

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K05827
研究課題名(和文) 超好熱菌由来タンパク質を利用した抗体scaffoldの開発

研究課題名(英文) Development of binding scaffold with a protein from a hyperthermophilic archaeon

研究代表者
古賀 雄一 (Koga, Yuichi)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30379119
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：超好熱菌由来プロテアーゼの一部であるSD1の可溶性を向上させるために、複数の構造予測プログラム(foldx とTango)を使った合理的設計によってSD1変異体を工学的に設計した。設計された変異体を大腸菌で発現させたところ、SD1表面残基の変異(Y15K, W18R, S106R)により、可溶性発現が改善された。さらに、計算により同定された凝集の原因になりやすい領域(APR)に変異(S26K, Q91P)を導入すると、可溶性発現が向上した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超好熱菌由来プロテアーゼの一部であるSD1は、抗体の基質結合ドメインと類似の構造をとっており、標的に対して特異的に結合する分子(binding scaffold)としての開発が期待されるが、タンパク質の可溶性に問題があった。本研究で可溶性の向上したSD1が得られたことから、SD1のbinding scaffoldとしての課題を解決したものである。

研究成果の概要(英文)：A thermostable protein domain from a protease is expected to develop to artificial binding scaffold. To improve the solubility of SD1, SD1 protein was mutated by rational design using several structure prediction programs (foldx and Tango). The designed mutants were expressed in E. coli, and mutations of SD1 surface residues (Y15K, W18R, S106R) improved solubility expression. Furthermore, introduction of mutations (S26K, Q91P) in the aggregation-prone region (APR) identified by calculation improved soluble expression.

研究分野：生物工学

キーワード：可溶性改変 binding scaffold 熱安定性

1. 研究開始当初の背景

現在、アレルギー疾患、がんに対する治療薬として 10 種類の抗体がバイオ医薬品として承認されるなど、抗体医薬の重要性が増しつつあり、医薬品業界ではバイオ医薬品の時代が来ることが予測されている。抗体医薬は病変に特異的に作用できること、抗体が持つ免疫機能 (ADCC 活性、アゴニスト・アンタゴニスト活性) を利用した治療効果が得られることから、副作用が少なく効果の持続性が良いというメリットがある。現在承認されているものは、ヒト型の免疫グロブリンを活用するもので第一世代抗体医薬品とされている。

第一世代抗体医薬品の主な課題として、高機能化 (抗原結合親和性の向上)、多機能化、低分子化、安定化、生産プロセスの改良が認識されている。これを受け、がん組織への移行性を強化した低分子化抗体 (Fab、一本鎖抗体)、体内動態の改良抗体 (リサイクリング抗体、シーピング抗体)、多機能化抗体 (DSS、パイスペシフィック抗体) などが第二世代抗体医薬品として開発され実用化されつつある。

一方で、抗体医薬品のターゲットとなる疾患原因タンパク質は種類が多く、これらのターゲットに結合する抗体を個別に用意しなければならない。また、抗体医薬品のターゲットとなるタンパク質の多くは細胞内部に存在する。細胞内部で抗原を補足し有効な効果を示すためには、細胞に浸潤し細胞内の還元環境下で安定に構造を維持する事が必要になる。既存の抗体分子では細胞内に浸透することはできず、還元環境下で構造を維持することもできない。このような問題は、抗体医薬品の多機能化、安定化、生産プロセス面の課題として受け止められており、第三世代抗体医薬品としての開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究では、第三世代抗体となりうる scaffold タンパク質の開発を行い、標的・特異的な結合が可能な分子のスクリーニングシステムの有効性を実証する。筆者らが生育温度 90 の超好熱菌から見出した、免疫グロブリンフォールド (サンドイッチフォールド) を持った分子量約 13kDa のドメイン (Jerry-roll domain および SD1 domain) の構造的特性を解析し、新規の scaffold タンパク質とそのスクリーニング系を開発する。

