

第5回 ネオバイオ分子研究会

日時：2016年6月10日（金）12:30～11日（土）12:00

場所：鹿児島大学郡元キャンパス（〒890-0065 鹿児島市郡元1丁目21番35号）

学習交流プラザ2階学習交流ホール（120名収容、鹿児島大学生協購買部2階）

*2日目は関係者のみでclosedで行わせていただきます。

主催：ネオバイオ分子研究会 代表 藤井郁雄（大阪府立大学）

実行委員長 伊東祐二（鹿児島大学）



（会場アクセス）鹿児島大学郡元キャンパス

鹿児島中央駅から：市電〔市電2系統〕（郡元行き）

「唐湊（とそ）」、「工学部前」電停下車 理学部の方向へ

キャンパスマップ：<http://www.kagoshima-u.ac.jp/about/campusmap.html> 建物番号92

連絡先：Tel 090-3884-9071（伊東携帯）

参加費：1,000円

懇親会費：5,000円（参加希望者のみ）

※当日、会場受付にて。

受付

6月10日（金）12:30～

鹿児島大学郡元キャンパス 学習交流プラザ2階学習交流ホール 入口にて

スケジュール

2016年6月10日（金）

13:00～13:10 ご挨拶

藤井郁雄先生（大阪府大理学系研究科）

— 講演 —

A01 班「分子多様性創出基盤技術」

司会： 藤井郁夫先生（大阪府大）

13:10～13:40 講演 1

「分子多様性に基づいた新規な RNA 立体構造と機能の創出」

井川善也先生（富山大学）

13:40～14:10 講演 2

「抗体、ペプチドライブラリーからの機能分子の特定における次世代シーケンサーの活用」

伊東祐二先生（鹿児島大学）

14:10～14:40 講演 3

「生体における多様性形成メカニズムに倣った人工抗体ライブラリーの利用と課題」

村上明一先生（琉球大学）

A02 班「分子選択基盤技術」

司会： 根本直人先生（埼玉大学）

14:40～15:10 講演 4

「親和性分子取得のための新規ハイスループットシステム」

根本直人先生（埼玉大学）

15:10～15:30（コーヒープレイク）20分

15：30～16：00 講演 5

「Zipbody:ロイシンジッパーを用いた Fab 抗体とその利用」

中野秀雄先生 (名古屋大学)

A03 班「設計基盤技術」

司会：新井亮一先生 (信州大学)

16：00～16：30 講演 6

「ネオバイオ分子の構造機能解析及び設計基盤技術

(X線結晶構造解析、タンパク質工学編)」

新井亮一先生 (信州大学)

16：30～17：00 講演 7

「ネオバイオ分子の構造機能解析及び設計基盤技術 (NMR、核酸工学編)」

坂本泰一先生 (千葉工業大学)

A04 班「機能デザイン基盤技術」

司会：伊藤嘉浩先生 (理研・和光)

17：00～17：30 講演 8

「ライブラリーの発想によるタンパク質のキメラ設計」

梅津光央先生 (東北大学)

17：30～17：35 閉会の言葉

伊東祐二先生 (鹿児島大学)

懇親会 (18:00～20:00) 場所：鹿児島市天文館近辺

— 関係者のみ —

6月11日（土）

9：00～12：00

新学術領域 計画班 検討会

（鹿児島大学郡元キャンパス 理学部2号館3階、生命化学セミナー室）

司会：藤井 郁夫 先生

- ・各班 15分ほどの計画班の研究計画を紹介
- ・総合討論

12：00 解散

（お問い合わせ）

埼玉大学大学院 理工学研究科 根本直人

Tel&Fax: 048-858-3531

E-mail: nemoto@fms.saitama-u.ac.jp

講演要旨

(講演 1)

「分子多様性に基づいた新規な RNA 立体構造と機能の創出」

井川善也 (富山大学 大学院理工学研究部)

細胞内では各種 RNA 分子が、従来の理解よりもはるかに多彩かつ能動的な役割を担うことが明らかにされつつある。これら多彩な RNA の能動的機能の中でも、立体 (3D) 構造の形成に基づくタンパク質類似の触媒機能 (リボザイム) や分子認識機能 (アプタマー / リボスイッチ) は、細胞機能の理解や制御に加え、ナノテクノロジーの素材としても魅力的な特性である。

