

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21676

研究課題名(和文)立体構造情報に基づいた、結合置換法による次世代抗体医薬品の創薬デザイン開発

研究課題名(英文) The development of new antibody drug discovery design by means of the bond replacement system based on the structure information

研究代表者

鵜澤 成一 (Uzawa, Narikazu)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30345285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がんの治療に用いる分子標的薬の一つであるCetuximabをモデルに新規の抗体医薬品の作製を試みた。タンパク質の立体構造情報に基づいて、抗体のリコンビナントタンパク質の発現を大腸菌で行う際に問題となりうる、ジスルフィド結合をIso-peptide結合に置換する事を行った。Iso-peptide結合の形成に必要な条件は結合形成残基同士の主鎖骨格間の距離は7.7オングストローム前後であり、触媒残基には酸性アミノ酸、加えて疎水アミノ酸側鎖による環境構築と判明した。得られた情報を基に変異体の発現を行った所、発現はしたものの、不溶各分に多く生成物が見られた為、今後、精製の向上を計画している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、構造学的な分子内のIso-peptide結合形成における必要な条件を明らかにする事で、抗体医薬品内で、精製難易度を上げているジスルフィド結合を、より単純な発現でも作製可能なIso-peptide結合に置換する部位の候補の提示が可能になり、従来の作製法よりも安価にかつ大量に薬剤を精製する可能性を検討する事で、口腔がん治療において、より安価に薬物療法を受けることができる可能性を示した。さらに、現在、行っているリコンビナントタンパク質の精製品質の向上を行う事で、将来的な臨床応用の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we attempted to generate the new antibody drug modeled on Cetuximab which was used for treatment of oral cancer. Concretely, based on the structural information of protein, the iso-peptide bond was replaced the disulfide bond which was an obstacle to expression the recombinant of antibody with Escherichia coli. The structure information was suggested that to form the iso-peptide bond was of importance as the following three point; the distance of main chain was about 7.7 A catalytic residue was acidic amino acids and environmental construction was Hydrophobic amino acids like Phenylalanine. The recombinant protein designed to the feature of iso-peptide was possible to expression in Escherichia coli, the other side, most of them was insoluble minutes. From now on, we will attempt to sophisticate the quality of the recombinant.

研究分野：結晶構造解析

キーワード：結合置換法 立体構造 情報 創薬 抗体医薬品 分子 分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

我が国において、悪性新生物(がん)は年間約100万人が罹患し、さらに死因の25%以上占めている。その中において、口腔がんは死亡率が40%前後と、今なお高い状態となっている。現在の口腔がん領域の治療には、主に外科療法・薬物療法・放射線療法の3種類の治療法があり、特に薬物療法は切除不能がんや再発症例において重要な役割を占めている。実臨床の現場で、薬物療法はDNA複製阻害を行う白金製剤・細胞分裂を阻害する微小管伸長阻害薬・細胞表面の特定の分子をターゲットとした分子標的薬・がん細胞によって引き起こされる免疫細胞へのブレーキを解除する免疫チェックポイント阻害剤などが主に用いられている。

中でも、分子標的薬とは抗体医薬品の一種であり、口腔がん領域においては、上皮細胞増殖因子受容体に対する分子標的薬(以下、cetuximab)が用いられているが、前述の通り、特定の標識の分子を有している細胞をピンポイントで攻撃することができるため、正常細胞への副作用は認められるものの、がん細胞に対しても高い治療効果が期待できる。一方で、抗体医薬品とは疾患関連分子特異的に結合する抗体を作製し、医薬品として用いたものである。その歴史は1975年にKöhlerとMilsteinによりマウスのモノクローナル抗体作製技術が確立したことが始まりである。しかし当初は、マウス由来の抗体に対して免疫応答が起こるといった問題点を抱えていたため、キメラ型抗体・ヒト化抗体といった技術開発により免疫原性を回避する事が可能となり、今日では多くの抗体医薬品が市場に出回っている。しかし、動物細胞を用いて抗体を作製する事で特殊な培養環境が必要となり、精製難度も高いため高コスト化は避けられず、医療費の高騰による患者の経済的な負担は避けられないものとなっている。

