

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670127

研究課題名(和文)抗体様スキャフォールドと光を用いた創薬標的のハイスループット探索

研究課題名(英文) Application of FALI with antibody-like scaffolds to the high-throughput functional proteomic screen for 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)：蛍光標識抗体と光によるタンパク質不活化法(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關与する分子の探索に応用可能な技術である。これを効率的に行う上での問題点は、標的となる細胞表面の膜タンパク質を網羅する高親和性抗体のライブラリーを作成することである。効率向上を図るため、無細胞翻訳系のcDNAディスプレイに応用可能な抗体(様)スキャフォールドについて検討した。その結果、ラクタ重鎖抗体由来の一本鎖組換え抗体を用いることで効率的な発現が見られたため、発現・精製条件の至適化を行った。現在、erbB系をモデルとしてクローン選択条件の検討を進めている。

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 obstacles for this method is the construction of antibody libraries containing high-affinity binders that cover cell surface membrane proteins as potential targets. To overcome barriers to efficiency, we tested new scaffolds compatible with cDNA display method. By using a single domain antibody framework derived from camel heavy-chain antibodies (VHH or nanobody), we optimized the cell-free expression of recombinant antibody clones that are linked to their genotype. Now we are trying pilot-scale clone selection for erbB as a model system.

研究分野：神経薬理学

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

研究代表者はマラカイトグリーン標識抗体とレーザー照射により抗原タンパク質を生細胞・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 (chromophore-assisted laser inactivation, CALI) を用いることで神経突起伸長に關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 はパルスレーザー照射により、抗体標識色素周辺に超短寿命のOHラジカルを発生させ標的分子に限局したリアルタイムの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。CALI を *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 96 または 384 ウェルマイクロ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 (Fluorophore-assisted light inactivation) を検討した (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タンパク質の質量分析法による同定を行った。細胞外の Hsp90 を浸潤に關与する新規標的タンパク質として同定し、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)。

現在進めている一連の研究は、Eustace らの方法をもと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・標的を網羅する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タンパク質の同定からなる。効率化を妨げており改善の余地のあるのは、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多大な時間と労力を要する。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 などを利用していった。

(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、場合によっては修飾による抗原結合能の低下という問題が

あった。

これらの問題を解決するため、以下の改変を進めた。

(1) 化学合成によるランダム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を利用する。タンパク質部分のサイズが小さい方が発現効率が高いため、組換え抗体としてヒト由来抗体の重鎖の可変領域のみからなる単ドメイン抗体のライブラリーを用いる。

(2) 研究分担者である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 (Yamaguchi J et al, Nucleic Acids Res. 37: e108, 2009)。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一本鎖抗体クローンの回収・増幅は cDNA 部分の PCR を利用する。それを鋳型とする *in vitro* 転写、ピューロマイシンリンカーと mRNA の結合、無細胞系の翻訳・ピューロマイシンを介したポリペプチドとリンカーの連結、逆転写により遺伝情報と連結された組換え抗体分子を再生できる。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。

2. 研究の目的

本研究では、一連の研究により上記の改変を行う中で明らかとなった(1)についての問題点を克服することを目的とした。具体的には、ヒト由来の抗体重鎖可変領域のみからなる単ドメイン抗体を用いた場合には発現効率が低くなることが明らかとなった。スタートコドン周辺の配列を変化させて検討を行ったが、十分な改善は見られなかった。そのため、cDNA display 分子発現に適した抗体(様)スキャフォールドを見出すことから検討を始めた。

(1) 抗体の可変領域は直接抗原と接触する 3 箇所の相補性決定領域 (complementarity determining region, CDR) とそれらを適切な位置に配置するためのフレームワーク領域からなる。結合能を持つ一本鎖組換え抗体(様)分子を得るためには、抗体または抗体様分子のフレームワーク領域中 3 箇所に相補性決定領域に相当する化学合成ランダムヌクレオチドを挿入すればよい。フレームワークとして、構造安定性に優れたヘビ毒由来の 3 フィンガースキャフォールドを利用する。あわせて、低分子量で発現効率、構造安定性が高く、近年利用が増えているラクダ重鎖抗体由