3. 研究の方法

(1) BJR 及び SD1 の発現系構築、可溶性、安定性評価

Scaffold タンパク質としての適正を評価し、最適な取扱条件を決定する目的で、超好熱菌由来プロテアーゼ (Tk-SP および Islandisin) の BJR ドメインおよび、SD1 ドメインの組換え体を調製し、溶媒条件 (pH、塩、安定化剤) における、溶解度と二次構造形成状態を円偏光二色性 (CD スペクトル) 測定によって可溶性、安定性を免疫グロブリンと比較する。可溶性・安定性が不十分だった場合には変異導入による可溶化を行う。

(2) M13 ファージを利用したファージディスプレイ系の構築

M13 ファージのコートタンパク質 pIII に BJR および SD1 をそれぞれ融合したファージミドを構築し、大腸菌を宿主として scaffold タンパク質を提示したファージの発現を行う。ウエスタンブロット解析および CD スペクトル測定によって pIII 融合 scaffold の発現状態と構造安定性を確認する。

(3) 変異ライブラリーの設計

ラクダ抗体可変領域 (VHH ドメイン) との立体構造の重ね合わせ情報をもとに、標的結合部位を設計する。VHH の抗原認識部位 (CDR1~3) に相当する部分と相同性の高いループを立体構造上で同定し、標的結合部位の作成に適していると思われるループ (BJR の CD ループ、EF ループ、SD1 の EF ループ) を選定し、アミノ酸配列のランダム化を行う。ランダム化に際してはスクリーニングの再現性を考慮し、多様性が 10⁹ 程度の変異ライブラリーを設計する。変異構築法の違いによる変異の多様性を評価し最適条件を決定する。

(4) 特異的結合タンパク質のスクリーニングと結合特性の評価

変異ドメインを提示したファージライブラリーを用いて、がん関連因子 (HER2、VEGF) や自己免疫疾患関連因子 (IL-6) を標的とした結合特性によるスクリーニング (バイオパニング) を行い、特異的結合能力を持った scaffold の選定を行う。標的結合配列を同定するとともに、結合 scaffold タン

パク質を組換え発現し、標的への結合特性を、物理化学的に測定(等温滴定カロリーメトリーITC、QCM)する。特異性、結合カインेटックス(Kd 値、kon、koff 値)を既存の抗体と比較する。

(5) 第三世代抗体としての評価

Scaffold としての安定性、ライブラリーとして改変タンパク質の取得の容易性を既存の抗体製造プロセスと比較して評価する。また、安定性や可溶性を最適化するために必要な構造因子の他、ライブラリー構築に有利な最適条件を探索する。

4. 研究成果

(1) BJR 及び SD1 の発現系構築、可溶性、安定性評価

CD 測定により単ドメインでの適切なフォールディングの形成及び熱安定性の高さを評価するため、大腸菌を宿主とした発現系を構築し、SD1 及び BJR を調製した。単ドメインとして SD1 は発現が確認されたが、BJR は発現が確認されなかったため、GST との融合タンパク質として発現させ、CD 測定に供した。その結果、短波長 CD スペクトルにより SD1 及び BJR ともに シートリッチな構造を形成していることが示唆された (Fig. 1)。また 216 nm での変性曲線を測定すると、SD1 は 77.5 の、BJR は 85 の変性温度を示したことから高い熱安定性を有していることが示唆された (Fig. 2)。この結果は SD1 及び BJR は Scaffold タンパク質として機能する可能性を示した。

