

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06161

研究課題名（和文）親和性成熟に伴う抗体の抗原認識機構変化と動的構造変化の解明

研究課題名（英文）Alteration of antigen recognition and structural dynamics of antibodies during affinity maturation

研究代表者

織田 昌幸（Oda, Masayuki）

京都府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：20318231

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ニトロフェニル（NP）に対する抗体の親和性成熟に着目し、その各種抗体の一本鎖Fv抗体（scFv）を作製して、構造、機能、物性を解析した。成熟型のC6 scFvとNPとのX線結晶構造を解明し、親和性を強める分子認識の構造基盤を明らかにした。また抗NP抗体の鍵になる重鎖95番のアミノ酸がGlyである一連のscFvを調製し、その機能物性を解析した結果、成熟型ではgermline型よりも熱安定性が低いものの、NP結合により上昇することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内での抗体の親和性成熟の構造基盤を解明し、如何に抗原結合能を高めるかといった抗体医薬分野へも応用可能な知見を得た。また抗体の抗原結合能と熱安定性がトレードオフ関係にあることを示し、蛋白質科学的な抗体の理解のみならず、免疫学的な意義、すなわち抗原結合前の不安定化は結合後の安定化で補われるという知見を得て、今後の蛋白質ラショナルデザイン全般に活かされる。

研究成果の概要（英文）：Single-chain Fv (scFv) antibodies against nitrophenyl (NP) on the process of affinity maturation were generated, and their structural, functional, and physical properties were analyzed. The X-ray crystal structure of NP complexed with C6 scFv, affinity-matured type, was determined, showing the structural basis of molecular recognition. The change in thermal stability was analyzed for the scFvs possessing Gly at residue 95 of heavy chain. The stability of germline-type scFv was higher than that of affinity-matured type, which was increased upon NP binding.

研究分野：蛋白質科学

キーワード：抗体 抗原結合 安定性

1. 研究開始当初の背景

抗体は様々な抗原を特異的に認識し、結合する。この認識機構は、蛋白質全般の分子認識の理解に役立ち、蛋白質工学的应用にも繋がる。一方で、多くの蛋白質の立体構造が X 線や NMR などでも明らかにされている今もなお、より結合力の強い高機能化蛋白質の創製など容易ではない。その困難さの主要因として、蛋白質の「動き」の理解が不十分であることが挙げられる。多くの蛋白質の立体構造は、最安定または平均的な静的構造であるが、蛋白質は溶液中で揺らいでおり、この「動き」により、相手分子に応じて大小様々に構造を変化させ、特異的に結合する。例えば抗体医薬の分野においても、高機能化抗体のラショナルデザインが世界的に求められており、「動き」の理解は同分野の進展にも大きく貢献する。

親和性成熟過程にある抗体の抗原認識機構を研究する上で、これこそ「自然界の蛋白質工学」で、人工的な「蛋白質工学」にも応用できる。抗体の親和性成熟とは、抗体可変領域の遺伝子再構成に加え、体細胞突然変異による可変領域のアミノ酸置換などにより、免疫原に対する結合親和性を高める現象で、生体内で抗体の創製と選択が繰り返され、最終的には抗原結合親和性の高い抗体が産生されるものである。本申請者は、ニトロフェニル (NP) を免疫原とし、産生される抗体をモノクローナル化して、免疫初期から後期にいたる各種モノクローナル抗体の抗原認識機構を解析してきた。非常に興味深いことに、免疫初期では重鎖 33 番のアミノ酸が Trp から Leu に変わること、結合定数 K_a が 10^5 M^{-1} から 10^7 M^{-1} 程度にまで上昇する一方、免疫後期では重鎖 33 番のアミノ酸は Trp のままで、重鎖 95 番のアミノ酸が Tyr から Gly に変わること、 K_a が 10^9 M^{-1} 程度にまで上昇することが明らかになった。すなわち、これら 2 つのアミノ酸が鍵となり、他のアミノ酸置換もあわせて、NP に対する結合力を高める「蛋白質工学」が、マウス生体内で行われている。本申請者は、これら自然現象をラショナルデザインに応用すべく、抗体可変部を一本鎖化した single-chain Fv (scFv) を創製し、その構造や機能、物性の解析を始めた。組換え scFv では、1) 特定部位にアミノ酸置換を施せるだけでなく、2) N 末や C 末へのタグの導入で、scFv の構造や機能を損なうことなく基板表面などに固定化でき、さらに 3) 低分子化により NMR 解析が可能となる、など、その利点は大きい。一例として主に 2) の利点を活かし、高輝度放射光を用いた X 線 1 分子回折実験 (DXT) により、抗原結合に伴う scFv の動きの抑制を検出し、論文発表した。

