

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
事後評価報告書

I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業

（プログラム名）（英語）Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間：平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）澤崎達也

（英語）Tatsuya Sawasaki

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：

（日本語）国立大学法人愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・教授

（英語）Professor, Proteo-Science Center, Ehime University,

II 補助事業の概要

(1) 支援

コンサルティ ング数	通常支援数（成果公開）				企業利用・成果占有利用数			
	支援中	支援完了	支援未達	計	支援中	支援完了	支援未達	計
100	20	28	1	49	3	2	0	5

拠点全体で PDIS からの継続も含め 49 件の支援を実施した。そのうち、28 件については依頼を受けた目標を達成し支援完了した。企業利用に関しては、5 社の企業と共同研究契約を締結し、技術導出を行っている。また、本事業で開発した高度化技術をもとに、新規の支援メニュー（Fab 抗体作製技術、フカボディ作製技術）を計画通りか、前倒しのスケジュールで提供した。当初の計画を上回る支援を実施し、成果につながる結果が順調に得られていることから、当拠点における支援は想定以上の成果が得られている。

【発現難タンパク質生産支援】(担当機関:愛媛大学)

愛媛大学の無細胞タンパク質合成技術を駆使したタンパク質生産支援を7件実施した。その中には細胞系での大量発現が困難であった複合体タンパク質、転写因子、膜タンパク質が含まれる。また、支援依頼者の希望を受けて、無細胞合成技術の技術指導も行なった。

診断や治療法開発につながる成果として以下が上げられる。脳を疾患部位とする自己免疫疾患の新たな診断マーカーの開発のため、膜受容体6種を合成した。創薬標的である転写因子およびその相互作用タンパク質を生産、提供し、さらに両者の相互作用を検出する系を AlphaScreen を用いて構築した。

【プロテインアレイを用いた相互作用パートナー探索支援】(担当機関:愛媛大学)

愛媛大学で整備している 28,000 種類のヒトタンパク質アレイ、プロテインキナーゼアレイ (480 種)、転写因子アレイ (1359 種)、ユビキチンリガーゼアレイ (498 種)、一日あたり 60,000 アッセイの AlphaScreen を実施可能なスクリーニング設備を駆使し、標的タンパク質の相互作用パートナーの探索を行う支援を提供した。

【PPI を指標とした薬剤探索 HTS 支援】(担当機関:愛媛大学)

愛媛大学のスクリーニング設備と PPI を指標とした薬剤探索アッセイ系構築のノウハウを支援依頼者に提供し、薬剤探索をサポートする支援を 7 件実施した。また、依頼者が東京大学創薬機構へ提出する申請書のブラッシュアップとヒアリングの事前コンサルテーションを提供した。化合物ライブラリは愛媛大学で受け入れ、愛媛大学のスクリーニング設備を用いて、依頼者とともに HTS スクリーニングを実施した。結果の解析および東京大学への報告書作成のサポートを提供した。支援の結果、老化やがん、敗血症を標的とした治療薬候補、植物のホルモンシグナル伝達や老化の調節化合物の候補が複数見出された。

【抗体作製支援】(担当機関:富山大学・愛媛大学)

富山大学が開発した ISAAC 法を用いることで、ヒト、マウス、ウサギなどのリンパ球から抗原特異的抗体産生細胞を特定し、1 細胞の B 細胞から抗体遺伝子を単離することができる。同技術を用いて、ヒト・マウス・ウサギモノクローナル抗体作製支援を 25 件実施した。そのうち目覚ましい成果を以下に紹介する。

①感染症では四類感染症に分類され、P3 実験施設において BLS3 扱い基準が必要なウエストナイルウイルスに対して、中和活性を持つヒト抗体を 3 種類取得した (Ozawa et al., *Antiviral Res*, 2018)。そして、ウエストナイルウイルスに対する新たな分子標的薬を開発する目的で、この抗体のエピトープを、Fab 化抗体との複合体を作製して X 線結晶構造解析にて同定する支援へと発展した。

②難病として指定されている自己免疫性後天性凝固因子欠乏症 (指定難病 288) 患者より、凝固第 XIII/13 因子モノクローナル自己抗体の取得を行い、17 種類の自己抗体が得られた。モノクローナル自己抗体は活性化過程で FXIII-A からの FXIII-B の解離をブロックする「Dissociation インヒビター」、FXIII-A と FXIII-B との異種四量体形成を阻害する「Assembly インヒビター」、および阻害作用を示さない「非インヒビター」の 3 群に分類され、凝固第 XIII/13 因子モノクローナル自己抗体に起因する自己免疫性後天性凝固因子欠乏症の病態解明が期待される。また、これら抗体について特許出願を、支援依頼者と共同で出願しており (特願 2017-233837)、導出先企業を検討している。

