

令和元年6月24日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04729

研究課題名(和文) コムギ無細胞系とNGS技術を融合したドチザメナノボディ選抜・構築技術の開発

研究課題名(英文) Development of houndshark nanobody by combination of wheat cell-free and NGS technologies

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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：愛媛大学で開発されたコムギ無細胞技術と愛媛県の水産栽培飼育施設とがタッグを組み、GFPタンパク質をモデルに、ドチザメ科4種のサメを対象にコムギ無細胞系と次世代シーケンス(NGS)技術を融合し単鎖抗体である“ドチザメナノボディ(フカボディ)作製技術の開発”を行った。その結果、エイラクブカがフカボディを誘導することがわかり、バイオパンニング後のNGS解析により抗原依存的なフカボディを同定できる技術ができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、日本産エイラクブカを用いて、抗原特異的なフカボディを単離する技術が確立できた。フカボディは、ナノボディよりさらに抗原タンパク質の溝を認識することが本研究成果により分かってきたので、フカボディを利用した創薬ができる基盤技術となった。また、本研究成果により古代ザメとは異なり、現在に広く存在するサメは、哺乳類に近い免疫応答系を有していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We used GFP (green fluorescent protein) as a model for shark nanobody, which we called shark nanobody as fukabody. After GFP immunization to houndshark, some houndsharks indicated specific immunoresponse to GFP. We screened GFP-binding fukabody by phage display at totally three-time rounds. DNA fragments from each round were analyzed its sequences by next generation sequencing (NGS) technology. Enriched DNA fragments were found, and then their proteins were synthesized by wheat cell-free system. Enriched clones indicated binding ability to GFP antigen. We are successful to develop construction system for fukabody by combination of wheat cell-free and NGS technologies.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：cell-free antibody shark nanobody fukabody houndshark NGS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

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ことから、ウイルスや病原菌の検出、病理・病態診断、疾病などへの抗体医薬疾患など様々な形で利用されており**人類の生活に必須の分子**である。一般的な抗体分子は、それぞれ**2種類**のH鎖と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・特異性を有し、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ことが分かってきた。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なため自由にナノボディ開発ができないのが現状であり、日本には熊本県にアルパカを利用したナノボディ作製のベンチャー企業が1社存在するのみである。

サメはナノボディ研究の有用な候補生物種であることが期待されているが、多くは体内受精を必要とし卵生や卵胎生など産卵形態が複雑なことから、水槽内での繁殖がほぼ不可能である。また、餌の確保や食いが悪く、水質や水温にデリケートであることから一般的な水槽での飼育も容易ではないなど、サメを研究材料にした環境整備の構築が難しく、研究はほとんど進んでいないのが現状である。愛媛県は瀬戸内海に面し、水産業が盛んである。興味深いことに、**松山市沖の伊予灘**は、性格が温和しく商用価値が低いドチザメ科に属する複数種類のサメが毎年産卵・繁殖している**天然の養殖場**となっており、1年中簡単に地引き網で捕獲されるため、これらの**ドチザメ科サメの入手が非常に容易**である。また愛媛県は水産業が重要な産業であることから、**愛媛大学や愛媛県内に様々な魚類飼育に対応できる水産試験場を多く有し、サメに対しても飼育可能な環境が整っている**。また、本申請は挑戦的萌芽研究の予算により、ドチザメ科の4種類のサメを対象に、餌の選定、飼育法の確立、免疫に適したサメ採取時期の決定、サメ血液のサンプルリング法、免疫後の識別法などの開発を進め、既にドチザメナノボディが取得できる基盤技術の構築を行っている。そのため、世界トップのサメナノボディ研究体制の準備は十分確立されている。プロジェクト期間中に、ナノボディは商標登録がされ、名前の利用において一般使用に制限されることになったため、本プロジェクトではドチザメのナノボディを**フカボディ**という命名し利用する。

2. 研究の目的

愛媛大学で開発されたコムギ無細胞技術と愛媛県の水産栽培飼育施設とがタッグを組み、ドチザメ科4種のサメを対象にコムギ無細胞系と次世代シーケンシング技術を融合し**“ドチザメナノボディ(フカボディ)作製技術の開発”**を行う。また、技術開発と並行して、サメの免疫機構解明に向けた基盤研究を行う(図2)。