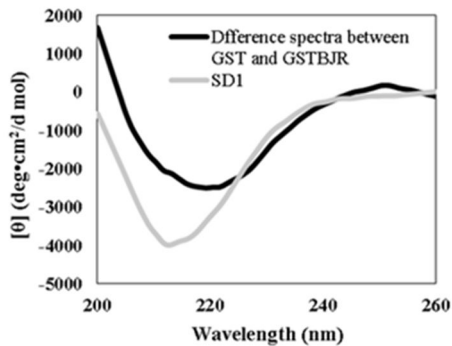


Figure 1 CD spectra of SD1 and BJR

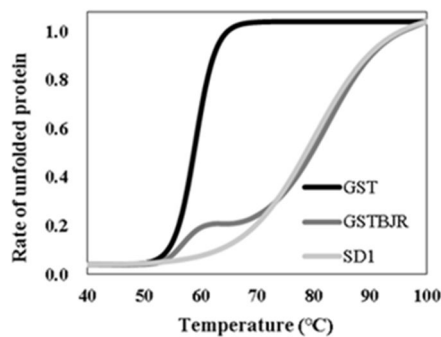


Figure 2 Thermal denaturation curves of SD1 and BJR

(2) M13 ファージを利用したファージディスプレイ系の構築

ファージライブラリーの構築に向けて、SD1 及び BJR に対してファージのコートタンパク質である p3 との融合タンパク質の発現系の構築を行ったところ、SD1 のみ発現が確認されたため、以降は SD1 に関してのみ Scaffold タンパク質としての評価を行った。ファージライブラリーとして SD1 の 2 つのループ構造に対して NNK 縮重コドンを用いた Overlap extension PCR 法により変異を導入した 3 種のライブラリーを構築した (Table 1)。構築したライブラリーに対する多様性評価により、全てのライブラリーで $10^7 \sim 10^8$ の多様性が確認された。そこで、3 種のライブラリーを用いてモデル標的である TNF- α を標的分子とした親和性選択を行ったが、バックグラウンドが高く、高い親和性を有する分子は確認されなかった。

Table 1. Library design

	Loop A	Loop B
SD1 (wild type)	VNSNGLTRVAFRKAEE	AYSSWRV
Library 1	XXXXXXXXRVAFRKAEE	AYSSWRV
Library 2	XXXXXXXXRVAFRKAEE	XXXXXXX
Library 3	VNSNGLXXXXXXXXXX	XXXXXXX

(3) 変異ライブラリーの設計

TNF- に結合するペプチドを SD1 のループ構造に移植する手法を用いた標的結合分子の開発も試みた。TNF- に結合するペプチドとして HIHDDLRYYGW の配列 [2] を使用し、inverse PCR により SD1 のループ構造に 3 種の導入位置で結合ペプチドの配列を導入し、3 種の変異体 (T1, T2, T3) を調製した。野生型の SD1 をコントロールとし、TNF- に対する結合能を ELISA 法により評価したが、2-A の結果と同様にバックグラウンドの高さから結合能は確認されなかった (Fig. 3)。