③頻回輸血を受けた血液疾患患者より、抗 HLA-B*40:02 抗体、及び抗 HLA-A*24:02 抗体が得られた (Zaimoku et al., *Blood* 2017)。これらの抗体は、最近増加している HLA 半合致造血幹細胞移植後の決めリズム解析や、HLA 欠失を伴う白血病細胞の検出などへの応用が期待される。また、これら抗体について特許出願を、支援依頼者と共同で出願し (特願 2016-176718)、導出予定の企業、及び支援先研究者と 3 者で共同研究を行っている。

④糖鎖修飾された B 型肝炎ウイルス表面抗原に対する抗体の作製を行い、1 種類の抗体が得られた (Agata et al., *BBA Gen Subj* 2022)。この抗体を用いることで、新規 B 型肝炎ウイルス検査系の開発、糖鎖付加抗原を認識できる抗体を誘導するワクチンの開発、また糖鎖が付加された抗原を認識し感染阻止効果を示す中和抗体の獲得が期待される。この抗体について特許出願を、支援依頼者と共同で行った (特願 2018-108179、PCT/JP2019/022588)。支援依頼者が設立したベンチャー企業がこの特許の独占実施許諾を受け、事業が行われる予定である。

⑤マラリア原虫由来タンパク質 PfRipr_5 は、グローバルヘルス技術振興基金 (GHIT) の援助を受け今年から前臨床試験が実施される非常に期待されているワクチン候補である。そこで感染防御機構の分子機構を構造生物学的に明らかにするため、PfRipr_5 に対するウサギモノクローナル抗体の作製を行い、12 種類の特異的な抗体が得られた。このうち 1 種類は、マラリア原虫の増殖阻害活性を有していた。現在、PfRipr_5 とモノクローナル抗体との構造解析をクライオ電子顕微鏡法での解析を試みている。また X 線結晶構造解析も行うために結晶化を進めている。

【新型コロナウイルス中和抗体作製支援】(担当機関:富山大学)

パンデミックの新型コロナウイルス感染症への研究支援として、新型コロナウイルス感染症の回復患者より、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質に対する抗体の取得を行い、28 種類のモノクローナル抗体が得られた。このうち 1 種類の抗体はデルタ株までの変異株に対して中和活性を有していること、またオミクロン株に対しても活性は減弱するが、中和活性を有していることが示された。これら抗体についての特許出願を、支援依頼者と共同で行った (特願 2021-056423)。今後得られた抗体を用いた中和抗体製剤などの実用化が期待される。本成果は、BINDS のウェブサイト、及び AMED ウェブサイトの COVID-19 特設ページに掲載された。

【フカボディ抗体生産支援】(担当機関:愛媛大学・愛媛県水産研究センター)

フカボディ (サメ VNAR 抗体) 作製支援については、アカデミアおよび産業界からの問い合わせが多く、同技術に対する関心の高さが伺える。そのため、支援開始時期を予定よりも半年繰上げ、2019 年後半から支援提供を開始した。アカデミア研究者に対しては 2 件の支援を実施し、VNAR をそれぞれ取得した。また、国内製薬企業との共同研究では VNAR を数十クローン取得した。

【タンパク質結晶化・構造解析支援】(担当機関: 東京大学)

東京大学グループが持つ X 線結晶構造解析技術、NMR 技術、高圧リフォールディング技術を用いた構造解析支援を提供している。これまで5件の支援を実施しており、このうち4件の支援において X 線結晶構造解析により立体構造の決定に成功した。原著論文を公表し支援が完了した成果を以下に紹介する。病原性原虫の赤痢アメーバにおける糖新生の律速酵素の解析支援では、X 線結晶構造解析により分解能 2.6 Å で立体構造を決定した。この酵素はリン酸転移反応に ATP を用いる高等動物の酵素とは配列相同性が低く (<15%)、ピロリン酸 (PPi) を反応に利用することから赤痢アメーバの増殖を特異的に抑制する薬剤設計の標的タンパク質の一つとして期待されている。本支援により決定した構造から PPi 選択性を説明する構造基盤と ATP 型酵素との構造的差異が明らかになった (Chiba et al., J Biol Chem 2019)。また、植物の生育制御に必須な植物ホルモン・ブラシノステロイド (BR) 情報伝達のマスター転写因子と標的 DNA 複合体においては、結晶化を促進する融合タグ技術により分解能 2.2 Å で構造決定に成功し、BR 応答性遺伝子の発現調節における中心的な制御機構を解明した (Nosaki et al., Nat Plants 2018; Nosaki et al. Sci Rep 2021)。