3. 研究の方法

- (1) **ドチザメ科サメ4種の免疫系遺伝子発現解析**: ドチザメ科4種類(ドチザメ、シロザメ、ホシザメ、エイラクブカ)の血液からリンパ球を濃縮し、全RNAを単離し、Illumina社HiSeq1500によるRNA-seq解析を行った。
- (2) **完全長フカボディ遺伝子のクローン化**: エイラクブカの脾臓からRNAを単離し、IgNAR遺伝子をRT-PCRにより単離した。
- (3) **フカボディ検出抗体の構築**: クローン化したエイラクブカIgNARのFc領域のドメインを大腸菌細胞で発現させマウスに免疫することにより、ポルクローナル抗体を単離した。
- (4) **フカボディファージライブラリの構築**: 市販GFPタンパク質をエイラクブカに免疫し、血液中の抗体脾臓からRNAを単離し、可変領域をRT-PCRで増幅し、ファージライブラリを構築した。
- (5) **ファージディスプレイを用いた抗原特異的フカボディモノクローナルの単離**: 市販GFPタンパク質を用いてバイオパンニングを3回行い、GFPに結合するドチザメナノボディを単離した。NGS解析は、各バイオパンニングの可変領域をPCRで増幅後、Illumina社HiSeq1500により行った。
- (6) **モノクローナルフカボディタンパク質の調製**: ドチザメナノボディを大腸菌発現ベクターに組み込み、

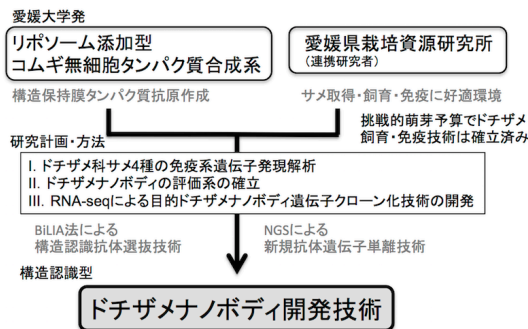


図1 本申請によるドチザメナノボディ技術開発の概念図

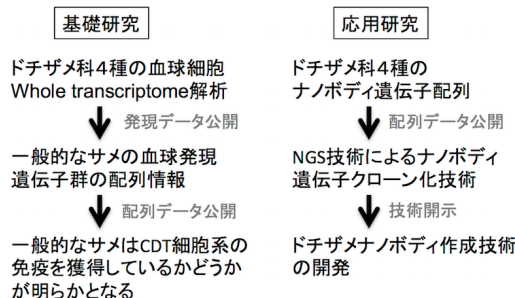


図2 本申請による基礎研究と応用研究

細胞内に発現させ、不溶画分を回収・洗浄し、加熱後、可溶性画分を回収し調整した。
 (7) **モノクローナルフカボディの評価**: ドチザメナノボディタンパク質の結合能は、AlphaScreen 法もしくは ELISA 法により行った。

4. 研究成果

ドチザメの飼育および採血は、愛媛県栽培資源研究所と共同で行った。

(1) ドチザメ科サメ4種の免疫系遺伝子発現解析

① 免疫系遺伝子群の評価

ドチザメ科 4 種類(ドチザメ、シロザメ、ホシザメ、エイラクブカ)からそれぞれ採血し、平成26年からの挑戦的萌芽(課題番号 26640130) 予算で確立したドチザメ血液からの RNA 単離法を用いて、DNA のコンタミを極力無くした単離 RNA を材料に、Illumina 社 HiSeq1500 による RNA-seq 解析を行い、これまでにサメでは報告のなかった、Toll 様受容体などを新たに見出すことに成功した。これによりサメ免疫においても、アジュバントが有効であることが分かった。

② 完全長ドチザメナノボディ遺伝子のクローン化

ドチザメ以外のシロザメ、ホシザメ、エイラクブカのナノボディ遺伝子(完全長の場合 IgNAR 遺伝子と)の配列は未知であった。I-1)で得られた配列データからプライマーをデザインし、最終的 RT-PCR により完全長ナノボディ遺伝子を単離することに成功した。

③ 免疫抗原応答性ドチザメナノボディ遺伝子発現解析

モデルとして GFP を抗原として用いて実験を行った。複数匹のドチザメ科 4 種の抗原 GFP 免疫の前後の血液を採血し、新たにフカボディ認識抗体を用いて、抗原により誘導されたナノボディを検出することができた。その結果、1 種類のドチザメ種エイラクブカにおいて、抗原依存的なナノボディの産生が確認できた。

