

令和元年6月14日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15206

研究課題名(和文)単ドメイン抗体無細胞ディスプレイと光を用いた創薬標的探索の効率化

研究課題名(英文) Use of FALI with cDNA display single-domain antibodies for efficient functional screening of therapeutic targets

研究代表者

櫻井 隆 (SAKURAI, Takashi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：70225845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：FALIは蛍光色素標識プローブと光により標的タンパク質のリアルタイム不活性化を可能とする。細胞機能アッセイ系と組合せることで創薬標的となり得るタンパク質の探索に応用可能である。効率化の大きな障害は、標的となる細胞表面の膜タンパク質をカバーする高親和性プローブのライブラリー作製である。問題解決のため、ラクダ重鎖抗体由来の一本鎖組換え抗体や抗体様スキャフォールドを用いて、cDNAディスプレイの高効率発現について検討した。その結果、熱安定性の高い抗体様スキャフォールドにより発現効率の向上が見られた。ライブラリーを作製し、高親和性結合クローン選択の条件検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経-グリア相互作用などの細胞間相互作用は、その局所における時間依存的なシグナルにより制御されていることから、それに関わるタンパク質の解析・探索には、時間分解能の高い方法が必要とされる。FALIと細胞機能アッセイの組合せはこれに適した方法であるが、その効率化には問題があった。本研究は組換え抗体様分子とcDNA displayによる課題解決を目的としたものであり、実現すればこれまでにない特徴を持った細胞機能スクリーニングとして創薬に結びつけることが可能である。

研究成果の概要(英文)：Fluorophore-assisted light inactivation (FALI) enables real-time inactivation of specific proteins targeted in-situ by fluorophore-labeled probes. In combination with a cell-based assay, FALI is a valuable technique for use as a functional proteomic screen to search for druggable targets. One of the major obstacles of this method is the construction of probe libraries containing high-affinity binders that cover cell surface membrane proteins as potential targets. To overcome this barrier, we used synthetic single domain antibodies derived from camel variable domains of heavy chain antibodies (VHH) and alternative non-antibody scaffolds. The efficiency of cell-free cDNA display expression of the molecules was measured. Through the use of thermostable scaffolds, we improved the expression of non-antibody affinity reagents linked to their genotypes. We attempted high-affinity clone selection for membrane proteins from a newly synthesized non-antibody probe library.

研究分野：神経薬理学

キーワード：組換え抗体 神経科学 プロテオーム cDNAディスプレイ

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

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、標的タンパク質を生細胞・生体内においてリアルタイムに不活性化する方法であるレーザー分子機能不活化法 (chromophore-assisted laser inactivation, CALI) をもとに、*in vitro* 細胞機能アッセイ系と組合せて創薬標的タンパク質のスクリーニングに応用するため、FALI (fluorophore-assisted light inactivation) を開発した (Beck S, Sakurai T, et al., *Proteomics*, 2: 247-255, 2002)。CALI はパルスレーザー照射により、抗体に標識されたマラカイトグリーンの周辺に超短寿命のOHラジカルを発生させ標的分子に局限したリアルタイムの不活性化を引き起こすものであり、抗体クローン中で大部分を占める抗原タンパク質の機能を阻害しない抗体を光により機能阻害抗体に変える技術ともいえる。FALI は、この特性を持ちつつ、スクリーニングに適したマイクロプレートと通常の光源を用いて多検体同時処理可能な方法であり、光照射時にフルオレセイン分子から発生する一重項酸素によるアミノ酸残基の修飾を利用する。FALI をがん細胞浸潤モデル系に応用し、光照射依存的な浸潤抑制を引き起こす抗体クローンの選択と抗体結合タンパク質の質量分析による同定を行い、がん細胞浸潤抑制のための新規標的タンパク質を見出した (Eustace BK, Sakurai T, et al., *Nat Cell Biol*, 6: 507-514, 2004)。

このスクリーニング法は、( ) 創薬標的となり得るタンパク質群に結合する抗体クローン集団 (ライブラリー) の取得、( ) 抗体の発現・精製とフルオレセイン標識、( ) 標識抗体の細胞表面への結合・光照射による標的タンパク質の不活性化、細胞機能アッセイによる機能阻害抗体クローンの選択、( ) 細胞由来標的タンパク質の免疫沈降による回収と質量分析による同定の過程からなる。この方法は細胞機能とダイレクトに機能分子を結びつけるユニークな手法であるが、( ) 及び ( ) の過程がその効率化のための障害となっていた。具体的には、

