

令和 3 年 8 月 21 日現在

機関番号： 87103

研究種目： 基盤研究(C) (一般)

研究期間： 2018 ~ 2020

課題番号： 18K05328

研究課題名 (和文) 認知症治療に向けた2機能型スーパー抗体酵素の開発

研究課題名 (英文) Development of a two functional super catalytic antibody for the treatment of dementia

研究代表者

宇田 泰三 (Uda, Taizo)

公益財団法人九州先端科学技術研究所・マテリアルズ・オープン・ラボ・特別研究員

研究者番号： 20232837

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,400,000 円

研究成果の概要 (和文) : 本研究はアミロイドベータ (A-beta) およびタウタンパクの両方を分解するヒト型スーパー抗体酵素の取得から始め、次いで、それらの可変領域部分をリンカーで繋げたscFv様分子を遺伝子工学的に作製した。ついでA-betaおよびタウのFRET-抗原を合成し、これらに対する分解活性 (ペプチダーゼ活性) を調べた。その結果、このscFv様分子は両抗原を同時に分解することが分かり所期の目的を達成した。さらに、このscFv様分子の95番目に存在するPro95を欠失させる変異を導入したところ、その酵素活性は4-5倍程向上し、かつ、A-betaの凝集を完全に阻止した。これは所期の計画を上回る成果であった

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、複数の抗原を同時に分解できる高性能分子を人為的に作製することを示した点において学術的に高く評価される。また、この新型機能を有する分子薬はこれまで世間には存在しなかったために将来の新型医薬品開発へと繋げる意味合いにおいて社会的に価値がある、と考えられる。

研究成果の概要 (英文) : This study is concerned with simultaneous decomposition of beta-amyloid (A-beta) and Tau protein (Tau). Firstly, we started to gain catalytic antibodies that can degrade A-beta and Tau. Safter that, genetically engineered scFv-like molecules in which their variable region portions were made by combining two molecules of the variable regions by a linker. Then, the FRET-antigens of A-beta and Tau were synthesized, and the degradation activity (peptidase activity) for these synthetic substrates was examined using the scFv-like molecule described above. As a result, it was found that this scFv-like molecule decomposes both antigens at the same time, achieving the intended purpose. Furthermore, when a mutation that deletes Pro95, which is present at the 95th position of this scFv-like molecule, was introduced, its enzymatic activity was improved by about 4 to 5 times, and the aggregation of beta-amyloid was completely blocked. This was a result that exceeded the intended plan.

研究分野： 生物工学、バイオ関連化学

キーワード： beta-amyloid Tau protein catalytic antibody two functional

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者の宇田らは1998年に「細胞融合法により得たモノクローナル抗体の軽鎖に抗原分解活性が存在する」ことを発見し、「スーパー抗体酵素」と名付けた。爾来、多数のスーパー抗体酵素の作製に成功している。この中で、ピロリ菌に対するスーパー抗体酵素では、世界初の動物実験を実施して、マウスの胃内に感染したピロリ菌の除菌に成功した。次に、ヒト型スーパー抗体酵素の開発に取り組み、ヒト抗体軽鎖( $\kappa$ 鎖)の胚細胞遺伝子群 Subgroup II に触媒三つ組残基構造が encode されていることを見出した。そこで、ヒト白血球から kappa 型軽鎖の遺伝子を選択的に取り出してライブラリー化し、その中から数百種類について、遺伝子配列を決定後、クローニングを行い大腸菌に形質転換した。これらの発現・回収・精製を10年間近く行って来た結果、これまでバンク化(抗体酵素タンパク質として保存)したクローン数は数百にのぼる。狂犬病ウイルスやインフルエンザウイルス、さらには、がん細胞に対して効果を示す完全ヒト型スーパー抗体酵素はこうして作製された。ヒト型スーパー抗体酵素は *in vivo* 実験で有効性を示すと同時に、安全性試験においても毒性は認められていない。最近、この抗体酵素バンクから、認知症の2大原因物質である、 $\beta$ -amyloid および Tau タンパク質をターゲットにしてスクリーニングを実施した。するとスーパー抗体酵素(A)および(B)が、共に高いペプチダーゼ活性を示すと共に、それぞれ、 $\beta$ -amyloid および Tau タンパク質を分解した。さらに驚くことに世界的に話題となっている免疫チェックポイント分子 PD-1 を分解するヒト型スーパー抗体酵素を見出すまで至っており、この分野の研究が急進展してきた。

