

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570176

研究課題名（和文）induced folding機構の獲得を抗体の親和性成熟に学ぶ

研究課題名（英文）Learning molecular design for acquired induced folding from the affinity maturation of antibodies.

研究代表者

古川 功治（FURUKAWA KOJI）

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：00297631

研究成果の概要（和文）：

本研究で最も時間を費やしたのは1024個の変異体ファージの作製であった。平成22年度終わりには変異体作製はほぼ終了していたが、東日本大震災による影響でかなりのクローンを喪失した。現在そのリカバリーに努めているが、幸い、同時に進めていた重要クローンの発現、物理化学的解析、本研究に必要な技術革新と応用利用について一定の成果を出すことができた。抗体に関するこれらの技術は有用性が高く、応用範囲も広い。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the first priority was construction of 1024 mutant phages. At the end of the 2010 fiscal year, we had almost completed the construction. Unfortunately, however, we were seriously damaged by the East Japan Great Earthquake. We lost a large number of the phage clones and expression vectors for the mutants. We are now making every effort to recover the lost clones and constructs. On the other hand, we had finished physicochemical analyses on the several important mutants. In addition, we had made great advances in technology necessary for the progress of this study (e.g.: improvement phage display, protein expression, and repertoire analysis). These have significant usefulness and are widely applicable.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：フォールディング、抗体

1. 研究開始当初の背景

抗体の親和性成熟について

- 抗体産生細胞であるB細胞の一部は免疫応答時に脾臓やリンパ節等に存在する胚中心と呼ばれる器官に移動し、可変領域特異的に変異が導入される（体

細胞突然変異）。

- 変異導入により抗原親和性が上昇したもの(数十～千倍程度)のみメモリーB細胞として生き残る（親和性成熟）。
- このB細胞多様化機構は変異と選択を伴う生体内の分子進化と見なすことが

できる。

これまでの研究

- 我々は C57BL/6 マウスの抗 NP ハプテン (4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl) 免疫応答で起こる抗体の親和性成熟に複数の成熟(進化)経路が存在し、それぞれは *evolvability* という観点から大きな違いがあることを見出した。
- high evolvability** 経路の一つである 9TX 経路は成熟後半でエントロピー駆動型の興味深い親和性成熟を行う。この経路の後半部分に属するクローンはモノクローナル抗体として取得済みであり各種物理化学的解析が可能であった。
- 一方、経路前半部分および起源(親)となるクローンを人工的に作製し、熱力学的解析に供した。
- これらを総合すると、9TX の親和性成熟経路の前半部分の変異導入の効果が相加的であり、成熟はエンタルピー駆動型であった。またそれぞれの変異箇所は立体構造上離れていた。これに対して経路後半では前半の変異近傍のアミノ酸が置換されており、また変異の効果は相乗的であった。既述のように後半の親和性成熟はエントロピー駆動型であり、また抗原結合の *on rate*, *off rate* とも遅くなっていた。
- 9TX 経路の最終点である 9T13 はこれまで大腸菌内で発現させることができなかったが、ベクターや培養条件を精査することで効率よく発現させることが可能になった (3-5 mg/L)。しかし同様の条件で親クローン 9TG や成熟後半のクローン 9T15 は 13-15 mg/L 発現し、9T13 のフォールディング能が低いことが示唆された。
- そこで 9T13, 9T15, 9TG についてグアニジン変性実験を行ったところ、成熟が進むとともに安定性が低下することがわかった。また 9T13 についてののみ抗原の添加で安定性が大幅に上昇することが明らかになった。
- 9T13, 9T15, 9TG についてグアニジン変性に伴う抗原親和性の変化を測定し、結合に伴う ΔG をグアニジン濃度に対してプロットした。一方、図 1 のような関係が成り立つ (抗原添加による構造安定化と抗原結合がエネルギー的にリンクしている) と仮定して Schellman の式から導いた $[\Delta G \text{ vs } \text{グアニジン濃度}]$ 理論曲線も求めた。その結果、理論曲線と一致したのは 9T13 のみであった。つまり 9T13 は親和性成

