

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：37401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15249

研究課題名（和文）ハブ咬傷治療薬開発を目指した筋壊死因子標的型高親和性Fabの創製

研究課題名（英文）Generation of a high-affinity anti-myonecrosis factor Fab for the development of a therapeutic agent for *Protobothrops flavoviridis* bite.

研究代表者

中村 仁美（Nakamura, Hitomi）

崇城大学・薬学部・講師

研究者番号：60510691

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：毒蛇ハブ咬傷被害における筋壊死症状は後遺症の原因になることから、抗血清よりも筋壊死抑制効果が高い治療薬が求められている。そのニーズに応えるべく、本研究課題は、ハブ毒筋壊死因子BP11に結合する抗体フラグメントFabに着目し、筋壊死誘導メカニズム解明のためのツールとしての有用性を高めることを目的とした。安定性および結合親和性を改善する変異部位の検討を重ねた結果、H鎖可変部に導入したI11L変異は結合親和性を、T84L変異は安定性を高めることが明らかとなり、改良型抗BP11 Fabの作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BP11の筋壊死誘導メカニズムが明らかになっていないことが、筋壊死抑制効果の高い治療薬開発の妨げとなってきた。本研究課題で改良型抗BP11 Fabを作製したことで、これとBP11の複合体の構造解析を行い、BP11の筋壊死誘導に関する詳細な構造情報を得ることが可能となった。この情報は、BP11の筋壊死誘導メカニズムの解明につながるると同時に、構造情報を基にした創薬にも応用可能である。これらが、ハブ咬傷被害の後遺症によるQOL低下の防止につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Myonecrosis induced by BP11, the myotoxin of *Protobothrops flavoviridis* venom, causes severe local tissue damage. Therefore, there is a need for a therapeutic agent that is more effective than antivenom in inhibiting myonecrosis. However, the details of the mechanism by which BP11 induces myonecrosis remain unclear, which is one of the factors hindering the development of myonecrosis inhibitors. The purpose of this study was to improve the structural stability and binding affinity of anti-BP11 Fab to generate a useful tool for elucidating the mechanism of BP11-induced myonecrosis. We found that the I11L and T84L mutations introduced into the heavy chain variable region of anti-BP11 Fab improved the binding affinity and the structural stability, respectively. We produced the improved anti-BP11 Fab by introducing these two mutations.

研究分野：蛋白質工学

キーワード：Fab 安定性 結合親和性 フレームワーク領域 ハブ咬傷

1. 研究開始当初の背景

ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) は、日本の南西諸島に棲息する日本固有の毒蛇である。ハブの毒液は多種多様な生理活性成分を含むため、ハブに咬まれた場合は、激痛や出血、浮腫などの様々な症状が現れる。現在は、抗血清を用いて迅速に治療できるようになったため、ハブ咬傷で死亡する例は稀になっている。しかし、抗血清はハブ咬傷の症状のうち、筋壊死に対する治療効果が低く、それが運動機能障害などの後遺症につながるケースもあることから、筋壊死抑制効果の高い治療薬が求められてきた。ハブ毒に含まれる BPII という蛋白質 (塩基性 PLA₂ アイソザイム) が筋壊死症状の責任因子であることは知られているが (Kihara *et al.* Biochem. Int. 1992)、その詳細なメカニズムは未だ明らかになっていない。メカニズムの解明が進まない原因として、BPII の分子内には 7 組の SS 結合が存在するため大腸菌や酵母での産生が難しいことに加え、BPII には細胞死誘導活性があるため、産生に用いる宿主細胞にダメージを与えてしまうことが挙げられる。すなわち、様々な BPII 変異体を作製して、BPII 側から筋壊死誘導メカニズムに迫るのが難しいことを意味する。そこで、我々は BPII 側ではなく、筋壊死抑制効果を示す抗体側からアプローチしようと考えた。これまでに、ハイブリドーマ法を用いて抗 BPII マウスモノクローナル抗体を作製し、その中から筋壊死抑制効果を示す目的の抗体を得ることに成功した。これを BPII の筋壊死抑制効果を明らかにするためのツールとして利用するにあたり、全長抗体のままではなく、Fab 化した方が共結晶構造解析にも利用しやすい等のメリットがあることから、抗 BPII マウスモノクローナル抗体 Fab (以下、抗 BPII Fab) の調製を進めた。当研究室では、抗体医薬品アダリムマブの Fab (Nakamura *et al.* BBRC 2018) をはじめ、セルトリスマブ、トラスツズマブといった抗体医薬品由来の Fab を、ピキア酵母を用いて 1 L 培養あたり 10 mg 以上の高収量で調製してきた (中村ら 日本薬学会第 142 年会)。このノウハウを用いて抗 BPII Fab を調製したところ、収量は約 40 µg/L という想定外の少なさだった。一般に、蛋白質の安定性と収量には相関が見られることから、抗 BPII Fab は安定性が低いことが予想された。また、結合親和性を表す K_D 値は 1.62×10⁻⁸ M を示し、アダリムマブ Fab などで見られる nM オーダーの K_D 値と比べて、一桁程度劣ることがわかった。

