

Peptide Transfer System from Bacteriophage to Alkaline Phosphatase

Fumiaki UCHIYAMA,* Tomomi CHIHARA

*Department of Molecular Biosciences, Institute of Preventive and Medicinal Dietetics,
Nakamura-Gakuen University, 5-7-1 Befu, Jounan-Ku, Fukuoka, 814-0198, Japan*

*Corresponding author. E-mail: uchiya-f@nakamura-u.ac.jp

Phone: +81-(0)92-851-2598 fax: +81-(0)92-841-7762

[Key words: alkaline phosphatase, phage display; fusion, somatostatin-14, expression plasmid]

Abstract

Phage display system facilitates the identification of peptide sequences bound to interesting targets on phage. However, time and cost are usually critical to perform the synthesis of selected peptide sequences and also synthetic peptides are not always equivalent to the binding properties of the selected phage clones. This issue is one of the bottle-neck in phage display technology. Here, We present the development of a peptide transfer system that allows rapid evaluation of the relative affinity of selected peptides by using alkaline phosphatase fusion.

To investigate the expression level of AP fusion formate, we constructed the expression plasmid containing the model gene fused somatostatin-14 to either N-terminal or C-terminal of alkaline phosphatase. The expression level was validated by SDS-PAGE analysis combined with both immunological and enzymatic methods. C-terminal AP fusion of somatostatin-14 was highly expressed as a main product of the total proteins in periplasm and adequately revealed the enzymatic activity of phosphatase. These results show that C-terminal AP fusion method may be applied to the characterization of hundreds of peptide ligands from phage display system.

バクテリオファージからアルカリフォスファターゼへのペプチド転送システムの開発

内山 文昭・千原 智美

中村学園大学・薬膳科学研究所・分子栄養学部門

(2009年3月30日受理)

要 約

ペプチドのディスプレイ技術は標的分子に結合するペプチド配列を同定することである。同定したバクテリオファージ上のペプチド配列は必ずしも合成ペプチドにおいて期待する結合活性を示すわけではないし、またすべてのペプチドを合成するには多大な時間とコストを要する。この問題を解決するためファージ上に提示したペプチドと合成ペプチドを繋ぐ技術としてペプチドのアルカリフォスファターゼ (AP) へのペプチド転送システムを

開発した。アルカリフォスファターゼとペプチドの結合は N-末端および C-末端で融合し、ペプチドを分泌発現できる AP 発現プラスミドを構築した。両発現プラスミドはファージクローンから得られるペプチドをコードする DNA 断片をクローニングすることができる。ソマトスタチン-14 のペプチドを融合したとき、その発現効率を Western Blotting で検討した結果、C-末端融合体が高発現を示した。その結果、ペプチドのディスプレイ技術においてこの C-末端融合法による AP 融合体の発現システムはペプチド転送システムとしてディスプレイ技術に統合できる可能性がある。

結 論

ディスプレイ技術は蛋白質-蛋白質、蛋白質-ペプチド、蛋白質-低分子化合物の分子間認識の相互作用の解析および標的蛋白質のリガンドを創出する方法である。ディスプレイ分子はバクテリオファージ^{1,2}、大腸菌³⁻⁵などで複製可能な遺伝情報として組み込まれ、その遺伝子産物を生物体の表面にディスプレイされる。それ以外にも同様の概念から多くの方法が提唱され、多くのレビューが報告されている^{6,7}。すべてのディスプレイ分子はバクテリオファージあるいは大腸菌等の生物体の適当な表面蛋白質に融合されている。スクリーニングで選択された生物体では標的分子に結合するディスプレイ分子が微量の融合蛋白質であるため、その融合蛋白質を精製して詳細な性状を把握する実験に直接使用することはできない。通常、ディスプレイ分子の生化学的評価試験はペプチド合成や独立した発現系で生成する分子を用いることになる。また、スクリーニング段階では標的分子に結合する候補ディスプレイ分子は数十から数百クローンに及ぶことがあり、ディスプレイ分子の適切な量を確保することでディスプレイ分子を正確な生化学的性状を明らかにすることができるようになる。ディスプレイ分子をディスプレイ系と独立して生成する方法として最も簡便な方法としてペプチド合成がある。ペプチド合成は実験室レベルでは膨大なコストを要するためその合成では多種類の候補化合物に対応できない場合がある。そのため近年融合蛋白質によるペプチドの産生が報告されている⁸⁻¹⁶。

