

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440076

研究課題名(和文) 配列多様性を持つ蛋白質のデザインルールの解明

研究課題名(英文) Analysis on the design principle of proteins with intrinsic sequence variations

研究代表者

浜田 大三 (Daizo, Hamada)

神戸大学・工学研究科・特命准教授

研究者番号：60372132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、潜在的に配列多様性を持つ抗体軽鎖可変ドメイン(VLドメイン)の立体構造構築原理を解明することを目指した。我々グループが開発した単量体型のVLドメインを用いて、種々の速度論・平衡論・構造論的な解析を行い、VLドメインに共通するコア領域を同定した。さらに、一部のVLドメインにおいて、高温で二量体構造が安定化するという一般的な概念に反する現象を発見し、その熱力学的機構を明らかにした。これらの結果は、抗体を含めた様々な有用蛋白質の構造安定性の向上や、抗体軽鎖のアミロイド線維化により起きるALアミロイドーシスの予防・診断・治療に資する有益な情報であり、今後その活用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Here, we analysed the folding mechanism of immunoglobulin light chain variable domain (VL) which intrinsically have sequence variation, although folded into the same structure. We performed various thermodynamic, kinetic and structural analyses on the monomeric VL that we invented ourselves in another study and clarified the core region for folding of VL. We also found the unexpected heat- induce dimerization for original VL, which instinctively against general idea that dimeric proteins have to dissociate into monomers by heating. We clarified the mechanism of this heat- induce dimerization by a series of thermodynamic analysis. These pieces of information about the folding of VL will be applicable to improve the thermal stability of proteins used in various fields and also provided a significant insight into the development of strategy for prevention, diagnostics and treatment against AL amyloidosis which the amyloid formation by immunoglobulin light chain is associated with.

研究分野：生物物理学

キーワード：抗体 ALアミロイドーシス フォールディング 複合体形成

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 一般的に蛋白質はそのアミノ酸配列に特有の立体構造を形成することで機能を獲得する。このような立体構造の形成における基本的情報は、個々の蛋白質のアミノ酸配列に収納されており、生体内などの適当な環境下において、個々の蛋白質は、自発的に立体構造を形成する。蛋白質が、立体構造を獲得する反応をフォールディングと呼ぶ。しかし、その基本原理は、完全には解明されておらず、アミノ酸配列から、個々の蛋白質の立体構造を予測することは、未だに困難である。数々の生物のゲノム情報が蓄積する中で、アミノ酸配列から、蛋白質の立体構造を予測する技術を確立することが、重要な研究課題であると世界中で認識されていた。

(2) 昨今、多くの特異的抗体が、医薬品や分子生物学的・細胞生物学的研究で用いられている。これらを正しく利用するためには、構造的に異常のない状態で、大量に生産しなければならないが、一部の抗体には、その立体構造が不安定なため、大量生産が困難かつ、長期保存なども難しいものがあり、その改善方法を知ることが必要とされている。

(3) 「なぜ抗体が、多様なアミノ酸配列を有するにも関わらず、全て同様な立体構造を形成することができるのか」という根本的な問題に対する基礎研究が、ほとんど存在しないことが、上記の問題を論理的に解決することが難しい理由の一つと考えられた。

(4) 単離された抗体ドメインのうち、抗体軽鎖可変ドメイン ( $V_L$  ドメイン) は、二量体化する性質を持っており、このことが抗体のフォールディング原理の解明を行う上で、さらなる困難さ・複雑さを招いていると考えられた。

(5) 研究代表者らは、 $\gamma$  型免疫グロブリン軽鎖の一つである REI の  $V_L$  ドメインの単量体化デザインに成功していた。この系を持っていることは、 $V_L$  のフォールディング機構の原理を明らかにするうえで、大きなアドバンテージになると期待された。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、潜在的に配列多様性を持つ  $V_L$  ドメインの立体構造構築に必須の配列要素を明らかにし、そのフォールディング反応における役割を解明することである。ここで、特に注目する点は、以下の4点である。

