

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07024

研究課題名(和文) 複数の抗原を特異的に認識する抗体の抗原認識機構の解明

研究課題名(英文) Understanding of antigen recognition mechanism of multispecific antibodies

研究代表者

鎌足 雄司 (KAMATARI, Yuji)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：70342772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、多くの免疫学の教科書に載っている「一つの抗体は一つの抗原を認識する」という概念から外れ、「複数の抗原を特異的に認識する」ことのできる抗体G2を発見している。本研究の目的は、このG2の抗原認識機構を解明することである。本研究により、タンパク質の構造揺らぎが異なる3つの準安定構造を可能とし、それぞれが異なる抗原を認識することで複数の抗原を特異的に認識することが可能となっていることを明らかにした。本研究のさらなる発展は、抗体の抗原認識の概念の拡張、蛋白質の分子進化の理解、さらには、二つの経路を同時に阻害するという新規抗体医療創出に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In general, a monoclonal antibody (mAb) bind only one antigen (Ag). However, we found an mAb G2 capable of specifically recognizing multiple Ags. The purpose of this study is to understand the Ag recognition mechanism of G2. This study suggested that the Ag-binding site of G2 was flexible in the free form and capable of adapting to at least three different conformations to enable interactions with three different Ags. Further development of this research may lead to extension of the concept of Ag recognition of mAbs, understanding of molecular evolution of proteins, and creation of novel antibody medicine that inhibits two pathways at the same time.

研究分野：生物物理学

キーワード：タンパク質 抗体 抗原認識機構 揺らぎ 準安定状態 NMR

## 1. 研究開始当初の背景

最近我々は、多くの免疫学の教科書に載っている「一つの抗体は一つの抗原を認識する」という概念から外れ「複数の抗原を特異的に認識する」ことのできる抗体 G2 を発見した (Kamatari et al., Protein Sci. 23, 1050-1059, 2014)。これまでも同様な抗体は数例報告されている (James et al., Science 299, 1362-1367, 2003 など) が、複数の抗原を特異的に認識できる仕組みは分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、この G2 の抗原認識機構を構造生物学や生物物理学的な立場から研究し解明することである。

## 3. 研究の方法

エピトープ配列の同定は下記のように行った。標的蛋白質の DNA 配列の一部をプラスミド pRSET-B に挿入し、大腸菌 BL21 を用い発現し、発現蛋白質と G2 との結合をウェスタンブロットによって評価した。これによりエピトープ配列を 30 アミノ酸程度まで絞り込み、その後は合成ペプチドと G2 の親和性を ELISA により評価し、エピトープ配列を決定した。

NMR 実験、及び、G2 変異体を用いた実験には、一本鎖可変領域抗体 (scFv) を用いた。NMR 実験により、複合体形成による構造変化を観測した。これは、<sup>15</sup>N 安定同位体標識した scFv に、抗原ペプチドを添加し、岐阜大学の極低温プローブを備えた 800MHz NMR を用いて行った。G2 変異体を用いた実験により、G2 の軽鎖可変領域 95 番目にプロリン残基を挿入した変異体 (G2VL95P) の抗原ペプチドとの親和性を調べた。これは、scFv と GST 融合抗原ペプチドとの相互作用を、表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて評価することにより行った。

## 4. 研究成果

これまでの研究で G2 は 4 つの異なる蛋白質を認識することを明らかにしていたが、そのエピトープ配列については、免疫源としたトリプリオン蛋白質 (ChPrP) ともう一つの蛋白質 ATP6V1C1 についてのみ明らかにしていた (Kamatari et al., Protein Sci. 23, 1050-1059, 2014)。本研究では、G2 の認識する 3 つめのタンパク質 SEPT3 の中のエピトープ配列 (Pep395) を同定した (Mahmud et al., Protein Sci. 26, 2162-2169, 2017)。この配列は、ChPrP 中のエピトープ (Pep18mer) とともに、G2 の認識するもう一つのタンパク質 ATP6V1C1 中のエピトープ (Pep8) とともに大きく異なっていた。3 つの全く異なる配列を強く認識できる抗体の報告は初めてであった。

また、scFv と NMR を用いた抗原ペプチドの結合実験を行い、抗原ペプチドの結合により抗体側の構造及び揺らぎが大きく変化することを明らかにした。NMR の結合実験より、抗原非結合の G2 の構造は比較的フレキシブルであり、これが複合体を作ることにより揺らぎの抑えられた一つの構造に収束することを見いだした。さらに、異なる抗原ペプチドを結合した G2 の構造はそれぞれ異なることを示した。これらの情報に基づき我々は、タンパク質の構造揺らぎが、異なる 3 つの準安定構造を可能とし、それぞれが異なる抗原を認識するというモデルを提唱した (図 1)。