( ) マウスモノクローナル抗体または免疫マウスの脾細胞由来の一本鎖組換え抗体 (scFv) を使用していたため、マウスの免疫、抗体のファージを用いたライブラリーの作製に多大な労力と時間を必要としていた。また、必要量の抗体の産生、発現・精製の後に、細胞表面タンパク質に結合する抗体クローンを選ぶため蛍光抗体法による染色や FACS などを用いていた。

( ) 標識にフルオレセインイソチオシアネート (FITC) を用いていたため抗体標識を妨害するアミノ基を含む低分子化合物の除去が必要であった。さらに、ランダムな部位への FITC 導入による FALI 効率のばらつき、FITC 修飾による抗原結合能の低下等の問題があった。

これらの問題を解決するため、以下のような改良を進めてきた。

(1) 無細胞系での翻訳と同時にピューロマイシンによりタンパク質とそれをコードする cDNA とを連結する cDNA display 法 (研究分担者である根本らにより開発、Yamaguchi J et al, *Nucleic Acids Res.* 37: e108, 2009) により、*in vitro* において十分な多様性を持った抗体クローンを扱える技術を利用した。発現効率を上げるため、抗体重鎖の可変領域からなる単一ドメイン抗体のライブラリー (抗原と相互作用する 3 つの超可変領域 (相補性決定領域) にランダムなアミノ酸配列を持つ化学合成一本鎖組換え抗体ライブラリー) を用いた。

(2) 上記ピューロマイシンリンカーにはフルオレセインが付加されているため、抗体発現後に導入する必要がなくなり、抗体精製および標識のステップが省略可能である。一定部位に標識されているため、FALI 効率のばらつきが低減できる。

標的となる細胞膜上のタンパク質と結合する抗体 (様) 分子クローンの回収と cDNA display の再構築は、cDNA 部分の PCR 増幅、*in vitro* 転写、リンカーとの結合、無細胞系の翻訳とピューロマイシンを介した mRNA とタンパク質の連結、逆転写という一連のサイクルにより実現される。細胞上における結合と結合クローンの回収、cDNA display の再構築サイクルを繰り返すことで結合クローンのライブラリーを得ることになる。これらの各ステップの効率を向上させるとともに、より結合親和性の高いクローン集団を得て、スクリーニングを実施するための基盤技術の開発が必要な状況であった。

### 2. 研究の目的

創薬標的となり得る細胞間相互作用等に関与する細胞表面分子を同定し解析するためには、相互作用の場における時間分解能の高い手法を用いる必要がある。フルオレセイン標識抗体と光照射を用いる FALI はそれに適した方法であるが、標的となりうる細胞表面タンパク質を網羅する抗体ライブラリーの調製やそのフルオレセイン標識に時間と労力を要することが大きな障害となっていた。本研究では cDNA display 技術をラクダ由来単一ドメイン抗体等の単一ドメイン組換え抗体のライブラリーに応用して FALI を行い、細胞機能アッセイと一体化させたハイスループット創薬標的探索法として確立するための基盤技術の確立を目指した。あわせて、抗体様スキャフォールドを利用した抗体様分子と単一ドメイン抗体を比較検討することで、生細胞膜上での結合クローンの選択、ランダムな変異導入による親和性成熟を利用した高親和性結合クローンの取得に適したスキャフォールドを選択し、ライブラリーを構築することを試みた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 抗体 (様) 分子の cDNA display 発現効率の検討

ラクダ科の動物に生理的に存在する重鎖のみからなる抗体の可変領域に由来する VH (ナノボディ) やヒトフィブロネクチンタイプ 3 ドメイン (Fn3) をスキャフォールドとするモノボディ