熟の過程で *induced folding* を獲得し、抗原結合により得た構造安定化エネルギーを親和性上昇に活かしたと言える。

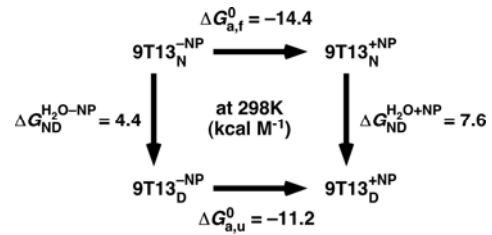


図 1. 9T13 の熱力学サイクル。

着想に至った経緯

我々の研究対象の特異な点は、生体内で実際に起こった蛋白機能の改変であることと、改変の出発点と最終点が得られていることである。9TG から 9T13 へは H鎖 L鎖含めて合計 18 個のアミノ酸置換が導入されているが、これまでの研究から成熟前半部分と後半部分で導入されたアミノ酸置換を区別することが可能である。*induced folding* は 9T15 では見られないことから、成熟の最終段階で獲得されたものと考えられる。従って、対象とすべきアミノ酸置換は H鎖 L鎖含めて 10 個であり、それら変異導入の順番を考慮しても実験的に成熟の過程をたどることができると考えた。生体内の分子進化に立脚しているため得られる知見は十分に信頼でき、蛋白工学的意義も高いことから、我々独自のプロジェクトとして推進すべきと考えた。

2. 研究の目的

既述のように、我々は親和性成熟の過程で *induced folding* 機構を新たに獲得する成熟経路を見出した。この経路では抗原結合に伴う *induced folding* により得られた構造安定化エネルギーを抗原結合に活かし、高親和性を獲得していると考えられた。本研究では生体内で行われたこのような親和性成熟について経路に沿って分子基盤を精査していく。そして最終的には *induced folding* を可能にする蛋白工学・進化工学デザインの基盤を構築したい。なお、本研究を進めるにあたり重要な技術的側面は、我々が独自に開発してきたファージディスプレイ法や抗体フラグメントの大腸菌での大量発現法、レパートリー評価法で、それぞれについてさらなる技術革新が必要になる。これらの技術は実用性が高く、かつ、応用範囲が広いと、本研究の成果としても重要であると考えている。

3. 研究の方法

本提案では親クローンに対して導入された10のアミノ酸置換(図2)のinduced folding および抗原親和性に対する寄与を精査する。成熟を経路として捉えるため、また9TCから9T13への成熟過程で導入される変異の効果が相乗的であると考えられたため、変異の順番も考慮に入れる。まずは必要な変異体(9T13の変異を元に戻したものの)の作製を終了させ、鍵となる変異・変異の順番を明らかにする。また同時並行で、重要な変異体について抗原抗体反応や構造安定性を精査するとともに結晶化を試みる。構造解析が完了したのものについては、それを元にマルチカノニカル分子動力学計算により理論的に取りうる構造についての知見も取得していく。抗体はFabとして発現させたものを用いる。

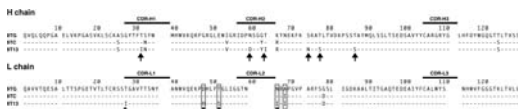


図2. 9T13に導入された変異。9TCは成熟経路前半で導入された変異を持つ成熟の中間体。H-L鎖界面に位置するアミノ酸置換を四角で囲った。矢印は今回標的とするアミノ酸置換。

変異体作製

- Fabの発現は phagemid vector を用いた方法(研究業績 1、H鎖はファージ gIII 蛋白とのキメラで発現し、ヘルパーファージ存在下でファージ表面提示され、非存在下で培養液中に蓄積される)による。
- 9T13のH鎖の変異6個(図2、矢印)を2つ(T31I, N59D, T63IとS74N, T77S, T86S)に分け、それぞれの変異を9TGタイプに戻した変異体の組み合わせをすべて作製する。前半・後半部分それぞれ8通りの変異体遺伝子をすべての組み合わせで連結させる(PCRを用いる)ことにより合計64通りのH鎖変異体を作製する。前半・後半それぞれ8つずつの変異体の確認はDNA配列解析で、最終的な64通りの確認は次項の変異体の選択で用いるPCRによる。
- L鎖については4つの変異箇所すべての組み合わせ(16通り)で9TGタイプに戻した変異体を作製する。確認はDNA配列解析で行う。
- 用いる phagemid vector はH鎖、L鎖の可変領域遺伝子をそれぞれ制限酵素サイトを用いて導入可能なことから、

64種類のH鎖変異体発現系 vector 混合物にL鎖変異体遺伝子断片混合物を導入し、 $64 \times 16 = 1024$ 通りの変異体を含むライブラリー構築が可能である。