(2) フカボディの評価系の確立

① フカボディをコードする IgNAR 遺伝子のクローニング

前年度の配列情報を元に RT-PCR を行った結果、ホシザメ、エイラクブカの IgNAR 遺伝子のクローニングに成功した。得られた遺伝子配列情報を元に、エイラクブカの IgNAR のコンスタント領域のタンパク質を大腸菌で合成し、ウサギに免疫し、抗エイラクブカ IgNAR 認識 2 次抗体の作製を行い、その結果、3 種のフカボディ遺伝子の配列情報とホシザメ、エイラクブカの IgNAR 遺伝子のクローニングに成功した。

② フカボディ検出抗体の構築

次に、Venus タンパク質をそれら 3 種のサメに免疫した結果、エイラクブカの血液中に抗原依存的な IgNAR の誘導が確認されたので、免疫したエイラクブカの脾臓を単離し、フカボディ遺伝子領域を PCR で増幅し、ファージライブラリを作製し、Venus タンパク質に結合するフカボディを 3 種類単離することに成功した。得られたフカボディの抗体評価を行ったところ、フカボディは 80℃ で 1 時間ボイルしても活性を保持しており、抗体価は平均で約 10^8 であることが分かった。以上のことから、愛媛県においてフカボディ作製技術の基盤は整った(図3)。

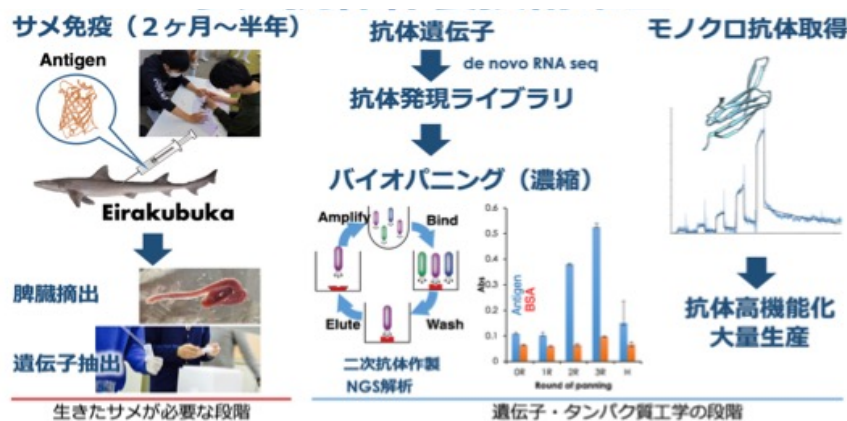


図3.フカボディ作製スキーム

(3) 次世代シーケンス技術を用いたフカボディのクローン化技術の確立

① 次世代シーケンス技術(NGS)を用いたエイラクブカフカボディ遺伝子のシーケンス

現時点でサメの抗体産生細胞のハイブリドーマ化は不可能であり、また抗体産生細胞マーカーの存在も未解明であるため、抗体産生細胞の濃縮は困難である。そこで近年技術革新が目覚ましい次世代シーケンス技術による可変領域 Amplicon sequencing データを用いた。上記の Venus タンパク質を免疫したエイラクブカを用いてファージライブラリを作成し、抗原を用いたバイオパンニング前と 3 回までのバイオパンニング後の各ライブラリを次世代シーケンスを

行った。

② NGSによるフカボディライブラリ解析

得られたフカボディ的可変領域シーケンスデータを解析したところ、バイオパンニングごとに濃縮されるフカボディ遺伝子が見出され(図4)、それら配列を人工合成し、タンパク質を合成し評価したところ抗原への結合能を有していた。この結果、次世代シーケンス技術を用いて抗原特異的エイラクブカフカボディ遺伝子の単離法が確立できた。

