

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：新規アミノ酸を用いた高親和性・高安定性 VHH 抗体の作製技術の開発
3. 研究開発代表者：坂本健作
4. 研究開発の成果
新規アミノ酸の導入によって VHH 抗体の性状を改良する技術の開発を開始した。具体的には、

- ① 新規アミノ酸が部位特異的に導入された VHH 抗体を、大腸菌を用いて生産するための技術開発に着手し、大量生産に向けた改良を進めている。
- ② 新規アミノ酸を導入した VHH 抗体の性状を評価するために、産業化を前提とした評価項目を設定し、モデルとなる VHH 抗体を用いて評価を実施することで、評価系の有用性を確認した。

新規アミノ酸を、タンパク質の望みの部位に導入するには、タンパク質遺伝子中の特定のコドンで新規アミノ酸に割り当てる。本開発では UAG コドンで新規アミノ酸に割り当て、タンパク質遺伝子のコード配列中に UAG コドンが現れたときに新規アミノ酸がタンパク質に組み込まれる方法を採用している。UAG コドンは普遍遺伝暗号においては終止コドンとして用いられており、UAG コドンをタンパク質合成の完了の合図として利用している。研究開発代表者は普遍遺伝暗号とは異なる遺伝暗号を持つ大腸菌の開発に成功しており (Mukai, T. et al. *Nucleic Acids Res.* **38**, 8188-8195, 2010 ; Mukai, T. et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 757-761, 2011 ; Mukai, T. et al. *Sci. Rep.* **5**: 9699, 2015)、最も新しく開発された B-95. ΔA 株を VHH 抗体の発現に用いるための条件最適化、及びプラスミド・システムの構築を行った。この B-95. ΔA 株において UAG コドンは終止コドンとして働くことはなく、新規アミノ酸を導入するための酵素 (aaRS) - tRNA 遺伝子ペアを導入することで UAG コドンをこのアミノ酸に翻訳することができる。

そこで、次の条件について検討を行った。

- ① VHH 抗体生産に適した B-95. ΔA 株の培養温度
- ② VHH 抗体発現プロモータの選択と発現誘導条件
- ③ aaRS、tRNA それぞれを発現させるための転写プロモータの選択
- ④ aaRS、tRNA 遺伝子が大腸菌に導入する為のベクターの選択

これらの条件検討によって、1つの VHH 抗体中の4か所に新規アミノ酸を同時に導入することに成功した。問題点としては、新規アミノ酸を導入しないで発現させた VHH 抗体と比べると合成量が著しく低下することである。この問題点は、上記発現条件をさらに広く検討することと、tRNA のヌクレオチド配列の最適化、aaRS の改変などによって解決できると考えており、次年度前半の開発課題として位置付けている。

新規アミノ酸の組み込み条件の検討・最適化と並行して、VHH 抗体自体の大量発現系の検討を行った。来年度以降、新規アミノ酸導入条件を取り入れる計画である。VHH 抗体の多くはシグナル配列を付加したタンパク質として可溶性発現させ、その後複数の精製工程を経るプロセスにて調製されている。しかしながら、この手法では可溶性 VHH 抗体以外を扱えず、可溶性を維持するために低温培養および発現制御が必要となり生産性の改善が難しい。また、シグナル配列の切断、かつシグナル配列残存副生物淘汰のため精製工程の煩雑化が懸念される。そこで、取得した VHH 抗体候補配列の網羅的評価および高生産性培養を可能とするため、シグナル配列を付加せず不溶性タンパク質として発現し、リフォールディングおよびゲルろ過精製一工程からなる生産プロセスを構築した。本手法によりフラスコ培養にて 100

[mg/L]以上の発酵成績が得られており、これまでの知見から生産スケールで数[g/L]の生産性が見込まれる。

新規アミノ酸が導入された VHH 抗体性状評価項目を以下の表のように選定し、それぞれの分析系の整備を行った。

純度	分子量	分散性	結合親和性	結合特異性	安定性/可逆性
逆相HPLC	(a) SDS-PAGE (b) SEC-MALS*	SEC (PBS系、 Arg系**)	(a) Biacore (b) ELISA	(a)免疫沈降 (b) ELISA	(a) CD/蛍光スペクトル (5~95℃) (b)逆相HPLC定量 (熱変性後の溶解性、25℃保存安定性)

*サイズ排除クロマトグラフィー (多角度光散乱検出)

**味の素特許技術

分散性の評価において取得した VHH 抗体候補配列から VHH 抗体として調製可能か判断することが可能である。一方、この評価系を用いて抗原が異なる VHH 抗体、またそれらの変異体を評価した結果、各 VHH 抗体間における差異 (分散性、結合親和性、安定性/可逆性) を検出するに至っている。今後はハイスループット化を検討し、迅速に候補 VHH 抗体の実用性・生産性を判断可能な評価系とする計画である。