変異体の選択

- 上記変異体ライブラリーをファージ上に提示する。ファージライブラリーをビオチン化抗原+アビジンビーズを用いたバイオパニングに供する。このシステムはプレート法と異なり、溶液論に準じた正確な親和性の区別が可能である。抗原濃度を1から100 nMまで10段階程度に区切り、それぞれの抗原濃度範囲で得られる Fab-phage を回収し、大腸菌に感染、コロニーを形成させる。コロニーPCRにより含まれる変異体の内訳を調べる。
- PCRによる変異体の検出は以下の方法で行う。9T13の10個の変異を特異的に認識する10個の sense 側オリゴプライマーとH鎖・L鎖V遺伝子それぞれの3'領域の anti-sense オリゴプライマー合計12個の混合物で phagemid を鋳型としたPCRを行う。3'側プライマーの位置を調節することで、例えば9T13が鋳型となった場合のPCR産物は電気泳動上10本のバンドとして検出することができる。他の変異体の場合にはこれより少ない数のバンドが観察されるので、消えたバンドの位置から9T13→9TGタイプへ変異が戻った箇所が同定できる。
- バイオパニングにより回収した各集団内で見られる9T13タイプの変異の存在比率と変異の co-variance を統計的に精査する。例えば親和性の低い集団で観られる変異は早く導入された変異、また co-variant な関係にある変異は相乗的に作用する組み合わせと判断できる。これらの知見を組み合わせると9TCから9T13への成熟で必須の変異と必須の順番を明らかにする。以上から、以後各種解析が必要なクローンも絞り込むことができると考えている。

物理化学パラメータの取得

- ストップコドンを導入することにより測定に用いるクローンのH鎖からファージ gIII 部分を除き、Fabとして大量に蛋白を調製する。
- 等温滴定型熱量計を用いて抗原結合に伴う熱力学パラメータを求める。
- CD変化を指標にグアニジン変性に対する安定性を精査する(熱変性で既存抗体は沈殿する)。
- CD変化を指標に変性過程の抗原親和性を測定し、induced foldingの有無を

検証する。

構造情報の取得

- ・ポイントとなる抗体について抗原存在下・非存在下での結晶化を試み、成功したものについてX線結晶解析に供する。抗NP抗体(ただし9TX経路とは異なるもの)の高次構造は過去に水谷らによって決定されており、結晶化条件等参考にする。また同型置換も可能と考える。
- ・得られた高次構造を元にマルチカノニカル分子動力学計算を行い、理論的に取りうる構造のアンサンブルを得、抗体構造の動的特性と熱力学パラメータの相関を精査して行く。

4. 研究成果

平成21年度から22年度にかけて時間を費やしたのは1024個の変異体ファージの作製であった。22年度終わりには変異体作製はほぼ終了していたが、東日本大震災による影響でかなりのクローンを喪失した。本件に関する回復状況は別途纏めることとする。

(1) 重要抗体の発現と物理化学測定

- ・今回の一連の変異体にとって重要なH鎖のアミノ酸残基33W, 64R, 107G, 112Hについて、生体内で変異導入されたものをgermline型L鎖と組み合わせて大腸菌で大量発現させた。配列を系統樹表示したものは図3のとおりである。

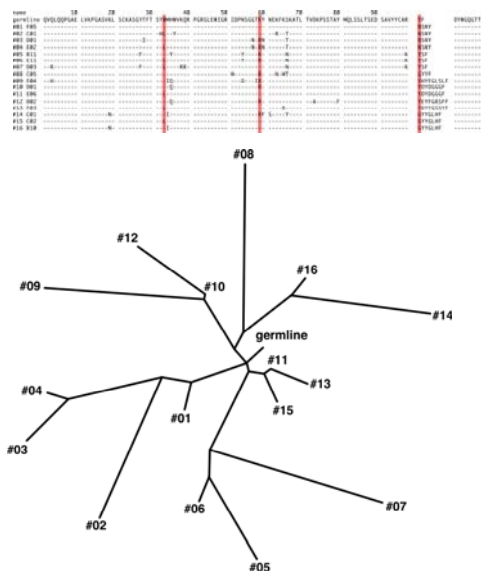


図3. 発現させたクローンの配列と系統関係。赤の箇所がIMGT numberingで33番、64番、107番となる。

- ・発現量が多く、滴定型等温熱量測定に供することができたクローンの親和性は以下のとおりであり。

clone-16: 1.9×10^6
clone-15: 7.1×10^5
clone-14: 3.8×10^6
clone-13: 6.8×10^6
clone-10: 6.2×10^5
clone-09: 2.6×10^6
clone-06: 2.5×10^6