これらの機能発現に必要な 3D 構造を RNA 分子が形成する過程は、タンパク質と同じく構造の階層性 (1D 配列・2D 構造・3D 構造) から理解できる。タンパク質と比べ、より限定されたビルディング・ブロック (A/G/C/U) と基本構造 (RNA 二重らせん) に加え、3D 構造形成に寄与する小さな構造ユニット (RNA モチーフ) が同定されており 3D 構造デザインのユニットパーツとして利用できる。以上の特性から RNA は「3D 構造の合理的設計」に適した高分子である。

機能性 RNA 分子のもう 1 つの魅力は進化分子工学に最適の分子素材である点にある。上述の RNA 機能や 3D 構造は、細胞内 RNA の探索だけでなく、進化分子工学によっても人工的に創成され、両者が相まって RNA の機能や構造のレパートリーが大きく拡大してきた。

発表者は機能性 RNA とその 3D 構造のもつ上記の特性に着目し「天然由来の RNA 構造をモジュール的に分割・再構成」して新規分子をデザインすると共に、進化分子工学を補完的あるいは交互的に利用して、新規な RNA 機能の創成を行ってきた。

本発表では上記アプローチによる研究例の紹介とともに、その成果を利用した RNA 集積ナノ構造の構築についても紹介したい。

(講演 2)

「抗体、ペプチドライブラリーからの機能分子の特定における 次世代シーケンサーの活用」

伊東 祐二 (鹿児島大学大学院理工学研究科)

ファージライブラリーは、タンパク質やペプチドの分子ライブラリーから、特定の機能を持つ分子を選別する方法として、長く用いられてきた。しかし、この手法は、目的の分子を提示したファージを濃縮するまで、繰り返しのパンニングの必要があることや、目的のクローンの単離には、通常、パンニングによる濃縮後、数百に及ぶファージのクローニングを行い、各クローンについて結合スクリーニングを行うといった手間のかかるステップを踏む必要がある。また、しばしば、得られたクローンが、特定の類似配列を有する偏ったクローンばかりとなり、再度パンニングを行わなければならないといったケースも見られる。

このような問題を解決する手段として、我々は、次世代シーケンサー (NGS) を用いて、バイオパンニング前後でのファージ集団中の分子配列を網羅的に解析することにより、目的の結合活性を持つ分子の特定手法の構築を行ってきた。特に、NGS によるデータを用いて、結合クローン候補を特定する際、特定分子のライブラリー中の存在頻度の計算を、塩基配列あるいはアミノ酸配列どちらで行うか、また、特定される配列を完全一致にするか、クラスターと呼ぶ類似配列集団で行うかなどの選択をフレキシブルに行う解析プログラム SOPRA (Sequence ordering program ranked by amplification factor) を開発した。本発表では、VHH 抗体ライブラリー、ヒト単鎖 Fv 抗体ライブラリー、ペプチドライブラリーからの本手法による特異的クローンの同定法を紹介するとともに、本手法の問題点、その他の分子ライブラリーへの適用を含めた改良法について議論したい。

講演 3

「生体における多様性形成メカニズムに倣った人工抗体ライブラリーの利用と課題」

村上明一（琉球大学大学院医学研究科）

ハイブリドーマ法に加え、ライブラリー法を用いたモノクローナル抗体(mAb)作製技術が一般的に用いられるようになり、本法により得られた完全ヒト抗体が治療用抗体として認可されるに至っている。ライブラリー法では必ずしも動物免疫が必要ではなく、大きな多様性を有するライブラリーを構築することにより、様々な標的抗原に結合する抗体を短時間に、かつ、少量の標的抗原 (<100 μ g : タンパク質抗原) で作製することが可能である。また、免疫原性の低い標的抗原や毒素など、動物免疫では得られない抗体を開発可能である点からもその有用性は高い。

