

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：44525

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26400438

研究課題名(和文) プロテインAとその誘導体の溶液内構造と抗体との結合様式の解明

研究課題名(英文) Structural Study of protein A and its derivatives in solution

研究代表者

木原 裕 (Kihara, Hiroshi)

姫路日ノ本短期大学・その他部局等・特任教授

研究者番号：20049076

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：プロテインAの溶液内の構造を、主にX線溶液散乱法とMD計算の知識を統合して求めた。試料としては、野生型だけでなく、一部をより安定化するように改変したC5d、さらにやや慣性半径の小さくなるC5n1の3種を用い、酸性、中性におけるそれぞれの構造を調べた。

結果は、MDで計算した結果と非常によく一致した。このことは、通常の球状たんぱく質とは異なり、5つあるドメインがそれぞれあまりストレスをかけないで、弱い結合で構造を保っていることを示唆している。次にプロテインAと免疫グロブリンIgGのFc端との相互作用を測定し、SVD法により複合体のみの散乱曲線を求めた。この構造の決定は今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Protein A is often used for preparation of immunoglobulins. However, its conformation in solution has not known. We have used X-ray solution scattering method for obtaining the conformation of protein A and its derivatives.

Results are also compared with the structure predicted by molecular dynamics, which gives the very good coincidence. This result suggests the protein A takes the relaxed conformation without the stress.

We have also done X-ray solution scattering study on the complex of protein A and Fc fragment of Immunoglobulin, and successfully obtained the scattering profile of the complex. Further analysis should be done.

研究分野：X線溶液散乱

キーワード：x線溶液散乱 プロテインA 蛋白質の溶液内構造 免疫グロブリン

1. 研究開始当初の背景

Protein A は、黄色ブドウ球菌に見出される分子量 56 kDa の細胞表面蛋白質である。Protein A は、5 つの 3 本鎖ヘリックスからなる相同ドメイン（下図の E, D, A, B, C）からなり、それぞれが、多くの免疫グロブリン(IgG)の Fc 領域と結合すること、またヒトの VH3 ファミリーの Fab 領域と結合することが知られており、免疫グロブリンの精製用のカラムに広く応用されている。一つのドメインと免疫グロブリンが結合した形については、すでに結晶構造も発表されている。一方、免疫グロブリンは、1 個のドメインが単独に存在する場合に比べて、5 個のドメインがつながった場合の方が強く結合することが分かっているが、その構造的理由は分かっていなかった。

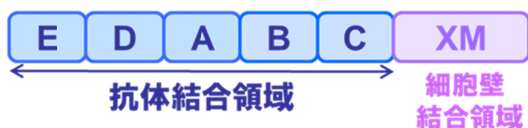


図 1 . プロテイン A の抗体結合領域模式図

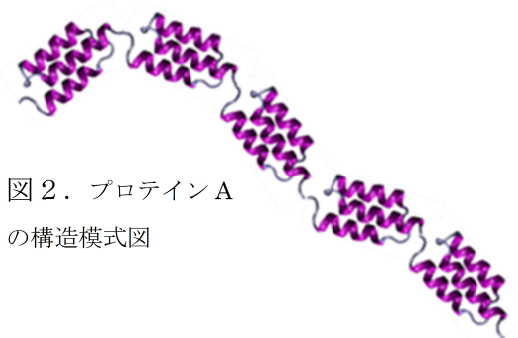


図 2 . プロテイン A の構造模式図

2. 研究の目的

(1) 我々は、したがって、まず Protein A が、単独で存在する場合にどのような構造をしているかを X 線溶液散乱法で明らかにすることを目的として本研究を始め

た。これが本研究の第一の目的である。さらにその知見の上で、Protein A と免疫グロブリンとがどのような結合様式を取るのか、明らかにしたいと考えている。これが第 2 の研究目的である。

(2) Protein A の溶液内構造 1 . 中性と酸性の構造

Protein A は酸性環境下にあるときには、結合していた免疫グロブリンを解離する。このことは、Protein A が pH に依存した構造変化を起こしていることを示している。しかし、それぞれの環境でのヘリックスの量は、pH に依存せず、不変であることが知られている。すなわち、2 次構造の変化を伴うような構造変化ではなく、pH により、高次構造が変化していることが示唆される。

一方、カネカでは、Protein A の種々の環境での耐性を調べ、上記 5 つのドメインのうち、C ドメインが最もアルカリ性耐性を持つことを見出し、C ドメインを変異させた C' ドメインを 5 つつないだ Protein A 変異体(C5d)と、C5d を更に改変した C5n1 を作り出した。我々は Protein A 及び C5d, C5n1 について、酸性、中性のそれぞれの環境下での溶液内構造を明らかにすることを目的として X 線溶液散乱の実験を行った。

