

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06606

研究課題名(和文) 計算・情報科学的アプローチを基盤とした合理的抗体設計

研究課題名(英文) Development of antibody modeling methods toward rational antibody design

研究代表者

黒田 大祐 (Kuroda, Daisuke)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60756732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の免疫系に存在する蛋白質である抗体は、「異物(抗原)」に対して高い特異性を持ち、生体防御機構を担っている。医薬品を始めとしたその応用範囲の広さから、抗体は単に医学・生物学のみでなく、薬学・工学等の分野でも重要な分子となっている。近年、その応用範囲の広さから、抗体の分子設計が近年注目を集めている。本研究では、立体構造が既知の蛋白質複合体を用いて、データベース解析及び分子シミュレーションにより、蛋白質設計のための新たな知見を得た。さらに、アミノ酸配列からの抗体設計を実現するために、抗体及び抗体-抗原複合体の立体構造モデリング手法の高度化を行なった。

研究成果の概要(英文)：The vertebrate adaptive immune systems are capable of promoting cells to degranulate nearly any foreign pathogens by producing antibodies that recognize specific epitopes of antigens. Using existing crystal structures of protein complexes, we revealed peculiar features of various protein complex types, and we quantified shape complementarity of antibody-antigen interfaces. Exploiting docking simulations, we also revealed a stubborn gap in backbone motion not captured by any current computational approaches. Aiming for rational antibody design from amino acid sequences, we also developed antibody modeling methods. An antibody design based on those knowledges are underway.

研究分野：生物物理学

キーワード：抗体設計 蛋白質工学 データベース 分子シミュレーション バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の免疫系に存在する蛋白質である抗体は、「異物(抗原)」に対して高い特異性を持ち、生体防御機構を担っている。医薬品を始めとしたその応用範囲の広さから、抗体は単に医学・生物学のみでなく、薬学・工学等の分野でも重要な分子となっている。近年、その応用範囲の広さから、抗体の分子設計が近年注目を集めている (Lippow et al. (2007) *Nat Biotechnol*, 10:1171-6)。天然の抗体は、同一なH鎖2つとL鎖2つから成る4量体構造をとりY字型を形成し、Y字の手の部分で同一抗原を認識する(図1)。そのため、抗体は本来1種類の抗原しか認識できず、既存の抗体医薬品は1つの標的にしか結合できない。癌などの疾患は、複数の伝達経路で増殖しうる。従って、複数の経路を阻害する薬剤、つまり複数の標的を認識できる抗体を設計できれば有力な医薬品候補となる。

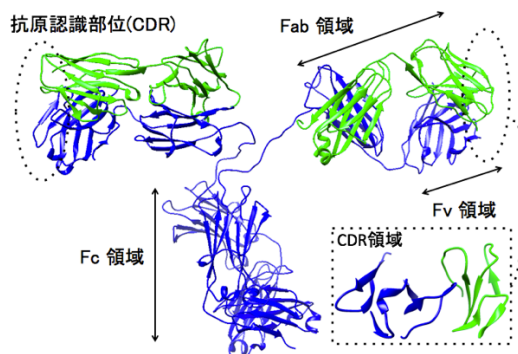


図1: 抗体の立体構造.

抗体工学の分野において、2種類の抗原を認識する抗体の様々なフォーマットが提案されている (Chan et al. (2010) *Nat Rev Immunol* 10(5):301-16)。その中でも、分子量が小さいため扱いやすく、物性にも優れている、1つのF_v領域(図1)に2種類の抗原認識能を付与した抗体(Two-in-one抗体)が近年注目を集めている。これまでに報告されているTwo-in-one抗体は、Genentech社が2009年に報告したものが唯一の例である (Bostrom et al. (2009) *Science*, 323:1610-4)。これは、既存の抗体医薬品を基に、ファージ・ディスプレイ法で抗

原認識部位にランダムに変異を導入して作成された。

このような背景から、我々は、「ランダムな変異に頼るのではなく、合理的に抗体を設計できれば、抗体医薬品開発のみならず、分子認識機構の理解につながり、新たな機能設計への示唆が得られる可能性がある」と考えた。