(1) 単量体型 REI の  $V_L$  ドメインのフォールディング機構の解明

単量体型 REI の  $V_L$  ドメインをプロトタイプモデルとして、速度論をベースにした遷移状態解析、変異体や核磁気共鳴法を用いた中間状態解析などの手法により解明し、そのそ

のフォールディング機構を明らかにする。

(2) 他の単量体型  $V_L$  のフォールディング機構の解明

REI の  $V_L$  ドメイン以外の  $V_L$  ドメインについて、(1) と同様な解析を行い、それらのフォールディング機構を解明する。

(3) 単量体型  $V_L$  ドメイン間のフォールディング機構の共通点・相違点の解明

上記(1)、(2)で得られた結果を元に、各単量体型  $V_L$  ドメインのフォールディング中間体、遷移状態の特徴における共通点・相違点を明らかにし、単量体型  $V_L$  ドメインのフォールディングの基本原則を解明する。

(4) 二量体化による安定性・フォールディング機構への影響

上記のフォールディング機構に付随して、本来の  $V_L$  ドメインで起きる二量体化の影響を解明し、本来の  $V_L$  ドメインのフォールディングの基本原則を解明する。

これらの研究により、 $V_L$  の立体構造構築原理の基礎を明らかにすることができるかと期待された。

## 3. 研究の方法

本研究では、上記の目的を達成するため、以下の4つの方法を用いた。

(1) ストップフロー法によるフォールディング機序の速度論的解析

蛍光・円二色性ストップフロー法により、反応機序の速度論的解析を進める。ここで、求める速度定数等を用いて、各反応におけるエネルギー的特徴を明らかにする。これ基礎データとして、(2)(3)の実験を進める。

(2) パルス重水素交換と核磁気共鳴 (NMR) を用いたフォールディング中間体の構造解析

各単量体型  $V_L$  のフォールディング中間体の構造的な特徴を明らかにする。

(3) 部位特異的変異体の速度論的解析による遷移状態の構造解析

部位特異的変異を利用した値解析を進めることで、遷移状態の構造的な特徴を明らかにする。

(4) 二量体形成に関する熱力学的・速度論的解析

超遠心分析、X線小角散乱などを用いて、 $V_L$  の二量体化に関わる熱力学的パラメータ、並びに、二量体形成機構の解析を進める。同時に、上記(1)のストップフロー法を用いて、単量体型  $V_L$  のフォールディング機構と、比較することで、二量体形成が加わった際の蛋白質のフォールディング機構への影響を明らかにする。

上記(1)~(4)を、様々な VL ドメインに対して実施し、それぞれの結果を比較することで、VL ドメインのフォールディングの基本原則が明らかにされると期待された。

#### 4. 研究成果

##### (1) 研究の主な成果

##### 単量体型 VL ドメインのフォールディング機構

単量体型 REI の VL ドメインにおけるフォールディング反応は、少なくとも5つの反応相を含む複雑な系であった。同時に、変性反応も2段階で進むものであった。特に遅い反応相については、フォールディング・変性反応ともに、その速度定数の変性剤濃度依存性から、プロリンの異性化が関与することが示唆された。二つのシス型プロリンが存在するという単量体型 REI の VL ドメインの X 線結晶構造解析の結果からも、この遅い相が、プロリンの異性化に起因するものと、考えられた。単量体型 REI の VL ドメインの様々な領域に、部位特異的変異を導入し、フォールディングの遷移状態の構造的特徴を明らかにすることのできる「値解析」を実施し、フォールディングのコアとなるアミノ酸の同定を試みた。その結果、いくつかの重要な残基の存在を確認した。同様な結論は、他の単量体型 VL ドメインにおいても得られた。さらに、パルス重水素交換による中間状態の解析からも、同様な共通する鍵となるアミノ酸の存在が示された。

