

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18113

研究課題名(和文)抗体変異体バーチャルライブラリの構築と機械学習を用いたスクリーニング系の確立

研究課題名(英文)Engineering antibody stability using molecular simulations and machine learning

研究代表者

黒田 大祐(Kuroda, Daisuke)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師

研究者番号：60756732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コンピュータ技術を用いて、合理的に抗体の物理的安定性を制御する手法を開発することを目的とした。(1)コンピュータ上での変異導入実験によって、6000以上の変異体を含む、バーチャルライブラリを作成した。その中に、親和性を維持したまま熱安定性が向上している変異体が存在することを、示差走査熱量計とELISAを用いて実験的に確認した。(2)安定な抗体と不安定な抗体のアミノ酸配列を比較し、安定性向上のための変異を同定した。分子シミュレーションを用いることで、その安定化要因を明らかにすることができた。こうして得られた変異体情報をもとに、機械学習による抗体安定性評価のための予測モデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

物質を分子レベルで自在に設計・制御する技術は、多くの研究者にとって「夢の技術」である。蛋白質の物性を自在に制御できるようになれば、基礎研究のみならず、蛋白質医薬品や新規素材開発への応用など、その社会へのインパクトも大きい。代表者が本助成により開発してきた計算・情報科学技術と、蛋白質工学や物理化学測定の実験手法を融合させることで、新たな分子操作技術の開発へ向けた次世代蛋白質工学への展開が期待できる。本研究で開発に取り組んだ、生体分子の物性を自在に制御するコンピュータシステムにより、将来的には抗体の完全人工設計や人工蛋白質の創製など、「夢の技術」の実現につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a method to control the physical stability of antibodies using computational technology.

(1) We have created virtual libraries containing more than 6000 mutants by mutagenesis experiments in a computer. we have experimentally confirmed by using a differential scanning calorimeter and ELISA that there are mutants with improved thermal stability while maintaining affinity.

(2) We have compared amino acid sequences of a stable antibody and an unstable antibody, and mutations for stability improvement were identified. We were able to clarified stabilizing factors by using the molecular simulation. Based on the mutant information thus obtained, a prediction model for evaluating antibody stability by machine learning was constructed.

研究分野：分子設計、情報科学

キーワード：抗体設計 タンパク質工学 分子シミュレーション 機械学習 データベース

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の免疫系に関わる抗体分子は、異物に対して高い特異性を持ち、生体防御を担っている。抗体に関する研究は、生体分子の特異的分子認識機構に関する知見を与えるだけではなく、近年注目を集めている抗体医薬品などの開発にもつながる。物質を分子レベルで自在に設計・制御する技術は、多くの研究者にとって「夢の技術」である。そうした「夢の技術」の実現に向けて、蛋白質の分子設計は、「蛋白質工学」として 1980 年台から盛んに行われてきた。これらは、人間が望む機能を持つ蛋白質を目指して、遺伝子操作などでアミノ酸配列を改変し、機能性蛋白質を創製する技術を確立する学問である(油谷克英・中村春木, 1991, 蛋白質工学, 朝倉書店)。

現状の機能性蛋白質の創製では、ファージディスプレイを用いる方法が主流である。これらは、抗原への「ランダム」な結合を基に蛋白質を選抜するため、物性の制御が難しい。創薬の現場では、抗体製剤の長期保存の必要性から、「熱安定性」や「凝集性」が近年主要な研究課題となっている(図 1)。そのため、抗体自身の物理的安定性向上のための分子操作技術の開発が望まれている。また、近年、コンピュータを用いた蛋白質の設計例が報告され始めている。しかし、現在さまざまな分野で注目を集めている「人工知能(機械学習)」は、生命情報科学分野の予測問題に広く使われている一方で、実際の蛋白質工学への応用例は少ないのが現状であった。



図 1: Scopus から得られた、キーワードとして「antibody」「stability」「aggregation」を含む文献数。

2. 研究の目的

蛋白質の物性を自在に制御できるようになれば、基礎研究のみならず、蛋白質医薬品や新規素材開発への応用など、その社会へのインパクトも大きい。代表者のこれまでの研究成果から、免疫系に関わる蛋白質である抗体分子のアミノ酸配列-立体構造間の関係性が見出され、抗体アミノ酸配列からの精度の良い立体構造予測が可能になりつつある。そこで本研究では、立体構造予測問題から一歩先へ進み、物性に焦点を当て、合理的に抗体の物理的安定性を制御するための手法を開発することを目的とした。具体的には、(1)シミュレーションに基づく抗体変異体ライブラリの構築と(2)機械学習を用いたそのスクリーニング系の確立・実験による検証を試みた。

