

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670023

研究課題名(和文)非天然型アミノ酸を有する新規機能性抗体の安定的生産システムの開発

研究課題名(英文)Development of a system for stable expression of antibodies bearing non-natural amino acids at defined sites

研究代表者

樋野 展正 (HINO, Nobumasa)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90469916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非天然型アミノ酸を部位特異的に含有する抗体を生産するには、サブレスサー-tRNAと呼ばれる外来tRNAを効率的に発現する細胞株の取得が必要である。tRNAの発現効率を改善するため、外来tRNAを内在性tRNAと同じく核小体から発現させることを目指したベクターを構築した。実際に、これらのベクターを用いることで、タンパク質への非天然型アミノ酸導入効率を2倍程度に向上させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：For stable production of antibodies with non-natural amino acids at specific positions, it is necessary to establish cell lines that constitutively and efficiently express exogenous amber suppressor tRNAs. To improve expression efficiency of the exogenous tRNAs, I attempted to develop a system that enables to express them from the nucleolus where cellular tRNAs are transcribed. I constructed tRNA expression vectors containing 5S rDNA sequences or genomic sequences surrounding cellular tRNA genes, which are expected to localize themselves to nucleolus. These vectors successfully increased the expression of the amber mutant of GFP by 1.5- to 2-fold as compared with the vector that contains tRNA genes alone.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：拡張遺伝暗号 非天然型アミノ酸 tRNA 抗体薬物複合体

## 1. 研究開始当初の背景

抗体分子に対して抗がん剤などの低分子化合物を付加し、新たな機能性抗体を作製する試みが世界的に進められている。従来、低分子がランダムに結合することによる薬効のばらつきや毒性が問題になっていたが、2008年に米 Genentech 社の研究者らが、抗体分子中に導入したシステイン残基を低分子化合物で特異的に修飾する方法を発表して以来、この方法が抗体-薬物複合体作製のスタンダードとなりつつある。しかしながら、抗体のジスルフィド結合の巻き戻しが非常に難しい点や、他のシステイン残基も修飾される恐れがあるなど制約も多い。我々は、哺乳類培養細胞内でタンパク質の望みの部位に「非天然型アミノ酸」を導入できるシステムを世界に先駆けて開発してきた (Hino, N. *et al. Nat. Methods* (2005), *Nat. Protoc.* (2007)). この方法を使えば、低分子化合物を非天然型アミノ酸導入部位に特異的に付加することができるので、抗体の本来の構造・機能を保持した抗体-薬物複合体を生産するための新たなプラットフォームを構築できる可能性がある。

哺乳類培養細胞を用いて非天然型アミノ酸含有タンパク質を生産するためには、終止コドンのひとつであるアンバー・コドン (UAG コドン) を翻訳するためのサブプレッサー-tRNA と、その tRNA に特異的に非天然型アミノ酸を結合させるアミノアシル tRNA 合成酵素変異体を、細胞中に安定的に発現させる必要がある。アンバー・コドンへのサブプレッサー-tRNA の結合は翻訳終結因子 eRF1 と常に競合するため、非天然型アミノ酸導入効率は一過性発現において 20%程度である。しかしながら、サブプレッサー-tRNA 遺伝子の安定導入細胞株を単離して同様の実験を行うと、アミノ酸導入効率は 3%程度に落ちてしまう (Young, J. F. *et al. Science* 1983).

サブプレッサー-tRNA の持続的高発現が難しい理由として、tRNA 遺伝子がサイレンシングされるか、もしくは転写された tRNA のプロセッシングや塩基修飾などの成熟過程に問題が生じている可能性が考えられる。真核生物のゲノム中では、tRNA 遺伝子は各染色体上に分散して存在しているが、空間的には核小体近傍に局在して積極的に転写されることが明らかになっている (Thompson, M. *et al. Science* 2003). さらに、転写された tRNA 分子は核小体周辺に局在する酵素によってプロセッシングおよび修飾を受けることで成熟し、細胞質へと輸送されて機能する。これらのことから、機能的な tRNA 分子が持続的に発現するには、その tRNA をコードする遺伝子の染色体上での位置が重要であると予想される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、外来サブプレッサー-tRNA を内在性 tRNA と同じような環境で転写させる仕組みを作ること、これまで困難とされてきたサブプレッサー-tRNA の安定発現細胞株の樹立を行うことにある。上記のように、tRNA 遺伝子は核小体で転写・成熟を受けることが知られている。そこで、以下の2つの戦略でサブプレッサー-tRNA を核小体から持続的に発現させる仕組みの構築を試みる。

