

2Ep16

DT40-SWを用いる *in vitro* 抗体作製システムの高機能化：遺伝子変換と点突然変異の転換システムの構築

○曲正樹, 梶田真道, 金山直樹, 大森 斉
(岡山大・工・生物機能)

我々は、抗体遺伝子への変異導入をON/OFF制御可能なニワトリB細胞株DT40-SWを作製し、その抗体ライブラリを利用する新規 *in vitro* 抗体作製システムを構築している。DT40 抗体ライブラリは、主に、標的相同組み換えに関するXRCC3に依存し、一度に最大数百塩基の置換が起こる遺伝子変換(GC)によって構築されるため、一度の変異で抗原特異性の変化が大きいと考えられる。一方、XRCC3 発現抑制に伴い誘発される点突然変異(PM)は1塩基置換であるため、より精密な特異性の変化が起きると考える。そこで本研究では、GCとPMのスイッチ可能なDT40-SWの作製が高親和性抗体取得へ有用であると考へ、Tet-Offシステムを用いてXRCC3の発現調節が可能なDT40-SW(DT40-SW-XRCC3)を作製し、その性質について検討した。Tet-Offシステムを組み込んだDT40-SW-XRCC3にDoxycycline(Dox)を添加することにより、以下の結果が得られた。1)XRCC3 mRNA 発現が抑制されていた。2)標的相同組み換え効率が減少していた。3)抗体軽鎖可変部遺伝子の変異導入効率に変化は見られなかったが、PM の割合が増加していた。以上の結果より、今回作製したDT40-SW-XRCC3は *in vitro* 抗体作製システムにおいて高親和性抗体取得に有用であると考えられる。この研究は、NEDO産業技術研究助成事業により助成されている。

A novel antibody screening system using a chicken B cell line, DT40-SW: switching system of gene conversion and point mutation.

○Masaki MAGARI, Masamichi KAJITA, Naoki KANAYAMA,
Hitoshi OHMORI
(Dept. Biotech., Okayama Univ.)

Key words DT40 cells, antibody, hypermutation

2Ep17

ニワトリ B 細胞株を用いた *in vitro* 抗体作製システムの高機能化：変異様式の転換による高性能抗体作製

○梶田真道, 曲正樹, 藤堂景史, 金山直樹, 大森 斉
(岡山大・工・生物機能)

当研究室では、抗体遺伝子への変異導入がON/OFF制御可能なニワトリB細胞株DT40-SWを用いる効率的な *in vitro* 抗体取得システムを開発している。本システムの利点は、単離した抗原特異的クローンの再度の変異による多様化と選択を繰り返すことにより、抗体を親和性成熟させることが可能な点にある。今回我々は、この親和性成熟システムをより効率化することを試みた。DT40-SWでは遺伝子修復酵素XRCC3遺伝子の発現を抑制することによって、変異様式を数十～数百塩基の塩基置換が生じる遺伝子変換(GC)と一塩基置換の点突然変異(PM)に転換できる。XRCC3の対立遺伝子の一方をノックアウトするだけで、高頻度にPMが導入され、増殖速度や細胞表面IgM発現にも影響が無いことを確認した。モデル抗原としてハブタンNPを用い、特異的な抗体の親和性成熟について検討した。単離したNP特異的クローンのXRCC3(+/-)変異株を作製し、PMによる変異導入を優位に転換した後セルソーターを用いて高親和性クローンの変異を試みたところ、GC優位な変異導入に比べ、より効率的に高親和性のクローンの取得が可能であった。本研究の結果は、初期ライブラリではGC、より高親和性抗体を取得する際にはPMによる変異導入が有用であることを示唆している。

***In vitro* antibody screening system using a chicken B cell line, DT40-SW: application of converting mutation pattern for high affinity antibodies.**

○Masamichi KAJITA, Masaki MAGARI, Kagefumi TODO,
Naoki KANAYAMA, Hitoshi OHMORI
(Dept. Biotech., Okayama Univ.)

Key words DT40 cells, monoclonal antibody, affinity maturation

2Ep19

シュードモナス フルオレッセンス TSB-25 株の挿し穂への作用

○秋津 教雄, 市位 恵三, 秋田 敬太, 水野 博之
(多木化学 (株))

【目的】挿し穂法は、親株と同じ遺伝形質が得られることから、園芸植物等において有用な栄養繁殖法である。特に種子繁殖が困難な花木類等では、挿し穂法による繁殖が一般的である。シュードモナス フルオレッセンス TSB-25 株 (以下、TSB-25 株) は、植物根より分離された微生物であり、様々な植物根に対し高い定着性を示す。本研究の目的は、花木類及び花卉類の挿し穂をTSB-25株懸濁液に浸漬処理することにより、挿し穂の発根を促し、活着を促進することである。本報告では、TSB-25株の各種植物に対する最適処理条件 (菌濃度、処理時間) について新たな知見を得たので報告する。

【方法・結果】TSB-25株を固定化した資材 (以下、TSB-25材) を、10～1,000倍に希釈した懸濁液を作成し、対象植物 (しきみ、サカキおよびキク等) の挿し穂切り口に、数秒～数時間浸漬処理した。評価は、発根率、根部新鮮重及び発根数等について行った。その結果、TSB-25材を10倍希釈懸濁液に、数分間浸漬処理することにより、対象植物の発根を促進することが確認された。また、挿し穂切り口において、カルス様組織の形成促進作用が確認された。今後、さらなる処理条件の検討及び作用メカニズムについて検証していく必要があると考えられた。

Effect of *Pseudomonas fluorescens* TSB-25 to cutting

○Norio AKITSU, Keizou ICHII, Keita AKITA, Hiroyuki MIZUNO
(Taki Chemical Co. Ltd.)

Key words *Pseudomonas fluorescens*, Cutting

2Ep20

Na 輸送系 AtHKT1 と AtNHX1 による植物の耐塩性機構の解析

杉本 佑¹, 石川 敦司², ○魚住 信之¹
(¹東北大院・工・バイオ工学, ²福井県大・生物資源)

植物の耐塩性を考察するには、植物内におけるNa循環を理解することが重要となる。しかし、植物のNa輸送と循環系に関しては不明な点が多い。当研究室ではシロイヌナズナにおいて Na 選択的に取込み輸送を行うAtHKT1を植物において初めて同定することにより、Naの循環系の一端を明らかにしてきた。植物内Na循環系を明らかにして、植物の耐塩性に関する仕組みを解明するために、本研究ではNa取込み系のAtHKT1と液胞内にNaを蓄積するNa/H対向輸送体 AtNHX1の関係を検討した。両遺伝子の二重変異株を作成して、野生株、athkt1変異株、atnhx1変異株と比較した。道管内のNa濃度は二重変異株とathkt1変異株とほぼ同じ傾向を示した。一方、atnhx1変異株はその両株より低い値であった。これは、AtHKT1は高い塩濃度培地において Na の植物内への取り込み口であることを強く示唆している。

Role of Na transporters, AtHKT1 and AtNHX1 on Na tolerance in plants

Yu SUGIMOTO¹, Atsushi ISHIKAWA², ○Nobuyuki UOZUMI¹
(¹Dept. Biomol. Eng., Grad. Sch. Eng., Tohoku Univ., ²Dept. Biosci., Fukui Pref. Univ.)

Key words salt tolerance, *Arabidopsis thaliana*, transporter, AtHKT1