そこで本研究では、上述したように、認知症の2大原因物質として、 $\beta$ -amyloid および Tau タンパク質が知られている中で、この両物質を標的として、両者を同時に分解するための「2機能型スーパー抗体酵素」を作製する事を順次進めて行く事を計画し本課題を達成しようとするものである。

### 2. 研究の目的

厚労省発表(厚労省オレンジプラン)では2025年には認知症患者が700万人に達し、65歳以上では5人に1人が認知症になると予想している。こうした背景を考えれば、認知症の治療薬あるいは進行を抑える薬の開発は喫緊の課題である。

認知症薬として開発のターゲットに挙げられているのは、脳に沈着し脳の神経細胞を侵すと言われている $\beta$ -amyloid と Tau タンパク質の両分子である。この2つが現在主要な原因物質として知られている。 $\beta$ -amyloid については抗体医薬品(アデュカヌマブ、ソラネズマブ等)があり、どちらも $\beta$ -amyloid を減じる効果があるが期待したほどの効果は出ていない。Tau タンパク質についての抗体医薬の開発は遅れている。

抗体医薬が $\beta$ -amyloid を減じるのは、抗体が刺激となってグリア細胞を呼び込み、このグリア細胞が $\beta$ -amyloid を減少させるからである。抗体そのものには $\beta$ -amyloid を分解できる能力は無いので細胞のような他の助けが必要となる。この点が大きな問題で効果的な治療薬が出来ない核心部分である。これを解決するには、 $\beta$ -amyloid と Tau を直接的に分解する事が最良策である。申請者らが開発したスーパー抗体酵素はそれ自体で $\beta$ -amyloid や Tau を直接分解できる。本研究では、両方の抗体酵素を組み合わせハイブリッド化した「2機能型スーパー抗体酵素」を合成し、一挙に両原因物質を取り除く事を目指す。これにより、一挙に両原因物質を除去する高機能医薬品の開発に繋げる。

### 3. 研究の方法

(1) 「2機能型スーパー抗体酵素」の合成:

遺伝子工学的合成法

(3)-1 「2機能型スーパー抗体酵素」の合成:

2つの異なるスーパー抗体酵素 ((A)が $\beta$ -amyloidを分解、(B)がTauタンパク質を分解)を図1の様に、遺伝子工学的にscFv型として作製する(この場合は異なる2つの抗体酵素(軽鎖)をリンカーで繋ぐ)。この手法は通常のscFv作製と同様なので特に問題はない発現量が低い場合には培養温度、IPTG濃度、vectorの種類、大腸菌の種類などいくつか条件を変えて、最適なものを選び出す。

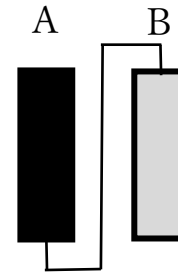


図1 遺伝子工学的合成法 (scFv-like molecule VL:軽鎖可変領域)

(3)-2 「2機能型スーパー抗体酵素」の性能測定

上記で合成した「2機能型スーパー抗体酵素」を用いて、 $\beta$ -amyloid 単独および Tau タンパク単独の場合におけるそれぞれの分解能、および、両者を混合した状態における分解能を調べ、次に繋げる基礎データを採取する。なお、この実験で必要となる2種類のFRET抗原(FRET- $\beta$ -amyloidとFRET-Tau)を化学合成する。