3. 研究の方法

(1) 分子シミュレーションを用いた抗体変異体のバーチャルライブラリの構築

- Protein Data Bank (PDB)中の構造既知の抗体を主な設計対象の 1 つとした。
- 構造未知の抗体 2 例に対して、申請者がこれまでに開発してきた手法で構造を予測し、予測構造をもとに分子設計を行った。
- Rosetta ライブラリを用いて、網羅的変異導入手法のプログラム開発を行い、それを標的抗体に対して適用した。

(2) 蛋白質工学実験と物理化学測定による検証

- 設計された複数の抗体変異体に対して、実際に遺伝子合成し、発現・精製を行った。
- 熱安定性を示差走査熱量計(DSC)により評価した。
- 凝集性を動的光散乱法(DLS)により評価した。

- 結合親和性を ELISA と表面プラズモン共鳴(SPR)により評価した。
- (3) 機械学習を用いた抗体変異体のスクリーニングと実験による検証
- 蛋白質の物理的安定性の情報を集積した ProTherm データベースや先行文献から、機械学習に用いる学習データを取得した。
 - 収集した変異/配列情報を蛋白質の構造環境に基づき分類し、特徴量を抽出した。アミノ酸組成、溶媒露出表面積、二次構造、計算により導出してエネルギーなどを用いた。
 - 抽出した特徴量をコンピュータに学習させ、分類器を構築した。分類器としては、サポートベクターマシンの、ニューラルネットワーク、ランダムフォレスト、ベイズ推定を用いた。機械学習のための Python ライブラリである、scikit-learn を用いた。
 - 現在、抽出した特徴量をもとに、抗体の立体構造データベースの構築も行っている。

