

令和元年6月20日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19562

研究課題名(和文)構造生物学的手法に基づく新規抗体作成法の創成

研究課題名(英文)A novel approach for antibody design utilizing structural biology

研究代表者

橋口 隆生 (Hashiguchi, Takao)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：50632098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では新規抗体作製法として、ウイルス学・構造生物学・コンピュータ計算科学的手法を組み合わせ、抗原の立体構造情報に基づき、ウイルス抗原上の標的部位へ自由自在に抗体をコンピュータ上で理論的に設計し、人工創成することに挑戦した。作成した新規設計抗体は、全体の3割程度の候補において、実際に蛋白質発現に成功した。また、発現に成功した抗体の一部では実際にウイルス抗原への結合が確認できたことから、設計システムのさらなる改良が必要だが、有用な抗体作製手段の一つと成り得ることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体は細胞/分子の単離・標識など生命現象を解明するための研究ツールや、疾患の診断・治療薬として非常に有用だが、標的分子に対して目的の機能・特異性を持つ抗体を取得することは容易ではない。従って、抗体作製のための新たな選択肢(技術)が求められている。そこで、本研究では新規抗体作製法として、抗原の立体構造情報に基づいて、抗原の望む部位へ自由自在に抗体をコンピュータ上で理論的に人工設計するシステム構築に挑戦した。

研究成果の概要(英文)：Combining the techniques of Virology, Structural biology and Computer science, in this study, a novel approach for antibody design was attempted based on a viral antigen structure using computers.

Designed antibodies were successfully produced in one third of the total. Further, some produced antibodies could exhibit the binding ability to the target viral antigen. Although the improvement of the design system is still required, this method might have a potential to be a next generation approach for the antibody production.

研究分野：ウイルス学

キーワード：抗体 感染症 構造生物学 コンピュータ科学

## 1. 研究開始当初の背景

抗体はウイルス感染を中和する等の宿主防御機構としての働きにとどまらず、細胞/分子の単離・標識など生命現象を解明するための研究ツールや、疾患の診断・治療薬として非常に有用である。しかし、標的分子に対して望んだ機能を持つ機能性抗体を取得することは容易ではない。従って、抗体作製のための新たな選択肢（技術）が求められている。

現在、抗体作製はマウス等の動物に抗原免疫することで取得されたものや、抗体ライブラリーから取得されたものなど、希望する機能を持つ抗体を取得するまで確率に依存する部分が多い。また、外注した場合は多額の費用がかかる。しかし、今後、抗体は生命科学分野における研究ツールや、医療分野における医薬品としての利用増加が見込まれる（図1）。

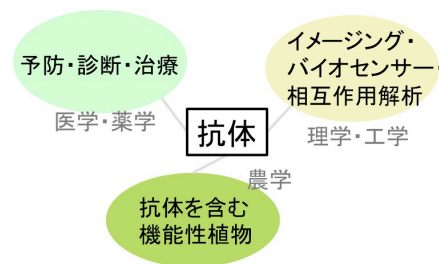


図1. 抗体活用の将来展望  
様々な研究領域への波及効果が見込まれる

## 2. 研究の目的

上述の背景に基づき、本研究では新規抗体作製法として、抗原の立体構造情報に基づいて、抗原上の目的の部位へ自由自在に抗体をコンピュータ上で理論的に設計し、人工創成する手法の開発を目的とした。モデルとする疾患対象として、抗体に機能性（中和能）があるかどうかを迅速に評価できる麻疹ウイルス（MeV）感染症を用いた。麻疹（はしか）を起こす MeV は高い伝播力と一過性の強い免疫抑制を特徴とする急性呼吸器感染症である[1]。未だに世界全体で多くの感染者と約 14 万人の死者を毎年出しており（WHO 2018 年度推計）、特異的治療法が存在しないため一旦発症すると対症療法しかない。MeV を含む全てのエンベロープウイルスは粒子表面に存在する糖蛋白質を介して受容体と結合し、細胞内へと侵入する[2-4]。すなわち、糖蛋白質は病原体の宿主域決定や病原性発現において非常に重要な役割を果たす一方で、同じ糖蛋白質が抗体の主要な標的ともなる。

抗体はその有用性から人工的に設計しようという試みは世界中で行われている。しかし、既存抗体の抗原結合能の増強や 2 種類の抗原に結合できるように改変するなど[5, 6]、現在は既存抗体の機能増強・拡張が主で、理論的な抗体のコンピュータ設計法の開発はどの研究者も模索中の段階である。将来的に幅広い生命科学領域への応用・貢献を目指すため、本研究では、機能性（中和）抗体取得の迅速化・効率化につながる新規手法を開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗体のコンピュータ設計

