

令和元年6月13日現在

機関番号：82626
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2016～2018
課題番号：16H03295
研究課題名(和文) マイクロRNA機能のダイナミズム可視化システムの開発

研究課題名(英文) Development of visualizing system of microRNA dynamism

研究代表者

中島 芳浩 (Nakajima, Yoshihiro)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：10291080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロRNA(miRNA)の成熟化と機能のダイナミズムを高精度に解析するための発光レポーターアッセイシステムの構築を目指し、発光レポーターであるルシフェラーゼ遺伝子と抗ルシフェラーゼ発光阻害抗体を共発現させる新規の可視化システムの基盤構築を行った。システムの鍵となる発光反応阻害するラクダ科動物由来ナノボディー抗体を世界に先駆けて導出するとともに、ルシフェラーゼ認識部位、解離速度定数、阻害様式等を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果である抗ルシフェラーゼナノボディー抗体の導出により、miRNAの機能と様々な生命現象や疾患との関連性を、従来よりも高い精度で解析できる可能性が増し、今後、新たな科学的知見の取得に貢献することが期待される。また、セルベースアッセイとして適用することで、急速に研究・開発が進展しているmiRNA研究における日本発の独自解析ツールとして国内外において標準的な手法として用いられる可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel visualizing assay system to evaluate dynamisms of maturation and function of microRNA in cells or whole organisms, in this study, we have generated nanobody antibodies which inhibit bioluminescence reaction of green-emitting and red-emitting beetle luciferases by binding to the luciferases. We have successfully expressed the nanobody antibodies in *E. coli*, and purified antibodies were used for further analysis. We clarified that the nanobody antibodies bind to specific region of luciferases with dissociation constant at nM level by means of surface plasmon resonance analysis. In addition, Lineweaver-Burk plot analysis using the purified luciferase and antibody demonstrated that mode of inhibition of the antibody is non-competitive inhibition.

研究分野：細胞生物学

キーワード：生体分子計測 miRNA ルシフェラーゼ 低分子抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (miRNA) は、ゲノムから転写される 20 - 25 塩基の短いノンコーディング RNA の一種であり、ゲノムから転写後にプロセッシングを経て成熟型 miRNA となり、標的遺伝子の 3' 非翻訳領域 (3' UTR) に結合し、mRNA からタンパク質への翻訳を阻害する。miRNA は細胞の発生、分化、増殖等の様々な生命現象に重要な役割を果たす。さらにその発現異常により発癌、炎症、感染症等の多くの疾患を誘発することから、近年臨床マーカーとしても注目されるようになり、標的遺伝子の同定をはじめ、miRNA の機能を高精度に解析する手法の重要性が増している。

miRNA の機能解析の最初のステップは、miRNA が標的とする遺伝子の同定 (結合配列の同定) であるが、現状では *in silico* 解析により標的遺伝子 (結合配列) を予測し、続いて細胞実験により、実際に miRNA が標的遺伝子に結合し発現を抑制するかを検証している。miRNA の機能解析には、miRNA の発現を直接検出する PCR やアレイ解析が一般的に行われているが、解析の定量性や網羅性に優れているものの、対象とする細胞等の試料を都度破碎し RNA を抽出する必要があるため、時系列変化を経時的且つ詳細に追跡することは極めて困難である。一方、対象試料を破碎しない非破碎的解析法として、発光レポーターであるルシフェラーゼを用いたセルベースアッセイや *in vivo* 発光イメージングが行われている。一般的には、解析対象とする miRNA の標的遺伝子の結合配列をレポーターベクター上のルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に配置、このレポーターベクターと共に、解析したい miRNA を細胞に導入し、miRNA 依存的な発光の減少を指標に、標的遺伝子に対する発現抑制効果を解析している。一方、動物個体における miRNA の機能解析においても同様に、miRNA の結合配列が挿入されたレポーターベクターを個体に導入し、*in vivo* 発光イメージングにより miRNA 依存的な発光の減衰を測定することで、miRNA 発現の変化に伴う疾患誘発等との相関性について解析がなされている。しかし、本来、ルシフェラーゼアッセイは、発光強度の増加を想定した評価系であり、その減少を指標にしたアッセイではダイナミックレンジが極めて狭く、これによる定量性の低下を招くばかりでなく、細胞毒性や転写不活性化等の二次的要因による偽陽性の検出を招く危険性を常にはらんでいる。

