

令和元年6月12日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02006

研究課題名(和文) 高速人工抗体創製法の開発とタンパク質1分子単位定量への応用

研究課題名(英文) High-speed method for selection of synthetic binding proteins and the application for quantitative detection of a target protein at single-molecule resolution

研究代表者

村上 裕 (MURAKAMI, HIROSHI)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：10361669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,300,000円

研究成果の概要(和文)：高速人工抗体創製法を開発し、得られた抗体をタンパク質の1分子単位定量に応用することを目的とした。まず抗体の創製を飛躍的に高速化するために、我々が開発した特殊ペプチド創製法を人工抗体創製用に改良し、迅速に人工抗体を創製する方法を開発した。実際にEGFR1やHER2の細胞外ドメインをモデルタンパク質としてセレクションを行い、nMレベルの解離定数で結合する抗体を取得した。さらに、細胞少数タンパク質に対しても抗体を作製した。得られた人工抗体を蛍光標識して、ガラス基板に固定したタンパク質標的を1分子単位で検出することに成功した。これらの技術はタンパク質の1分子単位定量の基盤技術になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1細胞におけるタンパク質の分子数は、タンパク質の種類によって大きく異なる。これら様々な数からなるタンパク質群の定量は、生物学において個々の細胞の個性を理解するための重要な課題である。そこで近年、タンパク質を1分子単位で定量する新手法の開発が進められている。このボトルネックは、標的に対して高い特異性と親和性を持った高性能抗体の作製である。本研究では、簡便に高速で人工抗体を作製する手法を開発した。さらに得られた人工抗体を用いてガラス基板上に固定化した標的を1分子単位で検出することができることを示した。本方法は、タンパク質の1分子定量を可能にする重要な基盤技術となると期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was to develop a high-speed method for selection of synthetic binding proteins (SBPs) and quantitative detection of the corresponding target proteins at single-molecule resolution. First, we modified our previous high-speed method of screening functional polypeptides (transcription-translation coupled with association of puromycin linker [TRAP] display; JACS, 2013) for SBPs selection. Then, using the improved TRAP display, we demonstrated successful selection of high-affinity (nM level) SBPs against model target proteins, EGFR1 and HER2. Finally, we applied the modified method to obtain several SBPs against low-copy-number proteins and to detect a target protein immobilized on a glass plate using a fluorescently labeled SBP. The improved version of the TRAP display for SBP selection and single-molecule detection of target proteins with the obtained SBPs could become a basic high-precision technology for protein quantification at single-molecule resolution.

研究分野：Biochemistry

キーワード：binding protein screening translation single-molecule

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1細胞におけるタンパク質の分子数は、タンパク質の種類によって大きく異なることが明らかとなっている (*Nature* 2003, 425:737; *Nature* 2006, 441:840, *Nature* 2011, 473, 337 : 2011年の文献では、複数の NIH3T3 から得られた試料について質量分析装置で 5,028 種類のタンパク質を定量し、1細胞におけるタンパク質の分子数の中央値が 5 万分子であり、その数の分布は少なくとも $50 \sim 10^8$ と広いことが報告された)。これら様々な数からなるタンパク質群の定量は、生物科学において個々の細胞の個性を理解するための重要なかつ挑戦的な課題であると考えられている。しかし、タンパク質は他の重要な生体高分子である RNA と異なり、逆転写 PCR で増幅することができない。そこで近年、タンパク質を 1 分子単位で定量する新手法の開発が進められている。この中でも、遺伝子操作によるタンパク質の標識を必要としない“ラベルフリー”な方法は、実際の人体等から得られる試料にも適用できるため、応用性が高いと考えられる。