(2) 高度化

【複合体タンパク質生産・調製技術】(担当機関: 愛媛大学・東京大学)

愛媛大学が独自に見出したアブシジン酸 (ABA) 依存的に複合体を形成するオオムギ ABA 受容体-PP2C 複合体の調製に取り組み、コムギ無細胞タンパク質合成系で生産したタンパク質が安定な複合体を形成することを明らかにし、精製から結晶化までの調製法を確立した。このオオムギ ABA 受容体-PP2C 複合体の結晶から得られた X 線回折データを分解能 2.85 Å で解析し、双子葉類と単子葉類の ABA 受容体間の化合物に対する選択性・感受性に影響する構造的差異を見出した。

【タンパク質複合体解析技術】(担当機関: 愛媛大学)

サリドマイドを代表とするタンパク質分解誘導剤は標的 E3 ユビキチンリガーゼに結合し、その基質タンパク質への結合特異性を変えることで、薬剤依存的に特定のタンパク質を分解誘導する。タンパク質分解誘導剤は薬剤依存的に細胞内の特定のタンパク質を検出限界以下に分解できるため、ゲノムでの遺伝子変異に匹敵する効果が得られると考えられており、薬剤の作用機序の概念を大きく変えた。実際、サリドマイドの世界的薬害で示されたように、薬剤依存的なタンパク質分解が表現型に与える影響は絶大である。現在、タンパク質分解誘導剤の探索や作用機序を理解する研究は、世界で最もホットなテーマの1つである。一般に、薬剤依存的分解の標的タンパク質の探索は、タンパク質分解誘導剤を細胞に投与した後、減少するタンパク質を質量分析を用いて同定する手法が広く用いられている。しかし、細胞というブラックボックスを介するため、分解標的タンパク質の同定は必ずしも容易ではない。我々は、コムギ無細胞系を用いて作製した 24,000 種のヒトプロテインアレイとスクリーニング技術を用いて、*in vitro* での薬剤依存的相互作用タンパク質の網羅的同定技術を開発した。同技術を用いてスクリーニングを実施した結果、サリドマイドの薬害の1つである催奇性に直接関与する転写因子の PLZF タンパク質を新たに見出した (図1、Yamanaka et al., EMBO J 2021; AMED プレスリリース)。PLZF はヒトやマウス、トリの四肢形成のマスター制御因子であり、サリドマイドの投与およびその代謝産物の5位水酸化サリドマイドができる、サリドマイド受容体 CRBN との相互作用が起こり、PLZF の分解が誘導される。その結果、四肢形成が正しく進まず、催奇性を誘導することを明らかとした。ヒトでは、PLZF 以外にもう1つの催奇性因子 SALL4 の両方がサリドマイドにより分解されることで感受性が高まるというモデルを提唱した。そこで、SALL4 と CRBN との複合体構造をサリドマイドおよび5位水酸化サリドマイドの両方で分解能 1.8 Å と 1.7 Å で決定 (東京大学グループ) し、サリドマイド (Thal) と 5位水酸化サリドマイド (5HT) の立体選択的な結合とそれによって誘導される複合体形成を可視化することに成功した (図2、Furihata et al., Nat Commun 2020; AMED プレスリリース)。

【催奇性回避サリドマイドの創出】(担当機関: 愛媛大学・東京大学)

上記で得られた構造情報を元に、インシリコユニットの本間先生と連携し *in silico* 薬剤設計を行い、催奇性を回避したサリドマイド誘導体化合物のデザインを進めている。インシリコデザインと生化学的解析を繰り返し、影響が多い部位を絞り込んだ。そこからは、様々な官能基を付加した化合物を有機合成した結果、薬効標的である IKZF1 や IKZF3

