

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業  
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative Biological  
Medicine
- 研究開発課題名： (日本語) 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  
(英語) Development of the technology for synthesizing VHH antibodies with  
high affinity and stability based on a novel repertoire of genetically  
encoded amino acids
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター  
グループディレクター 坂本 健作
- 所属 役職 氏名： (英語) Kensaku Sakamoto, Group Director, Center for Life Science Technologies,  
RIKEN
- 実施期間： 平成28年 4月1日 ～ 平成29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 新規アミノ酸導入の抗原親和性に対する影響の解析  
開発課題名： (英語) Analysis of the effects of introduced synthetic amino acids on antigen  
binding
- 研究開発分担者 (日本語) 東京大学 助教 長門石 暁  
所属 役職 氏名： (英語) Satoru Nagatoishi, Assistant Professor, The University of Tokyo
- 分担研究 (日本語) VHH 抗体の性状評価及び生産プロセスの開発  
開発課題名： (英語) Development of the methods for the production and quality evaluation  
of VHH antibodies
- 研究開発分担者 (日本語) 味の素(株) 研究員 春名健一  
所属 役職 氏名： (英語) Ken-ichi Haruna, Researcher, Ajinomoto Co., Inc.

## II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

理化学研究所は味の素㈱と協力して、新規アミノ酸 X の導入によって VHH 抗体の性状を改善する技術の開発を進めている。そのために、X を複数個所に導入した VHH 抗体バリエーションを生産するための技術を開発した。遺伝暗号表にない新規アミノ酸を抗体に導入する為に、UAG コドンが新規アミノ酸に再定義された B-95.delA 株を利用する。この大腸菌株は理研で独自に開発されたものであり、従来はタンパク質分子中に 2 か所以上に同時に新規アミノ酸を組み込むことは困難であったが、B-95.delA 株が開発されたことで、理論上は何か所でも同時に組込むことが可能になっている。しかし、実用上、VHH 抗体を大量生産することが必要になるので、複数個所に新規アミノ酸 X を組み込んだ VHH 抗体が 10mg/L の収率で生産できることを最初の目標とした。下記の条件検討前は、この 100 分の 1 の収量しか実現できていなかった。10mg/L まで収量が向上できるようであれば、味の素において生産菌の高密度培養などのノウハウの活用によって数 g/L の収量まで改善できる見込みである。

導入個所を 4 か所としたモデル VHH 抗体バリエーションについて最終的に 10~20mg/L の収量を実現することに成功した。検討した条件は次の 5 つである。

- 1) 生産宿主菌である B-95.delA 株の培養温度の最適化、
- 2) X を導入する為のアミノアシル tRNA 合成酵素変異体 (aaRS) の活性の改良、
- 3) UAG コドンを認識する tRNA の改良、
- 4) これら aaRS と UAG-tRNA の発現レベルの向上
- 5) VHH 抗体を発現させるベクターと、aaRS-tRNA 発現用ベクターの適切な組み合わせ

加えて、UAG-tRNA の改良では、味の素側のリクエストによって、すでに米国で特許化されている従来の UAG-tRNA と異なるものを新たに開発することを試みて成功した。このことで、味の素が CDMO 事業を行う際にはライセンス料の支払いが回避できる見込みである。

ここで開発された、新規アミノ酸 X を効率良く VHH 抗体に導入する技術を活用して、以下のような成果が得られている。まず、X を組み込んだ VHH 抗体を多数作製し、抗体の性状改善に効果があることを示した。X による VHH 抗体改良技術については 27 年度に POC (Proof of Concept) を行ったところであるが、28 年度は特許出願に必要なデータの収集を進めた。複数の VHH 抗体についてこの技術の有効性が示されて、29 年度中に特許出願を行う予定である。さらに東京大学では X 含有 VHH 抗体バリエーションの詳細な解析を実施し、熱力学的パラメータに基づいて性状改良のメカニズムが明らかになってきた。この成果は、改良技術の単なる裏付けという以上に学術的に興味深い内容を含んでいる。理研で進めているコンピュータ・シミュレーションの試みからは、X 導入による性状改善効果の評価が可能になり、効果を予測する技術として活用できる可能性が出てきている。

