モデリングの信頼性は高 いと考えられた。

3.3.2 立体構造と機能

元の抗原 (11-DOC) と目的とする抗原 (CS) との 構造上の唯一の違いはβ--face側の11位のOH基の



Fig. 5 Relative affinities for CS versus 11-DOC of representative clones. The binding ratio was defined as follows:

CS-binding/11-DOC-binding of each clone CS-binding/11-DOC-binding of DcC16 Each number in parentheses indicates the number of isolated clones of the particular type.

1, DcC16-type; 2, cc118-type; 3, cc96-type; 4; cc53-type; 5 cc10; 6. cc20.

 
 Table 2 Amino acid sequences of clones isolated from the randomly mutated library.

Position								Number of				
	30	41	46	50	51	56	64	67	71	72	73	clones
DcC16	Т	Р	Е	Y	Ι	Е	Κ	F	L	Е	Т	2
cc96	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	7
cc118	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	Ν	8
cc53	-	-	V	-	-	Κ	-	-	F	D		5
cc10	-	-	-	-	Μ	-	-	-	-	-	-	1
cc20	-	-	-	-	-	-	Μ	-	-	-	-	1

Bars indicate the same amino acids as those in DcC16. Circles indicate the amino acids at which a silent mutation was observed.

豊田中央研究所 R&D レビュー Vol. 34 No. 3 (1999.9)

有無のみである。11位のOH基と最も近い位置に あると考えられるアミノ酸はVHの50番目である ため,VH50番目のアミノ酸と抗原の間の相互作 用に着目した。

天然抗体SCET-11-DOC complexのモデリング結 果をFig. 7abに示す。SCETでは11-DOCをタイト にパッキングしており,CSを結合するflexibility が無く,CSの11位のOH基は立体障害をおこすた めに結合できないと考えられた。SCETのW50H

Table 3 Kinetic parameters for the association and dissociation of Fab-PPs with CS(a) and 11-DOC(b).

(a)			
	$k_{\rm ass}$	$k_{\rm diss}$	$K_{\mathrm{a}}$
clone	$(\times 10^4 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$(\times 10^{-3} \text{s}^{-1})$	$(\times 10^7 M^{-1})$
SCET	ND	ND	ND
DcC16	$2.46 \pm 0.29$	$3.91 \pm 0.13$	$0.63 \pm 0.05$
cc53	$5.50 \pm 1.01$	$2.27 \pm 0.35$	$2.42 \pm 0.20$
cc96	3.44 ± 0.39	$2.12 \pm 0.25$	$1.62 \pm 0.10$
cc118	$4.78 \pm 0.79$	4.67 ± 0.13	$1.02 \pm 0.14$
(b)			
	$k_{\rm ass}$	$k_{\rm diss}$	$K_{\mathrm{a}}$
clone	$(\times 10^4 M^{-1} s^{-1})$	$( \times 10^{-3} \text{s}^{-1})$	$( \times 10^7 \text{M}^{-1})$
SCET	$2.74 \pm 0.51$	$1.66 \pm 0.18$	$1.64 \pm 0.13$
DcC16	$4.60 \pm 0.88$	$2.62 \pm 0.32$	$1.70 \pm 0.16$
cc53	1.37 ± 0.36	$0.90 \pm 0.14$	$1.49 \pm 0.17$
cc96	$1.08 \pm 0.15$	$1.16 \pm 0.14$	$0.93 \pm 0.02$
cc118	$0.92 \pm 0.09$	1.37 ± 0.09	$0.73 \pm 0.04$

 $k_{ass'}$  association constant;  $k_{diss'}$  dissociation constant;  $K_{a'} \frac{\kappa_{ass}}{k_{diss}}$ 



Fig. 6 Results of the competition ELISA. , DOC16; , cc53; , cc96; and , cc118

36



Fig. 7 Structural models of Ag-binding pockets complexed with 11-DOC. Models of complexes of SCET with 11-DOC(a, b) and of DcC16 with 11-DOC (c, d). In the CPK(Corey-Pouling-Keltun) space-filling(a,c), and in backbone and side chain atoms with hydrogen-bond interactions(b,d). 11-DOC was shown with C atom(light green), O atom(red) and H atom(white). The hydrogen-bond interactions between Ag-binding pocket and 11-DOC were showen in pink-line with distance(Å) representation, and also interactions among residues were showen in pink-line.



Fig. 8 Structural models of Ag-binding pockets complexed with CS. Models of complexes of DcC16 with CS (a, b) and of cc53 with CS (c, d).

