

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670206

研究課題名(和文) タンパク質の高次構造情報に基づく医薬分子設計に向けた基盤的技術の創出

研究課題名(英文) Development of a de novo designed molecule to develop structure-based vaccine against anthrax

研究代表者

大西 なおみ(Ohnishi, Naomi)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・研究員

研究者番号：50507217

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)：本研究は新規抗炭疽ワクチンの開発に結実させることを最終目的とする。そこで、既に明らかになっている炭疽菌毒素タンパク質複合体の四次構造を標的とし、計算科学的手法により毒素複合体上の任意の領域と一致する分子表面形状を呈示する人工タンパク質を設計するための理論の構築を行った。研究期間内には少なくとも3分子の構造設計を行い、実際に作出して構造解析ならびに生化学的解析を行うことで分子設計手法の理論の妥当性を評価した。また、新学術領域「ゲノム支援」の2015年度の支援課題に採択され、国内外で深刻なアウトブレイクを引き起こした炭疽菌株ならびに炭疽菌に近縁のセレウス菌強毒株の全ゲノム情報を得た。

研究成果の概要(英文)：Anthrax is a lethal disease caused by the Gram-positive, spore-forming bacterium *Bacillus anthracis*. However, a safe and effective vaccine for humans is not available to the general public. A previous study showed that immunization with oligomerized protective antigen (PA) of *B. anthracis* neutralized *B. anthracis* toxicity more effectively than did monomeric PA. The aim of this study was to construct a de novo designed PA antigen based on structural information on PA heptamer. We calculated characteristic parameters of surface area of the PA heptamer and constructed three fully synthetic de novo designed molecules. The designed molecule was expressed in *E. coli* and then purified using column chromatography. We performed structural analysis and examined the antigenicity of the designed molecule using animal model and molecular basis-approaches. Such structural engineered protein is expected to contribute to the development of new prevention and treatment for various diseases.

研究分野：細菌学

キーワード：ワクチン 抗原 分子設計 感染症

1. 研究開始当初の背景

(1) 意図した立体構造により形成され、かつ任意の分子特性を持つ人工タンパク質を設計し作り出すことは、タンパク質工学の究極的な目標である。このような人工タンパク質は医薬品開発をはじめとし、個々のタンパク質の特性を生かした新しい産業への応用を含め非常に強い興味を持たれている。近年では、タンパク質の三次構造を基盤とした分子創薬技術が大きく躍進している。しかし、生体内の多くのタンパク質は標的分子との複合体形成を通してその機能を発現するにも関わらず、複合体を形成したタンパク質の四次構造情報に基づいた分子設計の手法や理論については未だブレイクスルーが見られない。

(2) 炭疽は細菌のなかでも最も毒性の強い炭疽菌による急性感染症であり、そのワクチン開発に関しては、これまでに多角的な研究が行われてきた。しかし、これまでの抗炭疽生ワクチン及び成分ワクチンの試みはいずれも副作用が強く、有効性と安全性を兼ね備えた抗炭疽ワクチンの開発は未だ達成されていない。これまでの検討において、複合体を形成した炭疽菌毒素タンパク質の四次構造上に、防御効果の高い抗体産生を誘導する抗原領域が存在することが示されている

2. 研究の目的

タンパク質の分子間相互作用部位を含む四次構造上の領域を標的とし、標的領域と一致した分子表面形状を示す新規人工タンパク質の設計方法を構築する。

3. 研究の方法

目的達成のため、下記のマイルストーンを掲げる。人工分子設計の標的領域の探索、標的領域の表面形状と物性の特徴付けによる人工分子設計、設計した人工分子の作出及び立体構造解析、を行い、分子設計手法の基盤の技術を創出する。さらに、作出された人工タンパク質を実験動物に接種し、ワクチン抗原としての有効性を含めた人工分子の生理的機能を研究期間において明らかにする。

4. 研究成果

人工分子設計の標的領域の探索

7量体を形成したPA複合体 (PDB ID: 1tzo) の分子表面露出度の解析を行い、人工分子設計の標的領域の探索を行った (図1)。分子表面への露出度が高い領域は、免疫応答においてより高い反応性を示すと考えられるため、重要なワクチン抗原候補領域と考えられる。本研究では、このような表面露出度の高い領域において、PAの分子間相互作用部位を含めた多分子間にわたる四次構造上の領域を人工分子設計の標的とした。