これらのコアとなる領域は、一般的に免疫グロブリン構造の基盤を作るといわれている、比較的アミノ酸の保存性が高い、フレームワーク領域に点在していたが、反応速度を司るアミノ酸のいくつかは、配列保存性の低い相補性決定領域にも存在していることが明らかになった。これらの結果から、フレームワーク領域に点在する特定のアミノ酸は、構造形成に必要な不可欠な配列要素であるが、蛋白質の中間状態や遷移状態の安定性に大きな影響を与える相補性決定領域のアミノ酸が、実際には存在し、そのアミノ酸の熱力学的・構造学的特性が VL に異なる熱力学的特性を与える要因となっていることが示された。同相補性決定領域は、免疫グロブリンの機能特性にも影響する領域であり、その一部が熱力学的特性にも深くかかわることは、蛋白質の進化やデザインを考える上で、非常に興味深いと考えられる。

##### 高温条件における二量体構造の安定化現象の発見

二量体化のもたらす影響を解明するための、基礎情報として REI VL のホモ二量体の解離定数の温度依存性を確認したところ、温度を上昇させるほど、解離定数が小さくなるという意外な発見がなされた。すなわち、高温条件に REI VL を置くと、ホモ二量体化が

促進され、天然状態の熱安定性が増すことが示された。この結果は、高温条件下では、無条件で二量体が解離するという、直観的な概念から、逸脱するものであった。

詳細な熱力学的解析、および、X 線結晶構造解析を行った結果、最終的に、この反応の熱力学的要因は、解離のエンタルピーが負であることに由来し、それを司るのは、たった一つのアミノ残基であることが確認された。すなわち、このアミノ酸を、物理化学的特性の異なるアミノ酸と入れ替えることで、通常、考えられている通り、高温で二量体の解離が促進されることが明らかになった。

この一見、異常な現象は、分子シャペロンなどのストレス条件下で、必要とされる多量体型蛋白質で、特に良く見られる現象であることが、文献検索によって、明らかになった。

通常、蛋白質の熱安定性を数上げるためには、様々な試行錯誤をもって変異実験を行わなければならないが、今回、REI VL 二量体で見出された機構を応用することで、数残基の変異をある程度、論理的に導入することで、同程度の熱安定性の向上を、比較的容易に行うことが可能であることが、示唆された。

##### (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

国内での学会や個人的な研究者間のディスカッションの中で、本研究で得られた「フォールディング機構」「高温での二量体化に関わる熱安定性の向上」に対する関心が、非常に高く、注目されていることが明らかになっている。このことは、国内には、抗体医薬品開発などの抗体の利用・応用に携わる研究者が多いことを反映していると考えられる。しかしながら、これらの興味は、研究者の好奇心に依存するものがほとんどで、共同研究や、研究費等の共同申請に至るものではない。

一方、国際学会等においては、抗体開発者からの問い合わせとともに、抗体軽鎖のアミロイド線維化により引き起こされる AL アミロイドーシスの予防・診断に対する興味の高まりとして、VL ドメインのフォールディング機構に関心を示す研究者が多く存在し、その中の数名の研究者から、本研究の成果を元にした共同研究の依頼・提案をいただいた。これらの依頼者の多くは、計算科学者であり、分子動力的シミュレーションによる変性・フォールディング機構の解明に興味を持つ者や、フォールディング中間体の描像を元にした、AL アミロイドーシスの予防・診断・治療に資する化合物・抗体のデザインを試行している者がいた。これらの研究者とは、現在、電子メールでのやり取りを行っており、将来的に国際共同研究への大きな流れを形成することができるかと期待している。