抗 NP 抗体の親和性成熟過程で、鍵となる重鎖 33 番と 95 番のアミノ酸の組み合わせ、A; Trp33, Tyr95, B; Leu33, Tyr95, C; Trp33, Gly95, D; Leu33, Gly95、の各変異体を作製し、その抗原結合能と熱安定性を解析した。D グループの抗体は、自然界では見出されなかったタイプであり、このようにモノクローナル抗体だけではカバーできない多様な抗体の解析が、本研究では可能となる。さらに免疫初期の germline 型となる A グループの抗体 N1G9 scFv は、免疫後期の親和性成熟型となる C グループの抗体 C6 scFv よりも、熱安定性が 20 近く高いことを明らかにし、論文発表した。

2. 研究の目的

抗体医薬など応用研究を見据えた場合、抗原結合力を高めるとともに、安定性を高めることも重要課題であり、本研究の主題「抗体の高機能化」における二本柱とした。抗 NP 抗体の 33 番と 95 番の各アミノ酸の違いに着目すべく、免疫初期に産生される N1G9 (A; Trp33, Tyr95) と、免疫後期に産生される C6 (C; Trp33, Gly95) さらに各 Trp33 を Leu に置換した N1G9_W33L (B; Leu33, Tyr95) と C6_W33L (D; Leu33, Gly95) の各 scFv を調製し、個々の抗原結合能と安定性を評価することで、親和性成熟の方向性を理解し、同時に蛋白質工学への応用展開を志向した。また X 線結晶構造としては、N1G9 のみ既知であったことから、C6 scFv と NP との複合の結晶構造を解明し、親和性成熟の構造基盤の理解を目指した。またこれらの研究を通じて、親和性成熟が、熱安定性の低下という「トレードオフ」関係にあったことから、その一般化を検証すべく、C グループの抗体の免疫初期の germline 型、9TG と、C6 よりさらに成熟が進んだ 9'7 や E11 の各 scFv も作製して、これらの抗原結合力と安定性の解明を目指した。さらに C6 scFv を対象として、抗原結合解離に伴う経時的な動的構造変化を解明すべく、溶液中にケージドプロトン混在させ、レーザー照射により溶液 pH を瞬時に下げることで、抗原解離を促し (酸性 pH では抗原 NP の水酸基が phenolic になり、抗 NP 抗体の抗原結合力が大きく低下する) その変化を DXT で解析することを目論んだ。

3. 研究の方法

大腸菌大量発現系を利用して、各種抗 NP 抗体 scFv を調製した。抗原結合能は、等温滴定熱量計 (ITC) や表面プラズモン共鳴バイオセンサー (SPR) を用いて、熱力学的、及び速度論的に解析した。安定性は、円二色性分散計 (CD) や示差走査熱量計 (DSC) を用いて解析した。各種 scFv と NP との複合体について、結晶化を行い、高輝度放射光施設を利用して X 線結晶構造解析を行った。DXT は、scFv の N 末端側に付加する His-tag を介して基板上に固定化し、さらに金ナノ結晶を付加して、高輝度放射光施設にて白色光を照射、金の回折点を経時的に観測し

た。

4. 研究成果

C6 scFv 抗体と NP との複合体の結晶化に成功し、高分解能で立体構造を決定した (図 1)。既報の親和性成熟前の抗体 N1G9 の結晶構造と比較し、抗原結合親和性向上の要因を解明した。特に成熟の鍵となる抗体重鎖 95 番のアミノ酸残基の役割について、主に同残基に続くループ構造に与える影響から、初めてその構造基盤を明らかにした。N1G9 と比べて、重鎖 CDR3 ループの構造が大きく異なり、この構造に Gly95 が大きく貢献することを明らかにした。さらに同構造情報に基づき、重鎖の Arg58 と His102 の役割に着目し、各アミノ酸置換体を調製して、抗原結合能への影響等を解析している。