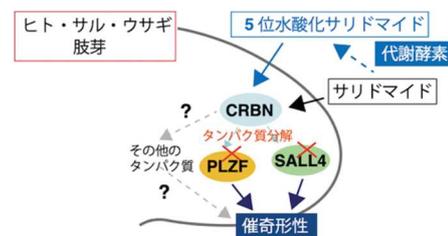


図1.ヒトにおけるサリドマイド催奇性形

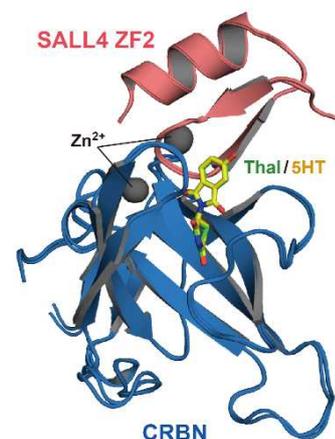


図2.CRBN-SALL4 複合体の構造

との相互作用は誘導するが、PLZF や SALL4 との相互作用を抑制した化合物 (図3、#2と#3) を取得することができた。さらに細胞内の分解においても、IKZF1 や IKZF3 は分解するが、PLZF や SALL4 の分解は抑制された。現在、ゲノムにヒト CRBN を組み込んだ形質転換マウスの作製が終了したので、秋頃には、新規薬剤の個体での催奇形性の評価ができる予定である。これらの一連の研究を進めることにより、**催奇性を回避した新しいサリドマイド誘導体の開発を目指す**。それにより、妊娠の可能性が殆ど無い 50 代後半以降の患者に実質使用が限定されているサリドマイド誘導体の対象者を、さらに若い世代の血液がんや過剰免疫系の患者へ対象が拡大できることが期待できる。

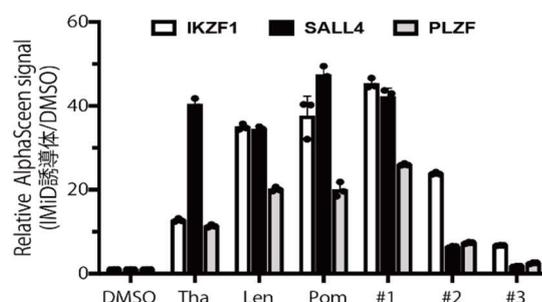


図3. 催奇性回避を目指した新規サリドマイド誘導体

【新規近位依存性ビオチン化酵素 AirID の創出】(担当機関: 愛媛大学)

本事業ではコムギ無細胞系を基盤としてヒトプロテインアレイを用いた複合体のパートナーの探索を進めてきた。さらに、細胞内もしくは生体内で相互作用パートナー候補を見つけることができれば、プロテインアレイのデータと組み合わせることにより、生物学的解析が加速すると考えた。その手段として、相互作用タンパク質をビオチン標識できる近位依存性ビオチン化酵素を用いることとした。これまで BioID と TurboID が近位依存性ビオチン化酵素として報告されていたが、BioID は活性が低く、TurboID は高活性であるが非特異的ビオチン標識を行うため相互作用解析を行うには、それらは大きな改善点であった。そこで、膨大なゲノム情報を用いた *in silico* タンパク質設計を行いまったくの新規な近位依存性ビオチン化酵素をデザインした。複数種類の候補酵素をコムギ無細胞系で合成し、活性評価を繰り返した結果、**タンパク質-タンパク質間相互作用解析に最適化した AirID 酵素を創出した** (図4、Kido et al., eLife 2020)。AirID を融合したタンパク質を細胞で発現させた結果、既知の相互作用タンパク質の高感度でビオチン標識でき、質量分析することにより、相互作用タンパク質やそのビオチン化部位の同定ができることが分かった。現在、サリドマイド受容体の CRBN に AirID を融合した遺伝子を組み込んだゲノム編集マウスを作製した。既に予備的には、サリドマイド投与により既知の基質のビオチン標識が検出できている。**AirID を用いて、細胞内・生体内で複合体の同定・解析ができる技術開発を進める**。

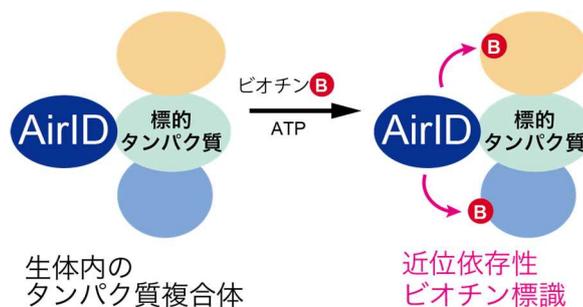


図4. AirID を用いた相互作用タンパク質のビオチン標識

【AirID を用いた薬剤に誘導される細胞内複合体解析】(担当機関: 愛媛大学)

