

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07759

研究課題名(和文) T1SSを利用した大腸菌による低分子抗体分泌生産システムの構築

研究課題名(英文) Construction of the secretory production system for small molecule antibody by Escherichia coli using the type I secretion system (T1SS)

研究代表者

湯浅 恵造 (YUASA, Keizo)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・准教授

研究者番号：70363132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Serratia marcescensが有するI型タンパク質分泌機構(T1SS)の一つであるLipシステムを利用して、大腸菌による低分子抗体(ラクダ科動物由来VHH、Nanobody)の分泌生産システムの構築を行った。これまでのT1SSを利用したタンパク質分泌生産では、目的タンパク質のC末端に100～200アミノ酸を付加する必要があったが、本研究で構築したシステムでは、10アミノ酸程度を付加するのみで分泌が可能となった。また、Lipシステムの3コンポーネント(LipB/C/D)のうちLipCのみで分泌生産できた。最終的に、培養液1Lあたり数mgの精製Nanobodyを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸菌を宿主としたタンパク質生産システムが数多く構築されているが、これまでのシステムではタンパク質をペリプラズムを含む菌体内に蓄積させるものであり、分泌生産システムの構築には至っていない。本研究で構築した分泌生産システムを用いて、C末端に10アミノ酸のみが付加した精製Nanobodyを培養液1Lあたり数mg得ることに成功した。最近、Nanobodyが医薬品として認可され、今後ますます開発が進むと期待されており、本研究の社会的意義は高いと考えられる。また、Nanobodyだけでなく一本鎖抗体(scFv)の分泌生産も確認しており、抗体以外の組換えタンパク質の分泌生産への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：We constructed the secretory production system for small molecule antibody (the variable domain of the camelid heavy-chain antibody, VHH or Nanobody) by Escherichia coli using the Lip system, one of the type I secretion systems (T1SS) in Serratia marcescens. In the secretory production systems using T1SS, long polypeptides (100-200 amino acids) must be fused to the C-termini of target proteins. However, in our system, Nanobody could be secreted by the addition of only about 10 amino acids at the C-terminus. Additionally, Nanobody was secreted by only LipC in the Lip system (LipB-LipC-LipD). Finally, our system yielded more than 5 mg of purified Nanobody per liter of culture medium.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：低分子抗体 タンパク質分泌生産

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬品の中で大きな割合を占める低分子化合物医薬品は、その作用機構の観点から副作用が問題となっており、近年、標的分子への特異的な作用により、副作用が生じにくく、優れた効果が期待できる抗体医薬品に注目が集まっている。現在までに 40 種以上の抗体医薬品が販売されており、今後もその数は増加することが考えられる。しかしながら、それらのほとんどが動物細胞であるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞を宿主として生産されるため、大量生産は困難で、莫大なコストがかかる。結果、高額になってしまった抗体医薬品は、超高齢社会である日本をはじめとする各国の財政を圧迫することになり、大きな社会問題となっている。抗体医薬品の中には、少数ではあるが、大腸菌を宿主として生産された低分子抗体が含まれる。大腸菌は、糖鎖付加を含む複雑な高次構造を持つ全長抗体の生産には適さないが、低分子抗体に関して大量生産が可能であり、コストの低減が期待できる。また、低分子抗体は分子量が小さいため組織浸透性に優れており、癌治療などにおいて通常の全長抗体で問題となっている標的組織への低浸透性の改善が期待できる。これまでに大腸菌を宿主とした生産システムが数多く構築されているが、ペリプラズムを含む菌体内に組換えタンパク質を蓄積させるため、菌体を破壊する必要があったり、菌体内タンパク質濃度が高まると発現抑制が引き起こされるといった問題が生じたりしている。これらの解決策の 1 つとして、組換えタンパク質を菌体外へ分泌させることが考えられる。菌体外には夾雑タンパク質がほとんど存在しないため、目的タンパク質の精製が容易になるという利点も挙げられる。しかしながら、グラム陰性菌である大腸菌には内膜の外側にさらに外膜が存在するため、タンパク質の分泌が困難であり、未だ実用的な分泌生産システムは構築されておらず、その開発が強く望まれている。