一般的に、標的遺伝子に対する miRNA の抑制効果は緩やかで、完全に遺伝子発現を抑制しないため、ルシフェラーゼアッセイにおいても発光の減少は顕著でなく、多くの例では数十%程度の減少に留まる。このため、細胞系においても miRNA の機能解析の結果が曖昧で、標的遺伝子に対する効果を明確に評価できない場合が多い。一方、個体での miRNA の機能解析では、検出感度が未だ十分でない *in vivo* 発光イメージングでの発光の減少は、著しい精度の低下を招いてしまい、検出が容易な個体表層や発現変化の劇的な miRNA 等、解析可能な例が限定されてしまう問題がある。

2. 研究の目的

前述のように、miRNA の解析には、一般的に PCR やアレイ解析等が用いられているが、これらの方法では試料を破碎するため miRNA 機能の時系列変化、即ちダイナミズムの解析は困難である。一方、非破碎的な解析法としてルシフェラーゼを用いた光学的測定が行われている。しかし、従来法では miRNA の成熟化 (機能化) に伴う発光の減衰を指標とするため、狭隘なダイナミックレンジでの検出による測定精度の低下を招くばかりでなく、細胞毒性等による偽陽性を検出するなど、高精度な解析は困難である。本研究ではこれらの問題を解決するため、ルシフェラーゼと共発現させた抗ルシフェラーゼ発光阻害抗体の発現を、解析対象とする miRNA により抑制させることで発光が増強する新規可視化システムの基盤を開発し、細胞や組織における miRNA 機能の量的および時空間変化のダイナミズム解析への適用を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アルパカ由来ルシフェラーゼ阻害抗体の作製と改良

本研究では最初に、miRNA の緩やかな遺伝子発現抑制を鋭敏に検出するため、我々が独自に開発した高発光強度型の緑色発光ルシフェラーゼ (ELuc) および赤色発光ルシフェラーゼ (SLR3) に対する阻害抗体の導出を行う。ELuc は既存の甲虫系ルシフェラーゼの中でも最高の発光強度を示し、また赤色ルシフェラーゼは既存のルシフェラーゼのうち最も長波長の光を放つルシフェラーゼであり、各々のルシフェラーゼは既にリアルタイム発光測定或いは発光イメージングにより、細胞および個体における遺伝子発現のダイナミズムを解析できることを実証しており、miRNA のダイナミズム解析においては各々細胞イメージングと *in vivo* 発光イメージングでの使用を想定している。

当該発光レポーター系では、細胞内でのルシフェラーゼ阻害抗体の発現を miRNA により抑制し、これに伴う発光の増強を検出する。即ち、細胞内で働く抗体の使用が不可欠であるが、通常抗体では分子の複雑さに起因するタンパク質としての不安定さのため、細胞内で機能しない場合が多い。一方、ラクダ科動物の抗体は、通常抗体とは異なり、軽鎖がなく重鎖のうちの 1 つのドメイン 1 個で抗原を認識することができる (ナノボディー抗体)。またその分子量も約 1 万と小さいため、細胞内で機能することが明らかとなっている。本研究では、既に保有するアルパカへ緑色および赤色発光ルシフェラーゼタンパク質を免疫し、ナノボディー抗体 (IgG2+IgG3) の抗体価の上昇を確認する。続いて白血球成分由来 mRNA から VHH 抗体 cDNA を増幅、ファージベクターにクローニングした抗ルシフェラーゼ抗体ライブラリーを作製し、活性

型ルシフェラーゼを 96 穴プレートに固定したバイオパンニングにより、これに結合するファージ、即ち抗ルシフェラーゼ抗体配列を発現しているファージクローンを選択する。

(2) In vitro でのルシフェラーゼ阻害抗体による発光阻害の検証と改良

上記で取得したルシフェラーゼ阻害抗体を大腸菌で発現、精製し、試験管内でルシフェラーゼに対する阻害活性を測定する。さらに認識領域の同定、解離定数の決定、阻害様式の解析を行い、阻害活性の高い抗体については多価化などのタンパク質工学を施し、発光活性阻害の最適化を図る。