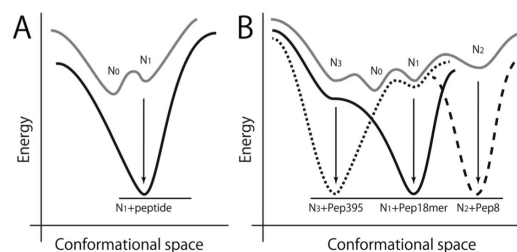


図 1: 通常の mAb (A) と G2 (B) のエネルギーランドスケープの比較。G2 の抗原非結合 (灰色) コンフォメーションは柔軟であり、N<sub>1</sub>、N<sub>2</sub>、および、N<sub>3</sub> を含むいくつかの

ンフォメーション間で揺らいでいる。抗原ペプチド Pep18mer 存在下では、G2 は抗原非結合(灰色)または Pep18mer 結合(黒色)の2つのエネルギーランドスケープのうちの一つに存在する。同様に、Pep8 存在下では抗原非結合(灰色)または Pep8 結合(破線)、Pep395 存在下では抗原非結合(灰色)または Pep395 結合(点線)のいずれかに存在する。

さらに、我々は G2 の原型の抗体(G2VL95P)は、3 つ目の抗原(SEPT3)を認識する抗体で、軽鎖可変領域の 95 番目の Pro の欠損により、抗体作成に使った ChPrP への結合能を獲得したことを見いだした(Usui et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 490, 1205, 2017)。

また我々は、タンパク質の揺らぎが G2 の特殊な認識機構を可能としていると考えている。その基盤となるこれまでのタンパク質の揺らぎに関する知見を総説としてまとめた(Li et al., *Subcell Biochem.* 72, 237-57, 2015; Li et al., *Chin. J. Mag. Res.* 33, 1-26, 2016)。

本研究により、G2 のユニークな抗原認識機構や抗体の分子進化の一端が明らかにされた。本研究のさらなる発展は、蛋白質の機能発現機構の解明、抗体の抗原認識の概念の拡張、蛋白質の分子進化の理解、さらには、二つの経路を同時に阻害するという新規抗体医療創出にも繋がる可能性がある。

#### 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 11 件 )

Y. Miyazaki, T. Ishikawa, Y. O. Kamatari, T. Nakagaki, H. Takatsuke, D. Ishibashi, K. Kuwata, N. Nishida, R. Atarashi, Identification of alprenolol hydrochloride as an anti-prion compound using surface plasmon resonance imaging, *Mol. Neurobiol.* in press, (2018).

Y. Ohhashi, Y. Yamaguchi, H. Kurahashi, Y. O. Kamatari, S. Sugiyama, B. Uluca, T. Piechatzek, Y. Komi, T. Shida, H. Müller, S. Hanashima, H. Heise, K. Kuwata, M. Tanaka, Molecular basis for diversification of yeast prion strain conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 115, 2389-2394, (2018).

M. N. Mahmud, M. Oda, D. Usui, Y. Inoshima, N. Ishiguro, Y. O. Kamatari, A multispecific monoclonal antibody G2 recognizes at least three completely different epitope sequences with high affinity. *Protein Sci.* 26, 2162-2169, (2017).

D. Usui, S. Inaba, Y. O. Kamatari, N. Ishiguro, M. Oda, Light-chain residue 95 is critical for antigen binding and multispecificity of monoclonal antibody G2. *Biochem Biophys Res Commun.* 490, 1205-1209, (2017).

S. Endo, S. Takada, R. P. Honda, K. Müller, J. H. Weishaupt, P. M. Andersen, A. C. Ludolph, Y. O. Kamatari, T. Matsunaga, K. Kuwata, O. El-Kabbani, A. Ikari, Instability of C154Y variant of aldo-keto reductase 1C3, *Chem Biol Interact.* in press. (2016).

A. Kabir, S. Endo, N. Toyooka, M. Fukuoka, K. Kuwata, Y. O. Kamatari, Evaluation of compound selectivity of aldo-keto reductases using differential scanning fluorimetry, *J Biochem.* 161, 215-222 (2016).

A. Kabir, R. P. Honda, Y. O. Kamatari, S. Endo, M. Fukuoka, K. Kuwata, Effects of ligand binding on the stability of aldo-keto reductases: Implications for stabilizer or

destabilizer chaperones, *Protein Sci.* 25, 2132-2141 (2016).

H. Li, Y. O. Kamatari, R. Kitahara, K. Akasaka, Application of high pressure NMR in the study of protein structure and dynamics, *Chinese J Magn Reson.* 33, 1-26 (2016).

