

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：32620  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659141  
 研究課題名（和文） 無細胞抗体ディスプレイを用いた神経-グリア相互作用創薬標的のハイスループット探索  
 研究課題名（英文） Application of a cell-free protein display technology to the high-throughput functional proteomic screen for regulators of neuron-glia interaction  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

蛍光標識抗体と光による蛋白質不活化法（FALI）は細胞機能アッセイ系と組合せることで特定の細胞機能に関与する分子の探索に応用可能であるが、抗体ライブラリーの作製が効率化の妨げとなっている。効率を上げるため、組換え抗体の無細胞ディスプレイ技術を導入することを計画した。遺伝情報と連結された抗体クローン発現の条件とニューレグリン-erbB モデル系の検討を行い、神経-グリア相互作用解析のための実験系構築を試みている。

## 研究成果の概要（英文）：

Fluorophore-assisted light inactivation (FALI) in combination with a cell-based assay is a unique method for functional proteomic screen to search for regulators of a specific cellular function. One of the major problems with the method is the construction of antibody libraries that contain high-affinity binders to cell surface membrane proteins as potential targets. To overcome barriers to efficiency, we used a cell-free antibody display method. We tried to optimize the *in vitro* expression of the recombinant antibody that is linked to its genotype and the neuregulin-erbB model system for pilot-scale screening of potential regulators for neuron-glia interaction.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：神経薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：神経科学、プロテオーム、組換え抗体、薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は米国留学中にマラカイトグリーン標識抗体とレーザー照射により特定蛋白質を生細胞・生体内において不活性化するレーザー分子機能不活化法(CALI)を用いることで神経突起伸長に関与する分子の機能を明らかとした(Sakurai T et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:10795-10800, 2002)。

CALI はレーザー照射により、抗体標識色素周辺に短寿命のOHラジカルを発生させ標的分子に限局した不活性化を引き起こすものである。また、CALI は、抗体クローン中、大部分を占める抗原蛋白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。CALI を細胞機能アッセイ系と組合せ創薬標的のスクリーニングに応

用することを考えた場合、1) CALI は高出力のパルスレーザーを必要とする、2) 同時多検体処理が不可能、という欠点がある。スクリーニングに適したマイクロウェルプレートに対応し通常の光源で多検体同時処理可能な変法としてフルオレセインを用いた FALI を開発した (Beck S, Sakurai T, et al., *Proteomics*, 2: 247-255, 2002)。これをがん細胞浸潤の *in vitro* モデル系に応用し、光照射により浸潤抑制を引き起こす抗体クローンの選択と抗原蛋白質の質量分析法による同定を行った。細胞外の Hsp90 $\alpha$  を浸潤に関与する新規標的蛋白質として同定し、FALI と抗体ライブラリーによるスクリーニング法を確立した (Eustace BK, Sakurai T, et al., *Nat Cell Biol*, 6: 507-514, 2004)。

## 2. 研究の目的

本研究は、Eustace らの方法を基礎に、スクリーニングの効率を上げることを目指すものである。このスクリーニング法は、(A) 抗体ライブラリーの作製・結合クローンの選択、(B) 蛍光色素標識、(C) 細胞への結合、光照射、細胞機能アッセイによる機能阻害抗体クローンの選択、(D) 免疫沈降と質量分析による抗原蛋白質の同定からなる。

効率化を妨げているのは、主に(A)及び(B)である。

(A) Eustace らの方法において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。この場合マウスの免疫、抗体ライブラリーの作製に長期間と多大な労力を要する。また、細胞表面に結合する抗体クローンを選択するためにも蛍光抗体法による染色、FACS などを利用していた。

(B) 標識に FITC を用いていたため抗体の精製 (標識を妨害するアミノ基を含む低分子化合物の除去) とランダムな蛍光色素導入による不活性化効率のばらつきという問題があった。

