

令和元年6月12日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13096

研究課題名(和文) Nanodiscとセルフリー合成系による創薬基盤技術の構築

研究課題名(英文) Technical developmet of drug discovery basis using cell-free system and nanodisc

研究代表者

車 愈徹 (Kuruma, Yutetsu)

東京工業大学・地球生命研究所・特任准教授

研究者番号：40508420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Nanodiscを加えたcell-free系において、バクテリオロドプシン(bR)を合成し、bRが膜挿入したNDを調製した。これをベイトとし、ランダムなアミノ酸(AA)配列を持つ10AAペプチドのプールから特異的に結合する配列を選択した。選択された配列のDNA情報からさらに次サイクルのライブラリーを作製し、同じセクションを数回繰り返したあと、選択された配列をNGSにより解析した。その結果、サイクルを重ねるごとにコピー数が増加した配列が入手できた。これらのDNA配列情報からターゲットのbRに特異的に結合するペプチドの裏付け実験を行なっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モノクローナル抗体を作製する従来の方法は、ハイブリドーマ法やファージディスプレイ法があるが、いずれの方法においても、ターゲット抗原発現細胞や精製抗原タンパク質の入手が必要である。申請者は先端技術としての試験管内合成法と、最新の脂質操作技術を用いて、正しい構造を維持した膜タンパク質の合成に成功している。本方法により、これまでの生体や培養細胞を用いた方法と比較して、抗体入手までの時間が大幅に短縮できることが期待できる。このようなセルフリー系による抗原作製と、連続した抗体作製ができるようになれば、抗体医薬創薬研究の1次選別技術として広く応用できることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：bacteriorhodopsin (bR) was synthesized in cell-free translation system which including Nanodisc. The synthesized bR were integrated into Nanodisc membrane and used as a bait for in vitro peptide selection. a peptide library containing total random amino acid sequence (10aa) were prepared by the cell-free system. After combining bR-nanodisc and peptide library, candidate peptides which specifically bind to bR were isolated together with their mRNA. the collected mRNA were treated by RT-PCR and applied for the second round peptide library. after repeating these cycle for several times, we analyzed the selected sequence by NGS, and the sequence were converted into amino acids seq. Such peptides were ordered and analyzed for its binding activity to bR.

研究分野：合成生物学

キーワード：セルフリー系 nanodisc GPCR mRNA display

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

## 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬は、従来の低分子医薬とは異なり、身体が持つ免疫システムを利用し、ガン細胞など特定の細胞を狙い打ちする画期的な医薬品である。副作用の少なさや、これまで治療法が無かった病気への効果などが注目を浴びており、今後の医療を変革する新しい医薬品として大きな期待が寄せられている。このような背景の中、ターゲットの抗原に特異的に結合する抗体を安定して獲得できる新技術の確立は創薬研究における急務であり、目下世界規模で先進的な研究が進められている (Takeda *et al.* 2015 *Sci. Rep.*, Estelles *et al.* 2007 *Int J Nanomedicine.*)

これまでに研究代表者は、試験管内タンパク質合成系 (セルフリー系) に膜画分を加えた *in vitro* システムを用いて種々の膜タンパク質を合成してきた (Kuruma *et al.* 2015 *Nat. Protoc.*, Matsubayashi and Kuruma *et al.* 2014 *Angew. Chem.*, Kuruma *et al.* 2012 *Biochem J*)。特に最近、人工的に構成したディスク型の脂質二重膜、Nanodisc を用いて GPCR 型の膜タンパク質を合成したところ、合成と同時に自発的に膜挿入し、さらに活性も保持されていることが確認できた。これは、セルフリー系で合成した GPCR が、天然型と同じ膜配向性を維持しつつ、受容体タンパク質として合成されたことを示唆するものである。また、同じセルフリー系を用いて、ランダムアミノ酸配列から、特定のタンパク質に結合するペプチド鎖をスクリーニングする、リボソームディスプレイの研究が進んでおり (Ohashi *et al.* 2012 *Methods Mol Biol.*)。生体を介さないその方法から、ハイスループット化による大規模スクリーニングへの応用が期待されている。セルフリー系を基盤としたこれら 2 つの技術を組み合わせることで、GPCR のような膜表在型抗原の作成から、それら抗原に結合する抗体配列の探索までを試験管内で行える新しい創薬基盤技術を構築する構想に至った。

## 2. 研究の目的

- Nanodisc と再構築型セルフリー系を用いたヒト GPCR 型受容体タンパク質の合成 (初年度予定)
- GPCR を組み込んだ Nanodisc とリボソームディスプレイ法によるスクリーニング系の構築 (2 年度目以降予定)
- 得られたペプチド配列を組み込んだ抗体の作製と機能評価 (3 年度目以降予定)

## 3. 研究の方法

### A) 再構築型試験管内タンパク質合成系によるターゲット受容体の合成

転写・翻訳反応に必要な酵素や高度に精製したリボソーム、NTPs や tRNA などの低分子化合物から再構築した試験管内タンパク質合成系 (PURE system) に Nanodisc を加えた反応系において、ターゲットとなる受容体膜タンパク質を合成する (図 1)。これまでに研究代表者等によって、合成された膜タンパク質が、翻訳と同時に Nanodisc 膜へ自発的に膜挿入することが確認できている。特に GPCR のような 7 回膜貫通型タンパク質について好成績を示しており、膜上で天然型の立体構造を維持していることも確認している (図 1)。さらに、Nanodisc を