4. 研究成果

- (1) 抗体の立体構造情報に基づき、コンピュータ上での変異導入実験によって、6000 以上の変異体を含む、バーチャルライブラリを作成した。評価関数による評価の上位 10 固程度の中から、実際に熱安定性が向上している変異体が存在することを、DSC を用いて実験的に確認した。それらの抗体は凝集性も改善されていたうえに、懸念していた親和性への影響も回避できていた。また、進化情報を取り入れることで、分子設計の精度が向上すること明らかにした。さらに、分子シミュレーションを用いることで、その安定化要因を探索した。抗体の分子設計のための新たな知見を得ることができた。
- (2) 安定な抗体と不安定な抗体のアミノ酸配列を比較し、熱安定性向上に寄与しているアミノ酸変異を実験的に同定した。これらの抗体は、その立体構造が明らかにされていないため、立体構造予測計算を実施した。予測構造をもとに、分子シミュレーションを実施することで、抗体の安定化要因を明らかにすることができた。また、不安定な抗体に対して、予測構造をもとに分子設計計算を実施したところ、熱安定性が向上する変異を同定できた。この結果は、抗体の立体構造情報がない場合でも、予測構造を用いることで、その物性の向上が可能であることを示唆している。さらに、実験により得られた測定データと分子シミュレーションの計算結果を比較することで、抗体 CDR-H3 と熱安定性の相関関係を明らかにした。
- (3) コンピュータを用いて、抗体 CDR-H3 領域の大規模な柔軟性の評価を行なった。これまでの通説とは異なり、親和性成熟前後で、立体構造の柔軟性の変化が常に伴うとは限らないことを明らかにした。現在、親和性成熟の過程を実験的に再現し、分子シミュレーションを駆使し、各変異の役割を解析している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kondo HX, Kiribayashi R, Kuroda D, Kohda J, Kugimiya A, Nakano Y, Tsumoto K, Takano Y	4. 巻 9
2. 論文標題 Effects of a remote mutation from the contact paratope on the structure of CDR-H3 in the anti-HIV neutralizing antibody PG16	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56154-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Eguchi A, Nakakido M, Nagatoishi S, Kuroda D, Tsumoto K, Nagamune T, Kawahara M	4. 巻 116
2. 論文標題 An epitope-directed antibody affinity maturation system utilizing mammalian cell survival as readout	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnology and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 1742 - 1751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bit.26965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kuroda D, Tsumoto K	4. 巻 1827
2. 論文標題 Antibody Affinity Maturation by Computational Design	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 15-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8648-4_2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jeliazkov JR, Sljoka A, Kuroda D, Tsuchimura N, Katoh N, Tsumoto K, Gray JJ	4. 巻 9
2. 論文標題 Repertoire analysis of antibody CDR-H3 loops suggests affinity maturation does not typically result in rigidification	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshida K, Kuroda D, Kiyoshi M, Nakakido M, Nagatoishi S, Soga S, Shirai H, and Tsumoto K	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Exploring designability of electrostatic complementarity at an antigen-antibody interface directed by mutagenesis, biophysical analysis, and molecular dynamics simulations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-40461-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 黒田 大祐, 津本浩平	4. 巻 36(11)
2. 論文標題 コンピュータ技術による抗体分子設計	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 1859-1866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miyabe K, Akiba H, Kuroda D, Nakakido M, Kusano-Arai O, Iwanari H, Hamakubo T, Caaveiro JMM, Tsumoto K	4. 巻 in press
2. 論文標題 Intramolecular H-bonds govern the recognition of a flexible peptide by an antibody	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kiyoshi M, Caaveiro JMM, Tada M, Tamura H, Tanaka T, Terao Y, Morante K, Harazono A, Hashii N, Shibata H, Kuroda D, Nagatoishi S, Oe S, Ide T, Tsumoto K, Ishii-Watabe A	4. 巻 8:3955
2. 論文標題 Assessing the Heterogeneity of the Fc-Glycan of a Therapeutic Antibody Using an engineered Fc Receptor IIIa-Immobilized Column	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi:10.1038/s41598-018-22199-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashiguchi T, Fukuda Y, Matsuoka R, Kuroda D, Kubota M, Shirogane Y, Watanabe S, Tsumoto K, Kohda D, Plemper RK, Yanagi Y	4. 巻 115(10)
2. 論文標題 Structures of the prefusion form of measles virus fusion protein in complex with inhibitors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America	6. 最初と最後の頁 2496-2501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1073/pnas.1718957115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Kuroda D
2. 発表標題 Exploring antibody designability through physicochemical analyses, mutagenesis, and computations
3. 学会等名 分子研研究会「New Frontiers in Protein Design and Engineering: Structure, Function, and Application」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田 大祐
2. 発表標題 コンピュータを用いた抗体工学研究
3. 学会等名 第4回蛋白質工学研究会ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田 大祐
2. 発表標題 コンピュータ技術を用いたタンパク質のモデリング計算とその応用
3. 学会等名 東京大学 工学部 化学生命工学科 講演会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 河上恵理, 黒田大祐, 中木戸誠, 津本浩平
2. 発表標題 分子シミュレーションと物理化学解析による抗体の熱安定性に関する研究
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 KAWADE, Raiji; AKIBA, Hiroki; NAKAKIDO, Makoto; KURODA, Daisuke; MARUYAMA, Toshiaki; OKUMURA, Shigeru; ENTZMINGER, Kevin; CAAVEIRO, Jose; TSUMOTO, Kouhei
2. 発表標題 Structural, physicochemical and computational analysis to reveal the mechanism of recognition of phosphorylated antigen by an antibody
3. 学会等名 日本化学会第98春季年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒田大祐
2. 発表標題 コンピュータ技術を用いたタンパク質のモデリング計算とその応用
3. 学会等名 東京大学工学部化学生命工学講演会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桐林遼, 近藤寛子, 黒田大祐, 齋藤徹, 香田次郎, 釘宮章光, 中野靖久, 津本浩平, 鷹野優
2. 発表標題 分子動力学シミュレーションによる抗HIV中和抗体PG16のCDR-H3の変異における構造への影響
3. 学会等名 第5回生命分子科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Emina Ikeuchi, Daisuke Kuroda, Makoto Nakakido, Maiko Yoshida, Narutoshi Tsukahara, Akikazu Murakami, Kouhei Tsumoto
2. 発表標題 Analysis of the denaturation midpoint to design the VHH with high thermal stability
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of the Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田浩平, 木吉真人, 黒田大祐, 中木戸誠, 長門石暁, 曾我真司, 白井宏樹, 津本浩平
2. 発表標題 アミノ酸電荷交換に関する抗原-抗体相互作用の物理化学解析
3. 学会等名 第45回 構造活性相関シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kouhei Yoshida, Masato Kiyoshi, Daisuke Kuroda, Makoto Nakakido, Satoru Nagatoishi, Shinji Soga, Hiroki Shirai, Kouhei Tsumoto
2. 発表標題 Physicochemical analysis of antigen-antibody interaction associated with charge exchange of amino acids, Kouhei Yoshida, Masato Kiyoshi
3. 学会等名 The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 桐林遼, 近藤寛子, 黒田大祐, 齋藤徹, 香田次郎, 釘宮章光, 中野靖久, 鷹野優
2. 発表標題 MD法による抗HIV抗体PG16のCDR-H3の変異における中和能への影響の解析
3. 学会等名 日本化学会中国四国支部大会鳥取大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryo Kiribayashi, Hiroko X. Kondo, Daisuke Kuroda, Toru Saito, Jiro Kohda, Akimitsu Kugimiya, Yasuhisa Nakano, Yu Takano
2. 発表標題 Molecular dynamics study of mutation effects on the neutralizing ability in CDR-H3 of an anti-HIV antibody PG16
3. 学会等名 Swedish-Japanese Workshop on Nano-Structure Science by Novel Light Sources (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮鍋 一紘、秋葉 宏樹、カアベイロ ホセ、黒田 大祐、中木戸 誠、高松 祐一郎、山下 雄史、津本 浩平
2. 発表標題 抗原配列の硫酸化が抗体との相互作用に与える影響の熱力学的解析
3. 学会等名 第11回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考