## 2. 研究の目的

本研究において、抗体医薬品の高コスト化の一因となっている、動物細胞を用いない新規の抗体医薬品の開発を目的としている。具体的には、抗体医薬品の内部に形成され構造安定化に働くシステイン残基同士によるジスルフィド結合を取り除き、システイン残基をアスパラギンとリジン残基を導入し、Iso-peptide結合への置換を目指す。

Iso-peptide結合とはグラム陽性細菌の線毛構造内に架橋として存在しており、強固な結合であると予想出来、構造安定化に大きく寄与できる可能性が高い。この結合の置換により、システイン残基によるmisfoldingやそれにより凝集を減らす事が可能になり、動物細胞の代わりに、安価にかつ大量に発現や精製が可能となる大腸菌によるリコンビナントタンパク質の精製を目標としている。加えて、新型の抗体医薬品の設計を行う上で、構造データベースより三次元構造を取得し、三次元構造を基に、Iso-peptide結合が形成される環境の特徴を抽出すると共に、ジスルフィド結合の形成可能部位の最適化を行う事で、より経済的な薬剤設計を可能としている。

## 3. 研究の方法

本研究は、大腸菌を用いた新たな抗体作製法の確立を目指しているため、すでに臨床で用いられている抗体医薬品の一つであるcetuximabをターゲットとし以下のように行う。cetuximabの特定の分子を認識する部位であるFab(antigen binding)領域はタンパク質構造データバンク(protein data bank)に11種類の構造データが収録されている。この中から、cQYN meditope - Cetuximab Fab(PDB ID:1YY8/4GW5など)の名前で登録されている構造データを取得し、分子グラフィックツールのPyMOL(Schrödinger, Inc.)を用いて、Cetuximabの三次元構造を表示させる。次に、Cetuximab内のシート間の主鎖の距離を測定しIso-peptide置換を行える部位を本来ジスルフィド結合が生じている場所を含めて数か所選択する。

続いて、分子内Iso-peptide結合を形成するために必要な環境情報を抽出するために、グラム陽性細菌の線毛タンパク質の情報をcetuximabと同様にタンパク質構造データバンク(protein data bank)より選択する。この際に用いる構造情報としては化膿レンサ球菌の線毛タンパク質(PDB ID:3B2M・6BBW・6N0A)及び、*Clostridium perfringens*の線毛タンパク質(5XCC・6IXY)を用いた。これらの構造より、Iso-peptide結合を形成するために必要な距離および、周囲環境情報を基に、Cetuximabの三次元構造より、形成可能部位の最適化を行う。