これらの問題を解決するため、以下の改変を計画した。

(1) 化学合成またはナイーブな可変領域レパートリーからなる一本鎖組換え抗体ライブラリーを用いる。さらに、無細胞系の翻訳及びピューロマイシンによるペプチドとそれをコードする cDNA との連結により、*in vitro* においてより多くの抗体クローンを扱える無細胞システムの確立を目指す。発現効率を上げるため、組換え抗体として抗体重鎖の可変領域からなるドメイン抗体を用いる

(2) 根本らにより開発されたピューロマイシンリンカーを用いる。リンカーにフルオレセイン修飾がなされているため、抗体発現後に導入する必要がなく抗体精製のステップが

省略できる。一定の部位にほぼ 100%ラベルされているため、不活性化効率のばらつきが少なくなることが期待される。

標的となる細胞膜上のタンパク質と結合する抗体クローンの回収・増幅は cDNA 部分の PCR を利用する。ピューロマイシンリンカーと mRNA の結合、無細胞系の翻訳によるペプチドとピューロマイシンとの共有結合、逆転写を介して、遺伝情報と連結された組換え抗体が実現する。また、無細胞系を用いることで、ファージディスプレイなどと比較して  $10^4$  以上多くのクローンを扱うことが可能になるとされている。

本研究では、以上の(1)と(2)の改変を行うための実験条件検討を目的とした。合わせて神経-グリア相互作用に関与する分子を探索するためのスクリーニングモデル系として、ニューレグリン-erbB 系を用い、スモールスケールのアッセイ系構築を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗体ライブラリーからの cDNA クローン増幅

組換え抗体ライブラリーとして英国 MRC で開発され Geneservice 社から供給されるドメイン抗体を使用した。DNA を抽出して鋳型とし、PCR により可変領域を含む抗体由来領域を増幅した。コントロールクローンはベクターに挿入して精製し、PCR のテンプレートとして用いた。

### (2) 無細胞翻訳系の条件検討

cDNA ディスプレイ用ピューロマイシンリンカーは根本らにより開発されたものを用いた。組換え抗体コード部分の PCR 増幅用プライマーを各種合成し、PCR 増幅の効率を検討した。さらに塩基配列を確認し、PCR による変異導入の有無を確認した。PCR 産物を鋳型とした *in vitro* 転写で作製した mRNA をリンカーと結合後 *in vitro* で翻訳し、ピューロマイシンによるペプチドと mRNA の連結効率をゲル電気泳動により確認した。タンパク質部分の発現を確認するため、C 末端に付加されている His タグに対する抗体を用いてイムノブロットを行った。

### (3) 細胞表面発現タンパク質を標的としたスクリーニングモデル系構築の準備

神経-グリア細胞間情報伝達に関与するニューレグリン 1-erbB 系をモデル実験系として用いた。組換え抗体の選択、FALI の条件を検討するため、ニューレグリン 1 または erbB 受容体安定発現細胞株の作製を試みた。erbB 受容体の活性化を細胞レベルで解析できるようにするため、リン酸化 erbB 受容体特異的抗体の特性を検討し、スモールスケール

ルのアッセイ系構築に必要な条件検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 組換え抗体を cDNA ディスプレイ化するための条件検討

$3 \times 10^9$  というクローン多様性を持つ組換え抗体ライブラリーとして Human Domain Antibody を使用した。合成 DNA を抗体重鎖可変領域に挿入した低分子組換え抗体である。分子量が小さいため、*in vitro* 転写・翻訳の効率が高いことが予測される。熱安定性の高いクローンが選別されており、抗体タンパク質の高発現が期待される。

組換え抗体は、抗原結合に関わる可変領域により構成されており、直接抗原と接触する3つの超可変領域とそれらをつなぐ4つの共通性の高いフレームワーク領域からなっている。両端の共通部分に相当するプライマーを用いて組換え抗体ライブラリー由来 DNA を PCR 増幅し、抗体と cDNA をピューロマイシンリンカーを介して連結する過程の条件検討を行った。

##### ① 組換え抗体 cDNA の PCR 増幅

両端のフレームワーク領域に相当するプライマーを用いることにより、ごく微量の組換え抗体をコードする cDNA から *in vitro* 転写反応の鑄型として必要な量まで PCR 増幅する条件を検討した。