抗体設計部位は相補性決定領域（CDR: Complementarity-determining region）と呼ばれる配列変化に富む 6 つのループ領域（CDR-L1, L2, L3, H1, H2, H3）のみに絞って行った。まず、蛋白質構造データベース PDB から抽出した抗体構造ライブラリー（約 800 種類）を用いて、

抗体と抗原の複合体の安定性と“かたちの相補性”に基づき、ウイルス抗原構造とのドッキングシミュレーションによるスクリーニングで順位付けを行った(利用プログラム: PatchDock・Rosetta)。次に、抗体と抗原の相互作用面の物理化学的性質も考慮するため、熱力学安定性を構造予測計算で最適化し、CDR 領域のアミノ酸配列の最終決定を行った(利用プログラム: Rosetta・GROMACS)。

## (2) 抗体の作成

コンピュータ設計した抗体配列の可変領域を人工遺伝子として合成し、ヒト化抗体作製用ベクターを利用して抗体発現プラスミドを作成した。作製したプラスミドをH鎖とL鎖で1:1、2:3、1:3と比率を変えながらHEK293細胞へトランスフェクトし、抗体を培養上清中へと蛋白質発現させた。培養上清中の発現抗体はProtein Gで精製した。

## (3) 機能(中和能)解析

MeVとコンピュータ設計抗体を含む培養上清を混合して30分静置した後、MeVの受容体を発現している培養細胞(Vero-SALM, Vero-Nectin4, Vero-CD46)に感染させ、コンピュータ設計抗体によるMeV感染阻害能を評価した。抗原に対するコンピュータ設計抗体の結合能を評価するために精製蛋白質を用いたELISAによる評価も行った。

# 4. 研究成果

## (1) 抗体のコンピュータ設計システムの構築

蛋白質構造データベース(PDB: Protein Data Bank)から抽出した約800種類の高分解能の抗体構造を基にして、抗原との相互作用面に存在するアミノ酸残基を変異させ、約800,000種類の異なる配列を持つ抗体の立体構造モデルをコンピュータ上で作製した。次に、ウイルス抗原構造と設計抗体とのドッキングシミュレーションにより、抗原-抗体の複合体の相互作用面積を計算し、1000 Å<sup>2</sup>以上の結合面積をもつ抗体のみへと絞り込んだ(この時点で約600,000候補)。また、抗原-抗体間の結合エネルギー( $\Delta G$ )も計算し、 $\Delta G$ と“かたちの相補性”に基づき、スクリーニングで順位付けを行った。順位付けを行った設計抗体の上位1%について、元になった機能性抗体と比較したところ、抗原-抗体の複合体の相互作用面積や結合エネルギーはほぼ同等であることが確認できた(図2)。従って、コンピュータ設計戦略として、極端な外れ値(理論的に異常な抗体)を生み出すことなく、自然界の選択圧により生まれた抗体と似た物理化学的性質を持つ抗体を設計することが出来る手順であったと考えられる。

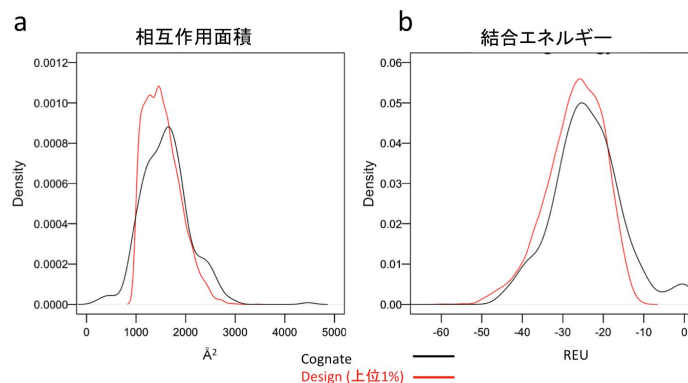


図2. コンピュータ設計抗体および既存抗体の抗原-抗体相互作用面積 (a) と結合エネルギー (b) の比較

- a) 抗原-抗体構造における相互作用面積の比較。
- b) 抗原-抗体構造における結合エネルギーの比較。

## (2) コンピュータ設計抗体の産生

Top100 スコア中に順位付けられたコンピュータ設計した抗体のうち、目視で抗原-抗体の立体構造の相互作用を確認し、機能性抗体として可能性が高いと期待される約 40 候補の配列の可変領域を人工遺伝子として合成した。合成した遺伝子をヒト抗体作製用ベクターへとクローニングし、抗体発現プラスミドを作成した。作製したプラスミドを H 鎖と L 鎖で 1:1, 2:3, 1:3 と比率を変えながら HEK293 細胞へ共発現させ、抗体を培養上清中へと蛋白質発現させた。Western blotting で抗体の蛋白質発現が確認できた候補について、さらに、大量培養系で蛋白質発現を行い、培養上清中の発現抗体は Protein G で精製した。今回の実験においては、全体の 3 分の 1 程度の候補において、実際に培養上清中に蛋白質として発現させることに成功し、コンピュータ設計した人工的な抗体を実際に蛋白質として産生できることを示すことができた。