4. 研究成果

(4)-1  $\beta$ -amyloid(A $\beta$ )に対する抗体酵素合成基質FRET-A $\beta$ をsubstrateに用いて、100種類以上の抗体酵素バンクのscreeningを行ったところ、複数のクローンでFRET-A $\beta$ を分解する事を見出した。中でも特に#7TRクローンは発現量・FRET-A $\beta$ 分解性能ともに良好なので(図2)、この可変領域をscFv様分子の片側(A側:図1)に用いた。#7TRのアミノ酸配列を下記に示す。

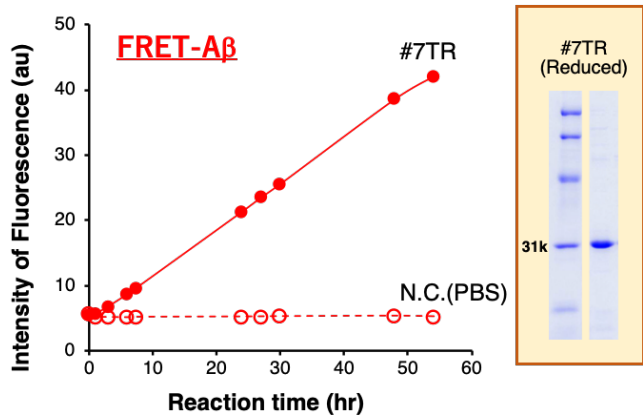


図2 #7TRによるFRET-A $\beta$ の分解活性 (右側に精製した#7TRのSDS-PAGEの結果を示す)

NH2-Met Asp Val Val Met Thr Gln Ser

Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser  
 Leu Leu His Ser Asn Thr Arg Asn Tyr Leu sp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr  
 Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys-  
 COOH

(4)-2 Tauタンパク質を分解する抗体酵素:

Tauタンパク質は約440のアミノ酸を有するタンパク質であるが、そのアミノ酸配列の中には特徴的な領域がいくつか存在する。本研究では、2つの配列、C末側(391-408番目: Tau-C peptide)およびN末側(19-30番目: Tau-N peptide)に着目し、それぞれをFRET化してスクリーニング

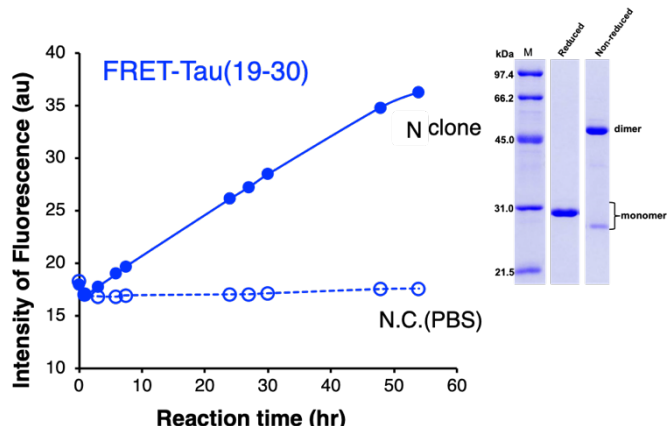


図3 NクローンによるFRET-Tau peptideの分解活性 (右側に精製したNクローンのSDS-PAGEの結果を示す)

を行い、その中から活性のあるものについて性質を解明した。その結果、Tau-C peptide については、抗体酵素 C1 & C2 を見出した。C1 は Val399-Ser400 間を、C2 は Gly401-Asp492 間を切断し、両クローンで切断部位が異なっていた。一方、Tau-N peptide については、98 種類の軽鎖クローンについてスクリーニングを実施したところ、強く分解するクローンが 1 種類(N1)を見出した。その切断サイトは Asp22-Arg30 間であった。さらなる検討を行ったところ、C 末側配列(391-408 番目: Tau-C peptide)および N 末側配列(19-30 番目: Tau-N peptide)に対する抗体酵素を見出した。これらのうち、C 末側を分解する C1 および C2 クローンよりも、N 末側配列を分解する N1 クローンの方が、より高い分解性能を示した。