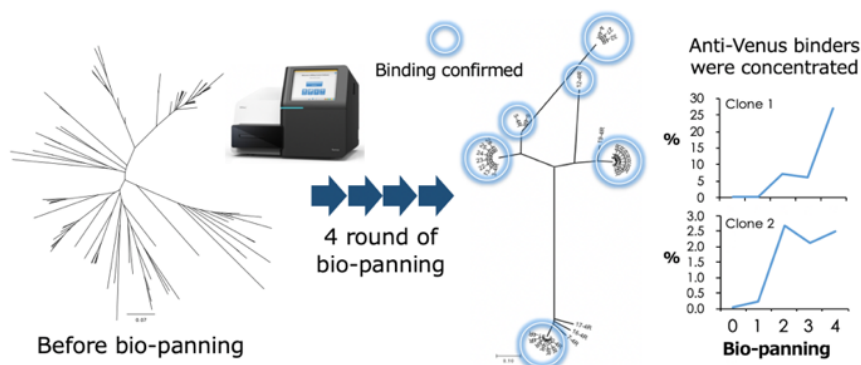


図4. NGSによるフカボディライブラリ解析

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 30 件)

1. Nakanishi A, Kaneko N, Takeda H, Sawasaki T, Morikawa S, Zhou W, Kurata M, Yamamoto T, Akbar SMF, Zako T, Masumoto J. Amyloid β directly interacts with NLRP3 to initiate inflammasome activation: identification of an intrinsic NLRP3 ligand in a cell-free system. *Inflamm Regen*. 2018, 38, 27, DOI:10.1186/s41232-018-0085-6.
2. Yonezawa T, Takahashi H, Shikata S, Sawasaki T, Kitamura T, Goyama S. The ubiquitin ligase RNF38 promotes RUNX1 ubiquitination and enhances RUNX1-mediated suppression of erythroid transcription program. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018, 505, 905-909, DOI:10.1016/j.bbrc.2018.10.006.
3. Miura T, Takeo S, Ntege EH, Otsuki H, Sawasaki T, Ishino T, Takashima E, Tsuboi T. The malaria parasite RhopH protein complex interacts with erythrocyte calmyrin identified from a comprehensive erythrocyte protein library. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018, 500, 261-267, DOI:10.1016/j.bbrc.2018.04
4. Hashimoto Y, Zhou W, Hamauchi K, Shirakura K, Doi T, Yagi K, Sawasaki T, Okada Y, Kondoh M, Takeda H. Engineered membrane protein antigens successfully induce antibodies against extracellular regions of claudin-5. *Sci Rep*. 2018, 8, 8383, DOI:10.1038/s41598-018-26560-9.
5. Nemoto K, Kagawa M, Nozawa A, Hasegawa Y, Hayashi M, Imai K, Tomii K, Sawasaki T. Identification of new abscisic acid receptor agonists using a wheat cell-free based drug screening system. *Sci Rep*. 2018 8, 4268, DOI:10.1038/s41598-018-22538-9.
6. Suzuki Y, Ogasawara T, Tanaka Y, Takeda H, Sawasaki T, Mogi M, Liu S, Maeyama K. Functional G-Protein-Coupled Receptor (GPCR) Synthesis: The Pharmacological Analysis of Human Histamine H1 Receptor (HRH1) Synthesized by a Wheat Germ Cell-Free Protein Synthesis System Combined with Asolectin Glycosomes. *Front Pharmacol*. 2018, 9, 38, DOI:10.3389/fphar.2018.00038.
7. Uematsu A, Kido K, Manabe E, Takeda H, Takahashi H, Hayashi M, Imai Y, Sawasaki T. DANFIN functions as an inhibitor of transcription factor NF- κ B and potentiates the antitumor effect of bortezomib in multiple myeloma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018, 495, 2289-2295, DOI:10.1016/j.bbrc.2017.12.142.
8. Nemoto K, Ramadan A, Arimura GI, Imai K, Tomii K, Shinozaki K, Sawasaki T. Tyrosine phosphorylation of the GARU E3 ubiquitin ligase promotes gibberellin signalling by preventing GID1 degradation. *Nat Commun*, 2017, 8, 1004, DOI:10.1038/s41467-017-01005-5.