2. 研究の目的

大腸菌を含むグラム陰性菌には、タンパク質分泌装置の type 1 secretion system (T1SS) が備わっている。T1SS は、ABC protein、membrane fusion protein (MFP)、outer membrane protein (OMP) の 3 種のタンパク質によって構成される単純なタンパク質分泌装置であり、タンパク質を N 末端シグナルペプチド非依存的に 1 ステップで菌体外に分泌する。グラム陰性菌 *Serratia marcescens* には 2 つの T1SS (Lip システム; LipB-LipC-LipD、Has システム; HasD-HasE-HasF) が備わっており、Lip システムは LipA、PrtA、SlaA の 3 種を、Has システムは HasA をそれぞれ選択的に分泌する。これまでに *S. marcescens* HasA に関して、C 末端 14 アミノ酸欠失変異体が Has システムによって分泌されないこと、また、C 末端から 14 番目 Val の直前に Val-Ala-Leu の 3 アミノ酸を挿入した HasA-VAL が Lip システムによって分泌されることが明らかとなっており、C 末端に VAL 配列を含む約 17 アミノ酸を付加させた異種タンパク質が Lip システムによって分泌される可能性が予想された。そこで、低分子抗体の 1 つである一本鎖抗体 (single chain Fv; scFv) の C 末端に VAL 配列と FLAG タグを含む 18 アミノ酸を付加し、Lip システムによって分泌される否かを調べた。C 末端 VAL 配列を付加した scFv の発現は低く、菌体外への分泌を検出するには至らなかったが、コントロールとして行った VAL 配列を付加してない scFv-FLAG が Lip システム依存的に分泌されることが判明した。しかしながら、分泌量はそれほど高くないため、より高効率な分泌生産システムの構築が必要であると考えられた。

本研究では、Lip システムによる低分子抗体の分泌機構を解明し、これを応用して、大腸菌による低分子抗体の大量分泌生産システムを構築することを目的とする。

3. 研究の方法

Lip システムによる低分子抗体の分泌機構解明のために、まず、Lip システムを構成する LipB-LipC-LipD の中で、低分子抗体の認識に関わるコンポーネントおよびその領域を同定する。また、*S. marcescens* Lip システム以外の T1SS による低分子抗体の分泌が分泌されるか否か検討し、より高効率な分泌システムを探索する。さらに、低分子抗体 scFv-FLAG の欠失及び置換変異体を用いた解析により、分泌に関わるアミノ酸配列を同定し、必要最小限かつ分泌効率の高い付加配列を決定する。

現在、大腸菌 DH5 株に pMW218-LipB-LipC-LipD と pUC18-scFv-FLAG を導入し、得られた形質転換体を LB 培地で 30、30 時間培養した後、その培養上清より scFv-FLAG を得ることに成功している。より高効率な分泌生産のために、菌株 (BL21 株など)、ベクター (Lip システムを pMW218 よりコピー数が高い pACYC 系ベクターに挿入、scFv-FLAG を pQE、pCold、pET 系ベクターなどの発現制御が可能なベクターに挿入など)、培養条件 (培地、培養温度、誘導のタイミング、誘導剤の濃度、誘導時間など) などについて条件検討を行う。

上記で得られた研究成果を組み合わせ、大腸菌による低分子抗体の大量分泌生産システムを構築する。

4. 研究成果

(1) Lip システムによる scFv の分泌生産の検討

まず初めに、Lip システム (LipB-LipC-LipD) のどのコンポーネントが scFv-FLAG の分泌に関わるのか検討した。T1SS によるタンパク質分泌において、最も細胞質側に位置する ABC

protein が基質認識に関わっていることが明らかにされているため、ABC protein である LipB が scFv-FLAG の分泌に関わっていると想定し、LipB 非存在下における Lip システム (LipC、LipD) による scFv-FLAG の分泌検討を行った。その結果、予想に反して、LipB 非存在下においても scFv-FLAG が分泌され、LipC と LipD が scFv-FLAG の分泌に関与していることが示唆された。続いて、LipC、LipD をそれぞれ単独に発現させ、いずれが、あるいは両方が scFv-FLAG の分泌に関わるのか否かを検討した。その結果、LipC によって scFv-FLAG が分泌されたが、LipD によって分泌はされなかった。このことから、Lip システムを用いた scFv-FLAG の分泌において MFP である LipC が重要な役割を担っていることが示唆された。また、*S. marcescens* Has システム (HasD-HasE-HasF) の MFP である HasE によって scFv-FLAG が分泌するか否かを検討したが、分泌は認められず、scFv-FLAG の分泌は LipC に特異的であることが推測された。