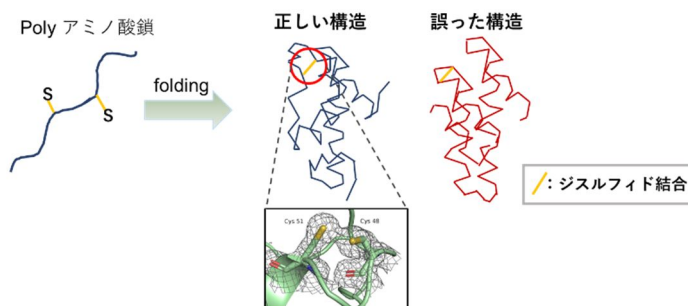
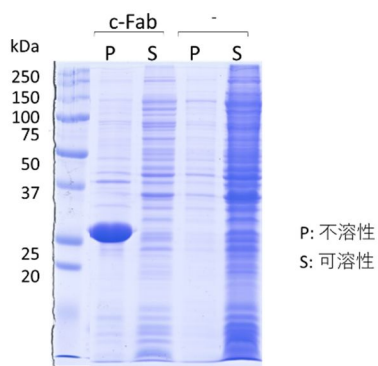
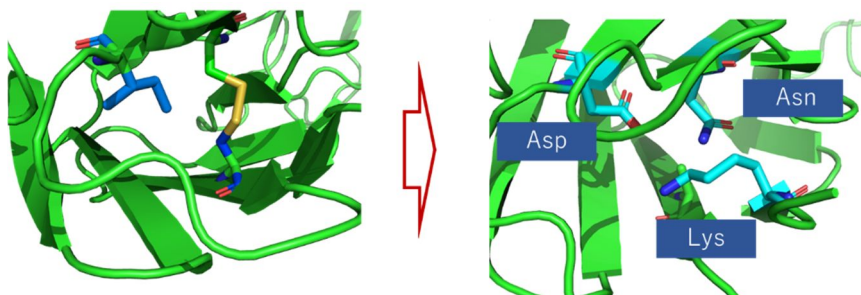
続いて、この方法で変異部分を決めたりコンビナントを大腸菌にて作成する。リコンビナントには精製のためにHis-tag修飾を行う。作成方法はまず、プラスミドの合成を行い、作成されたpET-15にプラスミドを接続し、大腸菌に形質転換を行う。大腸菌でのリコンビナント発現時には、大腸菌の発現には制限酵素を5'側をNdeI、3'側をBamHIとし、プラスミドをpET-15bとして発現を行った。続いて形質転換を行った大腸菌を培養し、超音波破碎を行った後に、Ni-NTAアガロースを用いてアフィニティクロマトグラフィーにて精製を行う。得られたリコンビナントをSDS-PAGE法にて精製度の確認を行った。

## 4. 研究成果

Iso-peptide結合を形成している線毛タンパク質(PDB ID:3B2M・6BBW・6N0A)及び、*Clostridium perfringens*の線毛タンパク質(5XCC・6IXY)より三次元的な情報を抽出すると、主鎖骨格間の平均は7.71オングストローム(7.3~8.5オングストローム)であり、加えて、Iso-peptide結合を形成に必要な触媒残基はアスパラギン酸とグルタミン酸といった二種類の酸性アミノ酸であり、それらは結合を形成するリジン残基の側鎖アミン及び、アスパラギン残基

の側鎖のアミドと水素結合距離に位置している事がわかった。また、結合形成の周囲には疎水アミノ酸残基の配位が多くみられ、構造内部に向いているフェニルアラニンが触媒残基であるアスパラギン酸とグルタミン酸と必ず、CH-結合を形成している事がわかった。加えて結合中心に付近に配位している疎水残基に着目するとほとんど全て構造内部に向かっており、疎水性側鎖で活性中心を籠の様に囲むことで反応を安定させている可能性が示唆された。

Cetuximab の構造内部で以上の特徴をもちえる部位の抽出を行うと、Cetuximab の 1 つ目の sheet 及び、3 つ目の sheet 間において、変異を行える場所があった。そこで、複数の発現パターンを検討しプラスミドである pET-15 にプライマーを接続し発現系の確立を行った。さらに、発現の確認を SDS-PAGE にて行った。不溶各分に出るリコンビナントタンパク質も多く、現在は、より収率を挙げられる発現系を実験中である



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 武部 克希、桑田（楠瀬） 隆夫、鈴木 守、高宮 知子、鶴澤 成一、飯島 洋
2. 発表標題 COMT（カテコールO-メチル基転移酵素）-新規阻害剤の複合体の構造解析：Opicaponeは基質（SAM）、生成物（SAH）とも安定な複合体を形成する
3. 学会等名 第142回日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林 弘子、寒川 剛、武部 克希、元吉 尚美、板垣 正、鶴澤 成一、鈴木 守
2. 発表標題 ヤマブシタケ由来RNase He1 のグアノシン複合体のX線結晶構造解析
3. 学会等名 第142回日本薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯島 洋、武部 克希、桑田（楠瀬） 隆生、鈴木 守、高宮 知子、鶴澤 成一
2. 発表標題 賦活化化合物によるCOMTの生成物阻害の解除機構：結晶構造解析による検討
3. 学会等名 第142回日本薬学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	鈴木 守  (Suzuki Mamoru)  (40280507)	大阪大学・蛋白質研究所・准教授    (14401)	

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
---------	---------