9. Sun S, Nakashima K, Ito M, Li Y, Chida T, Takahashi H, Watashi K, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of PUF60 in Transcriptional and Post-transcriptional Regulation of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Expression. *Sci Rep* , 2017, 7, 12874, DOI:10.1038/s41598-017-12497-y.
10. Yonezawa T, Takahashi H, Shikata S, Liu X, Tamura M, Asada S, Fukushima T, Fukuyama T, Tanaka Y, Sawasaki T, Kitamura T, Goyama S., The ubiquitin ligase STUB1 regulates stability and activity of RUNX1 and RUNX1-RUNX1T1. *J Biol Chem*, 2017, 292, 12528-12541, DOI:10.1074/jbc.M117.785675.
11. Hashimoto Y, Shirakura K, Okada Y, Takeda H, Endo E, Tamura M, Watari A, Sadamura Y, Sawasaki T, Doi T, Yagi K, Kondoh M. Claudin-5-Binders Enhance Permeation of Solutes across the Blood-Brain Barrier in a Mammalian Model. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 363, 275-283, DOI:10.1124/jpet.117.243014
12. Liu S, Hasegawa H, Takemasa E, Suzuki Y, Oka K, Kiyoi T, Takeda H, Ogasawara T, Sawasaki T, Yasukawa M, Maeyama K. Efficiency and Safety of CRAC Inhibitors in Human Rheumatoid Arthritis Xenograft Models. *J Immunol*. 2017, 199, 1584-1595, DOI:10.4049/jimmunol.1700192.
13. Krug SM, Hayaishi T, Iguchi D, Watari A, Takahashi A, Fromm M, Nagahama M, Takeda H, Okada Y, Sawasaki T, Doi T, Yagi K, Kondoh M. Angubindin-1, a novel paracellular absorption enhancer acting at the tricellular tight junction. *J Control Release*. 2017, 260, 1-11, DOI:10.1016/j.jconrel.2017.05.024
14. Takeda H, Zhou W, Kido K, Suno R, Iwasaki T, Kobayashi T, Sawasaki T. CP5 system, for simple and highly efficient protein purification with a C-terminal designed mini tag. *PLoS One*. 2017, 12, e0178246, DOI:10.1371/journal.pone.0178246.
15. Yamamoto T, Taira Nihira N, Yogosawa S, Aoki K, Takeda H, Sawasaki T, Yoshida K. Interaction between RNF8 and DYRK2 is required for the recruitment of DNA repair molecules to DNA double-strand breaks. *FEBS Lett*. 2017, 591, 842-853, DOI:10.1002/1873-3468.12596.
16. Ogawa S, Miyamoto K, Nemoto K, Sawasaki T, Yamane H, Nojiri H, Okada K. OsMYC2, an essential factor for JA-inductive sakuranetin production in rice, interacts with MYC2-like proteins that enhance its transactivation ability. *Sci Rep* , 2017, 7, 40175, DOI:10.1038/srep40175.
17. Shibata Y, Tokunaga F, Goto E, Komatsu G, Gohda J, Saeki Y, Tanaka K, Takahashi H, Sawasaki T, Inoue S, Oshiumi H, Seya T, Nakano H, Tanaka Y, Iwai K, Inoue JI. HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains. *PLoS Pathog* , 2017, 13, e1006162, DOI:10.1371/journal.ppat.1006162.
18. Kaneko N, Iwasaki T, Ito Y, Takeda H, Sawasaki T, Morikawa S, Nakano N, Kurata M, Masumoto J. Applications of reconstituted inflammasomes in a cell-free system to drug discovery and elucidation of the pathogenesis of autoinflammatory diseases. *Inflamm Regen*. 2017, 37, 9, DOI:10.1186/s41232-017-0040-y.
19. Kaneko N, Ito Y, Iwasaki T, Takeda H, Sawasaki T, Migita K, Agematsu K, Koga T, Kawakami A, Yachie A, Yoshiura K, Morikawa S, Kurata M, Masumoto J. Poly (I:C) and hyaluronic acid directly interact with NLRP3, resulting in the assembly of NLRP3 and ASC in a cell-free system. *European Journal of Inflammation*. 2017, 15, 85-97, DOI:10.1177/1721727X17711047.
20. Takagi M, Sakamoto T, Suzuki R, Nemoto K, Obayashi T, Hirakawa T, Matsunaga TM, Kurihara D, Nariai Y, Urano T, Sawasaki T, Matsunaga S. Plant Aurora kinases interact with and phosphorylate transcription factors. *J Plant Res*. 2016 129, 1165-1178. DOI:なし
21. Kuwahara M, Ise W, Ochi M, Suzuki J, Kometani K, Maruyama S, Izumoto M, Matsumoto A, Takemori N, Takemori A, Shinoda K, Nakayama T, Ohara O, Yasukawa M, Sawasaki T, Kurosaki T, Yamashita M. Bach2-Batf interactions control Th2-type immune response by regulating the IL-4 amplification loop. *Nat Commun*. 2016 7, 12596. DOI:10.1038/ncomms12596.
22. Nakazawa S, Oikawa D, Ishii R, Ayaki T, Takahashi H, Takeda H, Ishitani R, Kamei K,