J. Hosokawa-Muto, K. Yamaguchi, Y. O. Kamatari, K. Kuwata, Synthesis of double-fluorescent labeled prion protein for FRET analysis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 79, 1802-1809 (2015).

H. Li, Y. O. Kamatari, Cavities and excited states in proteins, In *High Pressure Bioscience* (K. Akasaka, H. Matsuki eds.), Springer, 237-257 (2015).

H. Noguchi, T. Ikegami, A. Nagadoi, Y. O. Kamatari, S. Y. Park, J. R. H. Tame, S. Unzai, The structure and conformational switching of Rap1B. *Biochem Biophys Res Commun.* 462, 46-51 (2015).

[学会発表](計 27 件)

鎌足雄司, 標的蛋白質と低分子と低分子化合物との相互作用を検証する, 第 7 回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム, 2018 年 3 月 22 日, 岐阜.

鎌足雄司, 複数の抗原を特異的に認識する抗体 G2 の抗原認識機構の解明, 平成 29 年度生物物理学会中部支部講演会, 2017 年 3 月 5 日, 名古屋.

M. N. Mahmud, M. Oda, D. Usui, Y. Inoshima, N. Ishiguro, Y. O. Kamatari, A three-in-one monoclonal antibody G2 recognizes completely different epitope sequences with high affinity, 抗体 G2 は異なる 3 つの配列を強く特異

的に認識する, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017 年 9 月 19-21 日, 熊本.

Y. O. Kamatari, Protein dynamics and molecular evolution, 9th International Meeting on Biomolecules under Pressure (IMBP2017), 2017 年 8 月 20-24 日, 京都.

K. Murayama, Y. Kamatari, S. Ohno, M. Sonoyama, Y. Sawada, S. Matusda, Interaction between Calmodulin and Bisphenol A, 19th IUPAB congress and 11th EBSA congress, 2017 年 7 月 16 日-20 日, Edinburgh, UK.

村山幸市, 鎌足雄司, 大野敏, 園山正史, 沢田義治, 松田禎行, ビスフェノール A 結合に伴うアポ型カルモデュリンの構造変化の解析, 第 44 回生体分子科学討論会, 2017 年 6 月 23 日, 秋田.

臼井大樹, 鎌足雄司, 稲葉理美, 織田昌幸: 複数のエピトープを認識する G2 の 1 本鎖抗体の構造解析, Structural analysis of a single-chain Fv antibody of G2 that recognizes multiple epitopes, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年 11 月 25-27 日, 筑波.

M. N. Mahmud, Y. Inoshima, N. Ishiguro, Y. O. Kamatari: Identification of the third epitope recognized by multispecific antibody G2, 複数の抗原を特異的に認識する抗体 G2 の 3 つめのエピトープの同定, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016 年 11 月 25-27 日, 筑波.

アウロンゴゼブ コビル, 遠藤 智史, 豊岡 尚樹, 福岡 万佑子, 桑田 一夫, 鎌足 雄司, 示差走査型蛍光定量法を用いたアルドケト還元酵素の化合物選択性の評価, Evaluation of compound selectivity of aldo-keto reductases using differential scanning

fluorimetry, 第 54 回日本生物物理学会  
年会, 2016 年 11 月 25-27 日, 筑波.

末松佑磨, 鎌足雄司, 林勇樹, 新井宗仁,  
アルカン合成酵素の NMR と分子動力学シ  
ミュレーションによるダイナミクス解  
析, Structural dynamics of an alkane  
synthase studied by NMR and molecular  
dynamics simulations, 第 54 回日本生  
物物理学会年会, 2016 年 11 月 25-27 日,  
筑波.

鎌足雄司, 臼井大樹, 石黒直隆, 織田昌  
幸, 複数の抗原を特異的に認識する抗  
体 G2 の抗原結合による構造及び揺らぎ  
の変化, Structural and dynamical  
changes of multispecific antibody G2  
induced by binding of different  
antigens, 第 55 回 NMR 討論会, 2016 年  
11 月 16-18 日, 広島.

鎌足雄司, 蛋白質の構造揺らぎと機能  
発現, 第 17 回若手 NMR 研究会, 2016 年  
9 月 10-12 日, 箱根.

D. Usui, S. Shimizu, M. Oda, N.  
Ishiguro, Y. O. Kamatari, Structural  
and dynamical changes of  
multispecific antibody G2 induced by  
binding of different antigens, The  
27th International Conference on  
Magnetic Resonance in Biological  
Systems (ICMRBS2016), 2016 年 8 月  
21-26 日, 京都.