2. 研究の目的

抗 BPII Fab について、BPII の筋壊死誘導メカニズムを解明するためのツールとしての有用性を高めるべく、アミノ酸変異により安定性や結合親和性を高めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 抗 BPII Fab の調製

① ピキア酵母 (*Pichia pastoris*) 発現系

抗 BPII マウスモノクローナル抗体の H 鎖 (V_H+C_H1) 遺伝子と L 鎖 (V_L+C_L) 遺伝子を、それぞれ酵母発現用ベクター pPICZαA (Invitrogen) に挿入後、これらを連結した共発現ベクターを作製した。直鎖化した共発現ベクターを、エレクトロポレーションでメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* (以下、ピキア酵母) に導入し、抗 BPII Fab 発現酵母株を作製した。スクリーニングを経て決定した Fab 高発現株を振とう培養し (BMGY 培地で 3 日間、その後、24 時間おきにメタノールを添加しながら BMMY 培地で 4 日間、いずれも 30°C)、培養上清を回収した。回収した上清を用いて、60%飽和硫酸沈殿を行った。

② CHO 細胞発現系

抗 BPII マウスモノクローナル抗体の V_H+C_H1 遺伝子と V_L+C_L 遺伝子を、それぞれ CHO 細胞発現用ベクター pcDNATM 3.4-TOPO ベクター (Invitrogen) に挿入した。ExpiCHOTM Expression System (Gibco) のマニュアルに従って ExpiCHO-S 細胞のトランスフェクションを行い、37°C、8% CO₂ 環境下で 10 日間振とう培養を行ったのち、培養上清を回収した。

なお、①、②ともに、ヒスチジンタグを H 鎖 C 末端に付加するため、これをコードする塩基配列 (CAC×6) を H 鎖遺伝子の 3' 側に追加した。

③ 精製

Ni Sepharose 6 Fast Flow (Cytiva) カラムにサンプルを流し、500 mM イミダゾール溶出画分を回収した。続いて、この画分を L 鎖にアフィニティを示す Protein L (ProteNova) に通したのち、ここで得られた溶出画分を、陰イオン交換カラム Resource Q (Cytiva) に通し、塩濃度勾配をかけて溶出させたピークを回収した。CHO 細胞で発現させた抗 BPII Fab はこれを最終精製品とした。一方、H 鎖に I11L/T84L 変異を含む変異体をピキア酵母で発現させた場合、糖鎖修飾体も大量に発現したため、Resource Q 精製の後にゲルろ過クロマトグラフィー (Superdex 75, GE Healthcare) を追加し、糖鎖修飾体を除去したものを最終精製品とした。精製度はいずれも SDS-PAGE で確認した。

(2) 相互作用解析

BPII と抗 BPII Fab の結合親和性は、BLItz system (Sartorius) を用いて、バイオレイヤー干渉法で評価した。BPII をリガンド、抗 BPII Fab をアナライトとし、EZ-Link NHS-PEG₄-Biotin (Thermo ScientificTM) を用いて BPII のビオチン化を行った。測定用緩衝液は 50 mM KH₂PO₄ (pH7.4) / 0.05% Tween20 / 0.1% BSA / 200 mM NaCl、Fab 濃度は 100、50、25、12.5、6.25 nM の 5 点とした。