本事業ではコムギ無細胞系を基盤としてヒトプロテインアレイを用いた薬剤依存的な複合体を形成するパートナーの探索を進めてきた。また本事業において、上述の相互作用解析に最適化した相互作用タンパク質をビオチン標識できる近位依存性ビオチン化酵素 AirID 酵素を創出した (Kido et al., eLife 2020)。多発性骨髄腫における主要抗がん剤であるサリドマイドやその誘導体であるレナリドミド、ポマリドミドは、受容体タンパク質である CRBN に結合し、本来の基質ではないネオ基質と呼ばれるタンパク質との相互作用を誘導し、ネオ基質を分解誘導することで薬効を示していると考えられている。この様なネオ基質を同定することは、更なる薬効の発見や副作用の原因を調べることになるため、非常に重要な研究テーマであると考えられている。そこで本年度は、CRBN に AirID を融合したタンパク質を用いて、細胞内でネオ基質を同定・解析できる技術開発を行った。その結果、様々なヒトがん細胞種を用いてビオチン標識ネオ基質を同定・解析することに成功し、血液がんを引き起こす ZMYM2-FGFR1 融合タンパク質が新たに分解誘導されることを明らかにした (Yamanaka et al., Nat Commun 2022)。

【低分子抗体作製技術(1) Fab 抗体生産技術】(担当機関: 富山大学・東京大学)

Fab 抗体は構造が不安定な膜タンパク質やタンパク質複合体の構造を安定化させ、結晶化を助けるシャペロンとして広く使われている。従来、Fab 抗体は全長抗体をパパイン処理して得られるが、生産コストや切断末端の不均一性が課題であった。富山大学では Fab 抗体の直接発現法を開発した。本技術では単離したモノクローナル抗体重鎖の定常領域遺伝子を遺伝子工学技術により改変し、Fab 部のみを組換えタンパク質として培養細胞に発現させる。これにより、**従来法のパパイン切断では不可能な末端が完全に揃った Fab 抗体の産生、より簡便・短期間な Fab 抗体生産が実現した**。本技術を用いた Fab 化抗体作製支援サービスを当初の計画通り 2018 年度から開始し、1 件の支援で Fab 化抗体との複合体の X 線結晶構造解析に成功した。

【Fab 抗体を用いた複合体タンパク質結晶化技術】(担当機関: 東京大学・愛媛大学)

構造が不安定なタンパク質複合体は、結晶化が構造解析の大きな障害である。エピトープタグを標的複合体の不安定な箇所へ挿入し、タグに対する Fab 抗体を結合させる事で、標的タンパク質の安定化を試みた。ツールとして愛媛大学が開発した新規タグエピトープ (AGIA) と Fab 化 AGIA 抗体を用いた。産総研富井グループと共同で、複合体

タンパク質への AGIA 配列の最適な導入位置を検討し、複合体を構成するタンパク質の配列内で非保存性かつ分子表面性の複数の領域が AGIA 配列の導入位置として見出された。これらの領域への配列導入によって複合体を構成するタンパク質の活性が低下しないこと、さらに AGIA 抗体と十分な親和性で結合できることが確認され、複合体の精製および結晶化に選択領域が利用できることが示された。また、Fab 化 AGIA 抗体を用いた結晶化技術のさらなる高度化のために Fab 化 AGIA 抗体の改変を行い、分解能 3.3 Å から 1.8 Å へと結晶性を大幅に改善した。

【低分子抗体作製技術(2)フカボディ生産技術の高度化】

抗体を持つ生物の中でサメはヒトを含む高等哺乳類から進化的に最も遠く、またサメ重鎖抗体からはシングルドメイン抗体 VNAR を作製できるなど、サメ免疫はマウス免疫にはない特徴をもつ魅力的な抗体作製技術である。VNAR はわずか 15kDa の最小の抗体分子であり、熱湯で煮ても巻き戻り活性を維持する高い可塑性や、他の分子に融合可能な改変自由度、大腸菌発現による低コスト生産など非常に魅力的な機能性分子である。しかしサメはモデル生物ではなく入手や飼育が困難であり、DNA 配列情報や二次抗体などのバイオリソースも整備されていないことから、VNAR の開発は他の抗体に比べて遅れている。我々は食糧消費されていない愛媛産の小型サメ(エイラクブカ)に注目し、エイラクブカを用いて VNAR を作製する技術を開発した。エイラクブカ由来の VNAR をフカボディと名付け、技術高度化を進めた。