ファージディスプレイにおいて、ファージ上のディスプレイ分子の同定はファージ ELISA を用いることができる。しかし、一旦ディスプレイ分子をファージから切り離せばファージ ELISA が使用できないので新たにディスプレイ分子の生化学的評価方法を構築しなければならない。通常、ペプチドに蛍光やビオチン化標識ラベルを用いればファージ ELISA と同様のバインディングアッセイが可能になり、その標識体のデザインとアッセイにおける影響を考慮したデザインが要求されることになる。一方、大腸菌で組換え体としてペプチドの融合蛋白質を利用することができる。その1つの方法としてディスプレイ分子の生成と生化学的評価を同時に、かつ多種類の検体を簡便に行える方法としてアルカリフォスファターゼ (AP) を用いた分子転送システムを検討した。大腸菌のアルカリフォスファターゼ (AP) はアルカリ性条件下でリン酸エステル化合物を加水分解する酵素であり、酵素標識体として使用されている。AP は *phoA* 遺伝子にコードされ、471アミノ酸残基の前駆体からシグナル配列が切断され、450アミノ酸残基のAPとなりペリプラ

スマに分泌されて二量体として存在している。この分子転送システムはファージディスプレイベクターからインサートを制限酵素で切り出し、そのインサートを *phoA* 発現ベクターに組み込み、インサート-*phoA* 融合体を大腸菌で発現させて AP 融合蛋白質を産生するものである。この AP 融合蛋白質のアルカリフォスファターゼ活性を用いれば標的分子との結合を容易に評価することができる。本研究ではペプチドあるいは蛋白質と AP の融合を AP の N 末端¹⁰および C 末端⁶で検討し、インサートはソマトスタチン-14¹⁷というペプチドホルモンを用いて、AP 融合蛋白質の発現ベクターの作製、その融合蛋白質の生産および性状を比較検討し、分子転送システムの構築を検討した。

実験材料・方法

発現ベクターの構築

アルカリフォスファターゼ遺伝子は pHI-1 プラスミド¹⁸の *XhoI*-*HindIII* 断片を含む pAP プラスミドを PCR テンプレートあるいは DNA 制限酵素断片の作製に用いた。AP の C 末端にクローニングサイトを導入するため 2 種類のオリゴヌクレチド (5'-GGGGTACCCAGAAA TGCCTGTCTCTGG-3', 5'-GGGGTACCTTAGCCGGCTT TCAGCCCC-3') をプライマーにして PCR に付し、1370 bp の PCR 産物を TA クローニングベクターに導入し、AP の C 末端に *NaeI*-*KpnI* 制限酵素サイト、N 末端に *KpnI* を導入した mature AP をクローニングし pAP1370 を構築した。AP のプロモーターとシグナル配列からなる 166bp の DNA 断片は 3' 末端に *NaeI*-*KpnI* 制限酵素サイトを導入するため、2 種類のプライマー (5'-GGAAT TCAACAGCTGTGTCATAAAGTT-3', 5'-GAGTACTCGG TACCGCCGGCTTTTGTACAGGGGTAAACAG-3') の PCR 産物を TA クローニングベクターに導入し、pAP166 を構築した。上記 3 つのプラスミドより以下に示す DNA 断片を調製して 2 種類の発現ベクターを調製した。AP の N 末端でシグナル配列の直後に位置する *NaeI*-*KpnI* 制限酵素サイトでクローニングできる pAP-N 発現ベクターは pAP 166 の *Sall*-*KpnI* 切断した AP のプロモーターとシグナル配列からなる 166 bp の DNA 断片、pAP 1370 の *KpnI*-*NcoI* 切断した 808 bp のベクターを含む成熟 AP の N 末端側の DNA 断片、pAP の *NcoI*-*Sal* 切断した 1549 bp の成熟 AP の C 末端側の DNA 断片をリガーゼ反応、それに続く形質転換により pAC-N ベクターを作製した。AP の C 末端の最後頭部と終止コドンの間に位置する *NaeI*-*KpnI* 制限酵素サイトでクローニングできる pAP-C 発現ベクターは pAP の *Sall*-*NcoI* 制限酵素切断から調製した 4914 bp の DNA 断片と pAP 1370 の *NcoI*-

