

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640130

研究課題名(和文) コムギ無細胞産生抗原を用いたサメナノボディ作成の基盤技術開発

研究課題名(英文) Basic technology development for Shark nanobody using antigen protein produced by wheat cell-free system

研究代表者

澤崎 達也 (SAWASAKI, TATSUYA)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：50314969

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、松山沖の伊予灘において、ドチザメ科に属する3種類のドチザメ類サメが十分量、実験材料として利用できることがわかった。それらのドチザメ類の飼育・免疫条件を明らかにし、採血法の至適化を行った。また、免疫したドチザメ類を他のドチザメと区別できる様にするために蛍光物質を皮下注射する標識法を見出した。ドチザメ類の全血からRNAを抽出する手法を確立し、得られたトータルRNAを用いたHiSeq1500でのwhole transcriptome解析を行い、3種のドチザメ類のナノボディをコードするIgNAR遺伝子配列を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：We were successful to make an environment for the immunological experimental using three kinds of banded dogfishes that are harvested from off the coast of Matsuyama, Ehime Prefecture, calling Iyonada. Furthermore, we established good methods for handling, feeding, blood sampling and labeling of these sharks. Next we isolated a pure total RNA from bloods of these sharks and it is used for analysis of whole transcriptome by RNA seq. These results showed sequences of IgNAR coding shark nanobody.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：ナノボディ 無細胞 サメ 抗体 ドチザメ 免疫

### 1. 研究開始当初の背景

抗体分子は特異的に分子を認識できるため、人類の生活に必須の分子である。一般的な抗体分子は、2種類のH鎖および2種類のL鎖のタンパク質からなる高分子である。近年の様々なバイオ技術開発に伴い、同等の結合能を有し、より小さな分子の開発が急務となってきた。例えば、膜タンパク質の構造解析や複合体タンパク質の安定化、細胞内への導入による特定分子の機能阻害などには、従来の抗体分子ではサイズが大きすぎるため困難である。小さな抗体分子として、1種類のH鎖からなり大きさが約10分の1である、ラクダやラマ、軟骨魚類のサメから見出されたナノボディ抗体分子が注目されている。しかし、国内でラクダやラマの飼育は困難であり自由にナノボディ開発ができないのが現状である。サメは有用な候補生物種であるが、飼育には海が近い環境を必要とし、養殖環境がないため研究はほとんど進んでおらず、約400種類いるサメ種のどれがナノボディ作成に適しているかも不明である。愛媛県は瀬戸内海に面し、サメの入手が容易であり水産業を主とするため、愛媛大学や県主導の水産試験場を多く有し、サメを飼育できる環境が整っている。

### 2. 研究の目的

抗体は特異的に分子を認識できることから、基礎研究や診断・医薬には必須の分子である。ラクダやラマから見出されたナノボディと呼ばれる抗体分子は、従来の抗体に近い結合能を保持しながら、1種類のH鎖からなり、大きさが約10分の1と小さいため様々な応用が考えられている。しかし、ラクダやラマの飼育は大量な餌や大きな土地を必要とするなど制約が大きいため広く利用されていない。同じナノボディをもつ生物種としてサメが知られているが、未だサメに抗原を免疫できる環境が整っていない。我々はこれまでに、コムギ無細胞で産生した抗原タンパク質は構造認識抗体作成に有用であることを示してきた。本申請では、水産業が盛んな愛媛県の特徴を利用して、コムギ無細胞産生抗原をサメに免疫することにより、構造認識できる高機能サメナノボディ作成技術の開発に向けた基盤作りを行う。

### 3. 研究の方法

これまで GPCR のドーパミン D1 受容体 (DRD1) をモデルにリポソームに組み込まれた DRD1-プロテオリポソームをマウスとラビットに免疫し質の高い構造認識抗体を取得する条件を確立してきた。これらの条件を参考に、丈夫で飼育が容易で、愛媛県や日本近海に簡単に入手可能なドチザメ (*Triakis scyllium*) を用いて行った。ドチザメの飼育および免疫は、愛媛大学および愛媛県の水産試験場と共同でサメナノボディ開発を進めた。

#### (1) ドチザメに免疫するための環境作り

ドチザメを十分量、栽培資源研究所 (愛媛県農林水産研究所水産研究センター) を通じて松山沖から捕獲・取得するために松山市の漁協組合と話会いを行った。栽培資源研究所と共同で、ドチザメからの採血、免疫するための環境整備を行うための条件検討を行った。免疫した抗原により誘導されたナノボディの検出には、市販されているカルフォルニアネコザメの抗体を用いた ELISA 法により行った。また、免疫したドチザメを区別するため方法として、鰭へのリングの取り付け、蛍光剤の皮下注射を試みた。