(3) 抗ルシフェラーゼ阻害抗体遺伝子およびルシフェラーゼ遺伝子を導入した安定細胞株の樹立と機能検証

哺乳類細胞における抗ルシフェラーゼ抗体の機能を検証するため、抗ルシフェラーゼ抗体遺伝子およびルシフェラーゼ遺伝子を安定的に導入した細胞株を樹立し、抗体の発現の確認およびリアルタイム発光測定法による発光阻害の検証を行う。安定細胞株の作製には、宿主細胞の染色体とは独立して安定に維持され、また微小核融合法により任意の細胞に移入可能な人工染色体ベクター（マウス染色体の遺伝子領域を削除し、複製・維持・継承に必要な最小領域のみを持つ極小の染色体）に、ドキシサイクリン依存的に抗体遺伝子が発現するベクターおよび、ドキシサイクリン依存的に転写を誘導する転写因子の発現ベクター、さらに恒常的プロモーター制御下でルシフェラーゼが発現するベクターの 3 種類ベクターを人工染色体ベクター内の挿入部位に相同組み換えにより導入し、薬剤選択により 3 種のベクターが導入された安定細胞株を樹立する。使用する細胞はマウス線維芽細胞 A9 を用いる。細胞を樹立後、ウェスタンブロット法により抗体の発現を確認し、続いてリアルタイム発光測定によりドキシサイクリン添加後の発光強度の変化を測定することで抗体による発光阻害を検証する。

4. 研究成果

(1) アルパカ由来ルシフェラーゼ阻害抗体の作製と改良

まず、ブラジル産ヒカリコメツキムシ (*Pyrearinus termitilluminans*) 由来緑色発光ルシフェラーゼ (ELuc) および鉄道虫 (*Phrixothrix hirtus*) 由来赤色発光ルシフェラーゼ (SLR3) に対するナノボディー抗体を導出するため、大腸菌で発現させた各々の高純度精製タンパク質を調製し、産業技術総合研究所が保有するアルパカに混合したルシフェラーゼタンパク質を複数回免疫した。両ルシフェラーゼに対する抗体価の上昇を確認後、部分採血した。続いて、白血球成分由来 mRNA から特異的プライマーを用いナノボディー抗体 cDNA を増幅し、ファージベクターにクローニングした抗ルシフェラーゼ抗体ライブラリーを作製した。

次に、抗ルシフェラーゼ抗体のスクリーニングのため、両ルシフェラーゼタンパク質のプレート上への固定化方法を検討した。ルシフェラーゼタンパク質の疎水性を利用し、直接プレートに固定化する方法と、ルシフェラーゼタンパク質に融合した Flag タグを利用し、抗 Flag タグ抗体を予めプレート上に固定化してから Flag タグを介して固定化する方法について検討したところ、後者がより優れていることが明らかとなった。そこで、精製 ELuc および SLR3 タンパク質を抗 Flag 抗体を介して 96 ウェルマルチプレートに固定し、バイオパンニングにより ELuc 或いは SLR3 に結合するファージクローンをスクリーニングした。その結果、ELuc および SLR3 に対し特異的に結合する複数のファージクローンを取得、ファージクローンからナノボディー抗体 cDNA の配列を解析した結果、ELuc に対して結合能を示す独立クローンを 9 種類、SLR3 に対するクローンを 8 種類取得することに成功した。

