

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25年5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655160

研究課題名（和文） 次世代スキャフォールドを持つ Fab 分子の開発

研究課題名（英文） Development of Fab molecule with the stable scaffold for next generation

研究代表者

植田 正 (UEDA TADASHI)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：90184928

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的はヒト型 Fab 定常部に普遍的な安定化を施し、この定常領域を新規なスキャフォールド（土台）として用いることである。まず、ヒト型 Fab の定常部位で L 鎖の Asn138 がヒト型 Fab の Asn の中で脱アミド化しやすい部位であることを示した。その部位 Asn138 を Asp 及び Ala に変異した変異体を作製し、pH6.5、25℃でグアニジン塩酸塩に対する安定性を評価した。その結果、Asp138Fab は、未変異型 Fab に較べて非常に不安定であったが、Ala138Fab は未変異型と同程度安定であった。pH 9 での加熱実験では、Ala138Fab は未変異型より安定であった。

研究成果の概要（英文）：

In order to prepare humanized Fab with the stable scaffold for next generation, we tried to stabilize the constant region of humanized Fab. At first, we showed that Asn138 in L chain of the Fab was easy to deamidate to Asp of Asn residues in the Fab. After preparation of the Fab mutants where Asn138 is mutated to Asp or Ala in L chain of the Fab, respectively, we examined their stabilities against guanidine hydrochloride at pH 6.5 and 25°C. As a result, we found that Asp138Fab was more destabilized than the nonmutant Fab while Ala138Fab had a stability similar to the nonmutant Fab. After heating at pH 9, the residual amount of Ala138Fab was higher than that of the nonmutant Fab.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：生体関連化学・複合化学

キーワード：抗体工学、安定化、アミノ酸改変、ヒト型 Fab、蛋白質の劣化

1. 研究開始当初の背景

抗体はいくつかの領域（ドメインと呼ぶ）から構成されているが、最近、抗体の中で最も不安定なドメインは CH₂ ドメインであること (Liu et al. Anal. Biochem. 2010)、CH₂ ドメイン内に分子内架橋すると抗体の安定性が向上すること (Gong et al. J. Biol. Chem. 2011) が報告された。すなわち、CH₂ を除去すると抗体は物性が向上することを意味している。Fab ドメインからなる医薬品（ラニビ

ズマブ、ノバルティスファーマ社製）が本邦で承認（2007年）されているように、Fab（図1）は対象分子（受容体など）に結合するだけでも生理活性を発揮する。一方、Fab は医薬の分野にとどまらず、食品、化粧品、写真印刷材料、電気通信材料としても Fab 修飾体の特許が公開されている。Fab は生体分子であるがこのように広範囲に利用されている。Fab は蛋白質である以上、3次構造の崩壊（変性）が起こると機能を発揮できない。従って、

Fab 定常部を普遍的に安定化することは重要な課題である。我々はヒト型 Fab を大腸菌発現系を用いて、安定的かつ安価に調製する方法を開発した (Fujii et al., J. Biochem. 2007)。このような背景から、無限の分子に結合能を持つヒト型 Fab の定常部 (CH₁ と C_L) に焦点を絞り安定なスキヤフォールドを持つ Fab 分子の研究開発を実施してきた。

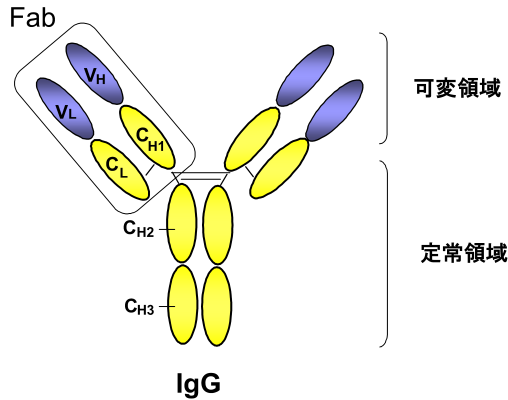


図1 IgG の基本構造

2. 研究の目的

本研究目的はヒト型 Fab の定常部 (CH₁ と C_L) に焦点を絞り、格段に安定なスキヤフォールド構築を実現することである。すなわち、定常部で脆弱な部分を見だし、それをアミノ酸置換することで、より安定な定常部 (スキヤフォールド) を持つヒト型 Fab 分子を構築することである。