XhoI 制限酵素切断から調製した572 bp よりリガーゼ反応, それに続く形質転換により作製した。

ソマトスタチン-14合成オリゴヌクレチドのクローニング

ソマトスタチン-14の dsDNA は2種類のオリゴヌクレチド, 5'-GCCGGCTGCAAGAATTTCTTTTGAAAACTTTCACCTCCTGTATCGAACGTACGGGTAC-3', 5'-CCGTACGTTTCGATACAGGAGGTGAAAGTTTCCAAAAGA AATTCTTGCAGCCGGC-3'のアニーリングにより作製した。アニーリングした dsDNA は, pAP-N および pAP-C プラスミドの NaeI-KpnI 制限酵素切断したベクターとリガーゼ反応, それに続く形質転換により各々 pAP-N-som, pAP-C-som の発現プラスミドを構築した。

大腸菌での AP-somatostatin 融合蛋白質の発現

形質転換体は10 mMリン酸二水素カリウムを含む MOPS 培地¹⁹ (0.4%グルコース, 0.15%カザミノ酸, 50 μ g/ml アンピシリンを含む) で前培養後, 0.1 mM リン酸二水素カリウムを含む MOPS 培地で37℃, 30℃あるいは25℃, 200 rpm で6時間培養し, OD₆₂₀が1.0で培養を終了し, 集菌した。菌体は20%ショ糖-30 mM Tris/HCl pH 7.5溶液で処理後, 遠心して再度集菌し, その残渣にはじめの培養液の10%容量の5 mM MgCl₂-0.1 mM PMSF 溶液で浸透圧ショックを与え, 遠心分離して上清をペリプラズム分画の蛋白質溶液として回収し, 残渣を細胞質分画として回収した。

Western-Blotting による抗ソマトスタチン抗体での反応とアルカイフォスファターゼ活性

ペリプラスム分画の蛋白質は非還元下で SDS-PAGE で分離後, ニトロセルロースフィルターにトランスファーした。フィルターはコーティング後, 1次抗体として倍希釈したウサギ抗ヒトソマトスタチン抗血清 (Cambridge Research Biochemicals), 2次抗体で倍希釈した HRP 標識したヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies, Inc.) で反応後, HRP 染色キット (Bio-Rad Laboratories, Inc.) で発色した。

アルカリフォスファターゼ活性は SDS-PAGE で分離後, ゲルを100 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 9.5バッファーで浸透置換して, アルカリフォスファターゼは5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) と nitro-blue-tetrazolium (NBT) により, 暗紫色の沈殿として可視化により測定した。

結 果

ソマトスタチン-14融合蛋白質の発現プラスミドの選択

大腸菌のアルカリフォスファターゼの N 末端, C 末端にペプチドを融合できる発現プラスミド, 各々 pAP-N, pAP-C を作製した。2種類の発現プラスミドで phoA にソマトスタチン-14をコードする合成 DNA を融合し, 各々 pAP-N-som, pAP-C-som の融合 DNA とそれに対応する融合蛋白質を図1に示す。3種類の融合遺伝子は phoA のプロモーターとオペレーターで制御されている。2種