(2) In vitro でのルシフェラーゼ阻害抗体による発光阻害の検証と改良

続いて抗ルシフェラーゼ抗体ライブラリーより単離したクローンのルシフェラーゼに対する阻害効果を検証した。まず、ELuc に対して結合能を示す 9 種の抗体タンパク質 (以下、抗 ELuc_VHH 抗体と略す) を大腸菌にて発現・精製し、精製 ELuc タンパク質に対する発光阻害実験を行った。発光阻害実験は、精製した ELuc タンパク質に発光基質である D-luciferin および補因子であるマグネシウムと ATP、さらに精製抗 ELuc_VHH 抗体を混合し、ルミノメーターを用いた発光強度測定により実施した。その結果、供試した 9 種類のうち 6 種類の抗体が ELuc に対し 40~50% の発光阻害活性を示すことが明らかとなった。発光阻害における抗 ELuc_VHH 抗体と ELuc タンパク質の量比について検討したところ、最適化した条件では 1 種類のクローンが ELuc の発光を約 70% 阻害することも明らかとなった。続いて、精製 ELuc タンパク質をセンサーチップ表面に固定し、表面プラズモン共鳴法により各抗 ELuc_VHH の ELuc に対する解離速度定数を解析した結果、いずれも数十 nM であることが明らかとなった。これらの結果は、当該研究の目的の一つである細胞内ナノボディー阻害抗体の導出という点において、取得したクローンは有望な抗体候補であることを示唆している。

次に、これら 6 種類の抗 ELuc_VHH 抗体の ELuc に対する認識領域を解析した。その結果、興味深いことに 5 種類は ELuc の C 末端を認識し、N 末端を認識する抗体は 1 種類であることが明らかとなった。続いて、抗体の阻害様式を明らかにするため、酵素反応速度論的解析を行った。解析には ELuc の C 末端を認識する 1 種類の抗体を代表例として用いた。一定濃度の抗体に濃度を変えた発光基質を添加し、生じる発光を測定して Lineweaver-Burk プロットを作成した。そ

の結果、非拮抗阻害型の阻害様式を示し、またその阻害定数は約 0.5 μM であることが明らかとなった (図 1)。解析した抗体が ELuc の活性部位とは比較的遠い距離にある C 末端を認識することを考慮すると、阻害様式が非拮抗型であることは理にかなった結果であった。

続いて、抗 ELuc_VHH 抗体を 2 分子連結させ、ホモダイマーを形成させることで完全な発光阻害能力を発現させる検討を行った。ホモダイマーに加え、結合部位が異なる他の抗 ELuc_VHH 抗体とのヘテロダイマーを作製したが、顕著な阻害能力の向上は見られず、ダイマー間のスペース配列やモノマーの組み合わせ等に工夫が必要であることが判明した。

次に、赤色発光ルシフェラーゼ SLR3 に対して結合能を示す 8 種の抗体タンパク質 (以下、抗 SLR3_VHH と略す) の SLR3 の発光阻害効果を検証するため、上記と同様、大腸菌にて発現・精製し、精製 SLR3 タンパク質に対する発光阻害実験を行ったところ、明瞭な発光反応阻害活性が認められた。続いて、精製 SLR3 タンパク質を固定化し表面プラズモン共鳴法により抗 SLR3_VHH の SLR3 に対する解離速度定数を算出したところ、抗 ELuc_VHH と同様、いずれも数十 nM であることが明らかとなり、赤色発光ルシフェラーゼ SLR3 に対するナノボディー抗体の導出についても成功した。

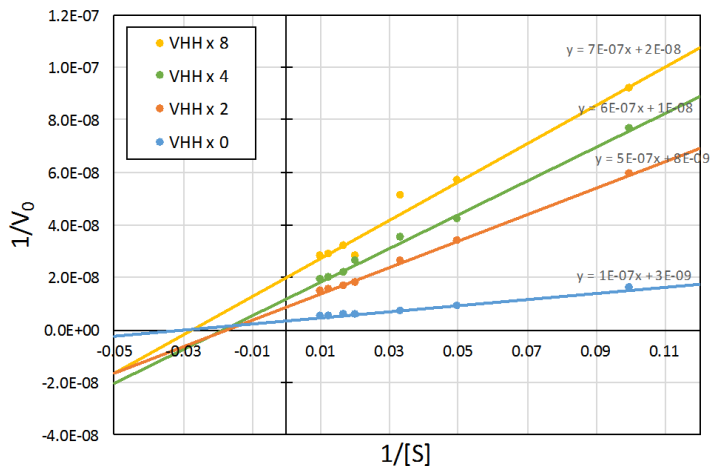


図 1 抗 ELuc_VHH の Lineweaver-Burk プロット解析

(3) 抗ルシフェラーゼ阻害抗体遺伝子およびルシフェラーゼ遺伝子を導入した安定細胞株の樹立と機能検証

続いて、導出した抗ルシフェラーゼ VHH 抗体が細胞内においてルシフェラーゼの発光反応を阻害するかを検証するため、抗 ELuc_VHH 抗体遺伝子および ELuc 遺伝子を安定的に導入した安定細胞株を作製した。抗 ELuc_VHH 抗体が高発現した場合、毒性等の影響を細胞に対して及ぼす可能性を考慮し、抗体はドキシサイクリン依存的に発現するようデザインした。具体的には、