##### ② 無細胞翻訳及びピューロマイシンによる cDNA との連結

陽性コントロールとしての抗  $\beta$  ガラクトシダーゼ組換え抗体クローン及び陰性コントロールクローンをを用いて cDNA ディスプレイ化の条件検討を試みた。研究分担者である根本らにより開発・改良されたフルオレセイン標識ピューロマイシンリンカーと組換え抗体 cDNA の *in vitro* 転写により得た RNA を連結した。無細胞翻訳系を用いた組換え抗体の発現とピューロマイシンとの結合反応の条件検討を行った。

無細胞翻訳系における発現効率が低いため、スタートコドン周辺の塩基配列を変化させ発現量の変化を解析した。発現効率を上げる配列が見出されたが、発現量にばらつきがあるため、更なる塩基配列の検討または無細胞翻訳系の条件等の至適化が必要と考えられる。

##### ③ cDNA ディスプレイ分子の濃縮・精製

無細胞翻訳系における発現ペプチドとピューロマイシンとの結合後に mRNA を鑄型にした逆転写、His タグによる濃縮・精製を行い、cDNA ディスプレイ分子をアッセイ系に適した任意のバッファー条件に置換するため

の条件検討を行った。

(2) ニューレグリン 1-erbB 系をモデルとするための活性化検出条件の検討

神経-グリア相互作用に重要な役割を果たすことが知られているニューレグリン 1-erbB 受容体相互作用をモデル系として用いるための準備を行い、実験条件を検討した。

結合する組換え抗体を選択するための発現用プラスミド作製と組換えタンパク質の発現を行った。細胞を用いたアッセイを行うためのニューレグリン 1 または erbB 受容体安定発現細胞株を樹立した。少数の細胞を用いた蛍光イメージングにより erbB 受容体活性化を定量的に検出するため、複数の erbB のリン酸化特異的抗体を用いて、蛍光抗体法及びウェスタンブロット法によりニューレグリン 1 による erbB 受容体活性化検出の条件検討を行った。結果的に蛍光抗体法により受容体活性化を検出できる条件が確立され、少数の細胞及び少量の組換え抗体を用いたアッセイ系の構築が可能となった。

現在、これらの基礎的技術をもとにモデルとなるスクリーニング条件の詳細を検討している。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Mochizuki Y, Kohno F, Nishigaki K, Nemoto N: A pull-down method with a biotinylated bait protein prepared by cell-free translation using a puromycin-linker. *Analytical Biochemistry*, 434: 93-95, 2012, 査読有  
DOI: 10.1016/j.ab.2012.10.041

(2) Ueno S, Kimura S, Ichiki T, Nemoto N: Improvement of a puromycin-linker to extend the selection target varieties in cDNA display method. *J Biotechnol* 162: 299-302, 2012, 査読有  
DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.09.003

(3) Ueno S, Nemoto N: cDNA Display: Rapid Stabilization of mRNA Display, *Methods in Mol. Biol.* 805: 13-135, 2012, 査読有  
DOI: 10.1007/978-1-61779-379-0\_8

[学会発表] (計 4 件)

① Fumiaki Kono: Easy-to-use and Rapid Molecular Interaction Analysis by

Combination of Pull-down method with mRNA Display. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡

② Yuya Yotsumoto: In vitro Evolution of Peptide Aptamers Against Survivin from a Novel Three-finger Scaffold Library by cDNA Display. 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡

③ 上野真吾: Improvement of a puromycin-linker for cDNA display towards realizing universal in vitro selection applications, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、横浜

④ 根本直人: cDNA display 法による新機能分子の創出、第 6 回理研「バイオものづくり」シンポジウム(招待講演)、2011 年 5 月 10 日、埼玉県和光市

[その他]

ホームページ等

組換え抗体ライブラリーと光による蛋白質機能不活性化法 (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)

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

根本 直人 (NEMOTO NAOTO)

埼玉大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：60509727

### (3) 連携研究者

檜山 拓 (KASHIYAMA TAKU)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90338343