現在、“ラベルフリー”なタンパク質 1 分子定量法開発のボトルネックは、標的に対して高い特異性と親和性を持った高性能抗体の作製である。そこで申請者らは、研究代表者が開発した TRAP 提示法 (transcription-translation coupled with association of puromycin linker, *J. Am. Chem. Soc.* 2013) を改良することで、迅速に高性能な人工抗体が創製できると考えた (図 1)。さらにこの抗体創製法と研究分担者が持つ 1 分子解析技術が融合すれば、新しい「細胞破碎液タンパク質 1 分子単位定量法」が開発できる。具体的には、解析対象となる様々なタンパク質を標的とし、複数種類の人工抗体を創製する。次に、ガラス基板上に 1 細胞破碎液を固定化し、蛍光標識した人工抗体と全反射照明蛍光顕微鏡などによる 1 分子イメージングシステムを用いて、標的タンパク質を 1 分子単位で定量する。本手法は、タンパク質の簡便で高感度な定量法になると期待される。

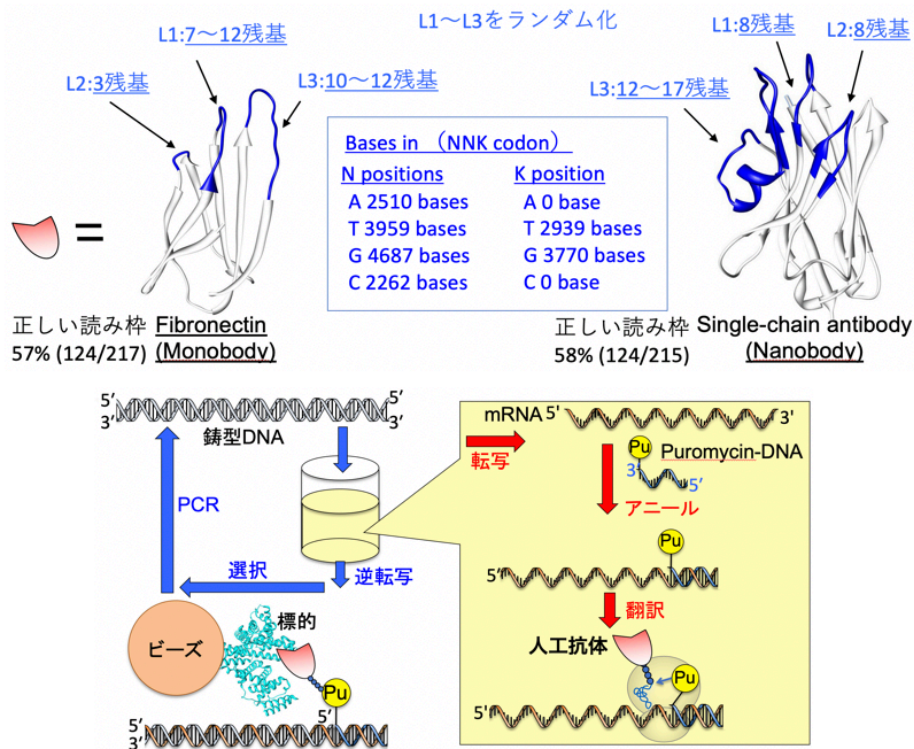


図 1 人工抗体の迅速な創製を可能にする TRAP 提示法の開発

2. 研究の目的

我々が 2013 年に開発した TRAP 提示法を改良して高速人工抗体創製法を開発し、これをタンパク質の 1 分子単位定量に応用することを目的とする。抗体は、生物科学の分野で必要不可欠なツールとなっているが、既存の抗体創製法では抗体の作製に多くの時間と費用が掛かる。本提案ではまず、抗体の創製を飛躍的に高速化するために、我々が開発した特殊ペプチド創製法 (TRAP 提示法) を人工抗体創製用に改良し、迅速に人工抗体を創製する新しい方法を開発する。さらに、作製した人工抗体は細胞破碎液を基板上に固定化した 1 分子単位定量に応用する。本研究の遂行により高速で高性能な人工抗体作製法が開発され、高感度なタンパク質定量法が開発できる。