(3) 熱安定性測定

Nano DSC (TA-instrument) を用いて、1°C/min の昇温速度で 25-90°C の範囲でスキャンを行った。測

定用緩衝液は 50 mM KH₂PO₄ (pH6.5) とし、Fab 溶液は 0.2 mg/ml に調製した。得られたスキャンデータを Nanoanalyze software (TA-instrument) で解析し、変性中点温度 (T_m) を算出した。

4. 研究成果

(1) 酸性アミノ酸の導入が結合親和性に与える影響

抗 BPII Fab の結合親和性を改善するための変異体をデザインするにあたり、酸性蛋白質を抗原とする Fab の L 鎖フレームワーク領域に塩基性アミノ酸を導入した Fukunaga らの報告を参考にした (BBR 2018)。すなわち、BPII は等電点 10.3 の塩基性蛋白質であることから、抗 BPII Fab に酸性アミノ酸を導入すれば結合親和性が改善するのではないかと予想した。しかし、Fukunaga らのこの報告によると、荷電アミノ酸の導入により Fab が不安定化していた。このことから、酸性アミノ酸の導入により抗 BPII Fab が不安定化し、さらなる収量低下を招くことが懸念された。本研究課題を遂行するにあたり、抗 BPII Fab の収量確保は重要な課題であるため、まず、ピキア酵母での生産性を高めるために、抗 BPII Fab への安定化変異の導入を行った。2019~2021 年度に実施した科研費若手研究「Fab エンジニアリングによる ADAs 産生抑制に関する研究基盤の確立 (課題番号 19K16434)」において、抗 BPII Fab の可変部とヒト抗体由来の定常部を連結したキメラ Fab を作製した。abYsis (<http://www.abysis.org/abysis/>) を用いて、このキメラ Fab の可変部のアミノ酸出現頻度を調べたところ、出現頻度 1%未満の unusual residue に該当する部位が 2 ヶ所見つかった (H 鎖 Ile11, H 鎖 Thr84)。これらを、その部位で最も出現頻度が高いアミノ酸に置換した I11L/T84L 変異体は安定化したことから、抗 BPII Fab にも I11L/T84L 変異を導入したところ、収量は野生型の約 1.9 倍にあたる 75 µg/L となった。収量を確保する上でこの変異は不可欠であると考え、I11L/T84L 変異体に対して、酸性アミノ酸を導入することとした。Fukunaga らが報告している変異部位を参考に、抗 BPII Fab L 鎖の Ser67, Ser69, Ser71 の 3 ヶ所全てをアスパラギン酸に変異させた 3D 変異体とグルタミン酸に変異させた 3E 変異体を作製した。3D 変異体は、結合速度定数 (k_{on}) と解離速度定数 (k_{off}) のどちらにも悪影響を及ぼした結果、K_D 値が一桁大きくなり、結合親和性を下げてしまった (表 1)。これは、導入したアスパラギン酸が抗 BPII Fab の劣化を引き起こしたためではないかと考えている。また、3E 変異体も結合親和性の改善が見られなかったため、グルタミン酸の数を増やした 5E 変異体の調製も試みたが、ピキア酵母ではほとんど発現しなかった。抗 BPII Fab の H 鎖に I11L/T84L 変異を入れてもピキア酵母では発現させられない変異体が出てきたため、抗体産生に汎用されている CHO 細胞発現系を新たに立ち上げた。その結果、抗 BPII Fab 野生型の収量は約 6 mg/L となり、ピキア酵母生産系の約 150 倍となった。ピキア酵母ではほとんど発現しなかった 5E 変異体も CHO 細胞では発現したが、Resource Q カラムでの精製時に想定外の複数のピークが出現した。それぞれのピークを用いて SDS-PAGE を行うと、いずれも抗 BPII Fab の分子量に相当する位置に単一のバンドが現れた。しかし、ResourceQ カラムでピークが割れていることから、グルタミン酸導入の影響で不均一な分子が産生されている可能性が考えられた。ここまで、酸性アミノ酸の導入により静電相互作用を強めることで結合親和性の改善を図ろうとしてきたが、酸性アミノ酸の導入によるデメリットが多いうえに、結合親和性が上がるような結果も得られず、この手法での目的達成は難しいと考えた。