#### (2) ドチザメ血中遺伝子の解析・取得

唯一、サメ類の中でゲノムシーケンシングが終了している最も原始的なサメといわれているエレファントシャークは免疫系として Th2 系がない。硬骨魚類には、Th2 系が存在する。ドチザメは、エレファントシャークより進化していると考えられることから、ドチザメの血液に発現している遺伝子の RNAseq 解析を行った。ドチザメからの RNA 抽出法は報告がなかったため、複数種類の既存 RNA 単離キットを試みた。RNAseq 解析はかずさ DNA 研究所と共同で行った。

### 4. 研究成果

#### (1)-1. 捕獲できるドチザメ類

ドチザメを十分量、栽培資源研究所 (愛媛県農林水産研究所水産研究センター) を通じて松山沖から捕獲・取得するために松山市の漁協組合と話会いを行い、ドチザメ類は愛媛県で食されておらず、食用エビなどを食べることから水産物として必要のないことが分かった。そのため、非常に安価に入手できることが分かった。また、年間3回のドチザメ類の捕獲実験により、主なドチザメ類は、ホシザメ、シロザメ、エイラクブカであることが分かった。

#### (1)-2. ドチザメ類の飼育条件

栽培資源研究所の主導で、ドチザメ類の飼育条件を調べた。その結果、循環させない海水の汲み上げから濾過のみの掛け流しの海水の供給により、夏場を苦手とする3種のドチザメ類の飼育も安定に行えることが分かった。餌も栽培資源研究所が独自に開発した種々の海産物を混合した練り餌で1年以上飼育できることがわかった。

#### (1)-3. ドチザメ類の採血・免疫法

栽培資源研究所と共同で、ドチザメ類の採血法の至適化を行った。その結果、ドチザメ類へのダメージが殆どなく、尻尾から上部10cm程度の箇所から安定に採血できることがわかった。また抗原を免疫する場所を検討したところ、鰓近くに免疫することで抗原に反応するナノボディが誘導されることがわかった。

#### (1)-4. 免疫したドチザメ類の標識法

免疫したドチザメ類を他のドチザメと区別できる様にするために標識法を検討した。その結果、鱈へのリングでは、鱈にダメージがおこり、時に鱈が千切れることがわかった。別の方法として、皮下に蛍光物質を注射することを試みたところ、成長や飼育に影響なく安定に標的できることがわかった。

#### (2) - 1. ドチザメ類血液からの RNA 抽出法の確立

ドチザメ類の血漿を分離することを行った。その結果、3種のドチザメ類とも一般的な方法で血漿を取得することに成功した。また全血から RNA を抽出するために、既存のキットを複数種類試みた。どのキットでも糖の混入が多く、その結果 DNA 分解が不十分であり、RNAseq に不適であることがわかった。最終的に、血液をできるだけ希釈することにより、RNAseq に適した RNA 抽出法を確立した。

#### (2) - 2. ドチザメ類血液発現遺伝子の RNAseq 解析

得られたトータル RNA を用いて、HiSeq1500での whole transcriptome 解析を行った。その結果、trinity を利用して 181,743 個のアセンブルを確保した。ただし、エレファントシャークゲノム上の遺伝子との相同性が高くないことが分かり、現時点においても、配列の解析を進めている。しかし、現時点でわかったことは、3種のドチザメ類のナノボディをコードする IgNAR 遺伝子配列が入手でき、それらは3種とも良く似ていることがわかった。現在、これらは単離 RNA から再度クローニング行っている。また、興味深いことにエレファントシャークでは見出されなかった免疫系遺伝子を多数見出し、ドチザメ類はナノボディを持っているが硬骨魚類に近い免疫系を持っている可能性が示唆された。これらについても現在、解析中である。以上の結果から、ドチザメナノボディ技術に向けた基盤作りができた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 30 件)

1. Takeda H, Ogasawara T, Ozawa T, Muraguchi A, Jih PJ, Morishita R, Uchigashima M, Watanabe M, Fujimoto T, Iwasaki T, Endo Y, Sawasaki T. Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay. **Sci Rep**. 5:11333 (2015) [査読有] doi: 10.1038/srep11333.
2. Onishi S, Adnan E, Ishizaki J, Miyazaki T, Tanaka Y, Matsumoto T, Suemori K, Shudou M, Okura T, Takeda H, Sawasaki T, Yasukawa M, Hasegawa H. Novel Autoantigens Associated with Lupus Nephritis. **PLoS One**. 10:e0126564 (2015) [査読有] doi: 10.1371/journal.pone.0126564.