来のフレームワークを使用し比較検討する。ラクダ重鎖抗体は、軽鎖なしで生理的に機能しており、抗原結合の親和性の点でも問題ない。

さらに、スクリーニングのモデル系として erbB 系を用い、スモールスケールのクローン選択およびアッセイ系の条件検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 抗体(様)分子ライブラリーと PCR による転写用鋳型の作製

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ヘビ毒由来 3フィンガースキャフォールドをフレームワークとするライブラリー、ラクダ重鎖抗体由来 VHH のフレームワークをもつライブラリーを検討した。ともに化学合成ランダムヌクレオチド領域を 3箇所もつライブラリーである。相補性決定領域を含むスキャフォールド領域をテンプレートとし、異なる無細胞翻訳系における発現を比較検討するために、それぞれに最適化された 5'側の非翻訳領域配列を PCR により挿入して、*in vitro* における転写反応の鋳型とした。

(2) 無細胞翻訳の条件検討

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。リンカーは、mRNA とアニールする配列、ピューロマイシン、精製用のピオチン、最終的にアビジンビーズから切り出すための酵素切断部位をもつ。mRNA との連結方法として、ligase を用いるものと *cnvK* (Yoshimura Y & Fujimoto K, *Org Lett*, 10: 3227-3230, 2008, Yoshimura Y et al, *Chembiochem*, 10: 1473-1476, 2009) により光架橋するタイプの 2 種類を検討した。PCR 産物を鋳型とした *in vitro* 転写で作製した mRNA にはストップコドンが含まれておらず、代わりに挿入された His タグの C 末端でピューロマイシンと連結される構造となっている。mRNA をリンカーとアニールして共有結合させた後、無細胞系で翻訳し、ピューロマイシンを介してポリペプチドと mRNA を連結させる。タンパク質部分の発現とリンカーとの連結効率を確認するため、SDS、尿素変性下でポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ゲル中でリンカーのフルオレセイン由来緑色蛍光を検出した。さらに、ゲルから PVDF 膜に転写後、C 末端側に付加されている His タグに対する抗体を用いてイムノプロットを行った。タンパク質の連結効率を指標に、翻訳反応の時間、nuclease 阻害薬の種類と濃度の至適条件を検討した。ピオチン化されたリンカーをキャプチャーするためのアビジン・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検討した。

(3) スクリーニングモデル系の構築

細胞間情報伝達に關与する erbB 系をモデルとするため、アミノ酸配列が報告されている抗 EGF 受容体 VHH クローン発現用の cDNA を化学合成した。PCR によるテンプレート作製、*in vitro* 転写、リンカーとの結合後、cDNA display 分子としての発現を行い、スモールスケールのクローン選択、アッセイに必要な準備を行った。

4. 研究成果

(1) 抗体様スキャフォールドの検討

抗体様スキャフォールドとして、当初ヘビ毒由来の 3フィンガースキャフォールドの使用を計画していたが、本研究の目的達成のためには発現効率が十分ではないことが判明した。そのため、ラクダ重鎖抗体由来のフレームワークをスキャフォールドとして使用することにした。ラクダ重鎖抗体の可変領域は 3フィンガースキャフォールドと同様 3つの相補性決定領域と 4つのフレームワーク領域からなる。分子量 15 kDa 程度と 3フィンガースキャフォールドよりややサイズが大きいものの、軽鎖の可変領域が必要なく重鎖由来の 1本鎖の可変領域のみで抗原結合能をもつ。*in vitro* 転写・翻訳の効率がよく、タンパク質としての安定性も高いことが予測された。相補性決定領域への合成ランダムヌクレオチド挿入によるライブラリー作製は根本らにより行われた。

