

報告番号	甲 第 13590 号
------	-------------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 **A rapid in vitro selection method for generation of antibody-like proteins (高速人工抗体創製法の開発)**

氏 名 近藤 太志

論 文 内 容 の 要 旨

本研究では、迅速かつ簡便な人工抗体創製法『改良 TRAP 提示法』の開発を行った。

第 1 章では、本研究の序論について述べた。人工抗体は、抗体のように標的に対して特異的に結合することが可能な分子である。また、単量体で標的に結合でき、分子量が 5,000 ~ 20,000 程度と小さく、一般的に熱安定性や可溶性が良く、調製コストが低いという特徴がある。さらに、標的に特異的に結合できることから抗体同様、分子夾雑での標的の検出に優れている。これらの優れた性質のため、人工抗体は様々な研究に応用されている。例えば、細胞内で発現して特定タンパク質をイメージングしている。また抗体は約 15 nm と大きいのに比べ、人工抗体は約 4 nm 程度と小さいため Stimulated Emission Depletion (STED) などの超高解像度イメージングにおいて高い解像度を達成するためのツールとなっている。また、治療薬への応用も行われており、実際に人工抗体の骨格の一つであるナノボディ骨格を用いたカプラシズマブが、血栓性血小板減少性紫斑病や血栓症の治療薬として FDA に認可されている。

人工抗体骨格には、抗体の一部を用いた骨格 (scFv, nanobody など) や抗体以外のタンパク質を基にした骨格 (monobody, fynomer, affibodies, DARPin, anticalin など) が報告されており、より優れた物理特性や結合能向上を目指し様々な結合様式を持つ多くの人工抗体骨格が開発されている。

人工抗体の創製方法として代表的なものが *in vitro* selection である。*In vitro* selection では、表現型 (人工抗体) とそれをコードする遺伝型 (DNA または mRNA) を対応付けた膨大な多様性を持つ複合体ライブラリを構築し、その中から標的に結合する人工抗体を選択的に回収する。さらに、回収した複合体の遺伝型 (DNA または mRNA) をもとに増幅し

ライブラリを再構築して、一連の操作を繰り返し行うことで標的に結合する人工抗体を獲得することができる。また、より良い人工抗体を得るには、初めにより大きな多様性を持つライブラリを構築することが重要である。

最も広く用いられているファージ提示法では、ファージ表面のタンパク質と人工抗体を組遺伝子とファージの遺伝子を含んだプラスミドを大腸菌に形質転換するだけで、ファージ内に遺伝型、表面に対応する表現型を提示したファージを調製することができる。このように、基本的な細菌培養技術のみライブラリを構築可能であるため幅広く用いられている。一方で、大腸菌にライブラリ遺伝子を導入したプラスミドの形質転換効率から創出できる多様性が最大で 10^{10} 程度に制限されるという欠点があった。

そこで、表現型と遺伝型を分子レベルで対応付ける mRNA 提示法 (*in vitro virus* 法) が開発された。mRNA 提示法では、ピューロマイシンをリンカーで mRNA の 5'末端に結合させ、翻訳後にピューロマイシンがペプチジル tRNA と反応し、ピューロマイシンを介して共有結合で人工抗体と mRNA を連結することができる。mRNA 提示法は、 10^{13} 以上の多様性を創出可能であり、多くの人工抗体が取得されている。しかし、mRNA 提示法では、DNA の転写、mRNA とピューロマイシンリンカー (PuL) のライゲーション、翻訳と多段階の複雑な操作が必要であり、人工抗体創製には時間と労力が必要であった。このように、人工抗体分野の発展には、 10^{13} 以上という膨大な多様性を作り出すことができる迅速かつ簡便な方法の開発が必要であった。

そこで、当研究室では mRNA 提示法をより簡便かつ迅速化した TRAP 提示法を開発した。TRAP 提示法では、PuL と mRNA を 21 塩基のアニールによって対応づけることで、ライゲーションステップの省略に成功した。さらに終結因子 RF1 を除いた再構成無細胞翻訳系を用いることで、転写から mRNA 上への提示までがワンポットで可能になった。そのため、DNA を加えるだけで表現型と遺伝型を対応付けた複合体を調製可能であり、かつ 10^{13} 以上の多様性を創出することを達成した。また、VEGFR2 に対して大環状ペプチドの取得に成功している。しかし、TRAP 提示法は大環状ペプチドの選択しか行われていなかった。そこで、TRAP 提示法を人工抗体選択に応用できるよう改良することで高速人工抗体創製法の開発を目指した。

第 2 章では、迅速かつ簡便なペプチド選択法であった TRAP 提示法を改良し人工抗体選択を可能にした『改良 TRAP 提示法』の開発を行った。初めに、TRAP 提示法を人工抗体選択に適用するために、monobody と nanobody 人工抗体骨格の提示を試みたが、翻訳後に 9 割近い PuL が mRNA とアニールできておらず、提示効率も約 2% と低いため大きな多様性を創出できないという問題があった。アニールを阻害している原因を検討した結果、転写酵素 T7 RNA ポリメラーゼのプロモータ非特異的転写が原因であると突き止めた。その活性によって、PuL の DNA 部分を非特異的に転写され DNA/RNA の 2 本鎖となり、mRNA とのアニールが阻害されていた。

