

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14059

研究課題名（和文）異種ナノ材料の集積を可能とするナノ界面接合抗体のボトムアップデザイン

研究課題名（英文）Bottom-up design of anti-material bispecific antibodies for the formation of hetero-nanocomposite materials

研究代表者

二井手 哲平（Niide, Teppei）

大阪大学・情報科学研究科・助教

研究者番号：20802705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ナノ材料界面を特異的に認識する低分子抗体分子をデザインして、異種ナノ材料の連結と生成した異種ナノ材料のヘテロ複合体の利用を試みた。さらに、材料認識低分子抗体の発現量と安定性を克服するための計算機支援によるタンパク質設計に取り組んだ。まず、金表面を認識する抗金抗体と酸化亜鉛表面を認識する抗酸化亜鉛抗体の二種類の抗体を遺伝子工学的に融合させた金-酸化亜鉛接合抗体を作製した。これを用いて、金ナノ粒子と酸化亜鉛ナノ粒子の集積化を実施したところ、金ナノ粒子と酸化亜鉛ナノ粒子は自発的に接着してヘテロ複合体を形成した。このことから、異種ナノ材料を集積を可能とするナノ界面接合抗体の設計に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ材料を基本単位としてボトムアップ的に構築される超構造体は、トップダウンでは達成できないユニークな物性が発現するため、次世代デバイスにおける新たな構成材料として着目されている。本研究ではナノ材料を連結する手法論として、タンパク質の分子認識能に着目し、ナノ材料の連結に挑戦した。タンパク質を用いた異なるナノ材料を繋ぐアプローチは、ナノ材料のヘテロ構造体を調製するための1つの技術として位置付けられ、またバイオミネラルへの適用も期待できることから、生体分子と材料の研究手法に新しい選択肢を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Herein we present a potential strategy for synthesizing heterogeneous nanomaterial composite structures using small bispecific antibodies recombinantly constructed from material-binding antibody fragments. The prepared composite structure could be utilized for the synthesis of various bulk materials controlled with a nano-scale. In addition, we worked on computationally assisted protein design to overcome nanomaterial-recognized antibody fragments' expression level and stability. When the anti-gold/zinc oxide antibody was used to integrate gold nanoparticles and zinc oxide nanoparticles, the gold nanoparticles and zinc oxide nanoparticles were adhered to each other to prepare hetero-composites spontaneously. Therefore, we have successfully designed a nano-interface bonding antibody that enables the integration of different nanomaterials.

研究分野：生物化学工学

キーワード：タンパク質工学 抗体工学 ナノ材料 計算科学

### 1. 研究開始当初の背景

新しい価値やサービスが次々と創出される「超スマート社会の実現」に向け、デバイスの高密度化・高速化技術の元となる新しいコア技術・素材の開発が重要になり、これまでのトップダウン的なデバイス構築から、より高速・高精度な情報処理が期待できるナノ材料によるボトムアップ的なデバイス構築が注目を集めている。ナノ材料集積体はナノ材料本来の物理特性が相乗的に増強することが知られているが、ナノ材料間の距離や整列パターンが特性に大きく影響するため、まずは、ナノ材料構造体の構造と物理特性を相互に評価できる設計指針が必要である。しかし、現在の集積化手法は適応できるナノ材料種の豊富さ（汎用性）と設計できる集合体の構造種（設計自由度の高さ）はトレードオフの関係にあるためナノ材料集積体の種類は殆ど無く、デバイスへのナノ材料の適用は進んでいない現状がある。

### 2. 研究の目的

ナノ材料を基本単位としてボトムアップ的に構築される超構造体は、トップダウンでは達成できないユニークな物性が発現するため、次世代デバイスにおける新たな構成材料として着目されている。ナノ材料集合体を作製するには、滴下・乾燥操法、LB 膜法、DNA 連結法のいずれかが用いられてきたが、「適用できるナノ材料少なさ」と「設計自由度の低さ」が課題となっていた。ナノ材料界面は、様々な物理現象の反応場として注目されるホットスポット領域にも関わらず、その界面環境を汎用的かつ確実に作製できる手法論は知られていない。これを受け、汎用性と高い設計自由度が両立するナノ材料集積化法を実現することができれば、ナノ材料集積体のデバイス応用を加速させ、これまでにないナノ材料集積体が創造できると考えた。そこで、全てのナノ材料に適応可能かつ、設計自由度の高さを兼ね備えたナノ材料連結技術の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 金ナノ粒子と酸化亜鉛ナノ粒子を繋ぐ材料認識抗体の作製と金多孔質膜作製への応用