- TK プロモーター下流に SLR3、IRES、ELuc を配した発現ベクター
- CMV プロモーター下流に Tet リプレッサー遺伝子を配した発現ベクター
- CMV 最少プロモーター下流にテトラサイクリン応答配列、抗 ELuc_VHH 抗体遺伝子を配した発現ベクター

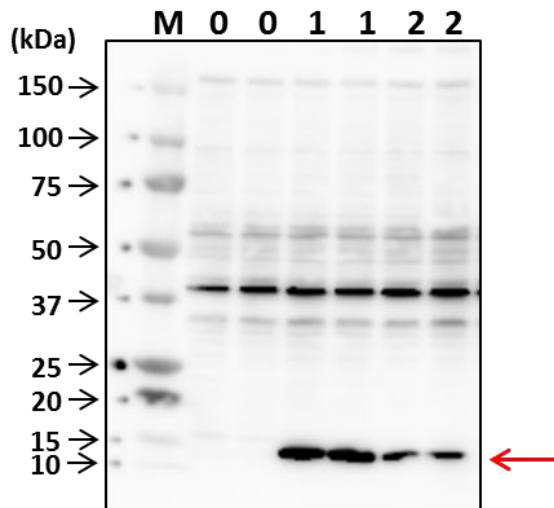


図 2 抗 ELuc_VHH 抗体の細胞での発現

の 3 種類の発現ベクターを作製、各々をマウス人工染色体ベクターが予め導入されたマウス線維芽細胞 A9 にトランスフェクションし、相同組み換えによりマウス人工染色体ベクターに挿入した安定細胞株を樹立した。最初に、抗 ELuc_VHH 抗体の細胞内での発現を確認するため、ドキシサイクリンで発現を誘導後、CO₂ インキュベーター内で 1、2 日間培養し、抗 ELuc_VHH 抗体に融合させた Flag タグの抗体を用い western blot 解析を行った。その結果、図 2 に示すように、抗 ELuc_VHH 抗体の A9 細胞内における発現が確認された。一方、解析に供した数種類の抗 ELuc_VHH 抗体については有意な発現が認められず、cDNA 配列の改変等の改良が必要であることが明らかとなった。

次に、ELuc の発光反応が抗 ELuc_VHH 抗体により細胞内においても阻害されるか検証するため、作製した安定細胞株を 24 ウェルプレートに播種し一晩 CO₂ インキュベーター内で培養後、発光基質 D-luciferin および所定濃度のドキシサイクリンを含む培養液に交換後、リアルタイム発光測定を実施した。その結果、ドキシサイクリンの濃度依存的に ELuc の発光強度は減少したが、対照のルシフェラーゼとして発現させた SLR3 の発光強度も同程度減少することが明らかとなり、抗 ELuc_VHH 抗体による特異的な ELuc の発光反応阻害は確認できなかった。このため現在、ELuc と抗 ELuc_VHH 抗体をペルオキシソーム等の特定の細胞内小器官に局在化させ、反

応場をコンパクトにすることで ELuc への結合、即ち発光反応阻害の確率を高めるための改良を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Kamrul Hasan Khan, Arisa Himeno, Shouhei Kosugi, Yosuke Nakashima, Abdur Rafique, Ayana Imamura, Takaaki Hatanaka, Dai-Ichiro Kato, Yuji Ito, IgY-binding peptide screened from a random peptide library as a ligand for IgY purification. *J. Pep. Sci.* (2017) 23, 790-797 (査読有). 10.1002/psc.3027