(1) 核小体局在化配列とサブプレッサー-tRNA 遺伝子を含むベクターを構築し、このベクターを用いて tRNA 安定発現細胞株を樹立する。

(2) 宿主ゲノム中の核小体局在領域に対してサブプレッサー-tRNA 遺伝子を挿入し、tRNA 安定発現細胞株を樹立する。

## 3. 研究の方法

・サブプレッサー-tRNA 遺伝子の選択

サプレッサー-tRNA 遺伝子としてはグラム陽性桿菌 *Bacillus stearothermophilus* から単離されたチロシン tRNA アンバー・サプレッサー (BYR) を用いた。この tRNA と大腸菌由来チロシル tRNA 合成酵素の変異体を哺乳類培養細胞中に共発現させることによって、アンバー・コドンに対して様々な非天然型アミノ酸を特異的に導入することが可能である (Sakamoto, K. *et al. Nuc. Acid Res.* 2002, Hino, N. *et al. Methods Mol. Biol.* 2012)。

#### ・核小体局在化を狙ったサプレッサー-tRNA 発現ベクターの構築

外来サプレッサー-tRNA 遺伝子を核小体で転写させることを目的とし、核小体への局在を誘導する機能を持つとの報告がある 5SrRNA 遺伝子配列とサプレッサー-tRNA 遺伝子配列を併せ持つベクターを構築した。同様に、この 5SrRNA 遺伝子配列をタンデムに 4 個並べたベクターの構築を行った。また、サプレッサー-tRNA 遺伝子配列の前後に宿主 tRNA 遺伝子の周辺配列を配置したベクターの構築を行った。

#### ・成熟サプレッサー-tRNA の発現量の評価

新規に構築したベクターを用いた場合に成熟した tRNA の発現量が向上するかどうかを検証した。ヒト胎児腎細胞に由来する 293 c18 細胞もしくはチャイニーズハムスター卵巣細胞株である CHO 細胞に対し、17 番目のコドンをアンバー・コドンに置換した GFP 遺伝子を搭載するベクター、非天然型アミノ酸としてアジドフェニルアラニンを認識するよう改変された大腸菌由来チロシル tRNA 合成酵素 (以下、AzPheRS とする) の遺伝子を搭載するベクターとともに、各種サプレッサー-tRNA 遺伝子搭載ベクターを導入した。培地中にアジドフェニルアラニン (AzPhe) を添加すると、上記酵素とサプレッサー

tRNA の働きにより GFP 遺伝子中のアンバー・コドンに対してこのアミノ酸が取り込まれ、GFP が発現して蛍光を発する。この蛍光強度を指標に、サプレッサー-tRNA の発現量について検討した。

#### 4. 研究成果

上記目標を達成するための解決策は、外来サプレッサー-tRNA 遺伝子を内在性 tRNA 遺伝子の存在するゲノム領域あるいはその他の核小体局在領域に組み込むことであるが、特定のゲノム領域を核小体へと誘導する機構が明らかになっていないため、ゲノム中のどの領域にサプレッサー-tRNA 遺伝子を挿入するかの指標が無い状態である。そこで、まず、宿主 tRNA 遺伝子が存在するゲノム領域もしくはそれ自身が核小体局在化能を持つという報告がある 5SrRNA 遺伝子配列を含むベクターを構築し、そのベクターにサプレッサー-tRNA 遺伝子を搭載することで、tRNA の発現量にどのような影響が生じるのかを調べることにした。

293 c18 細胞に対して、サプレッサー-tRNA 遺伝子を 9 個並べたベクター、もしくはサプレッサー-tRNA 遺伝子の近傍に 5SrRNA 遺伝子を配したベクター (それぞれ 9xBYR, 1x5SrRNA+9xBYR とする) を、アンバー・コドンを導入した GFP の遺伝子および AzPheRS の遺伝子を搭載したベクターとともに導入した。培地中にアジドフェニルアラニンを加えた際に発現する GFP の蛍光強度を測定したところ、5SrRNA 遺伝子とサプレッサー-tRNA 遺伝子を搭載したベクターを用いた場合には、5SrRNA 遺伝子配列を持たないベクターを用いた場合に比べて、サプレッサー-tRNA の発現量が 1.5 倍程度に向上することがわかった。一方で、5SrRNA 遺伝子をタンデムに 4 つ配したサプレッサー-tRNA 遺伝子搭載ベクター (4x5SrRNA+9xBYR とす

る)を用いた場合には、5SrRNA 遺伝子配列を1個配置したベクターを用いた場合と比べて tRNA 発現量の向上は見られなかった。このことから、5SrRNA 遺伝子配列は近傍の suppressor-tRNA 遺伝子の発現量を向上させる働きを持つことが示唆されたが、5SrRNA 遺伝子配列を複数並列したとしても tRNA 発現量の増加は見込めないことがわかった(図1)。