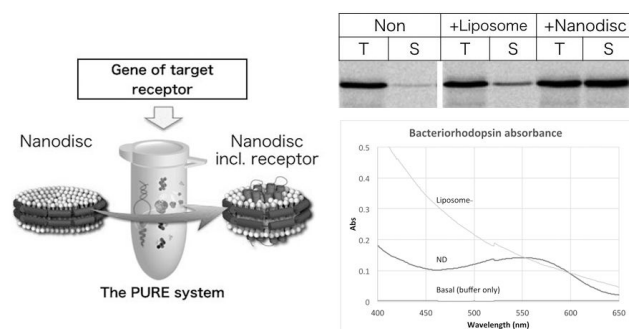


図1. (左)Nanodisc 存在下のPURE systemによるGPCR 型タンパク質 (ロドプシン) の合成. (右) T: 合成された全タンパク質; S: 遠心後の可溶性画分; Liposome: 人工膜小胞. Nanodisc を投入した場合のみ、ロドプシンの正常な立体構造形成を示す紫色呈色 (568nm) が観察された。

さらに、Nanodisc を

形成する膜骨格タンパク質 MSP (membrane scaffold protein) に付加されている Tag 配列を利用して、反応後に合成産物を容易に単離することが可能である。

ターゲットとする受容体膜タンパク質は、統合失調症の発症や認知症状に関連する Dopamine D3 receptor や、乳癌細胞での高発現が確認されている CXCR4 など、15 種類の受容体を想定している。これらは、細胞質膜上で機能するヒト由来 7 回膜貫通型タンパク質であり、すでに立体構造が解かれていることから、スクリーニングサンプルとして扱いやすいものを選定している。このような受容体膜タンパク質を合成し、遠心分離法による Nanodisc 膜への局在を確認したのち、成績のいいサンプルについては続くリガンド探索や抗体探索へと進める。

#### B) mRNA ディスプレイ法による受容体結合抗体の選別

ランダムな配列を持つ DNA ライブラリーを作製し、試験管内転写により mRNA を取得する。この mRNA の 3' 末端にピューロマイシンを蒸したタグ配列を結合する。これを PURE system により翻訳することで、様々なペプチド配列を合成したペプチド鎖-mRNA の二者複合体を得る。これらの中から抗原である受容体タンパク質に強固に結合する配列を選別する。受容体タンパク質は、(A) で合成したものをマイクロビーズに固定することでターゲット抗原として用いる。選別された mRNA を回収後に逆転写し DNA 配列を得る。このサイクルを数回繰り返すことで有意な配列が濃縮され、最終的に標的受容体タンパク質に結合するアミノ酸配列 (DNA 配列) 情報を獲得することができる。

上記 mRNA ディスプレイ法で選択された配列が正しく機能するかを確認するため、アミノ酸配列に変換したあと、上位のペプチドを入手する (外注)。このペプチドの中から、ターゲットに特異的に結合するものを選別し、SPR 法などにより反応速度定数 ( $k_a$ ,  $k_d$ )、反応定数 ( $K_D$ ) を決定し、標的抗原に対するアフィニティー評価を行う。また、選択された配列をヒト抗体遺伝子の定常領域を持ったベクターに組み込み、動物細胞などを介して完全ヒト抗体を獲得する。これを使用して、抗原を過剰発現させた HeLa 細胞への抗体染色を行い、細胞質膜上で結合していることを確認する。これにより、本手法で有用な抗体が獲得できることを立証する。

#### 4. 研究成果

人工的に調製した平面膜nanodisc (ND) を加えた無細胞タンパク質合成系 (cell-free系) でモデルG-protein coupled receptor (GPCR) であるバクテリオロドプシン (bR) を合成し、bRが膜挿入したND (bRND) を調製した。これをベイトとし、ランダムなアミノ酸 (AA) 配列を持つ10AAペプチドのプールから特異的に結合する配列を選択した。ランダムなペプチドプールは、bRNDを合成した時と同じcell-free系を用いて合成した。選択された配列のDNA情報からさらに次サイクルのライブラリーを作製し、同じセレクションを4-6回繰り返したあと、選択された配列をNGSにより解析した。その結果、サイクルを重ねるごとにコピー数が増加した配列が入手できた (図2)。これらのDNA配列をアミノ酸配列に変換し、ペプチド合成を行った (外注)。現在入手したペプチドの中からターゲットのbRに特異的に結合する配列の裏付け実験を行なっている。

ベイトとなるbRNDの調製法や、ライブラリーのデザイン、mRNA-peptide複合体のcell-free合成と単離精製、バインディングアッセイ、RT-PCR条件等、多くのwet実験の条件を詰めてきた。これにより、「Nanodiscとセルフフリー合成系による創薬基盤技術」の基礎を築くことができた。今後はbRNDに対して特異的に結合するペプチドの評価を行いう。強く結合するペプチドについては表面プラズモン共鳴法等によりカイネティクス解析を行う。

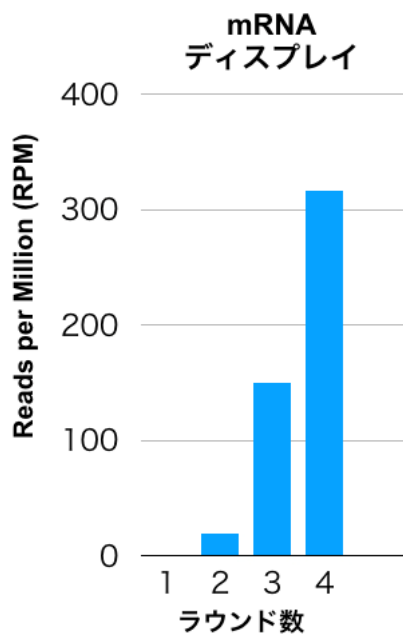


図2. mRNA法により選別・濃縮された配列のコピー数.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

第3回トランスポーター研究会関東部会(招待講演)、試験管内で人工的に合成するトランスポーター膜タンパク質、車愈激、2018、千葉県

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：研究員

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。