(FingR)、Protein A 由来のアフィボディ等の抗体(様)分子のうち、タンパク質・ペプチド結合活性が報告されているものを cDNA display 発現の検討に利用した。そのアミノ酸配列をもとに、発現系に最適化されたコドンを持つ人工遺伝子を作製し、スキヤフォールドの両端のフレームワーク部分に相当するプライマーを用いて PCR 増幅後、5' 非翻訳領域及び 3' リンカーアニール部位・His タグ配列を PCR にて付加した。In vitro 転写後に mRNA をピューロマイシンリンカー (cnvK 及びビオチン付加改良型リンカー、Yoshimura Y & Fujimoto K, Org Lett, 10: 3227-3230, 2008, Yoshimura Y et al, Chembiochem, 10: 1473-1476, 2009) と結合させ、紫外線により架橋を行った。ウサギ網状赤血球ライセートを用いた無細胞系での翻訳・ピューロマイシンを介したタンパク質部分とリンカーの連結後に、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いてリンカーを回収した。磁気ビーズ上で逆転写反応を行った後、RNase 処理によりビーズから遊離させた。タンパク質と連結された cDNA display 分子を C 末端の His タグを利用して Ni<sup>2+</sup>磁気ビーズに結合させて EDTA により溶出し、スピンカラムを用いてバッファの置換を行った。cDNA display の発現効率を確認するため、SDS、尿素による変性下でポリアクリルアミド電気泳動を行い、リンカーに付加されたフルオレセインの緑色蛍光をゲル中で検出した。さらに、ゲルから PVDF 膜に転写後、抗 His タグ抗体を用いてイムノプロットを行った。ビオチン化されたリンカーをキャプチャーするためのストレプトアビジン磁気ビーズについて、種類や使用量を変えて cDNA display 発現効率を検討した。さらに、ビオチン化した標的分子をストレプトアビジン磁気ビーズに固定化し、cDNA display 分子と反応させて、その結合活性を検討した。

#### (2) 抗体(様)分子ライブラリーの cDNA display 発現

抗体(様)分子ライブラリーとして、根本らにより作製されたラクダ重鎖抗体由来 VHH のフレームワークをもつ化学合成 VHH ライブラリーや Fn3 スキヤフォールドをもつランダム配列化学合成ライブラリーを用いた。(1)で検討した反応条件を用いて、抗体(様)分子ライブラリーを cDNA display として発現させた。ビオチン化した標的分子をストレプトアビジン磁気ビーズに固定化して cDNA display 分子と反応させ、結合クローンを選択するモデル実験を行った。

#### (3) 細胞表面でのクローン選択モデル実験

抗 erbB 抗体(様)分子を cDNA display として発現させ、界面活性剤を含まない生理的塩溶液への置換を行った。erbB を発現させた CHO 細胞と反応・洗浄後、結合フラクションから PCR により cDNA の増幅を行い、抗体様分子 cDNA display の結合を確認した。

#### (4) 試験管内の親和性成熟 (affinity maturation)

より高親和性の結合クローンを選択するため、標的タンパク質結合クローンの cDNA を増幅する際に、dPTP と 8-oxo-dGTP を用いた error-prone PCR を行い、ランダムなアミノ酸変異を導入した。さらに、抗体様分子 cDNA display をビオチン化した標的タンパク質と短時間反応後、過剰量の非ビオチン化標的タンパク質を添加して長時間インキュベーションを行い、解離の速いクローンはビオチン化標的タンパク質から解離する条件下で反応させた。その条件下でもビオチン化標的に結合している解離の遅いクローンをストレプトアビジンビーズで回収した (off-rate selection)。

### 4. 研究成果

#### (1) 抗体様分子の cDNA display 発現効率の検討

研究分担者が開発した光架橋により mRNA と高効率に結合可能な改良型ピューロマイシンリンカーの利用、最適な磁気ビーズの選択、反応条件の最適化により、抗体様分子の cDNA display の発現効率が向上した。

VHH と抗体様分子の cDNA display 発現効率を比較検討したところ、cDNA display の収量に大きな影響があるのは、還元条件である無細胞翻訳時のタンパク質フォールディングである可能性が示された。熱安定性が高くシステインを含まない抗体様スキヤフォールドは VHH よりも発現効率が高い傾向を示した。抗体様スキヤフォールドを持つ化学合成ライブラリーを新たに作製することにより、十分な多様性を維持したライブラリーの cDNA display 発現を効率的に行うことが可能となった。

#### (2) クローン選択条件の検討

GFP やペプチドタグに高親和性に結合する抗体様分子クローンを cDNA display として発現させ、抗原への結合や反応条件について検討を行った。また、erbB 結合活性を持つ VHH 及び抗体様分子クローンを cDNA display として発現させ、バッファ置換について検討を行った。安定した構造を持つ抗体様分子スキヤフォールドを用いることで、生細胞にも使用可能な界面活性剤フリーの生理的塩溶液への置換が可能となった。CHO 細胞表面に発現させた erbB への結合を確認するためのモデル実験を行い、条件検討を行った。