改めて動物が生産する抗体群と、ライブラリーに含まれる抗体群の違いを整理すると、大きく異なる点が少なくとも 2 点考えられる。1つは抗体の多様性形成メカニズム（親和性成熟機構を含む）の違いであり、1つは自己反応性抗体の除去システムの有無である。

今回、生体における多様性形成メカニズムを模して、人工的にレパートリーを増大させたアルパカ VHH ライブラリーを構築し ($\geq 2 \times 10^{10}$)、Ebola ウィルス、インフルエンザウィルス、ノロウィルスなど、様々な標的抗原に結合する VHH クロンの単離し、その特性を調べた。その多くは標的抗原特異的に高い親和性で結合する。また、ラクダ科 VHH の特徴である安定性に関して検証したところ、Fab や scFv と比較して非常に熱安定性が高いことも確認できた。しかし、得られたクローンの中には「多特異性」クローンが混在し、その利用が困難なクローンも得られている。これは、生体内における自己反応性抗体の除去システムを破綻させた故の結果であると理解している。つまり、人工的に構築したライブラリーから有用性の高いクローンを得るには、特殊なスクリーニング方法が要求される可能性を示唆している。

この度の研究会では、上記のような視点から、ライブラリー法を用いた抗体作製技術の利点と課題を整理しつつ、

「親和性が高いクローン」、「特異性の高いクローン」、「熱安定性が高いクローン」、「限定したエピトープに結合するクローン」 など、利用価値の高いクローンのみを短時間で釣

り上げる方法に関して行ってきた、試行錯誤を含めてお話しさせていただきたいと思っております。

講演 4

「親和性分子取得のための新規ハイスループットシステム」

根本直人（埼玉大学理工学研究科）

A02 班では、多様なネオバイオ分子（結合分子、酵素など）を様々な条件下でスクリーニングできるシステムの開発を目指している。この目標のためには1) スクリーニングサイズ、2) 様々な機能を創出するための淘汰（選択）方法の二つの大きな技術課題があると考えられる。1) の解決には膨大な未知の配列空間を探索するためにハイスループットなシステムの開発が急務である。次世代シーケンサーの出現によりライブラリー全体の配列を網羅的に解析することができることから、スクリーニングをハイスループット化することにより従来では考えられない規模の配列空間を探索できる可能性がでてきた。このことにより天然タンパク質では探索不可能だった配列の構造と機能を解析することにより、まさにネオバイオ分子に向けた量から質への転換が可能になると考えている。2) の淘汰条件はいわゆる「水系」から「有機溶媒系」でタンパク質や核酸の構造や機能はどのように進化するかを試験管内で選び出すことができればタンパク質、しいては生体高分子に対する新しい知見が得られると予想される。また、生体高分子の適応度地形を描くことは進化分子工学の長年の夢であったが、そのためにはスクリーニングだけでなくそこで選択された分子の適応度の評価もハイスループットで行う必要がある。A02 班では阪大の黒田教授がこの役割を担うことが期待されている。このようにしてネオバイオ研究会では様々な共同研究を通じてライブラリー構築からハイスループットな淘汰系・評価系まで一気通貫した真のハイスループットな進化工学のスクリーニング系が開発されると考えている。

今回は親和性分子のスクリーニングを加速する最近開発中の cDNA display のハイスループット系の紹介をしたい。

講演 5

「Zipbody: ロイシンジッパーを用いた Fab 抗体とその利用」

中野秀雄・加藤晃代・兒島孝明

(名古屋大学生命農学研究科)

B 細胞でつくられている抗体配列から一本鎖 Fv(scFv)を作製すると、結合活性を失うことも度々あることから、scFv は基本的には不安定なフォールドであると考えられる。一方 Fab は CH1 と CL の相互作用が有り、抗体の Fab 化により活性を失うことは稀であり、より安定なフォールドである。しかしながらその微生物生産は、分子量が大きいことや2本のポリペプチド鎖の会合が伴うために、scFv に比べると一般には困難である。

我々は各種の Fab 抗体に L 鎖と Hd 領域の C 末端に、互いに強く結合するヘテロロイシンジッパーを付加することで、大腸菌無細胞タンパク質合成系や、大腸菌細胞質内発現系において、Fab の形成効率が飛躍的に向上することを見出した(1)。ロイシンジッパーの会合効果により、L 鎖と H 鎖の会合速度が向上し、その後のフォールディングが促進されたのではないかと推測している。