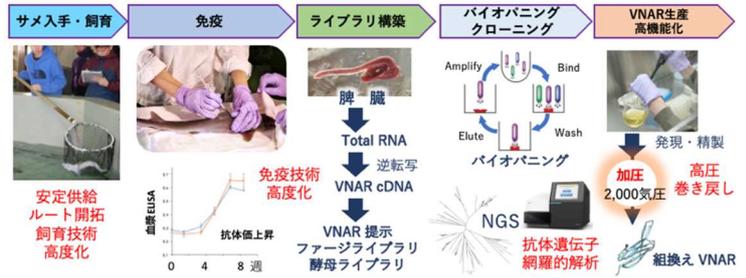


図5.フカボディ作製スキーム

《フカボディ抗体遺伝子の選抜技術》(担当機関:富山大学・愛媛大学)

フカボディ作製においては、免疫を行なったサメから抗体遺伝子可変領域を増幅し、VNAR を提示したライブラリを構築し、選抜を行う(図5)。本事業において、ファージディスプレイ(愛媛大学)、酵母ディスプレイ(富山大学)、リボソームディスプレイ(愛媛大学)の要素技術を検討し、ファージディスプレイと酵母ディスプレイにおいて抗原特異的クローン選抜に成功した。また、次世代シーケンス(NGS)解析を用いた効率的・網羅的な抗体遺伝子解析法を開発した。NGS データの解析のために、エクセルを用いた解析ツールを富山大グループが独自開発した。ツールを内製したことで、解析において浮上した問題点や改善点をもとに、研究者自身により速やかにツールを改良できた。実際に抗 Venus フカボディ提示ファージおよび酵母ライブラリを用いて NGS 解析を行なったところ、バイオパニング前はバイアスがかかっていた VNAR 配列が、バイオパニングを経て濃縮されクラスタを形成する過程が観察された(図6)。

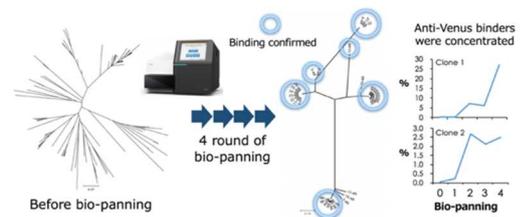


図6. NGS によるフカボディライブラリ解析

《抗体大量生産技術の高度化》(担当機関:東京大学・愛媛大学)

シングルドメイン抗体であるフカボディは大腸菌でも発現可能であるが、細胞質に発現させると分子内のジスルフィド結合により封入体を形成する。ペリプラズムへ移行させることで可溶化発現は可能であるが、生産性が低い。東京大学グループは大腸菌封入体として発現したフカボディを 2000 気圧まで加圧し、常圧に戻すことで巻き戻し、高純度の活性型フカボディを大量に調製できることを見出した(図7)(特願 2019-049400)。このフカボディ生産技術は極めて生産性が高く、哺乳動物培養細胞(Expi293 細胞)で生産する場合に比べて 1/100 のコストでフカボディを生産できる。また本技術は、封入体の可溶化に変性剤や界面活性剤を必要としない、アフィニティ精製なしで高純度のフカボディを精製可能などの特長を持つ。東京大学グループは本技術で巻き戻した抗 Venus フカボディと Venus の複合体の詳細な結晶構造を明らかにし、本技術で巻き戻したフカボディが高い結合能と均質性を保持していることを証明した。

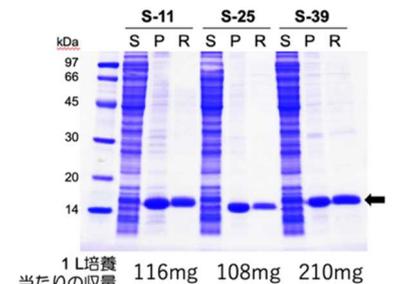


図7. 高圧リフォールディングによるフカボディ生産
S:大腸菌破碎後上清
P:大腸菌破碎後沈殿(封入体)
R:封入体の高圧処理後上清

《サメ飼育方法の高度化》(担当機関:愛媛県水産研究センター・愛媛大学)