金表面を認識するラクダ抗体断片 E32 VHH と酸化亜鉛表面を認識するラクダ抗体断片 4F2 VHH を連結した二重特異性抗体（4F2-E32 VHH）を作製することによって、金ナノ粒子と酸化亜鉛ナノ粒子が高密度に連結した金-酸化亜鉛複合膜を調製し、そこから金多孔質膜をボトムアップ的に調製した。このとき、金ナノ粒子のサイズを 5-100 nm と変化させることで、材料認識二重特異性抗体の結合能力の評価を行なった。また、金多孔質膜作製において、複合体を焼結させる温度を 200-400°C まで変化させることで、得られる金多孔質膜の形状変化を観察した。

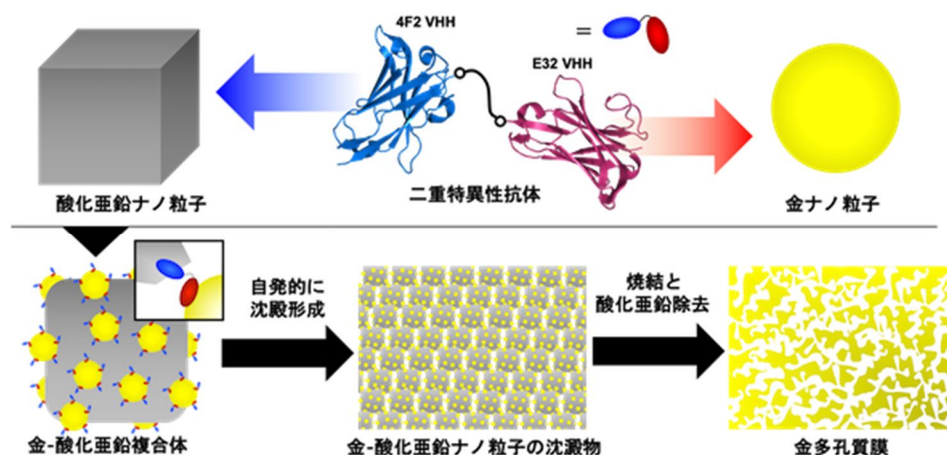


図1 材料認識二重特異性抗体による金-酸化亜鉛複合体の形成と金多孔質膜の調製

#### 3-2. 計算科学を利用した材料認識抗体の設計

原子レベルでの可視化と変異体設計・評価が計算機上で迅速に実現可能な、計算機支援によるタンパク質設計技術を取り入れることで、機能と構造安定性が両立する材料認識タンパク質の設

計を実施した。具体的には、複数の足場タンパク質を標的へ様々な角度からドッキングさせ、構造安定性に関与しない位置のアミノ酸を変異させることで、候補タンパク質をデザインした。その中から、計算機上でスコアの良い変異体 6 万種を酵母表層に提示させ、生化学実験により結合能を評価した。

#### 4 . 研究成果

##### 4-1. 金ナノ粒子と酸化亜鉛ナノ粒子を繋ぐ材料認識抗体の作製と金多孔質膜作製への応用

まず、金ナノ粒子と酸化亜鉛ナノ粒子が 4F2-E32 VHH により架橋されるかを観察した。その結果、4F2-E32 VHH の添加により、金ナノ粒子と酸化亜鉛ナノ粒子から構成される膜状の金-酸化亜鉛複合体が得られた。ここで、金ナノ粒子のサイズを 5–100 nm に変化させて金-酸化亜鉛ナノ粒子の沈殿物を観察したところ、20–100 nm で自発的な沈殿物形成が観察できた。次に、金ナノ粒子の低温での融解特性と酸化亜鉛の希酸溶解特性を利用して金-酸化亜鉛複合膜からの金多孔質膜の作製を試みた。その結果、金ナノ粒子サイズ 20 nm で 250 °C、50 nm と 100 nm で 300°C で均一