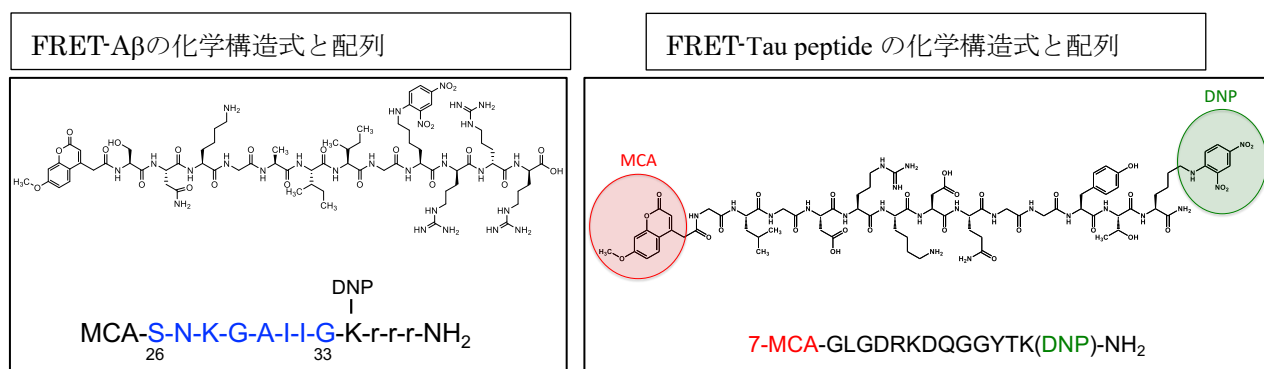
#### (4)-3 2 機能型スーパー抗体酵素の作製:

上記で見出された抗体酵素の中から都電点などを考慮して、#7TR(for Aβ)およびNクローン (for Tau)を scFv 様分子の A 側および B 側として特定し、両遺伝子を長さ 45 base のリンカーで結んだ scFv 様分子の合成(全長のサイズは 740 base)をした。scFv 様分子の遺伝子を大腸菌に形質転換し、IPTG による発現を試みたが、可溶性に発現してくる scFv 蛋白質は、単独で発現させた#7TR とくらべて少量であった。これを通常の Ni-NTA カラムクロマトに掛けて精製した。それを、それぞれ FRET-Aβ および FRET-tau の substrate を用いて両ペプチドに対する反応性を調べた。その結果、scFv 様分子は 1 分子でありながら、それぞれのペプチド抗原を分解した。

#### (4)-4 2 機能型スーパー抗体酵素のβ-amyloid および Tau タンパク質に対する分解活性

本研究課題を効率的に進めるために、両抗原に対する FRET-Aβ および FRET-tau を化学合成し、両合成基質を用いてそれぞれに対する反応性を調べた。その結果、2 機能を 1 分子に閉じ込めた scFv 様分子は、それぞれのペプチド抗原を分解した。

下図に FRET-Aβ および FRET-tau peptide の化学構造とそのアミノ酸配列を示す。MCA は蛍光基、DNP は消光基を示す。



#### (4)-5 変異導入による 2 機能型スーパー抗体酵素の活性向上

当グループではすでに、抗体軽鎖の超可変領域(CDR)-3 に存在する Pro95 を欠失させると抗体軽鎖が酵素活性を新たに獲得したり、あるいは、その活性が大幅に向上することを見出している。そこで、本研究でもこの思想を取り入れた実験を試みた。#7TR および N クローンの軽鎖可変領域の Pro95 を欠失させた変異型 scFv 型 2 機能抗体酵素を作製し、FRET-A $\beta$ および FRET-Tau に対する分解活性を調べたところ、それぞれの合成基質 FRET-A $\beta$ および FRET-Tau に対して変異を導入しない scFv 型 2 機能抗体酵素と比べると、前者の活性が後者の活性の 4-5 倍高い事を見出した。即ち、本手法で 2 つの抗原を同時に分解する高活性な 2 機能型抗体酵素の作製が可能となった。図 4 には、変異導入した scFv 型 2 機能抗体酵素と変異を導入しない scFv 型 2 機能抗体酵素を用いた合成基質 FRET-A $\beta$ に対する反応プロファイルを示した。