愛媛県水産研究センターが持つ愛媛県の漁業関係者との強いコネクションを活用して、免疫に適したサイズのエイラクブカを無傷で捕獲・供給できる入手ルートを確認した。食餌の改良により、捕獲後のエイラクブカ生着率を 50% から 90%以上に大幅に向上させる事に成功した。さらに、水温が低下する冬季に温水を循環させる仕組みや防護ネットの導入などにより、サメへい死事故を防止する仕組みを確認した。これにより、サメの生存率が格段に向上し、サメを安定して通年飼育できるようになった。本事業期間中に 180 頭を免疫試験に供給した。

《フカボディ開発》(担当機関:愛媛大学、東京大学)

事業期間中に18種類の抗原をエイラクブカに免疫し、そのほとんどにおいて、3~4ヶ月の免疫後に抗体価の上昇を確認した。免疫したエイラクブカの脾臓から抽出した抗体遺伝子を用いて、Venus 蛍光タンパク質、ヒト転写因子、CD マーカーなど9種類の標的についてフカボディ提示ライブラリを構築し、そのうち5抗原に対するフカボディを取得した。また、一部の抗 Venus フカボディクローンは90°C 近い高温、高濃度の還元剤処理後も結合活性を維持するなど、高い安定性を示した(論文執筆中)。特にマウス CD19 に対するフカボディ作製においては、 $K_D=0.5$ nM と極めて高い親和性をもつフカボディの取得に成功した。

【ISAAC 法による抗体スクリーニング法の高度化】(担当機関:富山大学)

支援依頼として、メチル化などエピトープの微細な構造の差異を識別する抗体の依頼が多い。それに対応するため、効率良くスクリーニングするためのプロトコルの確立を目指した。ブロッキング法と命名した不要な抗体を検出できなくなる方法を用いて、取得が難しいとされていた TCR 様抗体の効率的な取得に成功した(Ozawa et al., Eur J Immunol 2021)。今後ブロッキング法を用いて、様々なエピトープの微細な構造の差異を識別する抗体の取得が期待される。

【ウサギ抗体のヒト化】(担当機関:富山大学)

これまでに作製したウサギ抗体の抗体医薬開発のためのヒト化するための高度化を開始した。CDR グラフト技術を用いて、5種類のウサギ抗体のヒト化を行い、いずれも特異性が保たれていることが示された。

【みかんウイルス感染症検査法の開発】(担当機関:富山大学・愛媛大学)

愛媛県で栽培している高級みかん品種「紅まどんな」に感染し、品質や収量の低下をもたらす温州萎縮ウイルス B200_Az 株に特異的なウサギモノクローナル抗体を ISAAC 法を用いて作製した。7種類の特異的抗体が得られ、そのうち1つの抗体を用いて ELISA による温州萎縮ウイルスの特異的検出に成功した(Miyoshi et al., PLoS One 2020)。本研究成果を元に、現場において農業従事者がウイルス検出を簡便にできる検査キットの開発を進め、試作品が完成した。現在、感染柑橘樹木を用いた条件検討中である。

【無細胞膜タンパク質合成技術を応用した簡便なイオンチャネル電位測定法の開発】(担当機関:愛媛大学・日産化学)

産学連携による技術支援基盤の高度化研究として、愛媛大学と日産化学が共同で、無細胞膜蛋白質合成系と小型膜電位測定装置を組み合わせた、イオンチャネルの迅速・簡便評価手法を開発した。重要な創薬標的の1つであるイオンチャネルは、細胞を用いた発現や膜電位測定が創薬のボトルネックになっていた。愛媛大学では無細胞膜タンパク質合成技術を用いて、209種類のイオンチャネルをプロテインアレイとして整備した。2回から16回の膜貫通ヘリックスを持つイオンチャネルの93.6%が良好に合成された。合わせて、小型膜電位測定装置(図8)を用い、装置の人工脂質二重膜にイオンチャネルを融合させることで、数分~数十分以内に標的チャネルに特異的な膜電位が検出できる系を構築した。38種の電位依存性カリウムチャネルについて脂質平面膜法を用いた活性評価を行い、30種において電流シグナルを検出した(論文執筆中)。