2. 研究の目的

抗体が医薬品としての活躍を期待されているのは、主に癌などの重篤な疾患である。癌は複数の経路で増殖するため、一度の投与で複数の経路を遮断しうる薬剤の開発が望まれている。そのため、2種類の抗原を認識する抗体(Dual-specific抗体)に関する研究が盛んに行われている。そこで、本研究の目的は、「抗体の合理的な設計、特に「合理的な特異性の改変」を目指し、コンピュータ(情報科学・計算科学)を用いて、そのための知見を得ること」にある。最終的には、抗体のアミノ酸配列からの、合理的な設計を可能にしたい。

3. 研究の方法

以下の流れで研究を進めた。

- (1) コンピュータ上で設計した抗体の評価指標の導出するために、立体構造が既知の蛋白質複合体を用いて、それらの相互作用面のデータベース解析と分子シミュレーションによる解析を実施した。
- (2) アミノ酸配列情報からの抗体設計を可能にするため、抗体及び抗体-抗原複合体モデリング手法の高度化を行なった。
- (3) 分子シミュレーションと上記指標を用いて、実際に抗体設計を行った。

4. 研究成果

以下の8つの成果を得た。

- (1) 抗体-抗原複合体及びその他の蛋白質-蛋白質複合体の相互作用面の比較を行った。自然界の抗体-抗原複合体のかたちの相補性や水素結合能について網羅的に調べ、

今後の分子設計時の指標となるデータベースを構築した。図 2 より、抗体抗原相互作用面のかたちの相補性(S_c)は平均して 0.7 程度であることがわかる。このことから、コンピュータを用いて設計した抗体も、この程度の相補性が必要であることが示唆される。

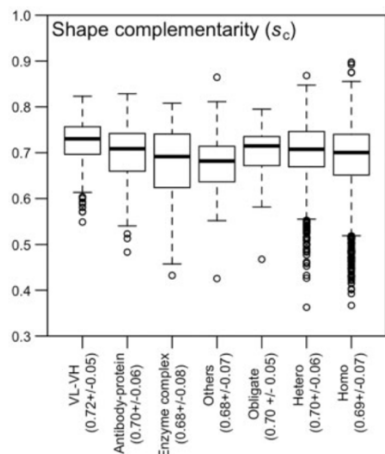


図 2: 立体構造が既知の蛋白質複合体相互作用面のかたちの相補性。

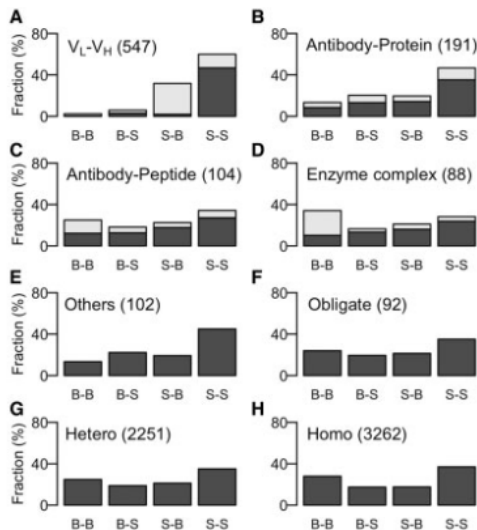


図 3: 立体構造が既知の蛋白質複合体相互作用面の水素結合パターン. S は側鎖, B は主鎖を表す。

- (2) 抗体-蛋白質抗原と、抗体-ペプチド抗原間の相互作用様式の違いを明らかにした(図 3)。特に、蛋白質抗原上のエピトープを同定する際に、しばしば断片化したペプチドが用いられるが、図 3 によると、蛋白

質抗原とペプチド抗原では、その水素結合パターンが異なることがわかる。後者では、ペプチドの主鎖を用いた水素結合の割合が高くなっている。このことから、蛋白質抗原と、それをペプチド化した抗原をそれぞれ免疫した場合には、産出される抗体は互いに異なる分子認識機構を持っている可能性が示唆される。より具体的な、分子レベルでの解析は今後の課題である。