38

は11-DOCの21位のOH基と水素結合を形成してお り,1次スクリーニングで得られた人工抗体 DcC16でもVH50番目のTyr (Y50H)は11-DOCの21 位のOH基と水素結合を形成していた (Fig. 7cd)。 一方,DcC16-CS complexではY50Hと21位のOH 基との水素結合は認められず (Fig. 8ab),VH50番 目のTrpがTyrに変異したことによりCSの11位の OH基が入るスペースが生じ,CS結合性が付与さ れたと考えられた。

また,2次スクリーニングで得られた3種のクロ ーン(cc53, cc96, cc118)のモデリング結果は,類似 した傾向を示したためcc53-CS complexのみをFig. 8cdに示す。3クローン共,Y50HとCSの11位の OH基は水素結合を形成していた。DcC16は新た にCS結合能が付与されたクローンであるが,そ の結合能はこれら3種のクローンと比較して弱い。 DcC16のY50HはCSと水素結合を形成しておら ず,これらの3クローンはY50HとCSの11位のOH 基が水素結合を形成するようになったことにより CS結合性が高まったと考えられた。

更に,3種のクローンではポケットを形成する アミノ酸に変異は認められなかった。共通して変 異していたのはVH56番目のアミノ酸であり,こ れは直接結合ポケットには接触していないが,結 合能向上の鍵となったVH50番目のアミノ酸の2個 隣(右隣)に位置しており,結合ポケットのfine tuningに貢献したと推測された。

4.まとめ

蛋白質の機能変換方法として,進化分子工学的 手法による2段階スクリーニング法を提案し,抗 体の分子認識能の効率的変換を行った。

 第1段階として新機能(CS結合性)を示す抗体 DcC16を,結合ポケットに特異的変異を加えた抗 体集団から得た(取得効率:1/5×10<sup>7</sup>)。構造から 予測した部位(11-DOCとCSで構造上異なる11位 のOH基と最も近づくと推測されたW50H周辺)の みが変異していた。

2) 第2段階として, DcC16のポケット周辺領域へ ランダム変異を加えた集団の中から, CS 結合性 が向上した抗体3種を得た。モデリングの結果か ら, CS 結合能の向上は抗体 (Y50H) とCS (11位の OH基)の水素結合の形成によると考えられた。3 種の抗体で共通に変異していたのはポケットの隣 に位置するVH56番目のアミノ酸で,ポケット周 辺の構造の最適化に貢献したと推測された。

現在までのところ,蛋白質の目的物質に対する 結合特異性をモデリングのみで予測するのは非常 に困難である。本報告で述べた2段階法は,立体 構造予測を取り入れた,結合特異性を効率的に変 換する非常に有効な手段であるといえる。この手 法を確立したことにより,今後目的機能を付与し た抗体や酵素の工業分野への応用が期待される。

#### 謝辞

本研究を行うに当たりご助言頂いた藤田保健衛 生大学黒沢良和教授と伊庭義孝研究員に謝意を表 します。

#### 参考文献

- 1) Tonegawa, S. : Nature, 302(1983), 575 ~ 581.
- 2) Griffiths, A. D., et al. : EMBO J., 13(1994), 3245 ~ 3260
- 3) De Kruif, J., et al. : J. Mol. Biol., 248(1995), 97 ~ 105
- 4) Vaughan, T. J., et al. : Nature Biotech., 14(1996), 309 ~ 314
- 5) Miyazaki, C., et al. : Protein Engng., **12**(1999), 407 ~ 415
- 6) Sawada, J., et al. : Mol. Immunol., 28(1991), 1063 ~ 1072
- Hosoda, H., et al. : Chem. Pharm. Bull., 35(1987), 1497 ~ 1501
- 8) Casson, L. P. et al. : J. Immunol., 155(1995), 5647 ~ 5654
- Iba, Y., Ito, W., and Kurosawa, Y.: Gene, 194(1997), 35 ~
   46
- 10) Davies, D. R., et al. : Annu. Rev. Biochem, 59(1990), 439
   ~ 473
- 11) Chothia, C. and Lesk, A. M. : J.Mol. Biol., 196(1987), 901
   ~ 917
- 12) Iba, Y., et al. : Protein Engng., 11(1998), 361 ~ 370
- 13) Arevalo, J. H., et al. : J. Mol. Biol., 231(1993), 103 ~ 118
- 14) Arevalo, J. H., et al. : Nature, 365(1993), 859 ~ 863
- 15) Hawkins, R. E., et al. : J. Mol. Biol., 226(1992), 889 ~ 896
- 16) Levitte, M.: J. Mol. Biol., 226(1992), 507 ~ 533
- 17) Johnson, B., et al. : Anal. Biochem., 198(1991), 268 ~ 277
- 18) Chaiken, I., et al. : Anal. Biochem., 201(1992), 197 ~ 210

## 著者紹介