- ・ clone-15は112の位置にHisを持つと同時に33番がLeuとなっている。このクローンの親和性は低く、112Hが33W->Lの変異に不利に働くというこれまで我々が提唱してきた説と矛盾しない。
- ・ 一方、9TXの配列の特徴をもっとも良く残しているclone-14およびclone-16はL鎖がgermline型であっても抗原親和性が大きく低下することはなかった。このことは高親和性化へのL鎖の寄与の大きさを示唆するものである。

(2) 派生技術の応用利用

- ・ これまでのファージディスプレイ法ではすべてのFabが等しく提示されることはなかった。Fabの大腸菌でのフォールディング効率が大きく影響し、Fab-phageレパートリーに大きな偏りができていた。この状態のライブラリーに対してバイオパニングを行っても「数の差」の影響が大きく、抗原親和性に準じた選択が行えなかった。しかし我々が最適化した培養方法を用いると、Fabのフォールディング効率に依存せずレパートリーに偏りのないライブラリーを作製することができた。このようなライブラリーに対してビーズを用いたバイオパニングを行うと、抗原親和性に準じた、しかも解像度の高いクローン選択を行えることを確認した。本方法は論文として発表した。
- ・ 本研究を進めるにあたり、我々の持つ抗体発現系をさらに改良した。ベクターのコピー数とH鎖定常領域の安定性を考慮することで、培養1Lあたり25mgの抗体フラグメントが採れるようになった(これまでは最高で15mg)。本方法は知財化を検討している。
- ・ 我々独自の配列解析技術をCD40L組換えマウスのレパートリー解析に応用した。また、抗体作製技術、および、物理化学解析技術を抗ヒト血清アルブミン抗体の解析に応用した。結晶化も進めている。

(3) 震災の影響について

- ・ 震災時のフリーザー停止による温度上

昇により影響を受けたものは以下のとおり。

消失したもの：

全てのファージライブラリー
精製済み抗体

部分的に消失、変質等があり、リカ
バリー中のもの：

ファージ用プラスミドベクター
抗体発現ベクター

- ・現時点でプラスミドのれかばり率は60%程度である。今後ベクターを再構築していくとともに、物理化学測定やX線結晶構造解析など、全てのクローンが揃う必要のないものにも積極的に注力していく。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①Keigo Saito, Kuniko Hamano, Masatoshi Nakagawa, Keiko Yugawa, Jin Muraoka, Hiroyoshi Kuba, Koji Furukawa, Takachika Azuma. Conformational analysis of human serum albumin and its non-enzymatic glycation products using monoclonal antibodies. *J. Biochem.* 査読有, 149, 569-580, 2011.

doi:10.1093/jb/mvr007.

②Yusuke Kishi, Yuichi Aiba, Tetsuya Higuchi, Koji Furukawa, Takeshi Tokuhisa, Toshitada Takemori, Takeshi Tsubata. Augmented antibody response with premature germinal center regression in CD40L-transgenic mice. *J. Immunol.* 査読有, 185, 211-219, 2010.

doi:10.4049/jimmunol.0901694.

③ Hiroyoshi Kuba, Koji Furukawa. An optimized procedure for efficient phage display of antibody fragments with a low folding efficiency. *Protein Expr. Purif.* 査読有, 65, 148-153, 2009.

doi:10.1016/j.pep.2009.01.016.

[学会発表] (計2件)

①Memory B cells generate the VH gene repertoire in the secondary response, distinct from that found in the primary antibody response. Tomohiro Kaji, Koji Furukawa, Michiko Shimoda, Toshitada Takemori. 14th International Congress of

Immunology (神戸、2010年8月)

②血清アルブミンの高次構造変化を識別する抗体の分子プローブとしての熱力学的評価. 齊藤桂吾、濱野邦子、久芳弘義、古川功治、東隆親. 第9回日本蛋白質科学会年会(熊本 2009年5月)

6. 研究組織

(1)研究代表者

古川 功治 (FURUKAWA KOJI)

独立行政法人産業技術総合研究所・

バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：00297631