- (3) 蛋白質の主鎖の柔軟性の取り込みは、蛋白質設計における長年の課題となっている。そこで、どの程度の柔軟性を考慮すればコンピュータ上で安定な蛋白質を設計できるかをモンテカルロシミュレーションを用いて解析した。その結果、RMSD 値で 0.6Å 程度の小さな揺らぎが特異的な複合体形成に重要であるという結果を得た。
- (4) 抗体-抗原複合体や蛋白質間相互作用の分子認識機構を、シミュレーションにより、「induced-fit」「conformer selection」の視点から議論した。蛋白質の立体構造の揺らぎとエネルギー地形及び分子認識の相関性を議論した。特に、二重特異性獲得のためには、二つの安定化状態をあらわに考慮した設計シミュレーションが必要であることが示唆された。
- (5) 抗原認識に関わっているとされる抗体フレームワーク領域のアミノ酸残基がいくつか報告されているが、その具体的な役割まで言及されているものは少ない。シミュレーションを用いて、そうしたアミノ酸残基の特徴づけを行い、その役割を立体構造の観点から明らかにした。

- (6) 抗体設計を志向した、抗体の立体構造予測及び抗体-抗原複合体の構造予測手法の高度化を行なった。複数の鋳型をプレートとしてもいることで、抗体 VL/VH ドメイン間の相対配置に柔軟性を取り込

むことができ、より精度のよいモデル構造の作成が可能となった。この新たな手法を用いて、設計の鋳型となる抗体抗原複合体の立体構造を構築した。

- (7) 構造が既知の抗体-抗原複合体を基に、最適な設計条件の検討を行った。抗体の CDR-H3 のみだけでなく、周囲の他の CDR も同時に改変することで、より安定なアミノ酸配列を得ることができることを明らかにした。
- (8) 実際に設計する対象としては、既に所属研究室で条件検討がなされていた、抗体 11K2 を選定した。抗原は MCP1 とリゾチームを用いた。11K2 に、新たにリゾチームの結合能を持たせることが狙いである。11K2-MCP1 複合体の結晶構造は既に Protein Data Bank (PDB)中に登録されている(PDB ID: 2BDN)。11K2 とリゾチームの仮想複合体構造は、上記 6)で開発した手法を用いてモデリングを行なった。野生型の 11K2 と MCP1 の発現・精製は完了し、その結合能を等温滴定量熱測定 (ITC)により確認した。設計した 11K2 に関する遺伝子工学・発現・精製は、現在進行中である。今後はさらに、表面プラズモン共鳴 (SPR)なども用いて、速度論を含めて、抗原結合能の定量的な確認を進める。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Weitzner BD, Jeliazkov J, Lyskov S, Marze NA, Kuroda D, Frick R, Adolf-Bryfogle J, Biswas N, Dunbrack RL and Gray JJ*. “Modeling and docking antibody structures with Rosetta”, Nature Protocols, 12(2):401-416 (2017) 査読有
DOI: 10.1038/nprot.2016.180
- ② Kuroda D and Gray JJ. “Pushing the backbone in protein-protein docking”, Structure, 24(10):1821-9. (2016) 査読有
DOI: 10.1016/j.str.2016.06.025

- ③ Kuroda D and Gray JJ. “Shape complementarity and hydrogen bond preferences in protein-protein interfaces: Implication for antibody modeling and protein-protein docking”, Bioinformatics, 32(16):2451-6 (2016) 査読有
DOI: 10.1093/bioinformatics/btw197

[学会発表] (計 8 件)

- ① 黒田大祐, 合田浩明, “On the shape complementarities in the adaptive immune response to pathogens”, 日本蛋白質科学会年会, 2016年6月9日, 福岡

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
黒田 大祐 (Kuroda, Daisuke)
昭和大学・薬学部・助教
研究者番号: 60756732