Mie, Y., Hirano, Y., Kowata, K., Nakamura, A., Yasunaga, M., Nakajima, Y., Komatsu, Y., Function Control of Anti-microRNA Oligonucleotides Using Interstrand Cross-Linked Duplexes, *Mol. Ther. Nucleic Acids* (2018) 10, 64-74 (査読有). 10.1016/j.omtn.2017.11.003

Satoh, D., Abe, S., Kobayashi, K., Nakajima, Y., Oshimura, M., Kazuki, Y., Human and mouse artificial chromosome technologies for studies of pharmacokinetics and toxicokinetics. *Drug Metab. Pharmacokinet.* (2018) 33, 17-30 (査読有). 10.1016/j.dmpk.2018.01.002

Akazawa-Ogawa, Y., Nagai, H., Hagihara, Y., Heat denaturation of the antibody, a multi-domain protein. *Biophys. Rev.* (2018) 10, 255-258 (査読有). 10.1007/s12551-017-0361-8

〔学会発表〕(計17件)

横田瑠里 他、CCAP 法による抗体薬物複合体の作成とその機能評価、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会

岸本聡 他、CCAP 法によるヒト IgG 抗体への部位特異的な Fc α R 特異的 VHH の導入とそのコンジュゲートの機能評価、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会

岸本聡 他、Fc R 特異的 VHH 抗体の IgG 抗体 Fc 領域への部位特異的コンジュゲート作製と機能評価、第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム

横田瑠里 他、CCAP 法による新規抗体薬物複合体の作製とその腫瘍細胞成長阻害活性評価、第 40 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム

加藤太一郎、バイオテクノロジーの発展に寄与するホタルの発光反応、三学会(日本動物学会、日本生態学会、九州沖縄植物学会)合同鹿児島例会

中島洋介 他、CCAP 法を用いたヒト IgG 抗体への部位特異的 HSA 付加による抗体検出感度の向上、平成 29 年度日本生化学会九州支部例会

中島芳浩 他、発光レポーターを用いた細胞機能解析およびセルベースアッセイへの応用、日本動物細胞工学会 2017 年度大会

中島芳浩 他、培養細胞を光らせて食品の機能性を探る、油化学関連シンポジウム in 岡山

八藤丸亮 他、プロテイン A 改変ペプチド Z33 を用いた部位特異的抗体標識試薬の設計と結合、第 49 回若手ペプチド夏の勉強会

鶴田篤弘 他、ホタルルシフェラーゼ特異的抗体を用いた酵素活性制御の試み、第 49 回若手ペプチド夏の勉強会

姫野ありさ 他、ヒト IgG 結合ペプチドの特異性変換、第 49 回若手ペプチド夏の勉強会

加藤太一郎、ホタル生物発光の魅力、平成 29 年度九州コロイドコロキウム

鶴田篤弘 他、アルパカ抗体を用いたホタルルシフェラーゼの発光活性制御、第 19 回生体触媒化学シンポジウム

鶴田篤弘 他、ホタルルシフェラーゼ生物発光活性制御におけるアルパカ抗体の利用、第 70 回日本生物工学会大会

鶴田篤弘 他、シングルドメイン抗体を利用したホタルルシフェラーゼの酵素活性制御、第 18 回泉屋コロキウム

鶴田 篤弘 他、抗体を用いたホタル生物発光制御、第 25 回日本生物工学会九州支部鹿児島大会

Atsuhiko Tsuruta 他、Utilization of single domain antibody for controlling the bioluminescent catalytic activity of firefly luciferase、The 20th Biocatalysis Symposium of Japan

〔図書〕(計2件)

Kato, D., Firefly Luciferase as Biocatalysts, T. Matsuda Eds, Future Directions in Biocatalysis, 2nd Edition, Elsevier, 2017, 149-171.

赤澤陽子、萩原義久、タンパク質のアモルファス凝集と溶解性、シーエムシー出版、2019、219-226.

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：赤澤陽子

ローマ字氏名：AKAZAWA, Yoko

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：バイオメディカル研究部門

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：50549897

研究分担者氏名：加藤太一郎

ローマ字氏名：KATO, Dai-ichiro

所属研究機関名：鹿児島大学大学院

部局名：理工学研究科生命化学専攻

職名：助教

研究者番号（8桁）：60423901

(2) 研究協力者

該当なし

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。