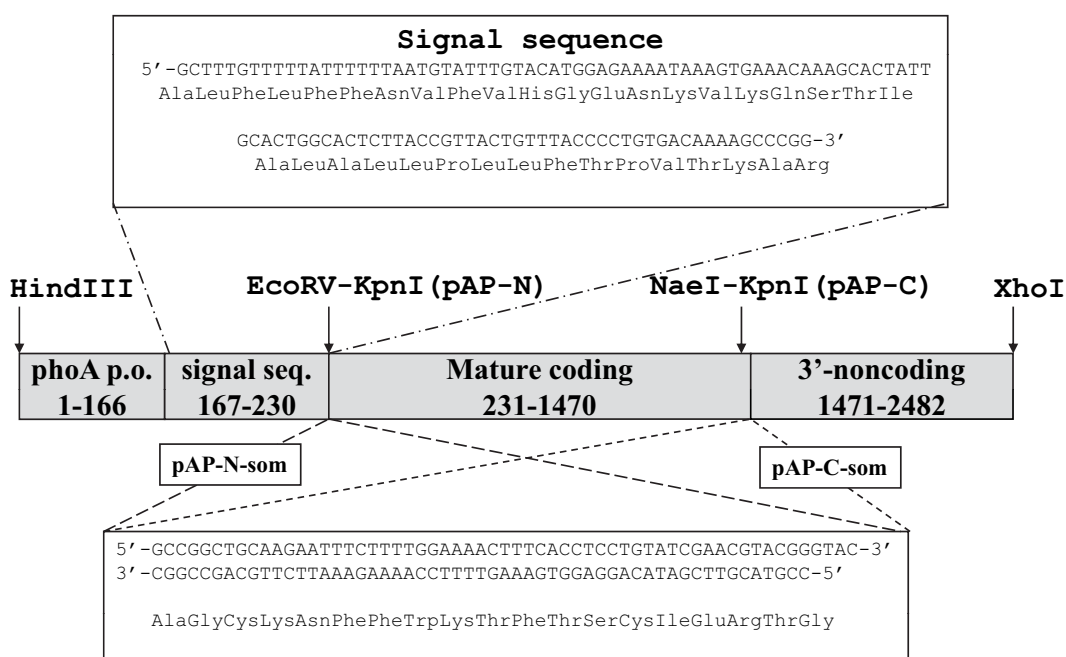


図1. AP融合蛋白質発現ベクターにおけるクローニングサイトとAP融合蛋白質の部分アミノ酸配列

類の発現プラスミドで大腸菌 AW1043を形質転換し、融合遺伝子の発現は低リン酸濃度での培養によりプロモーター活性を誘導した。AP は *phoA* 遺伝子から前駆体として発現され、シグナル配列を切断されペリプラスマに遊離され2量体を形成し酵素活性を発揮する。シグナル配列とソマトスタチン-14の融合部分のDNA塩基配列およびアミノ酸配列は図1に示している。2種類の融合蛋白質を発現させた大腸菌は細胞質分画とペリプラスマ分画を分離した。大腸菌を浸透圧ショックし遠心分離後上清に遊離する蛋白質をペリプラスマ分画として回収し、遠心した残渣を細胞質分画とした。両分画中の蛋白質は非還元下のSDS-PAGEで分離後、Western-Blotting、抗ソマトスタチン抗体あるいは抗アルカリフォスファターゼ抗体でAP-somatostatinを免疫学的に同定した。その結果を図2aに示している。37℃で培養してペリプラスマ分画に産生したAPのC末端融合ソマトスタチン-14 (AP-C-som)が理論分子量50 kDaと一致するバンドと49 kDaの蛋白質が検出された(図2a, レーン3)。ペリプラスマ分画に産生したpAP-N-somで発現したAPのN末端融合ソマトスタチン-14 (AP-N-som)は分子量48 kDaの蛋白質に微かに検出された(図2a, レーン2)。一般的に培養温度を下げると異種蛋白質の発現が増えることが知られており、融合蛋白質の発現を30℃で行なったところ、AP-C-som(図2a, レーン5)およびAP-N-somの産生量(図2a, レーン4)が増加してきた。AP-C-somの発現は50 kDaと49 kDaの2種類の蛋白質が検出され、49 kDaのバンドはAP-N-somでも検出している(図2)。50 kDaと49 kDaの蛋白質は抗ソマトスタチン抗体および後述するアルカリフォスファターゼ活性を有することからトランケート体と考えられる。細胞質分画においてpAP-N-som由来では50 kDaと49 kDaの蛋白質が認められた(図2b, レーン3)。pAP-N-som由来では52 kDaと50 kDaのバンドが検出され(図2b, レーン2)、52 kDaのバンドはAP-C-som前駆体と考えられる。以上の結果、pAP-C-somは大腸菌でAPのC末端融合ソマトスタチン-14を効率よく産生することが免疫化学的に判明した。