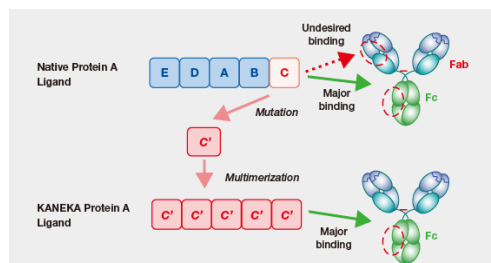


図 3 . 変異体模式図

3. 研究の方法

プロテイン A の試料の調整は、カネカ研究部の吉田博士の協力を得た。

X 線溶液散乱の実験は、二つの放射光施設（高エネルギー加速器研究機構放射光研究施設（PF）とあいちシンクロトロン研究センターの公開ビームラインを用いて行った。

4. 研究成果

(1) PF での実験 I. Protein A (wild) と C5d 変異体の酸性および中性の構造

測定試料は、次の 4 種であった。

Wild N : Protein A Wild Type pH7.4

Wild A : Protein A Wild Type pH3.5

C5d N : C5 domain pH7.4

C5d A : C5 domain pH3.5

*135mM NaCl 添加

(1-1) I_0/c 解析

mg/ml	Wild N	C5d N	Wild A	C5d A
3	0.367	0.412	0.292	0.381
4	0.304	0.337	0.322	0.353
5	0.310	0.351	0.291	0.311
Ave	0.327	0.367	0.301	0.348

表 1. I_0/c

結果は 4 条件とも I_0/C に大きな変化は認められない。このことは分子量に変化がない、すなわち会合がない系であったことが分かる。

(1-2) 慣性半径解析

結果は図 4 に示す通りで、4 条件とも誤差の範囲で、慣性半径に有意な変化があるとは言えず、大きな構造の変化はないと考えられる。

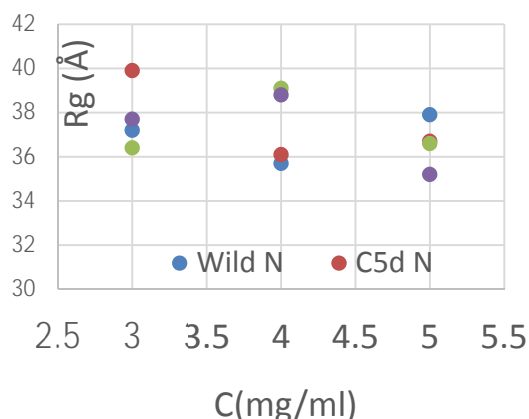


図 4. 慣性半径

(2). SAXS-MD による構造解析

X 線溶液散乱の結果から、蛋白質の構造を直接求めることはできないが、モデル構造を考えて、それを基にして散乱曲線を計算して、実験結果と比較してみることはできる。そのようにして求めた多くの結果から、ある X 線溶液散乱曲線を与える構造はほとんどユニークであることが分かっている。我々は、分子動力学計算により、C5d のモデル構造を次のように計算した。。

1) Protein A の C サブユニットの立体構造を基にして、これを 5 つ繋いだ。

2) その構造を基に分子動力学計算により、5 つのサブユニットの立体構造の予測を行った (C5d_md とする)。

このように計算した C5d_md と実験値との散乱曲線等を比較してみた(図 5)。結果として、C5d_md と C5d とは、2 次構造の値は一致している。また図 5 に示すように、実験データ(orange)とモデルから計算した散乱曲線は、良く一致している。