#### (3) ライブラリーのスクリーニング試行

膜タンパク質の細胞外ドメイン由来ペプチドを磁気ビーズに固定化し、VHH ライブラリー cDNA display のスクリーニング試行を行った。

抗体様分子を用いた発現効率、溶液置換の検討の成果をもとに、新たなライブラリーを構築し、高効率に発現させるための条件検討、固定化した標的タンパク質に結合するクローンの選択と高親和性クローンを得るための変異導入条件の検討を行うモデル実験を進めた。error-prone PCR によりランダム変異を導入し、高親和性クローンを選択するため off-rate selection の条件検討を行った。

以上により、ハイスループット創薬標的探索法として確立するために必要となる基盤技術のうち、最も重要なものである抗体様分子 cDNA display ライブラリーの作製・高効率発現のための条件検討がなされた。FALI と組合せハイスループット創薬標的探索法として確立するため、高親和性抗体様分子 cDNA display の細胞表面におけるクローン選択を行い、それをもとに細胞を用いたスクリーニングへの応用を進める予定である。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕（計 5 件）

Anzai H, Terai T, Jayathilake C, Suzuki T, Nemoto N. A novel immuno-PCR method using cDNA display. Anal Biochem, in press, 2019.

doi: 10.1016/j.ab.2019.04.017

Suzuki T, Mochizuki Y, Kimura S, Akazawa-Ogawa Y, Hagihara Y, Nemoto N. Anti-survivin single-domain antibodies derived from an artificial library including three synthetic random regions by in vitro selection using cDNA display. Biochem Biophys Res Commun, 503: 2054-2060, 2018.

doi: 10.1016/j.bbrc.2018.07.158

Takahashi K, Sunohara M, Terai T, Kumachi S, Nemoto N. Enhanced mRNA-protein fusion efficiency of a single-domain antibody by selection of mRNA display with additional random sequences in the terminal translated regions. Biophys Physicobiol, 14: 23-28, 2017.

doi: 10.2142/biophysico.14.0\_23.

### 〔学会発表〕（計 6 件）

山本恭秀、熊地重文、松川優太、望月祐樹、根本直人：制限酵素非依存ライブラリ構築法を利用した非天然次世代抗体 VHH ライブラリ 日本化学会第 98 回春季年会、2018 年、千葉  
Anzai H, Suzuki T, Mochizuki Y, Kimura S, Nemoto N: In vitro selection of single-domain antibodies from an artificial DNA library by cDNA display. 19th IUPAB(International Union of Pure and Applied Biophysics) congress and 11th EBSA congress, 2017 年、Edinburgh, UK.

橋本祥江、望月祐樹、熊地重文、櫻山拓、上窪裕二、藤本健造、根本直人、櫻井隆：cDNA ディスプレイ法を用いた単ドメイン抗体の FALI への応用 第 90 回日本薬理学会年会、2017 年、長崎

鈴木武尊、根本直人：完全人工デザイン VHH 抗体の進化工学的創製、第 16 回日本蛋白質科学会年会、2016 年、福岡

### 〔図書〕（計 2 件）

Nemoto N, Kumachi S, Arai H. In vitro Selection of Single-Domain Antibody (VHH) using cDNA display, Antibody Engineering Third Edition (edited by D. Nevoitris & P Chames), Methods in Mol Biol, 1827: 269-285, 2018

doi: 10.1007/978-1-4939-8648-4\_14

寺井琢也、熊地重文、根本直人：cDNA ディスプレイ法によるペプチドスクリーニング技術・ペプチド医薬品のスクリーニング・安定化・製剤化技術、技術情報協会、P40-P49, 2017 ISBN978-4-86104-687-2

### 〔その他〕

ホームページ等

研究代表者

組換え抗体ライブラリーと光によるタンパク質機能不活性化法（FALI）を用いた創薬標的探索  
[http://pharmacology.sakura.ne.jp/jp/research/fali\\_res/fali\\_res.html](http://pharmacology.sakura.ne.jp/jp/research/fali_res/fali_res.html)

研究分担者

埼玉大学大学院理工学研究科 物理機能系専攻 生体高分子研究グループ 根本研究室

<http://park.saitama-u.ac.jp/~nemoto/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：根本 直人

ローマ字氏名：(NEMOTO, naoto)

所属研究機関名：埼玉大学

部局名：理工学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：60509727

(2)研究協力者

研究協力者氏名：橋本 祥江

ローマ字氏名：(HASHIMOTO, yoshie)

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。