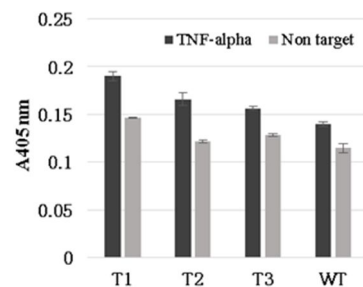
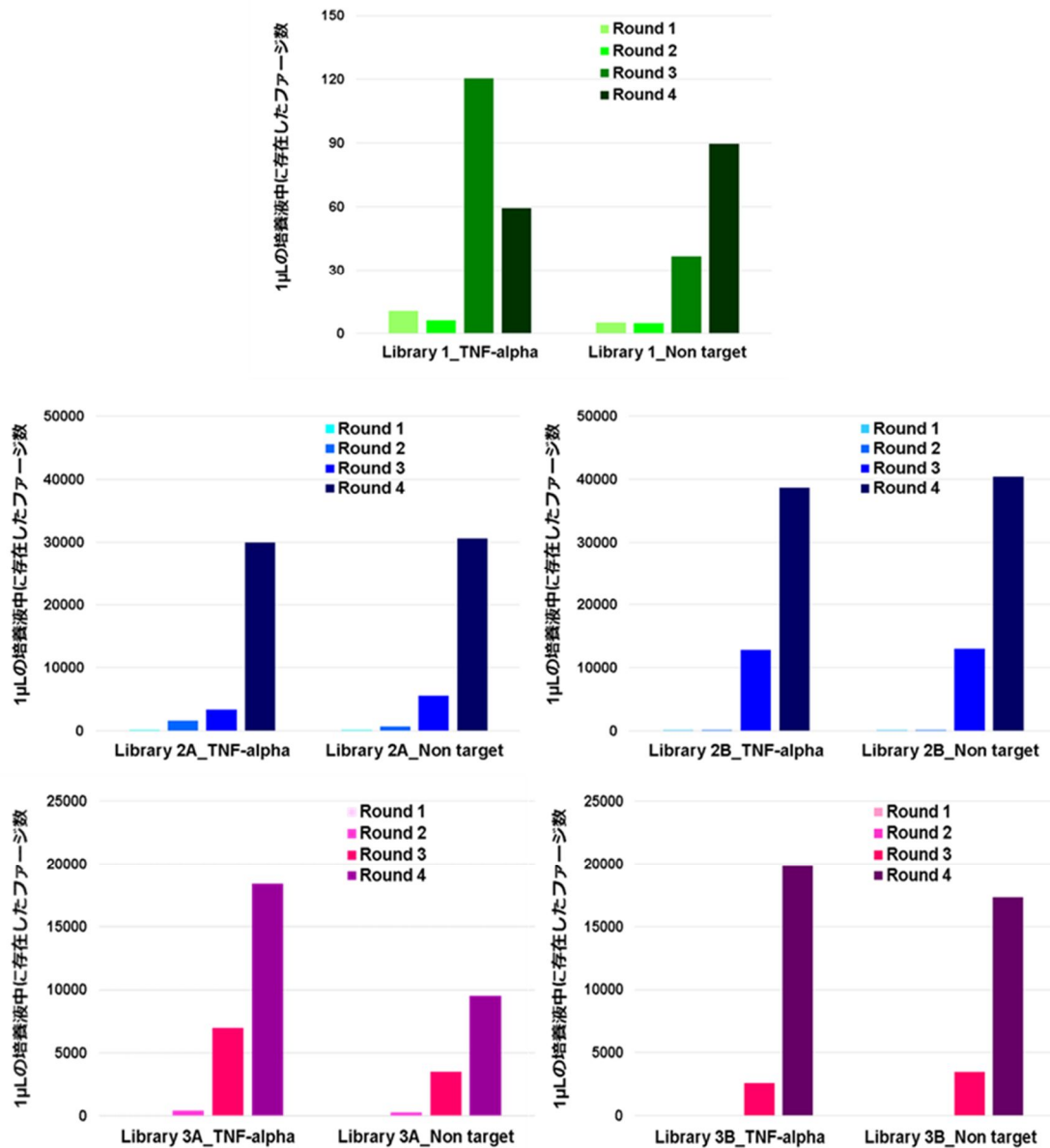


Figure 3. Binding of SD1 variants

上記のバックグラウンドの高さは、SD1 の非特異的吸着に起因すると考えられる。これは、一部のSD1 がファージ表面において適切な構造を形成していないためだと考えられる。この課題点を解決する手法として、SD1 にタンパク質工学的な改変を加えてSD1 のファージ表面での構造形成能を高める方法が考えられる。以上より、SD1 を Scaffold タンパク質とした新規標的結合分子の開発への足掛かりとするための課題点が明確になったといえる。

(4) 特異的結合タンパク質のスクリーニングと結合特性の評価

3. で設計したライブラリー5種類 (Library1, Library2A, Library2B, Library3A, Library3B) を用いて、ターゲット蛋白質の存在、非存在下でスクリーニング試験を行った(Figure4)。