プライマーを用いて組換え抗体ライブラリー由来 DNA、5'非翻訳領域及び 3'リンカーアニール部位を PCR にて増幅し鋳型を作製した。*In vitro* 転写後に mRNA をピューロマイシンリンカーと結合させ、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過程について条件検討を行った。

無細胞翻訳系の検討

cDNA display 用の無細胞翻訳系として、標準的にはウサギ網状赤血球ライセートを用いているが、真核生物の翻訳系としてはコムギ胚芽、原核生物の系としては大腸菌のライセートまたは組換えタンパク質による再構成系などが利用可能である。翻訳効率・連結効率を比較するため、それぞれに至適化された 5'非翻訳領域の配列を PCR にて付加して *in vitro* 転写の鋳型とし、mRNA を得た。Ligase タイプのピューロマイシンリンカーと結合後、翻訳を行ったところ、大腸菌の系は、翻訳効率が低いことが明らかとなった。一方、コムギ胚芽の系は翻訳の効率は高いものの、nuclease 活性が非常に高いため時間を長くすると蛍光標識されたリンカー自体が消失し、安定した発現を得られる条件を設定することは困難であった。以降、cDNA display 用の無細胞翻訳系としてはウサギ網状赤血球ライセートを用いた。

無細胞翻訳系における nuclease 活性の抑

制及びピューロマイシンによる連結効率の向上

Protein A の B ドメイン由来のコントロール(Yamaguchi J et al, *Nucleic Acids Res.* 37: e108, 2009) を用いて翻訳・ピューロマイシン連結条件の最適化を試みた。Ligase を用いるタイプピューロマイシンリンカーを利用した。

nuclease 活性を抑制するために各種の阻害薬と濃度依存性を検討したところ、30-60分程度の反応時間中ほぼ蛍光標識リンカー及び RNA の分解を抑制できる条件を見出した。しかしながらこの条件では翻訳自体が抑制される傾向がみられた。阻害薬濃度を下げて nuclease 活性をある程度抑制しつつ、ピューロマイシンを介したタンパク質部分の翻訳・連結効率が向上する条件を探し、実用上問題のない条件を見出した。VHH クローンを用いた場合には、mRNA 及びタンパク質のサイズが大きいため、全体の反応効率は 1/2 程度以下に低下するものの、上記で設定した阻害薬濃度と反応時間で、ほぼ最大の翻訳・連結効率を示した。以降、この反応条件で無細胞翻訳系における翻訳を行った。

ピューロマイシンリンカーの検討

発表論文(1)に示されている通り、mRNA とピューロマイシンリンカーの結合について、標準的な Ligase 処理によるものと *cnvK* を用いて紫外線により架橋するものを選択可能である。VHH クローンを用いてリンカーの違いによる翻訳・連結効率を比較したところ、*cnvK* による改良型光架橋リンカーを用いた場合に、より高い効率が得られることが明らかとなった。現在は、光架橋リンカーを用いて反応を行っている。

cDNA ディスプレイ分子の濃縮・精製

無細胞翻訳系における翻訳とピューロマイシンを介したリンカーとの連結の後には、mRNA を鋳型にした逆転写反応、His タグを介した精製・濃縮を行い、cDNA ディスプレイ分子をアッセイ系に適したバッファーに置換する必要がある。そのためにストレプトアビジン磁気ビーズを用いているが、その使用量、バッファー条件(塩濃度、界面活性剤の有無など)が効率に影響を与えることがわかっている(Mochizuki Y et al, *Biological Procedures Online*, 15: 7, 2013)。VHH クローンを用いて各種の磁気ビーズとバッファーの組合せを検討し、最終的に効率良くストレプトアビジン磁気ビーズから VHH-cDNA display が溶出される条件を見出した。

His タグによる精製過程の条件検討

His タグを介した精製・濃縮の際の反応時間・条件、溶出の際のバッファー条件とあわせ、スピカラムを用いたバッファー交換の効率について検討を行った。マイクロスピカラムを用いたバッファー交換(Ueno S et

al, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 11121-11126, 2012) について現在検討中である。他の方法を含めて、細胞表面に発現した膜タンパク質を用いたクローン選択をおこなうためのバッファー交換方法について検討を進めている。