そこで、PuL の DNA 部分に 2'-OMe DNA を用いることで、T7 RNA ポリメラーゼに認識されず、非特異的転写の抑制に成功した。その結果、提示効率を約 10 倍の 21% に改善することができた。そして、monobody と nanobody 人工抗体骨格の 3 本のループ部分をランダム化した mRNA ライブラリを提示したところ、計算上反応液 1 mL あたり 4×10^{13} の多様性を創出できた。その人工抗体ライブラリを用いて人工抗体選択を試みた。標的には、肺がんのバイオマーカーである EGFR1 と乳がん過剰発現している HER2 のそれぞれの細胞外ドメインを用いた。その結果、monobody, nanobody 二つの骨格で EGFR1, HER2 に対して共に解離定数が数 nM から数十 nM の人工抗体を得ることに成功した。これらのことから、迅速かつ簡便な人工抗体創製法『改良 TRAP 提示法』の開発を達成できた。

第 3 章では、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に対する人工抗体の迅速な創製を行った。新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) によるパンデミックは健康と経済に甚大な被害を及ぼしており、SARS-CoV-2 に対する研究試薬や、診断薬、治療薬の開発が急務となっている。SARS-CoV-2 の細胞への感染は、SARS-CoV-2 の表面に存在するスパイクタンパク質が細胞表面のアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) に結合することで起こる。そのため、スパイクタンパク質に結合する人工抗体を開発することで、中和抗体として治療薬への応用や抗原検査などの診断薬としての応用も期待できる。

そこで SARS-CoV-2 由来スパイクタンパク質に対して特異的に高い親和性で結合する人工抗体の迅速な創製を目指した。第 2 章で開発した改良 TRAP 提示法を用いて、スパイクタンパク質のドメインである S1 subunit を標的として人工抗体の選択を行った。人工抗体骨格には、第 2 章でより結合力が強い人工抗体が得られた monobody 人工抗体骨格を用いた。また、ランダム部分を BC ループと FG ループに絞り、アミノ酸の出現割合を 20% Tyr, 10% Ser, 15% Gly, 10% Trp, その他アミノ酸 3%, Cys 0% に偏らせたライブラリを新たに調製し用いた。

改良 TRAP 提示法によって、人工抗体の選択から次世代シーケンサによる配列決定までを、わずか 4 日間と、極めて迅速に行うことに成功した。得られたシーケンス結果から上位 9 配列を発見、精製し解離定数を測定した結果、 $K_D = 0.42 \sim 24.8$ nM と非常に強力な結合力をもつ人工抗体を選択することができた。また、得られた人工抗体の結合能を調べた結果、4 種類の人工抗体が CoV-2 の S1 subunit に特異的に結合し、同じ 4 種類のクローンが S1 と ACE2 の結合を阻害することができた。国立病院機構名古屋医療センターの岩谷グループによる中和活性評価の結果、 $IC_{50} = 0.5$ nM の中和活性を持つ人工抗体を得られたことがわかった。このように、改良 TRAP 提示法は、新興感染症に対して迅速に診断薬や治療薬に応用可能な人工抗体を創製可能であり、新興感染症に対する有効な手段になり得ることを示した。

第 4 章では、より安定にセレクションが可能な cDNA TRAP 提示法を開発した。TRAP 提

示法では、人工抗体と cDNA は分解されやすい mRNA を介して非共有結合で対応付されていた。そのため、RNA 分解酵素の混入に弱く、さらに標的の RNase のコンタミチェックが必須であった。また、細胞抽出液などを標的に用いることはできなかった。また、長時間のセレクションでは、mRNA の分解だけでなく、人工抗体と共有結合を形成した PuL が mRNA から外れ、対応関係のない mRNA とアニールし人工抗体と遺伝情報の対応が崩壊するという問題があった。そこで、PuL と cDNA を直接共有結合で対応させることを目指した。根元グループが開発した cDNA 提示法を参考に、ピューロマイシンリンカーから直接逆転写することで人工抗体と cDNA を共有結合で対応づけることを目指した。そして、塩基数の検討の結果、PuL のアニール部分の 3'末端 3 塩基を DNA にすることで、PuL から逆転写可能であることを見出した。そして新たな PuL を用いて RNA 分解酵素 (RNase H) を含む条件でモデルセレクションを行った。その結果、cDNA TRAP 提示法では、RNA 分解酵素を含んだ条件でも含まない条件と同程度の cDNA の回収を達成した。これによって、より厳しい条件や幅広い標的に対して選択可能であると考えられる。このように、迅速かつ簡便であり、安定的に人工抗体が選択可能な cDNA TRAP 提示法の開発を達成した。

本論文では、高速人工抗体創製法の開発を行った。第 2 章では、TRAP 提示法の PuL に 2'-OMe DNA を用いることによって人工抗体の提示効率を約 10 倍に改善することに成功した。さらに、monobody, nanobody 人工抗体骨格を用いて EGFR1, HER2 に対する人工抗体の創製を達成した。第 3 章では、改良 TRAP 提示法を用いて SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に対する人工抗体の迅速な創製を行った。わずか 4 日間での人工抗体選択を達成し、解離定数 $K_D=0.42$ nM, 中和活性 $IC_{50}=0.5$ nM と非常に強力な人工抗体の取得に成功した。第 4 章では、改良 TRAP 提示法の弱点である複合体が解体されやすいという問題点を解決した cDNA TRAP 提示法の開発を行った。PuL の 3'末端から 3 塩基を DNA にすることで、そこから逆転写が可能になり人工抗体と cDNA を共有結合によって対応づけることに成功した。これによって、複合体が大幅に安定化し、RNA 分解酵素の存在化でも人工抗体選択が行えることを示した。本論文では、 10^{13} 以上の多様性を創出可能かつ迅速で簡便な改良 TRAP 提示法と安定的に選択できる cDNA TRAP 提示法の開発に成功した。これらの方法によって、さらに多くの標的に対して人工抗体が迅速に創製され人工抗体分野の発展が期待される。