## (3) コンピュータ設計抗体による機能（中和能）解析

MeV とコンピュータ設計抗体を用いて、MeV 受容体を発現している培養細胞（Vero-SALM, Vero-Nectin4, Vero-CD46）に感染させ、コンピュータ設計抗体による MeV 感染阻害能を評価した。その結果、感染を大きく阻害する機能を発揮する抗体は確認できなかった。そこで、抗原に対するコンピュータ設計抗体の結合能を評価するために精製蛋白質を用いた ELISA による評価も行った。その結果、2 種類の抗体については、MeV 受容体結合蛋白質への結合が確認できた。

コンピュータ設計抗体の約 3 分の 1 程度の候補においては、蛋白質発現に成功したが、約 3 分の 2 程度の候補においては、蛋白質発現そのものが確認できなかったため、抗原抗体の安定性評価に加えて、今後、抗体単独での安定性の評価や分子動力学計算などの導入によるスクリーニングの評価系の改良が必要であると考えられる。

## 参考文献

- 1) Griffin DE. Measles virus. In: Knipe DM, Howley PM, J.I. C, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, et al., editors. Fields Virology 6 ed I. Philadelphia.: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1042-69.
- 2) Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, et al. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(49):19535-40. Epub 2007/11/16. doi: 10.1073/pnas.0707830104.
- 3) Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, et al. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. Nat Struct Mol Biol. 2011;18(2):135-41. Epub 2011/01/11. doi: 10.1038/nsmb.1969.
- 4) Hashiguchi T, Fukuda Y, Matsuoka R, Kuroda D, Kubota M, Shirogane Y, et al. Structures of the prefusion form of measles virus fusion protein in complex with inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(10):2496-501. doi: 10.1073/pnas.1718957115.
- 5) Kuroda D, Shirai H, Jacobson MP, Nakamura H. Computer-aided antibody design. Protein engineering, design & selection : PEDS. 2012;25(10):507-21. doi: 10.1093/protein/gzs024.
- 6) Tiller KE, Tessier PM. Advances in Antibody Design. Annual review of biomedical engineering. 2015;17:191-216. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071114-040733.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Sangha AK, Dong J, Williamson L, **Hashiguchi T**, Saphire EO, Crowe JE Jr, Meiler J. "Role of Non-local Interactions between CDR Loops in Binding Affinity of MR78 Antibody to Marburg Virus Glycoprotein." *Structure*. 2017 Dec 5;25(12):1820-1828. 査読あり doi:

- (2) 橋口隆生、  
X 線結晶構造に基づくパラミクソウイルスの細胞侵入および抗体による中和機構と予防・治療法への展開  
JVM 獣医畜産新報 2018 年 6 月 Vol.71 p432-436 査読なし
- (3) 橋口隆生、  
マイナス鎖 RNA ウイルスの細胞侵入と抗体による中和の研究  
雑誌ウイルス 2017 年 6 月 Vol. 67 No. 1 p69-78 査読なし

[学会発表] (計 9 件)

- (1) Takao Hashiguchi  
Structure-guided and computer-aided drug development to ameliorate persistent measles virus infection in the central nervous system  
**Japan-UK Workshop on Infectious Disease Research**, Tokyo, Jan 21-22 2019
- (2) 橋口隆生、  
モノネガウイルスの細胞侵入およびその阻害機構の研究と創薬への展開、  
**新興再興感染症制御プロジェクト 新興再興事業・J-GRID 合同シンポジウム 感染症研究連携のフロンティア**, 2018 年 3 月 23 日, 東京
- (3) Takao Hashiguchi  
Molecular dissection of virus entry and its inhibition by antibodies/inhibitors,  
**Immunology at the Forefront - The 9th International Symposium of IFReC**, Osaka, Jan 26 2018
- (4) 橋口隆生、  
X 線結晶構造に基づくパラミクソウイルスの細胞侵入および抗体による中和機構と予防・治療法への展開  
第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年 9 月 13 日、鹿児島
- (5) Takao Hashiguchi  
Molecular basis for Mononegavirus entry and inhibitions by antibodies/inhibitors  
**The 16th Awaji International Forum on Infection and Immunity (AIFI 16)**, Awaji, Japan  
Sep 5-8 2017

## 6. 研究組織

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：黒田 大祐

ローマ字氏名：(KURODA, daisuke)