Lip システムによって分泌された scFv-FLAG のアミノ酸配列を解析した結果、C 末端から 17-19 番目に Val-Ala-Leu 配列に類似した Val-Thr-Val が存在することを見出した。scFv-FLAG の分泌にこのアミノ酸配列が関係していることが考えられたため、scFv-FLAG の Val-Thr-Val の Val を Ala に置換した scFv-ATA-FLAG 変異体を作製し、Lip システムによる分泌を調べた。Lip システムによって scFv-FLAG の分泌が確認されたのに対して、scFv-ATA-FLAG の分泌は認められなかったことから、Lip システムによる scFv-FLAG の分泌に C 末端から 17-19 番目にある Val-Thr-Val 配列が重要であることが示唆された。この Val-Thr-Val 配列は V_H domain に由来する配列であるが、相補性決定領域外の配列であり、全ての抗体に保存されているため、他の抗体の分泌にも応用できることが考えられた。

次に、このシステムを利用して大腸菌によって分泌生産された scFv-FLAG が正しくフォールディングされ、抗原への結合能力を持つのか評価した。本研究で用いている scFv は、受容体型チロシンキナーゼの一つである HER2 を認識する Trastuzumab から作製したものであるため、骨肉腫細胞株 U2OS 細胞に HER2 を過剰発現させ、それを用いて細胞蛍光免疫染色を行った。コントロールとして用いたペリプラズム生産した periplasmic scFv-FLAG と同様に、Lip システムによって分泌された scFv-FLAG も HER2 発現 U2OS 細胞に特異的に反応したことから、分泌された scFv-FLAG は正常にフォールディングされ、抗体力価を有することが明らかとなった。

(2) Lip システムによる Nanobody の分泌生産の検討

他の低分子抗体であるラクダ科動物由来 VHH 抗体 (Variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody、Nanobody と呼ばれる) の C 末端側の抗原受容体可変領域の相補性決定領域外にも Val-Thr-Val 配列が保存されていたため、この配列を利用して Nanobody が同様に分泌するか検討した。アミノ酸配列が既知である GFP に対する Nanobody (GFP-Nanobody) の Val-Thr-Val 配列が C 末端から 16-18 アミノ酸の位置になるように FLAG タグを付加した GFP-Nanobody-FLAG 発現プラスミドを構築し、これを Lip システム (LipB-LipC-LipD) とともに大腸菌に導入し、培養液中への分泌を調べた。期待通り、Lip システムにより Nanobody が分泌された。さらに、scFv-FLAG と同様に、GFP-Nanobody-FLAG は LipC 単独によっても分泌され、LipB-LipC-LipD の 3 コンポーネントよりも LipC 単独のほうが GFP-Nanobody-FLAG の分泌量が高いことが判明した。一方、LipC にアミノ酸相同性が高い *Klebsiella aerogenes* MFP や *S. marcescens* HasE によって GFP-Nanobody-FLAG が分泌されるか否かを検討したが、いずれも分泌は認められなかった。また、LipC 発現が宿主大腸菌に細胞障害を引き起こし、その結果、Nanobody が漏洩したことが考えられたため、LDH 毒性試験を行ったが、LipC 発現による細胞障害は認められず、GFP-Nanobody-FLAG の分泌は LipC に依存的であることが示唆された。