K. Yamaguchi, Y. O. Kamatari, R. P.  
Honda, K. Kuwata, Real-time in vitro  
conversion of prion protein detected  
by NMR, The 27th International  
Conference on Magnetic Resonance in  
Biological Systems (ICMRBS2016), 2016  
年 8 月 21-26 日, 京都.

末松佑磨, 鎌足雄司, 林勇樹, 新井宗仁,  
アルカン合成酵素 AD の NMR と分子動力  
学シミュレーションによるダイナミク

ス解析, 第 16 回日本蛋白質科学会年会,  
2016 年 6 月 7-9 日, 福岡.

Y. O. Kamatari, K. Kuwata,  
Classification of anti-prion  
compounds based on the binding  
properties to prion proteins, PRION  
2016 Tokyo in conjunction with Asian  
Pacific Prion Symposium 2016  
(APPS2016), 2016 年 5 月 10-13 日, 東  
京.

鎌足雄司, タンパク質の構造揺らぎと  
機能発現, 第 5 回岐阜構造生物学・医  
学・論理的創薬研究会シンポジウム,  
2016 年 3 月 10 日, 岐阜.

鎌足雄司, タンパク質の構造揺らぎと  
機能発現, 津田沼分子科学フォーラム,  
2016 年 2 月 20 日, 千葉.

藤澤哲郎, 大山恭平, 亀山啓一, 吉田  
豊和, 鎌足雄司, 石黒亮, <sup>1</sup>H NMR を用い  
たニトリラーゼのホモオリゴマー形成  
の追跡, 第 54 回 NMR 討論会, 2015 年 11  
月 6-8 日, 千葉.

鎌足雄司, プリオンタンパク質を標的  
とした創薬における NMR の利用, 平成  
27 年日本分光学会 NMR 部会集中講義,  
2015 年 9 月 30 日, 名古屋.

⑲ Y. O. Kamatari, A. Kabir, S. Endo, K.  
Kuwata, 示差走査型蛍光定量法を用い  
たアルドケト還元酵素阻害剤の選択性  
の評価 (Evaluation of selectivity of  
aldo-keto reductase inhibitors using  
differential scanning fluorimetry),  
第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年  
9 月 13-15 日, 金沢.

⑳ S. Inaba, Y. O. Kamatari, H. Sekiguchi,  
H. Fukada, M. Oda, Spectroscopic and  
calorimetric analysis for  
conformational stability of c-Myb  
DNA-binding domain under different pH  
conditions, 第 53 回日本生物物理学会

年会, 2015年9月13-15日, 金沢.

- ⑳ Y. O. Kamatari, J. Hosokawa-Muto<sup>1</sup>, K. Yamaguchi, K. Kuwata, Strategy for elucidating abnormal structures of prion proteins using the double-fluorescent labeling method and FRET analysis, Asian Pacific Prion Symposium 2015 (APPS2015), 2015年9月4-5日, 金沢.
- ㉑ M. Tanaka, T. Shida, Y. O. Kamatari, K. Kuwata, Structural basis of cross-species prion transmission, Asian Pacific Prion Symposium 2015 (APPS2015), 2015年9月4-5日, 金沢.
- ㉒ Y. O. Kamatari, H. Li, Cavity and hydration as a source of protein dynamics and function, The International Society of Magnetic Resonance (ISMAR2015), 2015年8月16-21, Shanghai, China.
- ㉓ 志田俊信, 鎌足雄司, 山口芳樹, 桑田一夫, 田中元雅, 構造生物学的手法を用いた異種間プリオン蛋白質の相互作用解析, 第16回日本蛋白質科学会年会, 2015年6月24-26日, 徳島.
- ㉔ 鎌足雄司, 構造生物学・医学・論理的創薬拠点の維持と発展のために, 第四回岐阜構造生物学・医学・論理的創薬研究会シンポジウム, 2015年3月5日, 岐阜.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~kamatari/>

<http://researchmap.jp/kamatari/>

[https://www.researchgate.net/profile/Yuji\\_Kamatari](https://www.researchgate.net/profile/Yuji_Kamatari)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鎌足 雄司 (KAMATARI, Yuji)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号: 70342772

### (2) 研究分担者

織田 昌幸 (ODA, Masayuki)

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号: 20318231

### (3) 連携研究者

桑田 一夫 (KUWATA, Kazuo)

岐阜大学・連合創薬医療情報研究科・教授

研究者番号: 00170142

石黒 直隆 (ISHIGURO, Naotaka)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 00109521

赤坂 一之 (AKASAKA, Kazuyuki)

近畿大学・先端技術総合研究所・教授

研究者番号: 50025368

### (4) 研究協力者