3. 研究の方法

本研究計画は、(1) 高速人工抗体創製法の開発、(2) 少数タンパク質を標的とした人工抗体創製、(3) 少数タンパク質の1分子単位定量からなる。

(1) 高速人工抗体創製法では、研究代表者が環状ペプチド選択用に開発した TRAP 提示法 (*J. Am. Chem. Soc.* 2013) を改良することで、迅速に高性能な人工抗体の創製方法を開発する。翻訳系には再構成無細胞翻訳系を用い、DNA を加えるだけで人工抗体-mRNA 複合体が 30 分で効率よく生成する系を開発する。また、モデル標的タンパク質である EGFR1 や HER2 (癌のマーカータンパク質) に対して人工抗体を選択する。得られた遺伝子を次世代シーケンスにより解析し、このうち数種類の人工抗体について大腸菌で発現した後、その解離定数を決定する。(2) では、HEK293 細胞から少数タンパク質遺伝子をクローニングして大腸菌、CHO 細胞、コムギ胚芽無細胞翻訳系による標的タンパク質の調製を行う。さらに先に開発した TRAP 提示法を用いてこれらタンパク質に対する人工抗体を選択する。上記と同様の方法で、人工抗体タンパク質を得て、その解離定数を決定する。(3) では、得られた人工抗体を蛍光標識して、ガラス基板上に固定化した標的タンパク質を全反射照明蛍光顕微鏡により検出する。

4. 研究成果

(1) 高速人工抗体創製法の開発

標的タンパク質に高親和かつ特異的に結合する人工抗体を得るためには、人工抗体の骨格の選択と人工抗体ライブラリ遺伝子の質が大切である。本研究では、人工抗体の骨格として多くの実績があり小型である 2 種類のタンパク質を使用した (図 1)。まず、ヒトのフィブロネクチンの 1 ドメイン (10FN3 : 90 残基程度) の 3 つのループ部分の遺伝子を様々な長さのランダム配列に置き換えた遺伝子を作製した。また別に、ラマー本鎖抗体の抗原認識ドメイン (sAb : 120 残基程度) の 3 つのループ部分の遺伝子を様々な長さのランダム配列に置き換えた遺伝子も作製した。これらの遺伝子の質を担保するために、それぞれ 217 遺伝子と 215 遺伝子について DNA 配列解析を行い、約 60% の遺伝子が人工抗体ライブラリとして使用可能な遺伝子であることが分かった。また、ループ配列も完全にランダム化されており、 10^{13} のライブラリの多様性も確保できていることから、作製したライブラリは質の高いものであると考えられる。

次に、我々が以前にペプチド選択法に開発した TRAP 提示法を改良して、高速人工抗体創製法の開発を試みた。この人工抗体を作製する段階で、本来はペプチドの選択のために作製した TRAP 提示法が、必ずしも人工抗体の選択には最適ではないことが分かった。その大きな原因は、TRAP 提示法で使用しているピューロマイシンリンカーの DNA 部分が T7 RNA polymerase の非プロモーター依存的な転写により RNA へと転写され、望まない DNA/RNA 二重鎖が形成されるためであることが分かった。そこで DNA の 2'位を OMe 化修飾することでこの転写を抑えることに成功した。これにより、TRAP 提示法による人工抗体の提示効率が約 10 倍に上昇した。

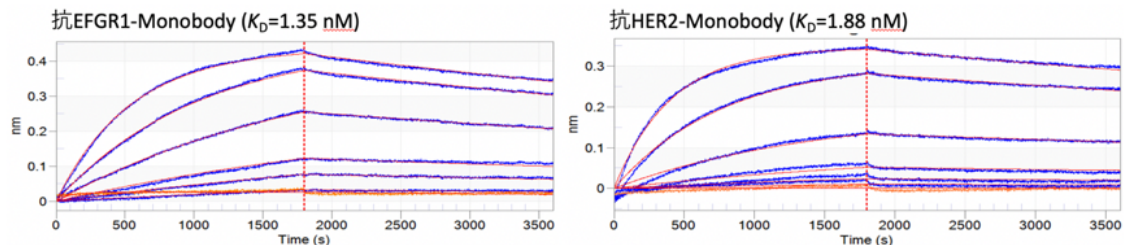


図 2 EGFR1 と HER2 に対して結合する人工抗体の例。青色の線は望みの標的タンパク質、赤色の線は、別の標的を固定化した際の結合曲線である。左は 20 nM ~ 0.62 nM 右は 50 nM ~ 1.5 nM の人工抗体を用いた。測定は OctRED を用いた。