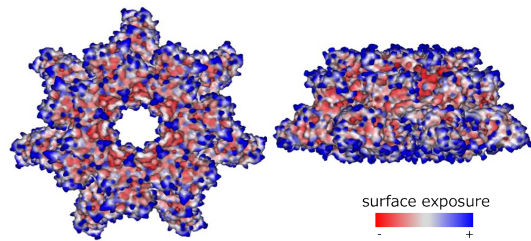
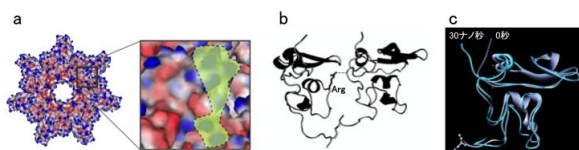


図1. 7量体PA複合体の溶媒露出面積の算出
濃色はPA複合体表面への露出度が高い分子内領域を示す。(左)7量体PAを上から見た像、(右)側面から見た像。

標的領域の表面形状と物性の特徴付けによる人工分子設計

四次構造上の形状と一致した表面形状からなる人工タンパク質の一次構造を設計するため、で探索した標的領域を形状と物性の特徴分析から妥当性を検討した。その際、分子表面の形状は本来滑らかであるが、計算機が取り扱いやすい形である三角メッシュで近似した表現を用いた。物性としては、水和効果や近距離における水素結合能、分子表面での電荷を重要な要因として考慮し、このような表現を用いることで、四次構造表面の形状と物性を物性付きベクトルの空間配置として表現した。続いて、PDB および eF-site から提供される既知タンパク質の分子構造データを用いて分子形状の類似度検索を行い、上記で特徴付けた標的領域と類似の形状を持つ鋳型候補タンパク質群を抽出した。得られた既知タンパク質の一次構造を鋳型として、遺伝子工学的手法およびタンパク質工学的手法により分子改変を加えながら分子構造のシミュレーションを用いて、任意の分子構造と物性を示す人工タンパク質の一次構造を設計した (図2a, b)。

図2. 人工分子設計の例 a)用いた人工分子



設計の標的領域の例を示す (拡大図内点線)。b) a)で示した標的領域と同一の分子表面形状を示すように設計した人工タンパク質の立体構造を示す。分子内に7個の α -ヘリックスと4個の β -シートを含む。また、図中のアルギニン残基 (Arg) は分子内相互作用を形成し分子構造の安定化に寄与する。c) 分子動力学シミュレーション (30 ナノ秒間) により、設計した人工分子の構造は水溶液中で大きく崩れることなく、比較的安定な構造を保つことが判明した。

設計した人工分子の作出及び立体構造解析

(1) で設計した人工タンパク質の一次構造情報に基づき、人工分子の立体構造とその安定性を *in silico* で検討する。具体的には、

エネルギー極小化計算を行いタンパク質の立体構造を最適化するとともに、分子動力学シミュレーションにより人工分子の構造安定性を評価し遂行された (図 2c)。

(2) 大腸菌を用いた異所性発現系により、立体構造解析に必要とされる人工タンパク質の大量発現系の構築、さらに単一精製に向けた精製方法を確立した。立体構造解析の結果を、理論的な人工分子構造と比較することにより設計手法の精度と理論の妥当性を評価した。設計手法とシミュレーション方法の比較検討を行い、理論計算値と人工分子について形状と物性の再現性率の向上を図った。

ワクチン抗原としての有効性を含めた人工分子の生理的機能解析

(1) 精製した人工分子を実験動物 (主にマウス) に接種し、ELISA 等の手法によりその抗体産生能を評価した。顕著な抗体価の上昇を認め人工分子について、培養細胞を用いた炭疽菌毒素タンパク質複合体の昨日阻害し件によりワクチン抗原としての有効性を評価した。その結果、少なくとも1種の人工分子について、培養細胞レベルにおける炭疽抑制能が示された。