3. 研究の方法

(1) *Pichia pastoris* を用いたヒト型 Fab の高発現株の調製

ヒト型 Fab の H 鎖と L 鎖に遺伝子は既に pET22b に挿入されている (Fujii et al. J. Biochem. 2007)。これらの遺伝子を制限酵素とリガーゼを用いて、*Pichia pastoris* のシャトルベクター pPICZαA へタンデム (5' AOX1/H 鎖/ターミネーター/5' AOX1/L 鎖/ターミネーターの順) に挿入したものを構築した。このベクターで *Pichia pastoris* X33 株を形質転換した。このベクターはゼオシン耐性遺伝子を持っているので、形質転換した X33 株を高濃度のゼオシンを含む培地で選別して、目的の Fab を高発現する株を選択した。発現株を Mine ら (Mine et al., FEBS Lett. 1999) の方法に準じ培養、蛋白質の発現誘導を行った。5 日間、30°C で培養後、培養液を遠心分離して、上清を 10 倍の水で希釈後、50mM リン酸緩衝液で平衡化したイオン交換 (CM-Toyopearl 650M 6cm x 10cm) に吸着させ、平衡化緩衝液で十分に洗浄したのち、1M NaCl を含む同緩衝液で溶出した。再カラムは、Fujii ら (Fujii et al., J. Biochem.

2007) の方法により行った。

(2) ヒト型 Fab 内でのデアミドーション部位の検出

ヒト型 Fab に生じるデアミドーションは、pH7、40°C で経時的にインキュベーションし、カチオン交換樹脂を連結した HPLC により解析した。すなわち、未変化体より早く溶出するピーク (Peak-A) の溶出の有無を確認することにより行った。サンプルをカチオン交換樹脂 (Asahipak, 6 x 150 mm) を HPLC に連結し、50mM リン酸緩衝液 (pH 7) で平衡化したものに吸着させ、50mM リン酸緩衝液 (pH 7) 20mL と同緩衝液に 0.5M NaCl を含むもの (pH 7) 20mL の濃度勾配で溶出させた。流速 0.8mL/min とした。蛋白質の溶出は 280nm で検出した。Fab 内のデアミドーション部位の同定は、既に我々が報告している方法 (Kameoka et al., J. Biochem. 2003) (図 2) により行った。Peak-A を分取し、¹⁵N 均一安定同位体ラベル化したヒト型 Fab と混合した。その後、Asp-N エンドペプチダーゼで消化したペプチド断片を MALDI-TOF Mass で解析した。

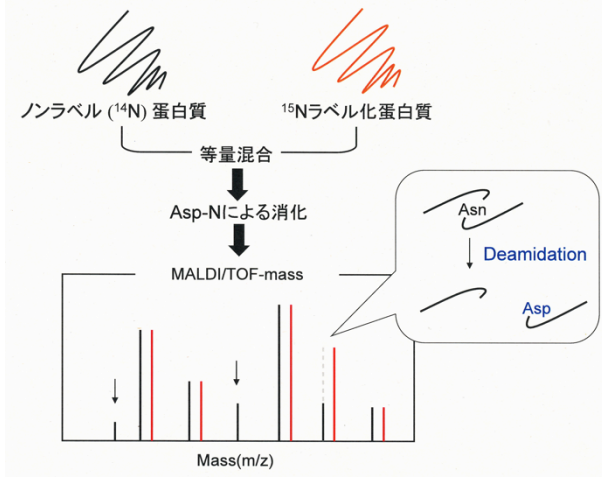


図2 安定同位体蛋白質と Asp-N プロテアーゼを用いた Asn 残基の検出方法の概要

(Asn 部位がデアミドーションしない部分場合は対のシグナルが検出されるが、Asn がデアミドーションした場合は、対のシグナルの大きさが変化し、新たに分子量の小さいシグナルが検出される)

(3) ヒト型 Fab の L 鎖変異体の調製

ベクター上でメガプライマー法により目的のアミノ酸変異を行った。変異導入については DNA 配列解析により確認した。これらの遺伝子は、制限酵素とリガーゼで、3 (1) で構築したシャトルベクター pPICZαA の L 鎖をコードする遺伝子の部分をそれぞれの変異を含む遺伝子で置き換えた。調製したベクタ