さらに本 TRAP 提示法を用いて人工抗体の選択が可能であることを確かめるために、モデル標的タンパク質である EGFR1 や HER2 (癌のマーカータンパク質) に対して人工抗体を選択した。600 μ L の翻訳液を用いて Monobody もしくは Nanobody のライブラリーを調製し、EGFR1 や HER2 を固定化した磁気ビーズを用いてこれらの標的に対して結合する人工抗体を選択した。

得られた人工抗体を精製してその標的に対する解離定数を測定した結果、これら抗体が標的に対して K_D がサブ nM から数十 nM という高い親和力で結合することが分かった (図 2)。また、図 2 から抗 EGFR1 人工抗体は HER2 には結合せず、抗 HER2 人工抗体は EGFR1 には結合しないことが分かる。これらの結果から、TRAP 提示法を用いることで Monobody もしくは Nanobody から効率的に標的に特異的に結合する人工抗体が選択可能であることが分かった。以上の結果は論文にまとめて投稿中である。

(2) 少数タンパク質の調製とこれを標的とした人工抗体の創製

上記のように、TRAP 提示法を用いることで、様々な標的に対して効率的に人工抗体を得られると考えられる。まず、TRAP 提示法の標的となる、少数タンパク質を含む 9 種類のタンパク質の調製を行った。これら遺伝子を A549 細胞の cDNA から大腸菌発現ベクターにクローニングし、動物細胞タンパク質発現用に tRNA を補完した大腸菌で発現させた。しかし、ほぼ全てのタンパク質について大部分のタンパク質が不溶性画分に現れた。そこで次にこれらタンパク質を、ほ乳細胞由来のタンパク質を発現するための系として知られる、CHO 細胞発現系、コムギ胚芽無細胞翻訳系で発現し、その発現効率を比較した。その結果、CHO 細胞ではタンパク質間で発現量に大きなばらつきがあるのに対し、コムギ胚芽無細胞翻訳系では、全ての標的タンパク質において TRAP 提示法による人工抗体選択に十分な量のタンパク質が得られた (図 3)。

次に調製したタンパク質を磁気ビーズに固定化して TRAP 提示法を用いて人工抗体の取得を試みた。その結果、いくつかのタンパク質について K_D が nM 程度の人工抗体が得られた (図 3)。