得られた成果のインパクト、今後の展望：

炭疽菌およびピロリ菌を含めた多くの病原微生物は、その病原因子を宿主内に送り込み、宿主細胞内標的分子との相互作用を介して病原性を発現することが知られている。また、癌をはじめとして変異タンパク質による異常なタンパク質複合体形成が原因となるヒトの疾病は多い。本研究の伸展はこの研究自体の完成のみを意味するものではない。任意の構造および性質を兼ね備えた人工タンパク質の設計技術が開発されることは、炭疽対策に限らず、種々の疾病の発症原因となるタンパク質複合体の分子機能を制御可能とし、人類にとって非常に貢献度が高い成果となりうるものである。

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4件)

Hirohito Ogawa, Miyuki Ohnuma, David Squarre, Aaron S. Mweene, Takayuki Ezaki, Daisuke Fujikura, Naomi Ohnishi, Yuka Thomas, Bernard M. Hang'ombe, Hideaki Higashi 「*Bacillus cereus* from the environment is genetically related to the highly pathogenic *B. cereus* in Zambia」, **J Vet Med Sci**, Vol 77(8), pp 993-5, doi: 10.1292/jvms.15-0059, 2015

Hirohito Ogawa, Daisuke Fujikura, Miyuki Ohnuma, Naomi Ohnishi, Bernard

M. Hang'ombe, Hitomi Mimuro, Takayuki Ezaki, Aaron S. Mweene, Hideaki Higashi 「A Novel Multiplex PCR Discriminates *Bacillus anthracis* and Its Genetically Related Strains from Other *Bacillus cereus* Group Species」, **PLoS One**, Vol 10(3): e0122004. doi: 10.1371/journal.pone.0122004.

eCollection 2015.

Yoshifumi Takei, Naomi Ohnishi, Mayumi Kisaka, Keichiro Mihara 「Determination of abnormally expressed microRNAs in bone marrow smears from patients with follicular lymphomas」, **Springerplus**, doi: 10.1186/2193-1801-3-288. eCollection, 2014.

Naomi Ohnishi, Fumito Maruyama, Hirohito Ogawa, Hirokazu Kachi, Shunsuke Yamada, Daisuke Fujikura, Ichiro Nakagawa, Mudenda B. Hang'ombe, Yuka Thomas, Aaron S. Mweene, Hideaki Higashi 「Genome Sequence of a *Bacillus anthracis* Outbreak Strain from Zambia, 2011」, **Genome Announcement**, Vol 2(2), pp. e00116-14, 2014

〔学会発表〕(計28件)

Naomi Ohnishi 「Genetic Profiles of *Bacillus anthracis* Indigenous to Zambia and Characterization of *Bacillus* Species Causing Anthrax-like Disease」, 2015JSME annual meeting and 7th JTK symposium, Ibaraki, 亀城プラザ, 2015年10月17日-20日

Naomi Ohnishi 「De novo designed molecule to develop structure-based vaccine against Anthrax」, American Society for Microbiology 114th general meeting, Boston Convention & Exhibition Center, Boston Massachusetts, USA, 2014年5月17日-20日

大西なおみ 「炭疽の制圧を目指した疫学調査と新規ワクチンの開発」, 第2回感染症国際研究センターシンポジウム, 東京大学医科学研究所, 2014年3月18日

大西なおみ 「新規炭疽ワクチン抗原の分子設計」, 第87回日本細菌学会総会, タワーホール船堀, 2014年3月26日-28日

大西なおみ, 「炭疽の克服戦略: Comprehensive strategy for anthrax control」BMB2015 (第38回日本分子生物学会年回、第88回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド, 2015年12月1日-4日

赤松玲子、大西なおみ, 「炭疽菌と近縁種セレウス菌の病態-遺伝学的連関解

析」，新学術「ゲノム支援」拡大班会議，
京都国際会館，2015年8月27日-28日

〔図書〕(計1件)

大西なおみ，東秀明，高田礼人，「エボ
ラ出血熱ワクチン・炭疽ワクチン」，**最
新医学 次世代型感染症ワクチン**，最新
医学社，69巻4号，2013

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.czc.hokudai.ac.jp/immun/about/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 なおみ (Ohnishi, Naomi)
公益財団法人がん研究会・ゲノムセンタ
ー・特任研究員
研究者番号：50507217

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()