APのC末端融合ソマトスタチン-14の産生

AP-C-somの産生における培養条件と培養経過による産生量を検討した。pAP-C-somプラスミドで形質転換したAW1043でのAP-C-somの産生のWestern-Blottingによる抗アルカリフォスファターゼ抗体での免疫染色を示す。コントロールのpAPプラスミド(図3, レーン2)とソマトスタチン融合APを産生するpAP-C-som(図3, レーン3)においてAPは分子量47 kDa、AP-C-som融合蛋白質は50 kDaと49 kDaの2種類の蛋白質を産生している。各々のバンドの強度はSDS-PAGEでのCBB染色

で図3の中央図に示している。両プラスミドにおける細胞当りのAPあるいはAP-C-somの産生量はほぼ同等であり、CBB染色で主生成体となる高い発現量を示した。融合蛋白質の質的、主にフォールディングの状態を検討するため抗アルカリフォスファターゼ抗体に反応した47 kDa、50 kDaと49 kDaの分子種においてポリアクリルアミドゲル中でアルカリフォスファターゼ活性を測定した。その結果を図3の右図に示している。3種類の分子種の詳細なアルカリフォスファターゼ活性の比活性は別途検討しなければならないが、3種類の分子種はすべてアルカリフォスファターゼ活性を有していた。このことからAP-C-som融合蛋白質におけるAP部分のコンフォメーションは天然のAPと同質であると考えられる。

大腸菌で異種蛋白質を生産する方法として低温培養が

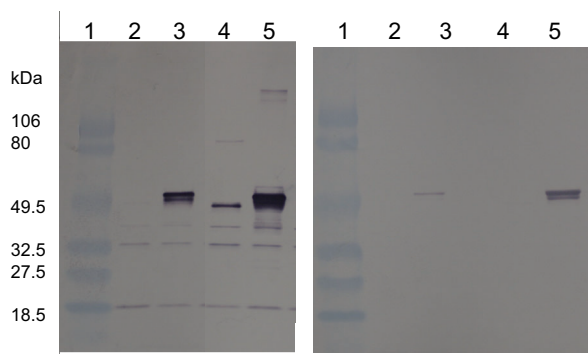


図2a. ソマトスタチン-14とAP融合蛋白質のペリプラスマ発現蛋白質のWestern-Blotting解析。左図は抗アルカリフォスファターゼ抗体、右図は抗ソマトスタチン抗体により検出した。レーン1は分子量マーカー、レーン2, 4はpAP-N-som、レーン3, 5はpAP-C-somのベクターの発現で、レーン2, 3は37℃で培養、レーン4, 5は30℃で培養した大腸菌のペリプラスマ分画である。