- Takeyoshi I, Kawakami H, Iwai K, Hatada I, Sawasaki T, Ito H, Nureki O, Tokunaga F. Linear ubiquitination is involved in the pathogenesis of optineurin-associated amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Commun*. 2016 7, 12547. DOI:10.1038/ncomms12547.
23. Sakamaki K, Ishii TM, Sakata T, Takemoto K, Takagi C, Takeuchi A, Morishita R, Takahashi H, Nozawa A, Shinoda H, Chiba K, Sugimoto H, Saito A, Tamate S, Satou Y, Jung SK, Matsuoka S, Koyamada K, Sawasaki T, Nagai T, Ueno N. Dysregulation of a potassium channel, THIK-1, targeted by caspase-8 accelerates cell shrinkage. *Biochim Biophys Acta*. 2016 pii: S0167-4889(16), 30215-4. DOI:10.1016/j.bbamcr.2016.08.010.
24. Santolini M, Sakakibara I, Gauthier M, Ribas-Aulinas F, Takahashi H, Sawasaki T, Mouly V, Concordet JP, Defosse PA, Hakim V, Maire P. MyoD reprogramming requires Six1 and Six4 homeoproteins: genome-wide cis-regulatory module analysis. *Nucleic Acids Res*. 2016 44, 8621-8640. DOI:10.1093/nar/gkw512.
25. Iwasaki T, Kaneko N, Ito Y, Takeda H, Sawasaki T, Heike T, Migita K, Agematsu K, Kawakami A, Morikawa S, Mokuda S, Kurata M, Masumoto J. Nod2-Nodosome in a Cell-Free System: Implications in Pathogenesis and Drug Discovery for Blau Syndrome and Early-Onset Sarcoidosis. *ScientificWorldJournal*. 2016 2597376. DOI:10.1155/2016/2597376.
26. Kudoh A, Miyakawa K, Matsunaga S, Matsushima Y, Kosugi I, Kimura H, Hayakawa S, Sawasaki T, Ryo A. H11/HSPB8 Restricts HIV-2 Vpx to Restore the Anti-Viral Activity of SAMHD1. *Front Microbiol*. 2016 7, 883. DOI:10.3389/fmicb.2016.00883.
27. Yano T, Takeda H, Uematsu A, Yamanaka S, Nomura S, Nemoto K, Iwasaki T, Takahashi H, Sawasaki T. AGIA Tag System Based on a High Affinity Rabbit Monoclonal Antibody against Human Dopamine Receptor D1 for Protein Analysis. *PLoS One*. 2016 11, e0156716. DOI:10.1371/journal.pone.0156716.
28. Takahashi H, Uematsu A, Yamanaka S, Imamura M, Nakajima T, Doi K, Yasuoka S, Takahashi C, Takeda H, Sawasaki T. Establishment of a Wheat Cell-Free Synthesized Protein Array Containing 250 Human and Mouse E3 Ubiquitin Ligases to Identify Novel Interaction between E3 Ligases and Substrate Proteins. *PLoS One*. 2016 1, e0156718. DOI:10.1371/journal.pone.0156718.
29. 根本圭一郎、澤崎達也。チロシンリン酸化によるジベレリン応答の新しい制御機構。バイオインダストリー 2018, 76, 232-225.
30. Takeda H, Sawasaki T. AGIA タグシステム：細胞生物学研究に最適な高感度検出およびキャプチャー用ペプチドタグ [AGIA tag system: a super-sensitive detection and capture peptide tag suitable for cell biology]. *生化学*. 2017, 89, 302-307.

〔学会発表〕（計 41 件）誌面の制約のため抜粋

- くすりはタンパク質を狙う，口頭発表，澤崎達也，第 91 回日本薬理学会年会／第 18 回国際薬理学・臨床薬理学会議（WCP2018） | 市民公開講座，2018/7/1-6，国内。

〔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/cell-free/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：成田 公義

ローマ字氏名：Mitsuyoshi Narita

所属研究機関名：愛媛県栽培資源研究所

※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。