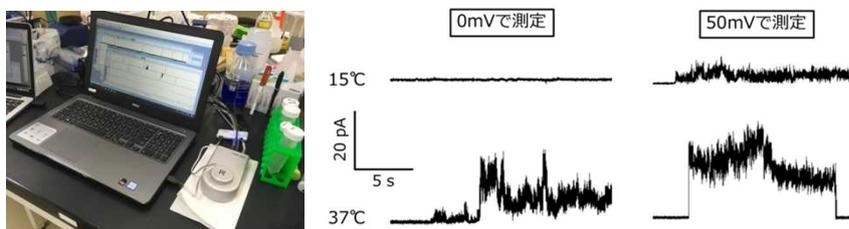


図8. 無細胞合成イオンチャネルの膜電位測定

(1) Support

Ehime University has developed a wheat cell-free protein synthesis system. By making full use of the cell-free system, seven cases of protein production support were carried out. In addition, support was provided to search for interaction partners of target proteins by utilizing the screening facility that can perform 60,000 assays of AlphaScreen per day on 28,000 human protein arrays, protein kinase arrays, transcription factor arrays, and ubiquitin ligase arrays maintained at Ehime University. We also provided support for the search for interaction partners of target proteins. In addition, Ehime University's screening facilities and know-how on the construction of drug discovery assay systems using protein-protein interactions as an indicator were provided to the client to support drug discovery. As a result of the support, several therapeutic drug candidates targeting aging, cancer, and sepsis, as well as candidates for compounds regulating hormone signaling and aging in plants were found.

Using the ISAAC method developed by the Toyama University, it is possible to identify antigen-specific antibody-producing cells from human, mouse, and rabbit lymphocytes, and to isolate antibody genes from a single B cell. The technology has been used to support the production of a number of human, mouse, and rabbit monoclonal antibodies. In addition, as research support for pandemic novel coronavirus infection, antibodies against the spike protein of SARS-CoV-2 were obtained from patients recovering from novel coronavirus infection, and 28 types of monoclonal antibodies were obtained. One of these antibodies was shown to have neutralizing activity against mutant strains up to delta strain, and also against omicron strain, although the activity was attenuated.

The University of Tokyo group's X-ray crystallography, NMR, and high-pressure refolding technologies were used to successfully support the determination of the three-dimensional structures of protein complexes.

(2) Advancement

As an advancement of protein complex analysis technology, screening was conducted using 24,000 human protein arrays generated using wheat cell-free systems and screening technology to comprehensively identify drug-dependent interacting proteins in vitro, which resulted in the identification of thalidomide's drug-induced We newly discovered the PLZF protein, a transcription factor directly involved in one of the teratogenic effects (Yamanaka, et al., EMBO J 2021, AMED press release). Furthermore, PLZF is a master regulator of limb formation in humans, mice, and tori, and administration of thalidomide and the formation of its metabolite, thalidomide 5-hydroxylated, results in interaction with the thalidomide receptor CRBN, which induces PLZF degradation. As a result, limb formation does not proceed properly and teratogenesis is induced. In humans, we proposed a model in which both PLZF and another teratogen, SALL4, are degraded by thalidomide to increase susceptibility. Furthermore, the complex structure of SALL4 and CRBN was determined at 1.8 Å and 1.7 Å resolution for both thalidomide and 5-hydroxythalidomide (University of Tokyo group), and the selective binding of thalidomide and 5-hydroxythalidomide and the complex formation induced by it were successfully visualized (Furihata, et al., Nat Commun 2020, AMED press release).

In this project, we have been searching for complex partners using human protein arrays based on wheat cell-free system. Furthermore, we have an idea that if we could find candidate interaction partners in cells or in vivo, biological analysis could be accelerated by combining them with protein array data. We decided to use proximal-dependent biotinyltransferases that can biotin-label interacting proteins. Therefore, we designed an AI using a vast amount of genomic information and created an AirID enzyme optimized for completely novel protein-protein interaction analysis (Kido et al., eLife 2020, AMED press release).

Among antibody-bearing organisms, sharks are the most evolutionarily distant from higher mammals, including humans, and shark immunization is an attractive antibody production technology with features not found in mouse immunization, such as the ability to produce single-domain antibody VNAR from shark heavy chain antibodies. However, the development of VNAR has lagged behind other antibodies because sharks are not model organisms and are difficult to obtain and breed, and bioresources such as DNA sequence information and secondary antibodies have not been developed. Therefore, we focused on small sharks of no commercial value (*Hemirhamphys japonica*) caught off the coast of Matsuyama, Ehime, which are not consumed as food, and developed a technology to produce VNARs using *H. japonica*. We named the VNAR derived from *H. japonica* "Fukabody" and succeeded in creating a technology to prepare a large amount of highly pure and active Fukabody as a result of technological advancement. Furthermore, the detailed crystal structure of the complex of anti-Venus Fukabody and Venus was clarified, proving that the Fukabody rewound by this technology retains high binding ability and homogeneity.