残念ながら、国内からの共同研究のオファーは、今のところ、全く来ていないが、基礎研究者だけでなく、抗体医薬関連の研究を進められている企業等との共同研究へと、将来

的に発展することを期待している。

### (3) 今後の展望

本研究で得られた主要な成果のほとんどについては、残念ながら、論文等の形で、未だに発表することができていないので、今後は、それを重点的に進める。

これとともに、鎖 V<sub>L</sub> や、抗体重鎖で、同様な解析を行うことで、最終的に抗体全構造の構築原理を解明するに至ることが期待される。

本研究の中で発見された様々な現象のうち、特に、熱力学的安定性の向上に資するものを、様々な蛋白質の分子デザインに応用することが、今後、可能であると期待される。特に、高温での多量体化の促進現象は、蛋白質の熱安定性を上げるために、活用することができる重要な発見である。

一方、AL アミロイドーシスの予防・診断・治療に関する研究については、計算科学者だけでなく、医学系の研究者を巻き込み、AL アミロイドーシス患者に資することのできる成果を挙げることができると期待される。

### 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)

Kimiko Kuroki, Kazuhiro Mio, Ami Takahashi, Haruki Matsubara, Yoshiyuki Kasai, Sachie Manaka, Masahide Kikkawa, Daizo Hamada, Chikara Sato, Katsumi Maenaka. Cutting Edge: Class II-like structural features and strong receptor binding of the nonclassical HLA-G2 isoform homodimer. *Journal of Immunology*, 査読有, Vol. 198, 2017, pp. 3399-3403. doi:10.4049/jimmunol.1601296

Chiaki Ota, Masamichi Ikeguchi, Akiyoshi Tanaka, Daizo Hamada, Residual Structure in the unfolded state of starch-binding domain of glucoamylase revealed by near-UV circular dichroism and protein engineering techniques. *Biochim Biophys Acta*, 査読有, Vol. 1864, 2016, pp. 1464-1472. doi:10.1016/j.bbapap.2016.05.002

Bochao Wang, Mitsuhiro Nishimura, Huamin Tang, Akiko Kawabata, Nora F. Mahmoud, Zahra Khanlari, Daizo Hamada, Hiroki Tsuruta, Yasuko Mori. Crystal structure of human herpesvirus 6B tegument protein U14. *PLoS Pathog.* 査読有, Vol 12, 2016, e1005594. doi:10.1371/journal.ppat.1005594.

#### [学会発表](計 7 件)

縄田 万里奈、堤 浩崇、小林 祐大、雲 財 悟、峯 昇平、中村 勉、上垣 浩一、上久保 裕生、片岡 幹夫、浜田 大三. Role of dimerization by immunoglobulin light chain variable domain for inhibition of amyloid formation. 第16回日本蛋白質科学会年会、2016.6.7-2016.6.9、福岡国際会議場

Daizo Hamada. Decreasing amyloidogenicity of immunoglobulin light chain variable domain by mutation of surface exposed residues and peptide inhibitor targeting partially unfolded state. 30th Anniversary Symposium The Protein Society, 2016.7.16-2016.7.19, Baltimore, USA.

Daizo Hamada. Controlling the native state stability by mutational modulation of surface properties of the immunoglobulin light chain variable domain. British Biophysical Society Biennial Meeting 2016, Liverpool, UK

浜田 大三. 免疫グロブリン関連アミロイドーシスの分子病態学 - 揺らぎの伝播と制御-, 第17回生命分子ダイナミクスセミナー、2015.2.4、東北大学

浜田 大三. 平衡条件下において形成される二つの天然変性蛋白質融合蛋白質のフォールディング中間状態、第52回日本生物物理学会年会、2014.9.25-2014.9.27、札幌コンベンションセンター

浜田 大三、小林 祐大、堤 浩崇、縄田 万里奈. 免疫グロブリン軽鎖可変ドメインのアミロイド形成における構造揺らぎの役割、第14回日本蛋白質科学会年会、2014.6.25-2014.6.27、ワークピア横浜/横浜産貿ホール

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

浜田 大三 (HAMADA, Daizo)  
神戸大学・大学院工学研究科・特命准教授  
研究者番号: 60372132