(2) erbB をモデル実験系とするための条件の検討

erbB 受容体をモデル系として組換えタンパク質および細胞表面に発現させたタンパク質を用いた結合クローン選択を行うための準備を進め、実験条件を検討した。

クローン選択のための組換えタンパク質(erbB 細胞外ドメインの組換え体)として市販の erbB1 (EGFR)を用いることとした。ポジティブコントロールとするため、アミノ酸配列が報告されている抗 EGFR-VHH クローン 2 種の配列をもとに、発現用 cDNA の化学合成を行った。それをテンプレートとして *in vitro* 転写用の鋳型を PCR により作製し、転写、mRNA 精製、リンカーとの結合、無細胞翻訳系による組換えタンパク質の cDNA display としての発現を行った。また、ネガティブコントロールクローンを得るために、VHH ライブラリーの一部を PCR 増幅後、TA クローニングによりプラスミドに挿入し、大腸菌のトランスフォーメーションを行った。数クロンを拾い、プラスミドを精製後、塩基配列を決定した。上記同様に cDNA display として発現させた際に発現に問題がなく、上記ポジティブコントロールとはゲル電気泳動上サイズで区別でき、PCR 後の制限酵素切断でクローン判別が可能なるものをネガティブコントロールとして選定した。EGFR 細胞外ドメインと IgG Fc 領域の融合タンパク質を Protein A ビーズに結合させることにより、クローン選択条件設定の実験が可能となる。

抗 EGFR-VHH クロンの解離定数は、100 nM 程度であるため、PCR によるランダムな変異導入と EGFR-Fc との結合及びより強い条件での wash を組み合わせ、より親和性の高い結合クローンを選択する実験条件の検討を進めていく予定である。

現在、これまでに確立した基礎的技術とともに、組換えタンパク質および細胞表面発現タンパク質によるクローン選択条件決定のモデル実験に進む準備を行っている。本研究により確立された技術及び研究分担者により確立された細胞表面への結合クローンを選択する技術(Ueno S et al, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109: 11121-11126, 2012)をもとに、標的とする細胞の表面に発現するタンパク質群をある程度網羅する高親和性結合組換え抗体のサブライブラリーを取得することが可能になるとと思われる。今後、これらの技術を利用して、FALI と細胞機能アッセイを組合せ、ハイスループットスクリーニング系を確立できるよう技術の開発・検討を進めていく予定である。

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2件)

(1) Mochizuki, Y., Suzuki, T., Fujimoto, K., Nemoto, N. A versatile puromycin-linker using *cnvK* for high-throughput in vitro selection by cDNA display. *J. Biotechnol.*, 212:174-180, 2015, 査読有
DOI: 10.1016/j.jbiotec.2015.08.020.

(2) Tanemura Y, Mochizuki Y, Kumachi S, Nemoto N. Easy and rapid binding assay for functional analysis of disulfide-containing peptides by a pull-down method using a puromycin-linker and a cell-free translation system. *Biology (Basel)*, 4(1): 161-172, 2015, 査読有
DOI: 10.3390/biology4010161

〔学会発表〕(計2件)

望月 佑樹, 根本 直人: 試験管内選択により取得されたジスルフィドリッチペプチドアダプターは分子認識スキャフォールドとなりうるか? 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月26日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜)

木村 真之介, 望月 佑樹, 鈴木 武尊, 根本 直人: 人工合成ラクダ科単ドメイン抗体(VHH)ライブラリを用いた survivin 結合分子の cDNA display 法による試験管内淘汰 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜)

〔その他〕

根本直人: 進化による有用タンパク質・ペプチド分子の創出 - 進化分子工学 社団法人埼玉県経営者協会会報 埼経協ニュース 381号、16、2014(7月25日発行)

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

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/index.php?id=2>

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・教授

研究者番号: 60509727