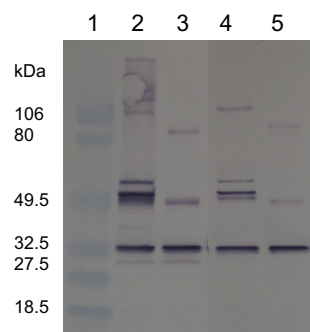


図2b. ソマトスタチン-14とAP融合蛋白質の細胞質でのWestern-Blotting解析。抗アルカリフォスファターゼ抗体により検出した。レーン1は分子量マーカー、レーン2, 4はpAP-N-som、レーン3, 5はpAP-C-somのベクターの発現で、レーン2, 3は30℃で培養、レーン4, 5は37℃で培養した大腸菌の細胞質分画である。

あり、その効果を検討した。pAP-C-som の組換え体を 30℃と25℃の培養温度による AP 融合蛋白質の産生への影響を検討した。図4a に30℃と25℃の培養温度における増殖曲線を示しめている。25℃培養での増殖は明確な対数増殖期を示さず、30℃では培養後2時間から3時間のところで対数増殖期を有していた。各時間の AP-C-

som の産生量は SDS-PAGE で蛋白質を分離後、CBB 染色(図4b, 左図)と抗アルカリフォスファターゼ抗体を用いて Western-Blotting(図4b, 右図)で解析した。25℃の培養温度においては Western-Blotting 解析によりどの時間においても産生を確認できなかった。一方、30℃培養では対数増殖期後の培養5~9時間において AP-C-som の高産生が認められた。以上の結果、pAP-C 発現ベクターはペプチドを AP 分子上に効率よく提示でき、しかも AP 活性を維持できることが判明した。このことはバクテリオファージ上のペプチドをアルカリフォスファターゼ分子にペプチド転送する効率的なシステムと考えられる。

考 察

ファージディスプレイ技術に基づくペプチドの同定方法はペプチド合成以外に融合蛋白質が利用されている^{8, 9, 11, 13, 14}。

本研究においてペプチドを融合するとき、AP 上の融合部位による融合蛋白質の産生差異を検討するためソマトスタチン-14を用いて AP の N 末端、C 末端に融合し、その産生効率を比較した。AP の N 末端融合体、AP-N-som の産生を抗体で検出したところ、抗ソマトスタチン抗体と抗アルカリフォスファターゼ抗体で共通して反応する48 kDa のバンドが検出された。免疫化学的に検出した48 kDa の分子種はソマトスタチン-14を融合した AP の分子量に匹敵する。一方、抗ソマトスタチン抗体で反応せず、抗アルカリフォスファターゼ抗体で反応する32 kDa のバンドは融合蛋白質の種類にかかわらずすべての発現で認められた。この32 kDa のバンドは宿主単独実験では検出されず、天然の AP を産生する pAP の発現でも極少量検出されている(データ非表示)。この32 kDa のバンドの発現は細胞質分画の分析では phoA 遺伝子発現上の主生成物であった(図2b)。これらの結果はこの32 kDa の分子種が融合蛋白質の切断体(trun-

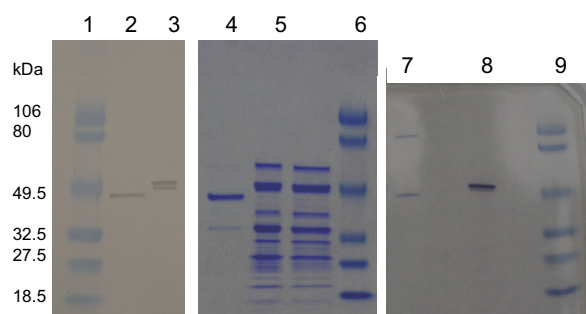


図3. ソマトスタチン-14と AP-C 末端融合蛋白質のペリプラスマ分画での SDS-PAGE の CBB 染色(中央図)、抗アルカリフォスファターゼ抗体により Western-Blotting 解析(左図)、アルカリフォスファターゼ基質による発色(右図)。レーン1, 6, 9は分子量マーカー、レーン2, 4, 7は pAP による天然型 AP の発現、レーン3, 5, 8は pAP-C-som 融合蛋白質の発現である。