T1SS は 3 コンポーネントで機能するため、LipC が単独で GFP-Nanobody-FLAG の分泌を行っている可能性は低く、LipB や LipD に相当する大腸菌タンパク質が存在し、LipC と協調的に働き、GFP-Nanobody-FLAG の分泌を行っていることが考えられる。大腸菌外膜チャネルタンパク質の TolC はいくつかの分泌システムとの共役が可能で、例えば、*S. marcescens* Has システムの OMP である HasF の代わりとして機能し、HasA を分泌することが報告されている。GFP-Nanobody-FLAG の分泌において、TolC が LipD の代替タンパク質として LipC と共役する可能性を考え、TolC 欠損株における GFP-Nanobody-FLAG の分泌を検討した。親株である BW25113 株においては LipC による GFP-Nanobody-FLAG の分泌が確認されたが、TolC 欠損株では LipC による分泌は認められず、GFP-Nanobody-FLAG の分泌に TolC が何らかの関与をすることが推測された。現在、TolC 発現によるレスキュー実験を実施中であり、TolC に関して今後更なる検討が必要である。

次に、Lip システムによる GFP-Nanobody-FLAG の分泌に C 末端側に存在する Val-Thr-Val 配列が関与することを証明するために、Val を Ala に置換させた ATA 変異体を作製し、その分泌を調べた。野生型 GFP-Nanobody-FLAG は LipC によって分泌されたが、ATA 変異体は分泌されず、LipC による GFP-Nanobody-FLAG の分泌には C 末端側に存在する Val-Thr-Val 配列が関与することが確認された。また、GFP-Nanobody-FLAG の C 末端 FLAG タグを HA タグや Myc タグに置換しても LipC によって分泌されることを確認した。一方、FLAG タグの 8 アミノ酸を欠損した GFP-Nanobody や FLAG タグをさらに C 末端に付加した GFP-Nanobody-2 × FLAG では LipC による分泌が認められなかった。これらの結果より、Val-Thr-Val 配列が C 末端から 15 アミノ酸程度に位置することが分泌には重要であることが推測された。

最終的に、N 末端に Strep タグを付加した GFP-Nanobody-FLAG (Strep-GFP-Nanobody-FLAG) を LipC とともに大腸菌に導入し、培養上清を Strep-Tactin Sepharose を用いてアフィニティー精製を行った。その結果、培養液 1L あたり数 mg の精製 Nanobody(SDS-PAGE(CBB 染色) において単一バンドとして検出) を得ることに成功した。また、得られた分泌 Nanobody は、細胞蛍光免疫染色法により抗体力価を有することを確認した。

以上、本研究において、*S. marcescens* Lip システムを利用して、大腸菌培養液 1L あたり数 mg の低分子抗体 (Nanobody 等) の分泌生産システムを構築することができた。これまでの T1SS を利用したタンパク質分泌生産では、3 または 2 コンポーネントの T1SS の発現が必要で、また、分泌タンパク質の C 末端に 100 ~ 200 アミノ酸の長いタンパク質を付加する必要があった。本研究で構築したシステムでは、LipC のみの発現で、且つ、分泌タンパク質の C 末端には 10 アミノ酸程度を付加するのみで分泌生産が可能となった。検討が不十分な点もあり、更なる検討により、培養液 1L あたり 10 mg オーダーの低分子抗体の分泌生産が可能になると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木大地、浜垣秀平、辻明彦、大森謙司、湯浅恵造
2. 発表標題 大腸菌を用いた低分子抗体の分泌生産系の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第48回講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高木大地、浜垣秀平、辻明彦、大森謙司、湯浅恵造
2. 発表標題 Serratia marcescens type 1 secretion systemを利用した大腸菌による低分子抗体分泌生産系の構築
3. 学会等名 第69回 日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森川瑠美、小出（吉田）静代、山下純平、高木大地、辻明彦、大森謙司、湯浅恵造
2. 発表標題 Serratia marcescensへム捕捉タンパク質HasA分泌の分子機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木大地、浅田知範、辻明彦、大森謙司、湯浅恵造
2. 発表標題 Serratia marcescens Lipシステムを利用した大腸菌による低分子抗体分泌生産系の構築
3. 学会等名 第4回 日本生物工学会西日本支部講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	大森 謙司 (OMORI Kenji) (80714352)	名古屋大学・大学院創薬科学研究科・特任教授 (13901)	