(5) Figure 4 各ライブラリーのラウンド毎の溶出ファージ数の変化

SD1 がブロッキング溶液中の BSA に対して結合能を有している可能性を示唆し、同時に溶出するファージ数がラウンドを重ねるごとに増加していることから BSA に対して高い親和性を有する SD1 変異体を提示したファージが濃縮されている可能性を示した。その結果、TNF- に対して高い親和性を示す SD1 変異体を提示したファージが濃縮されていないと考えられた。各ライブラリーから溶出したファージ数の推移を見てみると、溶出するファージ数の増加は確認されなかった。すなわち、今回構築したライブラリーの中に TNF- に対して高い親和性を有する SD1 変異体が存在していなかった可能性が考えられ、同時に SD1 が Scaffold タンパク質として適切でない可能性が示唆された。

(ア) しかしながら、BSA に対する結合能が確認されたことから SD1 が本来 BSA に対する結合能を有している可能性とライブラリーから BSA に対して高い親和性を有する変異体が濃縮された可能性の 2 つの可能性が考えられる。

(6) 第三世代抗体としての評価

SD1 の BSA などへの非特異的な結合の原因は、SD1 が大腸菌菌体内で発現した際の folding の遅さにより、疎水性部位が露出したことによると考えられた。そこで SD1 の可溶性を最適化するために必要な構造因子を folding シミュレーションソフトウェア (Foldx, Tango) を使って予測した。SD1 上の表面残基とコア残基への変異の影響を解析するために、foldx 上で $\Delta\Delta G$ 計算を適用した。SD1 上の凝集しやすい領域 (APR) の解析には Tango を用い、ゲートキーパー残基の導入に伴う安定性の変化を foldx で求めた。同定された変異体は SDS-PAGE によって確認された。SD1 変異体のスクリーニングでは、2 つの変異体 (S17G および S17G, I89V) が同定された。しかし、さらなるスクリーニングと選抜が必要である。SD1 表面残基の変異 (Y15K, W18R, S106R) により、可溶性発現が改善された。最も安定化する変異 (S26I, ΔG -3.33192 kcal/mol) は、SD1 コア残基の疎水性アミノ酸への *in silico* 極性変化であるが、溶解性には貢献しなかった。SD1 の APR の変異 (S26K, Q91P) は、その可溶性発現を改善した。これらの結果は、SD1 の新規結合アプリケーションのためのエンジニアリングを継続する上で有望な結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Uehara R., Dan N., Amesaka H., Yoshizawa T., Koga Y., Kanaya S., Takano K., Matsumura H., Tanaka SI.	4. 巻 594
2. 論文標題 Insertion loop mediated folding propagation governs efficient maturation of hyperthermophilic Tk subtilisin at high temperatures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS letters	6. 最初と最後の頁 452-461
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hokao R., Matsumura H., Katsumi R., Angkawidjaja C., Takano K., Kanaya S., Koga Y.	4. 巻 129
2. 論文標題 Affinity shift of ATP upon glycerol binding to a glycerol kinase from the hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis KOD1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biosci. Bioeng.	6. 最初と最後の頁 657-663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2019.12.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koga Y., Konishi K., Kobayashi A., Kanaya S., Takano K.	4. 巻 127
2. 論文標題 Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase complex from hyperthermophilic archaeon Thermococcus kodakarensis KOD1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 679-685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2018.11.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 巽 祐介, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史
2. 発表標題 Protein trans-splicingを利用した耐熱性プロテアーゼ再構成の検討
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田大暉, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史
2. 発表標題 有機溶媒中におけるTk-subtilisinの酵素活性の解析
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長尾征秀, 前川大樹, 山野-足立 範子, 古賀 雄一, 大政 健史
2. 発表標題 超好熱古細菌(始原菌)由来プロテアーゼ(Tk-SP)のProペプチドが成熟化に与える影響
3. 学会等名 第71回日本生物工学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古賀雄一
2. 発表標題 Novel application of proteins from hyperthermophiles
3. 学会等名 Thai society of biotechnology 2019(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------