一で *Pichia pastoris* X33 株を形質転換し、高発現株をスクリーニングした。培養、精製は未変異型 Fab と同様の方法により行った。

(4) ヒト型 Fab の平衡論的な安定性の評価
種々の濃度のグアニジン塩酸塩 (MES 緩衝液 pH6.5) に一定量の Fab を溶解し、25°C で 36 時間インキュベーションした。各溶液における蛍光強度比 (280nm を励起した際の 350nm の蛍光強度を 330nm の蛍光強度で除したものを) を測定し、グアニジン塩酸塩濃度に対してプロットした。

(5) ヒト型 Fab の不可逆反応に対する安定性の評価

Fab (50 μg/ml) を pH6.5 の MES 緩衝液に溶解し、60°C で経時的にインキュベーションした。その後 10 分間氷冷し、遠心後上清に残った Fab の量を 3 (2) に記載した条件 (カチオン交換樹脂に連結した HPLC) により解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト型 Fab の発現

目的の遺伝子が挿入されたベクターで形質転換された *Pichia pastoris* X33 株を Mine ら (Mine et al., FEBS Lett.1999) の方法により培養した。精製はカチオン交換樹脂により行った。SDS-PAGE 後 CBB 染色し、目的の分子量を持つ Fab が生成していること、1L の培養で 10mg 以上得られたこと、抗原と十分な親和性があることがわかった。以上のことから、目的の Fab の劣化実験を実施するのに十分量調製することができた。

(2) ヒト型 Fab のデアミデーションの評価
3 (2) の方法に沿って、この Fab を経時的にインキュベーションし、カチオン交換 HPLC により Fab のデアミデーションについて解析した (図 3)。

インキュベーション前のピークは主たるピークは一つであるが、インキュベーションするにつれて、主ピークが減少し Peak-A が生成してくることがわかった。溶出位置から蛋白質の正の総電荷が減少しているため、デアミデーションが生じていることが示唆された。また、この Fab を 100°C で 1 時間加熱すると Peak-A の位置にピークが溶出することがわかった。この条件では容易に Peak-A を調製することができるので、本研究では 100°C、1 時間の加熱で得た Peak-A について解析した。3 (2) に記載したように、¹⁵N 安定同位体ラベル化ヒト型 Fab を調製するとともに、Peak-A を分取した。それらを同量混合し、Asp-N プロテアーゼにより消化した。消化物は MALDI-TOFF Mass により解析した (図 4)。