表 1 荷電アミノ酸導入変異体の相互作用解析の結果 (ピキア酵母)

	K _D [M]	k _{on} [1/Ms]	k _{off} [1/s]
野生型	1.62 × 10 ⁻⁸	1.56 × 10 ⁵	2.53 × 10 ⁻³
I11L/T84L 変異体	1.29 × 10 ⁻⁸	1.49 × 10 ⁵	1.92 × 10 ⁻³
3D 変異体	3.14 × 10 ⁻⁷	2.03 × 10 ⁴	6.38 × 10 ⁻³
3E 変異体	1.92 × 10 ⁻⁸	1.67 × 10 ⁵	3.21 × 10 ⁻³

(2) I11L, T84L 変異が結合親和性と安定性に与える影響

安定化を狙って導入した I11L/T84L 変異によって K_D 値が下がっていることに着目し (表 1)、新たに立ち上げた CHO 細胞発現系を利用して I11L, T84L, I11L/T84L の 3 変異体を調製し、結合親和性と安定性に関するデータを取得した。3 変異体の相互作用解析の結果を表 2 に示す。ここで、表 1 と表 2 の野生型と I11L/T84L 変異体の K_D 値を比較すると、どちらも表 2 に示した値の方が小さく、CHO 細胞で調製した Fab の方が結合親和性が高い傾向が見られた。宿主細胞が違っても産生される蛋白質の構造は変わらないので、この結果は、精製~相互作用解析に至るまでの手順の違いによるものと考えている。ピキア酵母で I11L/T84L 変異体を発現させた場合、糖鎖修飾体も発現するため、これを除去するためにゲルろ過に通す必要があり、その際にサンプルの濃縮を行った。また、ゲルろ過を通す必要がない野生型も、精製度を確保するための SDS-PAGE や定量のために濃縮を行った。一方、CHO 細胞の場合は、I11L/T84L 変異体で糖鎖修飾は起こらず、ゲルろ過に通す必要がなかった。さらに、収量が多いことから SDS-PAGE や定量のために濃縮を行う必要もなかった。すなわち、ピキア酵母を用いて調製した抗 BPII Fab は、相互作用解析の前に濃縮を複数回行ったことが構造に影響し、結合親和性が下が

表 2 I11L, T84L, I11L/T84L 変異体の相互作用解析の結果 (CHO 細胞)

	K _D [M]	k _{on} [1/Ms]	k _{off} [1/s]
野生型	1.04 × 10 ⁻⁸	2.09 × 10 ⁵	2.18 × 10 ⁻³
I11L 変異体	7.62 × 10 ⁻⁹	2.14 × 10 ⁵	1.63 × 10 ⁻³
T84L 変異体	1.03 × 10 ⁻⁸	2.26 × 10 ⁵	2.31 × 10 ⁻³
I11L/T84L 変異体	8.32 × 10 ⁻⁹	2.21 × 10 ⁵	1.84 × 10 ⁻³

った可能性がある。したがって、ここからは濃縮の影響を受けていない表 2 の結果をもとに考察していく。まず、T84L 変異体の K_D 値は野生型とほぼ同じだったのに対し、I11L 変異体と I11L/T84L 変異体はともに野生型よりも K_D 値が低下していた(表 2)。I11L 変異を含む 2 つの変異体で K_D 値の低下が認められたことから、I11L 変異が抗 BPII Fab の結合親和性の改善に有効であることがわかり、この変異だけでも nM オーダーの結合親和性を獲得することができた。次に、抗 BPII Fab の熱安定性測定を行い、安定性の指標となる T_m 値を算出した。その結果、抗 BPII Fab 野生型の T_m 値は 68.2°C だった。また、I11L/T84L 変異体の T_m 値は 75.3°C を示し、野生型より 7.1°C も上昇していたことから、この 2 ヶ所の変異によって狙い通りに抗 BPII Fab は安定化していた。アダリムマブ Fab 野生型の T_m 値が 74.9°C なので(Nakamura *et al.* BBRC 2018)、これと同等の安定性を獲得することに成功した。さらに、T84L 変異体の T_m 値が 74.7°C だったことから、安定化には T84L 変異の寄与が大きいと考えられる。I11L 変異と T84L 変異は、アミノ酸の出現頻度を指標として絞り込んだ変異部位であり、当初はどちらも安定化に寄与すると予想していた。T84L 変異は確かに抗 BPII Fab の安定化に大きく寄与した一方で、I11L 変異は、安定化よりも結合親和性の改善に効果を示すという予想外の結果が得られた。大部分の抗体の H 鎖 11 番目のアミノ酸が Leu であることを踏まえると、この部位の Leu が、抗原との結合を下支えする重要なアミノ酸残基のひとつであることが示唆された。