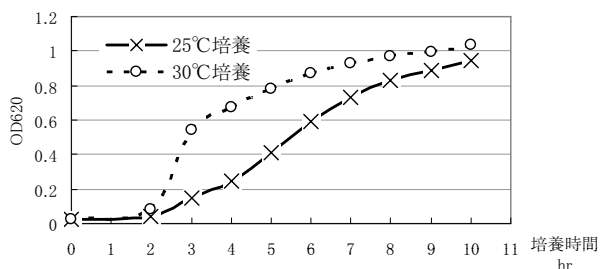


図4a. pAP-C-som/AW1043組換え体の増殖曲線。

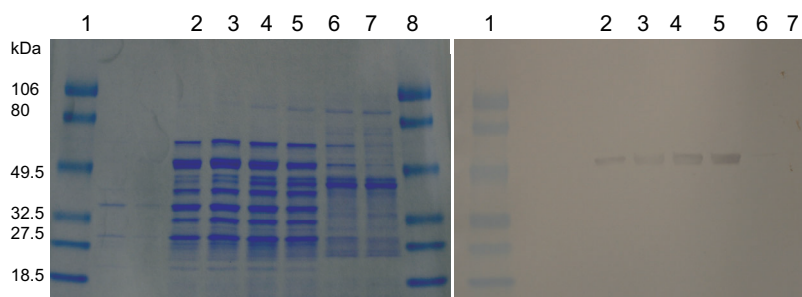


図4b. pAP-C-som/AW1043組換え体の増殖におけるソマトスタチン-14と AP-C 末端融合蛋白質の発現。ペリプラスマ分画での SDS-PAGE の CBB 染色(左図)、抗アルカリフォスファターゼ抗体により Western-Blotting 解析(右図)レーン1, 8は分子量マーカー、レーン2からレーン9は各々培養開始から5, 6, 7, 8, 9, 10時間後の検体である。

cated form)であることを示している。その切断体への分解は細胞質のみならずペリプラズムでも進行しており、しかも細胞あたりおよそ一定量の産生を示していた(図2)。APのC末端融合体、AP-C-somの産生はAP-N-somに比べて抗ソマトスタチン抗体と抗アルカリフォスファターゼ抗体で共通して反応する50 kDaと49 kDaの蛋白質のバンド強度が非常に増加しており、高発現を示した。抗ソマトスタチン抗体と抗アルカリフォスファターゼ抗体で共通して反応する48 kDaから50 kDaの融合蛋白質の産生においてAP-C-somの産生量はAP-N-somに比べて産生量が顕著に増加しており、APのC末端融合体はペプチド融合蛋白質の産生に適していると考えられる。

APとソマトスタチン-14の融合において、AP-C-somとAP-N-somは構成ドメインが同じでありながら発現量に大きな差が生じた。AP-N-somは融合部位がAPのシグナル配列の近傍にあるためシグナル配列の切断と内膜通過で天然のAPに比べて遅い過程になる可能性があるが、AP-N-somの細胞分画には前駆体の存在を示さなかった。この結果はAP-N-somでは細胞質分画およびペリプラズマ分画の分泌の総産生量の低下を示している(図2a, 2b)。その原因は、AP-N-somにおいて大腸菌でのDNA転写やmRNA翻訳過程から分泌過程まで共役していることに起因するのか、あるいはSOSシグナルを誘起して分泌できない前駆体が迅速に分解することに起因するかもしれない。どちらの過程においても構成ドメインの配列順番は融合蛋白質の産生に大きな影響を与えている。

AP融合蛋白質は抗体、酵素標識、蛍光標識を用いることなくAP融合蛋白質自身のアルカリフォスファターゼ活性で酵素反応を行うことができるため、ELISA、Western-Blottingにそのまま応用することができる。図3の右図に示したように融合蛋白質は非還元下のSDS-PAGEの後、バッファーを置換することにより直接アクリルアミドゲル内でアルカリフォスファターゼ活性による発色を確認することができた。このことはファージディスプレイに基づいて選択したペプチドの結合活性の測定に新たに評価系を作製する手間を省いてくれることを意味し、ファージディスプレイシステムによるペプチドの選択でより簡便な方法を提供することになる。