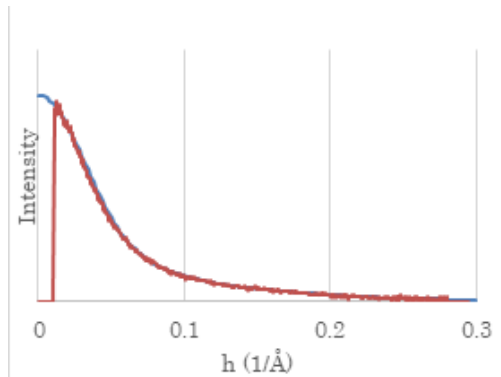


図 5 . 実験値(赤)とモデル計算 (青) の散乱曲線の比較

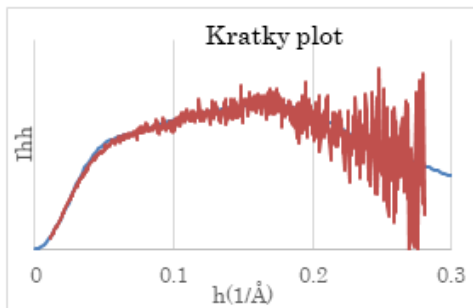


図 6 . 実験値(赤)とモデル計算 (青) の Kratky plot の比較



(3) C5d と Fc fragment 複合系の構造
この実験は、主にあいちシンクロトロン研究センターで行った。条件は pH7.4 の場合のみ行った。

	M w (kDa)	Rg (Å)	C (mg/ml)	I ₀ /(C · M w)
C5d	33.4	37.7 ± 0.4	5.50	1.46x10 ⁻²
Fc	51.8	29.7 ± 0.8	2.53	1.28x10 ⁻²
Fc/C5d=0.05/1 (モル比)	43.9	± 0.5	5.42	1.70x10 ⁻²
Fc/C5d=0.15/1 (モル比)	43.4	± 0.2	6.06	2.60x10 ⁻²
Fc/C5d=0.25/1 (モル比)	50.9	± 0.2	6.66	3.59x10 ⁻²

混合溶液の Guinier 解析では、小角で綺麗な直線が得られ、C5d、Fc 単成分の時に比べ、大きな慣性半径の値が得られた。複合体形成の影響とみられる。ただし、直線にはなったが複数の成分が混在しているはずである。

混合溶液での I₀/(C · M w)の値は単成分の場合より大きくなり、このことも分子量の大きな複合体の存在を示唆している。

モル比 1:0.25 の場合は 1:0.05、1:0.15 に比べ更に大きな慣性半径が得られた。ゲル濾過実験の結果を照らし合わせると、分子比で 1:2 など更に大きな複合体を形成している影響と思われる

(4) 複合体に関する検討

C5d、Fc のモル比が 1:0.05 のサンプル
図 7 . C5d_md、Fc は全て 1:1 複合体になっている構造が得られた。

混合系の散乱曲線から C5d の散乱曲線を濃度を考慮して引くことにより 1:1 複合体の散乱曲線を推定してみる。結果は

$$R_g \sim 61 \text{ \AA}$$

$$I_0/(C M_w) \sim 1.48 \text{ E-}02$$

が得られた。

(5) おわりに

今回の研究で次のようなことが解明された。

1) protein A の溶液内構造を MD で予測した結果が、X 線溶液散乱の実験結果

と合致するところまで，得られた。

2) protein A と IgG の Fc fragment との複合体の散乱曲線から，複合体だけの部分の散乱曲線を求めることができた。

5. 主な発表論文等

(1) 論文は，まだ発表しているものはない。

(2) 学会発表等

1. 市村 薫，新庄正路，木原 裕 (2014) Protein A の溶液内構造，2014 年 3 月，PF 研究会
2. 新庄正路，市村 薫，山本章嗣，木原 裕 (2015) Protein A 及びその誘導体の X 線溶液散乱法による構造解析，第 53 回日本生物物理学会，2015 年 9 月 13 日-15 日，金沢大学角間キャンパス
3. 木原 裕，市村薫，山本章嗣，新庄正路，杉本泰伸 (2015) Protein A とその誘導体の溶液内構造，第 4 回名古屋大学シンクロトン光研究センターシンポジウム，2015 年 1 月 22 日，名古屋大学
4. 市村 薫，新庄正路，木原 裕 (2015) Protein A とその誘導体の溶液内構造，ワークショップ「標的タンパク質の構造と機能予測による創薬の開発」，2015 年 6 月 23 日，東京薬科大学.
5. 木原 裕 (2015) 蛋白質のフォールディングとミスフォールディング. 疾患との関係，医療講演会，2015.2.20，姫路（ハーベスト医療福祉専門学校）
6. 市村 薫，新庄正路，木原 裕 (2016) Protein A とその誘導体の溶液内構造，シンポジウム「蛋白質の構造と病態」，2016 年 2 月 13 日，グランドパレス徳島.

7. Protein A と IgG fragment の結合様式 (25 分)

8. 木原 裕，新庄 正路 (2017) Protein A と IgG fragment の結合様式，心不全重症化研究班会議，3 月 16 日，伊藤学術研究センター（東京大学）

9. Masaji Shinjo, Kaoru Ichimura, Masaki Kojima and Hiroshi Kihara (2017) Structure of Protein A and its derivative in solution studied by small-angle x-ray scattering, Singapore Joint Symposium on Bioimaging between Singapore and Japan (5th International Symposium for Bioimaging), May 20-21, National University of Singapore.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 裕 (KIHARA HIROSHI)
姫路日ノ本短期大学特任教授
研究者番号：20049076