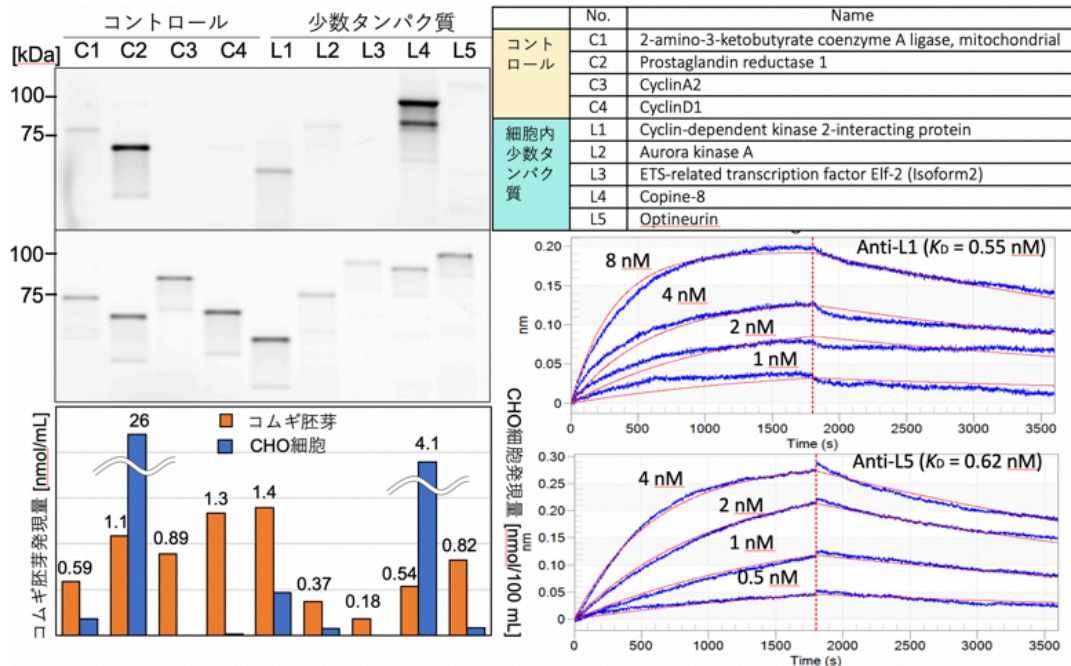


図 3 CHO 細胞発現系もしくはコムギ胚芽無細胞翻訳系を用いた標的タンパク質の調製と得られた人工抗体の K_D 値

(3) タンパク質 1 分子単位蛍光観察

本研究を推進するためには、1 細胞を分離してガラス基板上で溶解しタンパク質を基盤に固定化する技術が必要である。そこで、dynactin-GFP を発現した Hela 細胞を培養し、ここから 1 細胞をマイクロインジェクターで分取して、ガラス基板にまく技術を確認した。次に、これに様々な細胞溶解試薬を使って、細胞が効率よく溶解する条件を見つけた。またガラス基板もポリリシンで修飾することで、タンパク質が効率よく固定化されることが分かった。さらに、固定化されたタンパク質から GFP の蛍光を TIRF で検出することに成功した (図 4)。

ただし、ポリリシン修飾では非特異的吸着が多いため、人工抗体を用いた標的タンパク質の検出はできない。そこで、ガラス基板上に活性基を結合させてタンパク質を固定化することを試みた。まず、エポキシ基を持つシラン化剤を用いてガラス基板の修飾を試みたが、エポキシ基の反応性が低く、タンパク質の固定化率が低いことが分かった。そこで、アミノ基をもつシリル化剤をもちいてガラス基板を修飾した後に、無水酸をもちいてカルボン酸を生成させ、こ

それを NHS で活性化することで、効率よくタンパク質をガラス基板上に共有結合を介して固定化できるようになった。ただし、用いたシリル化剤が3反応点をもつものであったため、シリル化剤同士の凝集を抑えて平坦なガラス基板上を調製するために1反応点タイプのシリル化剤を用いて AFM で観測しても平坦なレベルの活性化ガラス基板を作製した (図 5a)。

次に、ガラス基板の吸着特性を検討するために、SortaseA を使用して JF549 蛍光標識した人工抗体を含む溶液をガラス基板上にのせて TIRF による蛍光観察を行った。ガラス基板の NHS エステルに様々な化合物を反応させ、その上から 1 nM の蛍光標識人工抗体を作用させた結果、PEG2000 の修飾によりガラス基板の非特異的吸着を大幅に低減できることが分かった (図 5b, c)。さらに抗 L5 人工抗体を用いてガラス基板上に固定化した L5 の検出を試みた。その結果、基板に L5 を固定化せず抗 L5 人工抗体を用いたものや、基板に L5 を固定してコントロール人工抗体 (WT 人工抗体) を作用させたものにくらべ、基板に L5 を固定して抗 L5 人工抗体を用いたものは蛍光が多くなった (図 5d-f)。今後、さらに非特異的吸着を低減することで、より精度の高い1分子定量ができると考えられる。

本研究課題では、高速人工抗体創製法を開発し、これを用いて少数タンパク質に結合する人工抗体を得ることに成功した。さらに、人工抗体の吸着を大幅に低減するガラス基板修飾技術を開発し L5 の1分子検出を行った。今後、本研究で開発した、一細胞破碎技術、ガラス基板修飾技術、高速人工抗体作成技術を組み合わせることで、1細胞破碎液からの少数タンパク質の1分子単位定量が可能になると期待される。