研究開始当初は、静電相互作用を利用した抗 BPII Fab の結合親和性の改善を目指していた。その手法での目的達成は難しかったものの、安定化のために作製した I11L/T84L 変異体が、結果的に結合親和性と安定性を高める有用な変異体であることが明らかとなった。これにより、BPII の筋壊死誘導メカニズム解明のためのツールとして、抗 BPII Fab の有用性を高めるという本研究課題の目的は達成されたと考えている。今後は、この改良型抗 BPII Fab を用いて BPII との共結晶構造解析等を行い、BPII の筋壊死誘導領域に関する詳細な情報を取得し、筋壊死誘導メカニズムの解明や筋壊死抑制効果を示す低分子医薬のデザインに繋げていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshikawa Moeka, Senda Miki, Nakamura Hitomi, Oda-Ueda Naoko, Ueda Tadashi, Senda Toshiya, Ohkuri Takatoshi	4. 巻 700
2. 論文標題 Stabilization of adalimumab Fab through the introduction of disulfide bonds between the variable and constant domains	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149592 ~ 149592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.149592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Oyama Kosuke, Nakakido Makoto, Ohkuri Takatoshi, Nakamura Hitomi, Tsumoto Kouhei, Ueda Tadashi	4. 巻 32
2. 論文標題 Enhancing thermal stability in the CH2 domain to suppress aggregation through the introduction of simultaneous disulfide bonds in <i>Pichia pastoris</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pro.4831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshikawa Moeka, Nakamura Hitomi, Oda-Ueda Naoko, Ohkuri Takatoshi	4. 巻 174
2. 論文標題 Analysis of thermostability for seven Phe to Ala and six Pro to Gly mutants in the Fab constant region of adalimumab	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 345 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvad047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yoshikawa Moeka, Nakamura Hitomi, Oda-Ueda Naoko, Ueda Tadashi, Ohkuri Takatoshi	4. 巻 172
2. 論文標題 Effect of an intermolecular disulfide bond introduced into the first loop of CH1 domain of Adalimumab Fab on thermal stability and antigen-binding activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 49 ~ 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac040	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村仁美、吉川萌香、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 ヒト型抗体Fab安定化のための新規分子間SS結合導入部位の探索
3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川萌香、中村仁美、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 抗体医薬品アダリムマブFabにおけるVH-CH1及びVL-CLドメイン間へのSS結合の導入による安定化
3. 学会等名 第40回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川萌香、中村仁美、上田直子、植田正、大栗誉敏
2. 発表標題 抗体医薬アダリムマブFabの変可-定常ドメイン間へのSS結合導入による熱安定性の上昇
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村仁美、坂元里帆、古川怜奈、吉川萌香、上田直子、大栗誉敏
2. 発表標題 セルトリズマブFab可変領域へのアミノ酸変異導入による安定化
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉川萌香、中村仁美、上田直子、植田正、大栗誉敬
2. 発表標題 抗体医薬アダリムマブFabの定常領域における7種のPhe Ala変異体及びPhe-Pro配列上の6種のPro Gly変異体の熱安定性解析
3. 学会等名 第22回日本蛋白質科学科年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究業績データベース http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp?resId=S000164 生化学研究室ホームページ http://www.ph.sojo-u.ac.jp/~nakamura/homepage/index.html
--

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