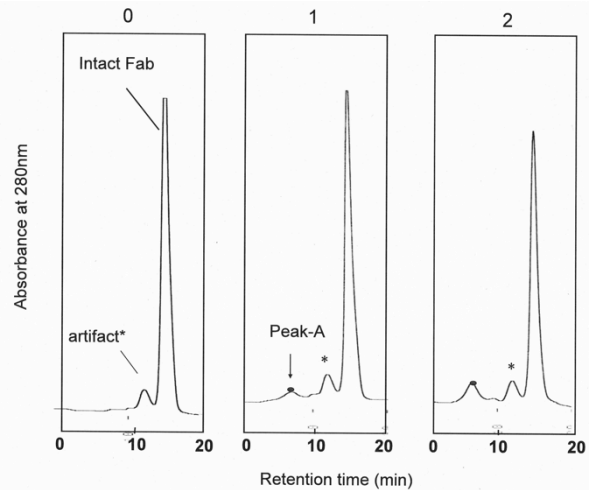


図 3 カチオン交換樹脂によるインキュベーションした Fab の分析

縦軸は 280nm の吸光度、横軸は溶出時間、各図上の数値はインキュベーションした週を表している (分析条件は研究方法に記載)。

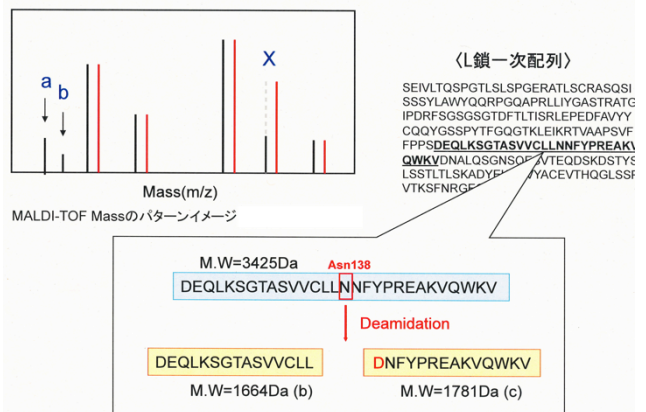


図 4 Peak-A 内のデアミデーション部位の同定 (MALDI-TOF MASS のパターンは現在論文投稿中で著作権等の問題が危惧されるのでイメージで示している。アミノ酸配列の記載、Asp-N プロテアーゼ消化後にパターンが変動したシグナル X、a、b の分子量を記載することで科学的な議論に耐えると判断した)

通常シグナルは 2 本の対で検出されるが X はシグナルの大きさに差があり、新たなシグナル a、b が検出された。X の分子量は、安定同位体ピークとの差を基準にして評価すると 3425Da であった。このシグナルは L 鎖の Asn138、Asn139 を含んでいるが、Asp-N を用いることによって、a と b のペプチドに分解され、a と b のシグナルの分子量がそれぞれ 1664 と 1781 であることから、デアミデーションした部位は Asn138 であることがわかった。

(3) デアミド化部位の変異体の調製
 4 (2) に示したようにデアミド化部位の同定ができたので、実際 L 鎖の Asn138 がデアミド化した場合の安定性の変動を解析するため、ヒト型 Fab の L 鎖の Asp138 及び Ala138 を調製した。アミノ酸が変異していることの確認は DNA 配列の解析により確認した。また、発現は 4 (1) と同様の方法で行い SDS-PAGE 後 CBB 染色して、単一物として精製できていることを確認した。

(4) ヒト型 Fab の L 鎖の Asn138 変異体の安定性

pH 6.5 で未変異型 Fab と Asp138 Fab、Ala138 Fab の円偏光スペクトルを測定したところ、Ala138 Fab は未変異型 Fab と同様な β シート構造を持っていたが、Asp138 Fab はこれらと異なるパターンを示していた (ランダム構造ではないが、 β シートとは異なるパターン)。図 5 に未変異型 Fab の 25°C、pH6.5 のグアニジン塩酸塩 (横軸) に対する変性曲線を示した。

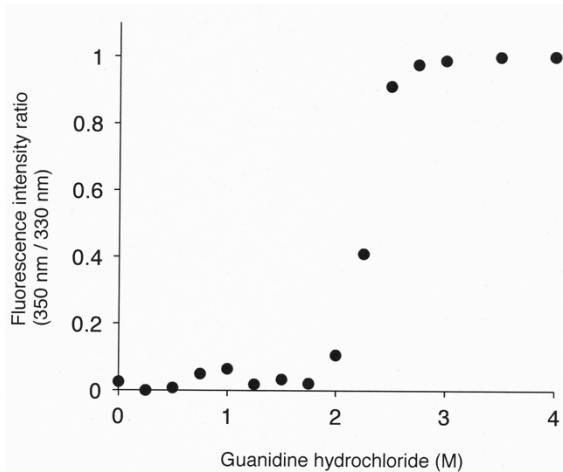


図 5 未変異型 Fab のグアニジン塩酸塩に対する変性曲線

縦軸は 330nm と 350nm の蛍光強度比である。この値は変性の程度を表し、0 は全く変性しない状態、1 は完全の変性していることを示す。未変異型 Fab は蛋白質の変性に特徴的な協同的な変性カーブを示しており、半分の分子が変性するグアニジン濃度は約 2.1M であった。Ala138 Fab は、未変異型 Fab とほぼ同様な変性曲線を示した。一方、Asp138Fab は、これらの 2 つの Fab に較べて、協同性が低い変性曲線を与えた。半分の分子が変性する濃度は約 1M であった。以上の結果から、ヒト型 Fab の L 鎖の Asn138 がデアミド化することにより、Fab 分子が非常に不安定化することが示唆された。また、一アミノ酸置換で蛋白質分子が劇的に不安定化すること