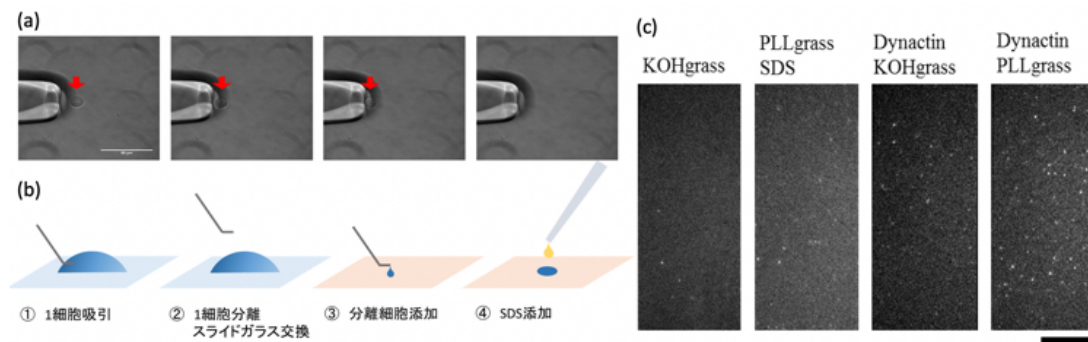


図 4 TIRF による、1細胞 HeLa 細胞破碎液中の GFP の固定化と蛍光観察 (a) マイクロインジェクターを用いて HeLa 細胞を分取する様子。(b) 細胞質の調製手順 (c) 各条件における輝点の TIRF 画像。スケールバーは 10 μ m。

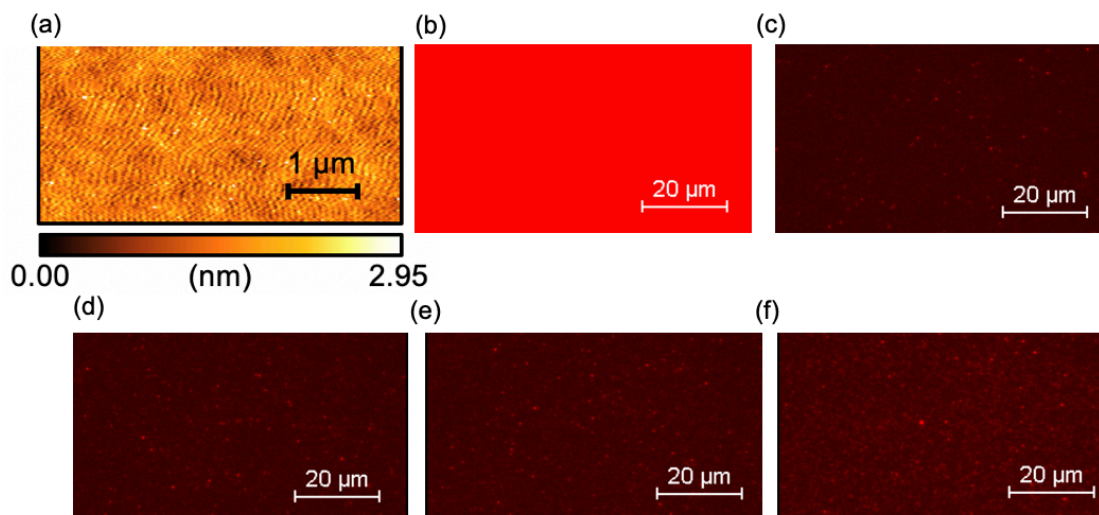


図 5 ガラス基板の (a)AFM 像と(b)-(f) 全反射蛍光顕微鏡像。(c)-(f)は PEG2000 修飾あり。(a) シラン剤で修飾したガラス基板表面 (b) カルボン酸を表面に持つガラス基板に蛍光標識人工抗体を作用 (c) PEG2000 で修飾したガラス基板に蛍光標識人工抗体を作用 (d)基板に L5 を固定化せず抗 L5 人工抗体を作用 (e)基板に L5 を固定してコントロール人工抗体 (WT 人工抗体) を作用(f)基板に L5 を固定して抗 L5 人工抗体を作用。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文, 査読有〕(計 4 件)