多数の VHH 抗体をスクリーニングし、新規アミノ酸 X の導入によって性状が改良されたバリエーションを取得するための技術開発が、味の素と理研でそれぞれ行なわれた。味の素では、ハイスループット・スクリーニングのシステムを立ち上げて、1 カ月で 40 種類以上のバリエーションについて抗原親和性、立体構造安定性、構造多形などの複数の項目を調査するためのシステムを構築した。理研では、ディスプレイ技術を応用して、多数の VHH 抗体バリエーションの中から迅速に性質の良いバリエーションを絞り込むための技術開発が進捗を見せている。

(英文)

RIKEN and Ajinomoto Co., Inc. are working together to develop a technology for improving VHH antibodies by incorporating synthetic amino acid X into the molecules. We have developed a cell-based system for producing VHH antibodies with X at multiple defined sites. This system involves *E. coli* B-95.delA strain, which was engineered in RIKEN and has the UAG codon assignable to X. Before this strain, it was difficult to incorporate synthetic amino acids, not included in the natural genetic code, into a protein molecule at multiple sites. Although B-95.delA can theoretically be used for incorporate such amino acids at as many sites as desired, we thought that a yield of 10 mg/L should be achieved for any VHH variant containing the amino acid X at a few sites, because practical applications would require the large-scale production of the antibodies. We successfully increased the initial yield of X-containing VHH antibodies by 100-fold, by optimizing the parameters described below. With the 10mg/L target being achieved, Ajinomoto researchers will further increase the yield up to a few grams per liter, by applying their know-how, such as incubating host cells at a super high-density.

Thus, we succeeded to reach a 10-20mg/L target for a model VHH variant containing four Xs at different sites. The following 5 parameters have been optimized.

- 1) Temperature for growing the host B-95.delA cells
- 2) Activity of the aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS) for incorporating X
- 3) Activity of tRNA recognizing the UAG codon
- 4) Expression levels of these aaRS and tRNA molecules
- 5) Matching between the plasmid vectors used for expressing VHH antibodies and the aaRS-tRNA pair

In addition, we attempted to fill the request of Ajinomoto, which did not want to use tRNA developed and patented elsewhere, and succeeded in it by engineering another UAG-reading tRNA. This achievement will allow the company to avoid paying for the patented tRNA for their business.

By applying the developed efficient system for synthesizing VHH antibodies with X, we got the following results. Firstly, we showed the utility of X in improving the properties of VHH antibodies, by synthesizing and analyzing a large number of VHH variants with X. As we already got POC (Proof of Concept) for this technology in the previous fiscal year, we obtained data to show its applicability to various VHH antibodies this FY, and are going to apply for a patent in a few months. Secondly, the colleague with the University of Tokyo conducted detailed analyses of X-containing VHH variants and discovered a thermodynamic basis for the favorable effect of X, which is very interesting from a scholarly viewpoint. Thirdly, computer simulation studies conducted in RIKEN is enabling the prediction of the effects of X incorporation into VHH antibodies.

RIKEN and Ajinomoto made separate efforts to develop methods for rapidly screening for improved VHH antibodies with X. The company has installed a high-throughput screening system to evaluate more than forty VHH variants in a month about a number of different qualities, including the affinity for antigen, and structural stability and polymorphism. The institute is now applying a display technique for rapidly narrowing down a list of improved variants, with some promising results.

### Ⅲ. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Expanded genetic codes in mammalian cells, codon reassignments in *E. coli*, and their applications、口頭、坂本健作、The 2016 Genetic Code Expansion Conference、2016/8/13、国外
2. Engineered genetic codes applied for enhancing the usefulness of antibody、口頭、坂本健作、第 89 回日本生化学会大会、2016/9/26、国内
3. 非天然型アミノ酸の抗体技術への応用、口頭、坂本健作、山口純、第 11 回無細胞生命研究会、2016/10/6、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願