当研究グループでは、これまで B 細胞 1 個由来の抗体 mRNA を逆転写・PCR で増幅し、無細胞タンパク質合成系を用いてモノクローナル抗体を取得する技術(SICREX)を開発してきており(2,3)、この新規なロイシンジッパー付 Fab (Zipbody と名付けた)、N 末端翻訳促進配列 (SKIK) と組み合わせることで(4)、B 細胞 1 個から迅速安価にモノクローナル抗体を大量合成する技術体系を確立した。

また Zipbody の C 末端側にホタルルシフェラーゼおよび GFP を結合させた Fab-LZ-Luc、Fab-LZ-GFP を、大腸菌細胞質で合成したところ、抗原結合能と、Luc 活性および GFP 蛍光を有する融合タンパク質を作製できた。得られた抗体融合酵素をもちいて、1 ステップの迅速 ELISA を行うことが出来た。

Zipbody およびその派生物は、抗体分子のスクリーニング、大量合成、およびその利用の、いずれのステップにおいても、効率化、簡便化、コスト削減に寄与するものとして期待している。

1) Ojima-Kato, T., Fukui, K., Yamamoto, H., Miyake, S., Hirakawa, Y., Yamasaki, T., Kojima, T., and Nakano, H. (2016) 'Zipbody' leucine zipper-fused Fab in E. coli in vitro and in vivo expression systems. *Protein Eng. Des. Sel.* 29, 149-157

2) Jiang, X.P., Suzuki, H., Hanai, Y., Wada, F., Hitomi, K., Yamane, T. and Nakano, H.(2006) A Novel Strategy for Generation of Monoclonal Antibodies from Single B Cells Using RT-PCR Technique and in Vitro Expression. *Biotechnol. Prog.*, 22, 979-988.

3) Ojima-Kato, T., Hashimura, D., Kojima, T., Minabe, S., and Nakano, H. (2015) In vitro generation of rabbit anti- *Listeria monocytogenes* monoclonal antibody using single cell based RT-PCR linked cell-free expression systems. *J. Immunol. Methods* 427, 58-65

4) 加藤晃代, 中野秀雄. 「タンパク質の発現方法」 特願 2015-121443

*連絡先 : hnakano@agr.nagoya-u.ac.jp

講演 6

「ネオバイオ分子の構造機能解析及び設計基盤技術

(X線結晶構造解析、タンパク質工学 編)」

新井亮一先生 (信州大学繊維学部応用生物科学科)

A03 班では、分子構造設計班として、ネオバイオ分子の構造解析、合理的デザイン及び構造・機能を最適化する役割を担う。原子レベルの立体構造の視点から、ネオバイオ分子を合理的かつ迅速に設計し、最適化することは極めて重要である。そこで、構造機能解析、計算科学、タンパク質工学、核酸工学等を駆使・融合して、各班で創り出されたネオバイオ分子の構造・機能の最適化やさらなる新分子のデザインをおこなう。分子設計理論の構築と分子最適化技術の開発は、ネオバイオ分子の創製から応用に至るまで、領域全体の推進に必要不可欠であると考えられる。

タンパク質・核酸等の生体高分子の立体構造解析の主な手法として、X線結晶構造解析、NMR、電子顕微鏡等があるが、A03 班では主に X線結晶構造解析と NMR 法を適切に使い分け、あるいは組み合わせて構造解析に取り組む体制を考えている。X線結晶構造解析法の長所は、解析可能な分子量の制限がないことや高精度（高分解能）の構造情報が比較的得られやすいこと等であり、短所は、結晶化が必須であり、その結晶化が困難でボトルネックになることが多いことである。ひとたび良質な結晶さえ得られれば、近年の放射光施設や解析ソフトウェアの発展によって構造解析自体はそれほど難しくはなくなってきており、領域内で創出したネオバイオ分子やその複合体等の構造解析について、今後積極的に共同研究に取り組んでいきたい。