3. Nemoto K, Takemori N, Seki M, Shinozaki K, Sawasaki T. Members of the Plant CRK-superfamily are Capable of trans-/auto-Phosphorylation of Tyrosine Residues. **J Biol Chem**. 290:16665-16677 (2015) [査読有] doi: 10.1074/jbc.M114.617274.
4. Ohnishi T, Yanazawa M, Sasahara T, Kitamura Y, Hiroaki H, Fukazawa Y, Kii I, Nishiyama T, Kakita A, Takeda H, Takeuchi A, Arai Y, Ito A, Komura H, Hirao H, Satomura K, Inoue M, Muramatsu S, Matsui K, Tada M, Sato M, Saijo E, Shigemitsu Y, Sakai S, Umetsu Y, Goda N, Takino N, Takahashi H, Hagiwara M, Sawasaki T, Iwasaki G, Nakamura Y, Nabeshima Y, Teplow DB, Hoshi M. Na<sub>2</sub>K-ATPase  $\alpha$ 3 is a death target of Alzheimer patient amyloid- $\beta$  assembly. **Proc Natl Acad Sci USA** 112:E4465-74 (2015) [査読有] doi: 10.1073/pnas.1421182112.
5. James SJ, Jiao H, Teh HY, Takahashi H, Png CW, Phoon MC, Suzuki Y, Sawasaki T, Xiao H, Chow VT, Yamamoto N, Reynolds JM, Flavell RA, Dong C, Zhang Y. MAPK Phosphatase 5 Expression Induced by Influenza and Other RNA Virus Infection Negatively Regulates IRF3 Activation and Type I Interferon Response. **Cell Rep**. 10:1722-1734 (2015) [査読有] doi: 10.1016/j.celrep.2015.02.030.
6. Mizutani Y, Tsuge S, Takeda H, Hasegawa Y, Shiogama K, Onouchi T, Inada KI, Sawasaki T, Tsutsumi Y. In situ visualization of plasma cells producing antibodies reactive to Porphyromonas gingivalis in periodontitis: The application of the enzyme-labeled antigen method. **Mol Oral Microbiol**. 29:156-173 (2014) [査読有] doi: 10.1111/omi.12052.

[学会発表] (計 110 件)

- ① 澤崎達也、宮城 洋平、ヒト無細胞プロテインアレイを用いた乳がん特異的自己抗体バイオマーカーの探索、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場
- ② 澤崎達也、コムギ無細胞系を用いたキナーゼ基質の探索技術、第 15 回日本蛋白質科学会年会、2015 年 6 月 24 日～26 日、あわぎんホール (徳島県徳島市)
- ③ 澤崎 達也、無細胞ヒトプロテインアレイを用いたタンパク質ワイド相互作用解析技術、2015 年 6 月 8 日、公益財団法人がん研究会臨床研究セミナー、吉田富三記念講堂 (東京都江東区)
- ④ 澤崎達也、Wheat cell-free system for drug discovery platform、神戸大学 WINTech2015、2015 年 3 月 12 日、神戸大学連携創造本部・応用構造科学産学連携推進センター (兵庫県神戸市)

- ⑤ 澤崎達也、タンパク質合成技術開発の現状と展望、第74回産研テクノサロン、2015年2月6日、大阪大学産業科学研究所（大阪府吹田市）
- ⑥ 澤崎達也、コムギ無細胞系を基盤としたタンパク質修飾解析技術、平成26年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム開催“新学術領域研究がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動”、2015年1月27日～28日、一橋講堂（東京都千代田区）澤崎 達也、コムギ無細胞 HTS を用いた創薬基盤技術、第87回日本生化学会大会、2014年10月15日～18日、京都国際会議場（京都府京都市）
- ⑦ 澤崎 達也、無細胞技術を基盤とした自己抗体探索によるアンチエイジング医学のブレークスルーをめざして、第14回 日本抗加齢医学会総会、2014年6月6日～8日、大阪国際会議場（大阪府大阪市）
- ⑧ 澤崎 達也、GPCR 研究のためのコムギ無細胞系プロテオリポソーム技術、第11回 GPCR 研究会、2014年5月9日～10日、日本科学未来館 みらい CAN ホール（東京都江東区）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://http://www.pros.ehime-u.ac.jp/ce11-free/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

澤崎 達也 (SAWASAKI, Tatsuya)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

研究者番号：50314969