T. Fujino, and H. Murakami, In Vitro Selection Combined with Ribosomal Translation Containing Non-proteinogenic Amino Acids, *The Chemical Record*, 16, 365-377, 2016;10.1002/tcr.201500239

N. Taniguchi, H. Murakami, Multiple Site-Directed and Saturation Mutagenesis by the Patch Cloning Method, *Methods Mol. Biol.*, 1498, 339-347, 2017; 10.1007/978-1-4939-6472-7_22

M. Sugawa, T. Masaike, N. Mikami, S. Yamaguchi, K. Shibata, K. Saito, F. Fujii, Y. Toyoshima, T. Nishizaka, and J. Yajima, Circular orientation fluorescence emitter imaging (COFEI) of rotational motion of moto proteins, *Biochemical and biophysical research communications*, 504, 709-714, 2018 ; 10.1016/j.bbrc.2018.08.178.

T. Fujino, T. Kondo, H. Suga, and H. Murakami, Exploring of minimal RNA substrate of flexizymes, *ChemBioChem*, in press, 2019; doi.org/10.1002/cbic.201900150

〔学会発表〕(計 21 件)

中山紗由美、藤野公茂、村上裕 ; TRAP 提示法を用いた高速人工抗体作製法の開発 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、2015 年

中山紗由美、藤野公茂、村上裕 ; High-speed in vitro display method for selection of functional peptides and protein 2015 環太平洋国際化学会議、2015 年

村上裕 ; 翻訳系を用いた進化分子工学と合成生物学、ChemBio 講演会 (京都大学)、2017 年
翻訳系を用いた進化分子工学と合成生物学

村上裕、TRAP 提示法を用いた機能性ペプチド・人工抗体選択、化学工学会第 49 回秋季大会 (招待講演)、2017 年

近藤太志、石崎敬悟、藤野公茂、村上裕 ; 2'-OMe オリゴヌクレオチドを用いた TRAP display の改良、日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会、2017 年

近藤太志、石崎敬悟、藤野公茂、村上裕 ; 改良 TRAP 提示法による mRNA への人工抗体提示の高効率化、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、2017 年

近藤太志、石崎敬悟、藤野公茂、村上裕 ; Improved TRAP display for high-speed selection of antibodies from trillions of candidates、the 2nd International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2017)、2017 年

丸山洋平、須河光弘、三嶋将紀、矢島潤一 ; CIK4 induces the large fluctuations of the left-handed rotational movement of dimeric kinesin6、Biophysical society 62nd annual meeting、2017 年

近藤太志、瀬崎貴大、鬼頭清太、石崎敬悟、藤野公茂、村上裕 ; Improved TRAP Display for Selection of Monobodies, Nanobodies, and Macrocyclic Peptides、第 10 回国際ペプチドシンポジウム、2018 年

近藤太志、瀬崎貴大、鬼頭清太、石崎敬悟、藤野公茂、村上裕 ; Improved TRAP display for selection of binding peptides against multiple target proteins、The 17th Akabori Conference(German-Japanese Symposium on Peptide Science)、2018 年

村上裕 ; 無細胞翻訳系を用いた 進化分子工学・合成生物学、第 11 回 ChemBio ハイブリッドレクチャー (招待講演)、2018 年

村上裕 ; TRAP 提示法を用いた迅速な人工抗体創製、第 49 回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (招待講演)、2018 年

Y. Maruyama, M. Sugawa, M. Mishima, J. Yajima ; CYK4 promotes the flexibility in the sidward stepping by MKLP1 kinesin-6、Mitotic Spindle symposium. From living and synthetic systems to theory (招待講演)、2019 年

他ポスター・口頭発表 8 件

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 矢島潤一郎

ローマ字氏名 : YAJIMA Junichiro

所属研究機関名 : 東京大学

部局名 : 総合文化研究科

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 00453499

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。