また、タンパク質工学分野では、天然タンパク質の変異体・改変体の作製による構造安定化や機能性の向上のみならず、近年、天然にはない新規な人工タンパク質(de novo protein)

のデザインや人工タンパク質複合体の創出等の研究にも大きな進展がみられる。その中の一例として、我々が開発した“人工タンパク質ナノブロック”による自己組織化複合体の創出に関する研究(Kobayashi, N., et al., J. Am. Chem. Soc. 137, 11285-11293, 2015)等を紹介する。

講演 7

「ネオバイオ分子の構造機能解析及び設計基盤技術（NMR、核酸工学編）」

坂本泰一（千葉工業大学先進工学部生命科学科）

構造解析の手法として、X線結晶構造解析とNMRがある。NMRの長所の一つとして、結晶化が必要なく、比較的容易にNMRスペクトルが得られる点がある。天然変性タンパク質や核酸のように結晶化が困難な試料にNMRは有効であり、dynamicsの情報も得られる。NMRにより立体構造解析が難しい試料はたくさんあるが、立体構造がわからなくても有用な情報が得られる。例えば、タンパク質や核酸のfoldingをNMRで確認した後に結晶化することにより、結晶化の効率を上げることができると考えられる。

タンパク質と核酸の立体構造を比べると、20種類のアミノ酸からなるタンパク質より4種類のヌクレオチドで構成されている核酸は単純である。核酸の立体構造を大別すると、一本鎖の部分と二本鎖の部分があり（三本鎖や四本鎖の部分もある）、一本鎖の部分は様々な構造を形成するが、二本鎖の部分は二重らせん構造を形成する。従って、相補的な配列の核酸を作れば、容易に二重らせん構造をつくることができる。このような核酸の構造ユニットとタンパク質の構造ユニットを組み合わせると、ネオバイオ分子を設計したいと考えている。

講演 8

「ライブラリーの発想によるタンパク質のキメラ設計」

梅津光央（東北大学大学院工学研究科）

タンパク質は、新しいタンパク質の機能や構造が年間 1 万件程度報告されており、他の有機・無機材料と比較すると構造安定性は劣るものの、機能の多様性と特異性の面では他素材を凌駕したライブラリーを持つ分子である。我々は、タンパク質が階層的構造であり、機能を発現させる主な構造単位がドメイン(モジュール)であることに着目し、ドメインを「単位」とした機能ドメイン群からライブラリーの発想と積木細工的にタンパク質を設計する手法を組み合わせることで新たな機能素子を創り上げる研究を行っており、腫瘍がんを標的としたがん治療抗体や非食物系バイオマスを基質とした糖化酵素の高機能化を出口として、ライブラリーの発想によってキメラなタンパク質を迅速に設計するプロセスを開発している。

がん治療抗体に関しては、T リンパ球とがん細胞を架橋する二重特異な低分子抗体を研究対象としている。この二重特異性抗体の腫瘍傷害性は、構成される抗体の特性(標的, エピトープ)やドメインの組み合わせ構造によって大きく変化するが、その規則は分かっていない。そこで我々は、既存の抗体群から T-リンパ球上の活性化シグナル伝達蛋白質に特異的な抗体と上皮増殖因子受容体(EGFR)群を選抜し、それらの可変領域断片を構成要素として設計される 100 種を超える二重特異性抗体群を迅速に調製・薬効評価を行うスクリーニング系を開発することで、高活性な二重特異性抗体を同定すると共に高活性ルールが抽出できることを示してきた。

糖化酵素に関しては、セルロソームに着目してきた。糖化酵素セルラーゼの一部では、より効率的にセルロース分解を行うために、セルロース表面に吸着できる結合ドメインを持つ巨大な骨格蛋白質に機能の異なった複数の触媒ドメインが蛋白質間相互作用で結合してセルロソームと呼ばれる巨大複合体を形成しているものがある。そこで我々は、触媒ドメインと結合ドメイン群を調製し、それらを巨大蛋白質の模倣構造としたナノ粒子の表面で様々に集積化させることで、これまで報告がなされている中で最も高い還元糖生産能力を持つエンドグルカナーゼを創り出すことに成功した。