本研究で作製したAP融合蛋白質はバクテリオファージからAPへのペプチド転送システムとしてファージディスプレイによるペプチド同定におけるファージディスプレイシステムに組み込むことができると考えられる。

参考文献

1. Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W. & Dower, W.J. Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 6378-6382 (1990).
2. Scott, J.K. & Smith, G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**, 386-390 (1990).
3. Rice, J.J., Schohn, A., Bessette, P.H., Boulware, K.T. & Daugherty, P.S. Bacterial display using circularly permuted outer membrane protein OmpX yields high affinity peptide ligands. *Protein Sci* **15**, 825-836 (2006).
4. Lang, H. Outer membrane proteins as surface display systems. *Int J Med Microbiol* **290**, 579-585 (2000).
5. Etz, H., Minh, D.B., Schellack, C., Nagy, E. & Meinke, A. Bacterial phage receptors, versatile tools for display of polypeptides on the cell surface. *J Bacteriol* **183**, 6924-6935 (2001).
6. Sergeeva, A., Kolonin, M.G., Molldrem, J.J., Pasqualini, R. & Arap, W. Display technologies: application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Adv Drug Deliv Rev* **58**, 1622-1654 (2006).
7. Uchiyama, F., Tanaka, Y., Minari, Y. & Tokui, N. Designing scaffolds of peptides for phage display libraries. *J Biosci Bioeng* **99**, 448-456 (2005).
8. Gonzalez-Techera, A. et al. High-throughput method for ranking the affinity of peptide ligands selected from phage display libraries. *Bioconjug Chem* **19**, 993-1000 (2008).
9. Huang, X., Zhang, X.E., Zhou, Y.F., Zhang, Z.P. & Cass, A.E. Construction of a high sensitive Escherichia coli alkaline phosphatase reporter system for screening affinity peptides. *J Biochem Biophys Methods* **70**, 435-439 (2007).
10. Martin, C.D. et al. A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies. *BMC Biotechnol* **6**, 46 (2006).
11. Han, Z., Karatan, E., Scholle, M.D., McCafferty, J. & Kay, B.K. Accelerated screening of phage-display output with alkaline phosphatase fusions. *Comb Chem High Throughput Screen* **7**, 55-62 (2004).
12. Voss, S.D., DeGrand, A.M., Romeo, G.R., Cantley, L.C. & Frangioni, J.V. An integrated vector system for cellular studies of phage display-derived peptides. *Anal Biochem* **308**, 364-372 (2002).
13. Wright, R.M. et al. A high-capacity alkaline phosphatase reporter system for the rapid analysis of specificity and relative affinity of peptides from phage-display libraries. *J Immunol Methods* **253**, 223-232 (2001).
14. Zwick, M.B. et al. The maltose-binding protein as a scaffold for monovalent display of peptides derived from phage libraries. *Anal Biochem* **264**, 87-97 (1998).
15. Carbonell, X. & Villaverde, A. Peptide display on functional tailspike protein of bacteriophage P22. *Gene* **176**, 225-229 (1996).

16. Kerschbaumer, R.J., Hirschl, S., Schwager, C., Ibl, M. & Himmler, G. pDAP2: a vector for construction of alkaline phosphatase fusion-proteins. *Immunotechnology* **2**, 145-150 (1996).
17. Burgus, R., Ling, N., Butcher, M. & Guillemin, R. Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 684-688 (1973).
18. Inouye, H., Michaelis, S., Wright, A. & Beckwith, J. Cloning and restriction mapping of the alkaline phosphatase structural gene (phoA) of Escherichia coli and generation of deletion mutants in vitro. *J Bacteriol* **146**, 668-675 (1981).
19. Neidhardt, F.C., Bloch, P.L. & Smith, D.F. Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* **119**, 736-747 (1974).