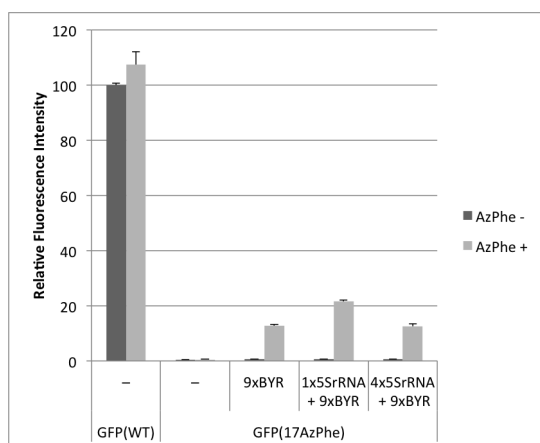


図1 5SrRNA 遺伝子配列が近傍の suppressor-tRNA 遺伝子の発現に与える影響。野生型 GFP (GFP(WT)) を発現させた際の蛍光強度を 100 とし、それぞれの tRNA 発現ベクターを用いて AzPhe 含有 GFP (GFP(17AzPhe)) を発現させた際の蛍光強度を相対的に示す。黒のバーは AzPhe 非添加、灰色のバーは AzPhe 添加時の蛍光強度を示す。

次に、より生理的な tRNA 遺伝子の転写環境を再現するため、 suppressor-tRNA 遺伝子の前後に宿主 tRNA 遺伝子のゲノム周辺配列を約 1Kbp ずつ配置したベクターを構築し、周辺配列が tRNA 遺伝子の転写に及ぼす影響を調べた。CHO-K1 細胞に対して、 suppressor-tRNA 遺伝子のみを持つベクター、もしくは suppressor-tRNA 遺伝子の前後にゲノム tRNA 周辺配列を配したベクター(それぞれ BYR, BYR + genomic seq. とする)を、アンバー・コドンを導入した GFP の遺伝子および AzPheRS の遺伝子を搭載したベクターとともに導入した。培地中に AzPhe を加えた際に発現する GFP の蛍光強度を測定したところ、 suppressor-tRNA 遺伝子の前後に

ゲノム配列を搭載したベクターを用いた場合には、当該配列を持たないベクターを用いた場合に比べて、 suppressor-tRNA の発現量が 2 倍程度に向上することがわかった(図2)。これらの結果は、 suppressor-tRNA の安定発現細胞株を樹立する上でその遺伝子を挿入するゲノム領域として、5SrRNA 遺伝子近傍あるいは宿主 tRNA が存在する領域が有力な候補であることを示している。

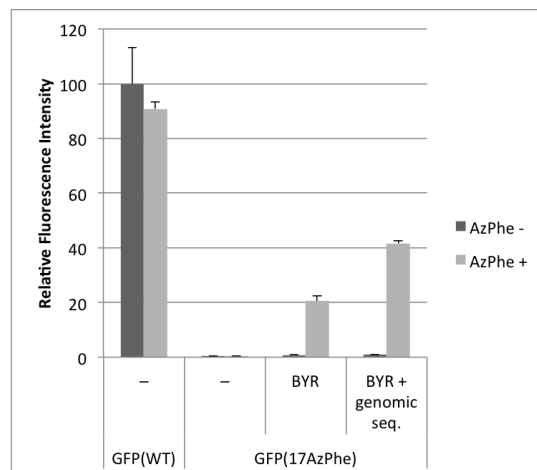


図2 宿主ゲノム tRNA 遺伝子の周辺配列が suppressor-tRNA 遺伝子の発現に与える影響。野生型 GFP (GFP(WT)) を発現させた際の蛍光強度を 100 とし、それぞれの tRNA 発現ベクターを用いて AzPhe 含有 GFP (GFP(17AzPhe)) を発現させた際の蛍光強度を相対的に示す。黒のバーは AzPhe 非添加、灰色のバーは AzPhe 添加時の蛍光強度を示す。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Okada, Y., Funahashi, N., Tanaka, T., Nishiyama, Y., Yuan, L., Shirakura, K., Turjman, A. S., Kano, Y., Naruse, H., Suzuki, A., Sakai, M., Zhixia, J., Kitajima, K., Ishimoto, K., Hino, N., Kondoh, M., Mukai, Y., Nakagawa, S., García-Cardena, G., Aird, W. C., Doi, T.” Endothelial cell-specific expression of roundabout 4 is regulated by differential DNA methylation

of the proximal promoter.”*Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1531-1538, (2014).

(査読有)

DOI: 10.1161/ATVBAHA.114.303818.

〔学会発表〕(計3件)

1. 喜多絢海、一瓢奨、樋野展正、土井健史  
「非天然型アミノ酸含有タンパク質の安定生産系の構築」日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会 / 2014年6月 大阪

2. 一瓢奨、喜多絢海、張功幸、高島成二、樋野展正、土井健史  
「プローブ転移能を有する光クロスリンカーを用いた細胞内タンパク質間相互作用解析法の開発」日本ケミカルバイオロジー学会第9回年会 / 2014年6月 大阪

3. 一瓢奨  
「タンパク質間の相互作用部位の解析を可能にする細胞内光クロスリンク技術の開発」第13回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2014 / 2014年9月 富山

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋野 展正 (HINO, Nobumasa)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：90469916