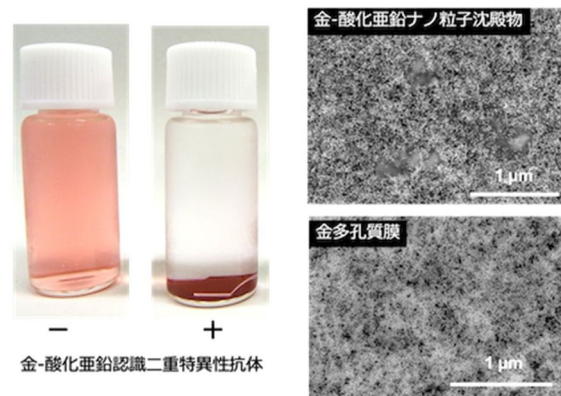


図 2 金-酸化亜鉛認識二重特異性抗体を介した金-酸化亜鉛複合体の形成と金多孔質膜の調製

な細孔を持つ金多孔質膜の形成が確認できた。特に、20 nm の金ナノ粒子で調製した金多孔質膜は 50nm 以下の空隙を持つ緻密な多孔構造を持つことが分かった。更にエネルギー分散型 X 線分析の結果、これら金多孔質膜は金原子のみで形成されていることが明らかとなった。これより、材料表面に高親和な抗体を利用して接合分子を設計することで、ナノ材料を連結できることが示され、本手法はナノ材料の積木細工的な自己組織化の新規手法論として期待できる。

(研究成果： Langmuir, 35 (8), 3067–3076 (2019))

##### 4-2. 計算科学を利用した材料認識抗体の設計

ナノ界面接合抗体の構造と、それにより得られるナノ材料集合体の構造と構造的関係性を評価することで、ナノ材料集積体の構造と物理特性を相互に評価できる集積化指針を示すことに取り組んだ。そのなかで、材料認識抗体の発現量と安定性に課題が生じる確率が高かったため、計算機支援によるタンパク質設計に取り組んだ。計算機によるタンパク質設計の適用により、材料認識抗体の発現量と安定性の課題は解決できることが示せた一方で、結合機能の減少が生じやすい傾向があることが明らかとなった。これは、ナノ材料とタンパク質間のスコア関数が現実とシミュレーションで乖離があることが示唆された。今後スコア関数の見直しが必要となるが、本研究結果は計算機による材料認識抗体設計において有効な設定指針の第一歩となった。

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 Nakazawa Hikaru, Onodera-Sugano Tomoko, Sugiyama Aruto, Tanaka Yoshikazu, Hattori Takamitsu, Niide Teppei, Ogata Hiromi, Asano Ryutarō, Kumagai Izumi, Umetsu Mitsuo	4. 巻 160
2. 論文標題 Association behavior and control of the quality of cancer therapeutic bispecific diabodies expressed in <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 107636 ~ 107636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bej.2020.107636	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 Niide Teppei, Manabe Noriyoshi, Nakazawa Hikaru, Akagi Kazuto, Hattori Takamitsu, Kumagai Izumi, Umetsu Mitsuo	4. 巻 35
2. 論文標題 Complementary Design for Pairing between Two Types of Nanoparticles Mediated by a Bispecific Antibody: Bottom-Up Formation of Porous Materials from Nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 3067 ~ 3076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.8b03687	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 二井手 哲平、スィーカー デイビッド、クールマン ブライアン
2. 発表標題 免疫細胞の活性機能調節を目指したin silicoタンパク質設計
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teppei Niide, David Thieker, Matthew Cummins, Brian Kuhlman
2. 発表標題 Rationally Designing Active Ga Protein Inhibitors for Signal Transduction Regulation
3. 学会等名 Winter RosettaCON（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 難水溶性薬物の複合体及びその製造方法	発明者 二井手哲平, 梅津光 央, 中澤光	権利者 東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、P20180329	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

ホームページ等 <a href="http://www-shimizu.ist.osaka-u.ac.jp/hp/index.html">http://www-shimizu.ist.osaka-u.ac.jp/hp/index.html</a> JST ACT-X領域会議にて本成果の一部を発表（2021年1月25日）
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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		
米国	ノースカロライナ大学チャペル ヒル校		