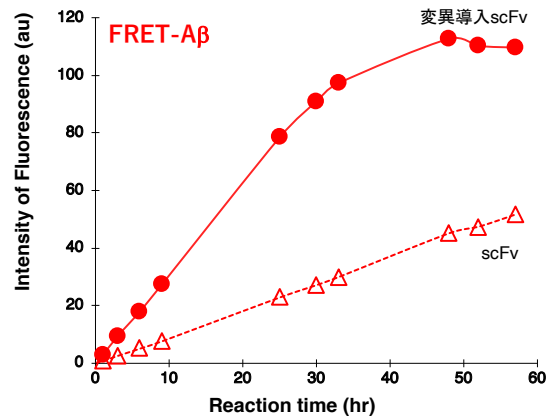


図 4 変異型および変異導入しない scFv 型 2 機能抗体酵素の FRET-A $\beta$ に対する分解活性の比較

<引用文献>

1) Hifumi, E., Taguchi, H., Tsuda, H., Minagawa, T., Nonaka, T., Uda, T. *Science Advances*, **6**(13), eaay6441(2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroaki Taguchi, Yuki Kato, Taminao Ito, Emi Hifumi, and Taizo Uda	4. 巻 56
2. 論文標題 Discovery of Antibody Light Chains Possessing Tau Protein- Hydrolyzing Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Peptide science 2019	6. 最初と最後の頁 139-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroaki Taguchi, Iida Yuki, Mao Oba, Yoshio Fujita, Emi Hifumi, Taizo Uda	4. 巻 55
2. 論文標題 Discovery of antibody light chains capable of hydrolyzing tau protein using fluorescence- quenched substrate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Peptide science 2018	6. 最初と最後の頁 40-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Taizo Uda, Hiroaki Taguchi, Emi Hifumi
2. 発表標題 Unique antigenases to enzymatically cleave Tau peptides at C- and N-terminal moieties
3. 学会等名 The 12th ECCE(European Congress of Chemical Engineering) & 5th ECAB(European Congress of Applied Biotechnology) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口 博明、伊藤 民直、加藤 佑規、一二三 恵美、宇田 泰三
2. 発表標題 Discovery of Antibody Light Chains Possessing Tau Protein- Hydrolyzing Activity
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田口 博明、伊藤 民直、加藤 佑規、一三三 恵美、宇田 泰三
2. 発表標題 タウタンパク質を加水分解する抗体酵素の開発
3. 学会等名 第38回日本認知症学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇田泰三、田口博明、一三三恵美
2. 発表標題 2種類の抗原(Tau&A )を同時分解する2機能型抗体酵素の作製と性質
3. 学会等名 第100春季日本化学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口 博明、伊藤 民直、加藤 佑規、一三三 恵美、宇田 泰三
2. 発表標題 タウタンパク質のリピート2部分を加水分解する抗体酵素の開発
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroaki Taguchi, Iida Yuki, Mao Oba, Yoshio Fujita, Emi Hifumi, Taizo Uda
2. 発表標題 Discovery of Antibody Light Chains Capable of Hydrolyzing Tau Protein Using Fluorescence-Quenched Substrate
3. 学会等名 10th international peptide symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宇田泰三・田口博明・一二三恵美
2. 発表標題 Tauペプチドを分解するヒト型抗体軽鎖
3. 学会等名 第99春季日本化学会年会
4. 発表年 2019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
研究分担者	田口 博明 (Taguchi Hiroaki) (20549068)	鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授  (34104)	
研究分担者	一二三 恵美 (Hifumi Emi) (90254606)	大分大学・全学研究推進機構・教授  (17501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------