は興味ある知見である。この実験で用いた Fab の X 線結晶解析は未だ解析されていないが、ヒト型 Fab の定常部は共通しているため、既に X 線結晶解析が終了しているヒト型 Fab で L 鎖の Asn138 の位置を示した (図 6)。Fab 分子の定常部位の CH_1 と C_L の界面に Asn138 が存在しており、デアミド化することで、Fab 分子の定常部の分子間で側鎖の静電的反発などにより、Fab 分子の 3 次構造の不安定化が生じたためではないかと予想される。

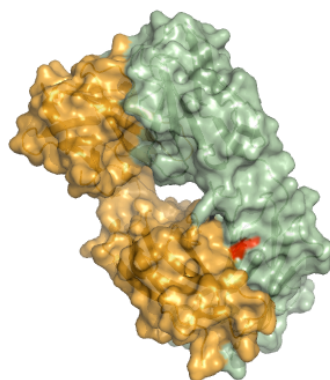


図 6 蛋白質データベースに登録されているヒト型 Fab (PDB ID : 1VGE) における L 鎖 (緑) 内の Asn138 の位置 (赤)

(5) ヒト型 Fab の L 鎖の Asn138 変異体の不可逆反応に対する効果

3 (5) の条件に従って、pH6.5、60°Cでの加熱後の残存量を図 7 に示した。このように Asn138 を Ala に変異した Fab ではほとんど不可逆反応に対する差は認められないが、Asp に変異した Fab は非常に劣化しやすいことがわかった。これは、4 (4) での結果と一致するものである。

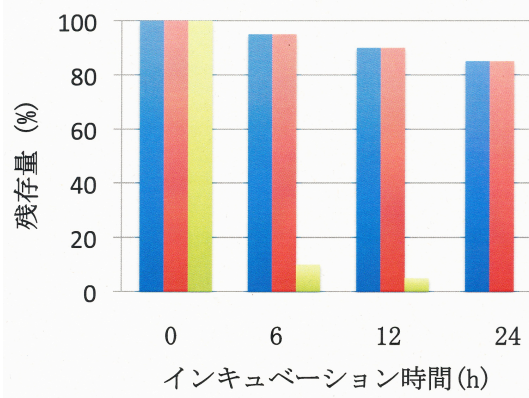


図 7 ヒト型 Fab の残存量
 未変異型 Fab (青)、Ala138Fab (赤)、Asp138 Fab (黄緑)

また、pH9、60°Cで同様の実験を行うと、未変異型 Fab の残存率が Ala138Fab の半分程度に減少した。この結果から、この条件では未変異型 Fab の Asn138 のデアミド化が起き、不安定化したのであろう。従って Ala138 Fab は、未変異型 Fab の平衡論的な安定性を保ちながら、広い pH で安定に使用できる Fab と考えられる。

(6) ヒト型 Fab の安定化機構に関する考察
以上の結果から Fab の安定化機構について以下のようなスキームを用いて議論する。

未変性状態 ⇌ 変性状態 →→→ 凝集
(デアミド化)

ヒト型 Fab は水溶液中において、未変性状態と変性状態の平衡関係にある。変性状態に共役する不可逆変性は凝集へ導く。本実験系では、加熱により未変異 Fab の定常部に生じた L鎖の Asn138 のデアミド化が、安定性を非常に低下させ、凝集を促進することを示した。この考えは、Asp138 Fab が不安定で凝集しやすいことと矛盾しない。また、この Asn138 を Ala に変換した Ala138 Fab は、pH9 においては、未変異型 Fab よりも頑強であることを示すことができた。

本研究は、ヒト型 Fab の定常部において、デアミド化しやすい部位を見だし、その変異体を作製することによって、広い pH で利用できるヒト型 Fab の土台を作ることができた。この結果は、Fab の広範な利用に向けて、頑強なスキュフォールドを作製するという目標のマイルストーンとなるであろう。

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)

[学会発表] (計1件)

阿部義人、植田 正 バイオ医薬品の創製と
プロテインエンジニアリング 北海道大学薬
学部ファーマサイエンスフォーラム 2012 年
07 月 25 日 北海道大学薬学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 正 (UEDA TADASHI)
九州大学・薬学研究院・教授
研究者番号：90184928

(2) 研究分担者

白石 充典 (SHIROISHI MITSUNORI)
九州大学・薬学研究院・助教
研究者番号：00380527

(3) 連携研究者

阿部 義人 (ABE YOSHITO)