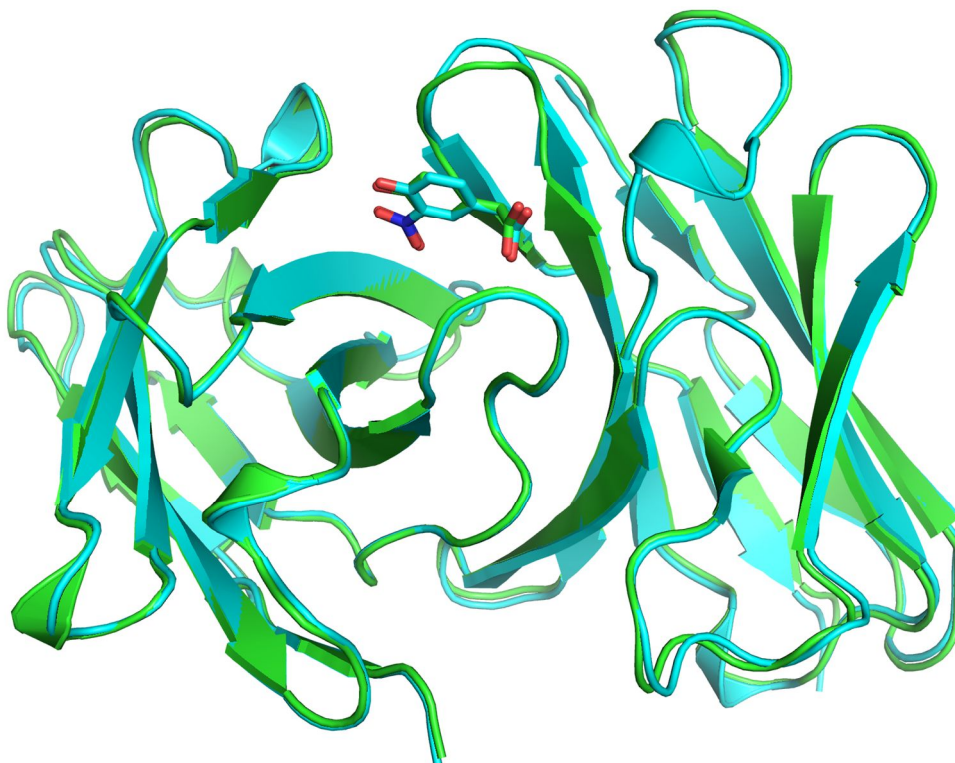


図 1、C6 scFv と NP との複合体の X 線結晶構造 (PDB code; 6K4Z)

着目する重鎖 95 番を C6 と同じく Gly として、他のアミノ酸配列を系統的に変えて親和性成熟の分子機構を解明すべく、9TG、9T7、9T13 という一連の抗 NP scFv 抗体、さらに C6 から成熟が進んだ E11 scFv 抗体を創製した。いずれも大腸菌不溶性画分からの可溶化、巻き戻しを経た調製となるため、機能構造を有する単量体 scFv の取得を目指し、抗原カラムとゲルろ過を併用して精製し、ITC で得られる NP との抗原結合比が、1:1 に近づくことを指標に調製した。ITC や SPR を用いた抗原結合解析の結果、結合力は C6 と比べて 9TG で低く、9T7、9T13、E11 で高いという予想される結果となった。一方、熱安定性は、抗原結合前で抗原結合力の強い抗体ほど低く、抗原結合に伴い安定化するという、N1G9 と C6 で示した先行研究の結果を支持した。重鎖 95 番のアミノ酸が Tyr から Gly に変わることで安定性が低下することも考えられたが、この仮定は否定され、免疫初期の germline 型全般では、抗原結合前でも一定の安定性が確保され、親和性成熟とともに同安定性が低下するものの、抗原結合に伴い安定性が回復する一般性が示唆された。これを蛋白科学的に考えると、抗原結合力の増大には、蛋白質構造の柔軟性が求められ、その結果として分子内結合が弱まり、安定性が低下、一方、抗原結合に伴い、その分子内結合も強くなるので、安定性は回復するものと考えられる。さらに免疫学的に考えると、免疫後期に産生される抗体は、周囲に抗原が多く存在する環境下で、産生直後に抗原結合し、結合前の不安定性は生体内での分解等デメリットも少ないのかもしれない。

C6 scFv と NP との混合溶液にケージドプロトン混在させる系では、予備実験段階で、プロトン解離に必要なレーザー強度の調整に多くの検討を要した。具体的には、レーザー強度が弱いと、溶液 pH を十分に下げられず、強いと DXT 基板のガラスの破損、あるいは固定化蛋白質の解離が認められた。溶液の緩衝液濃度を下げて、出来るだけ pH を変化させやすい環境下での複数回のレーザー照射により、溶液 pH を 7 から 5 程度にまで段階的に下げることに成功した。同条件下で、C6 scFv に結合した金ナノ結晶の回折スポットの経時変化から、C6 scFv の抗原結合時から解離にいたる運動性の変化を解析した。その結果、解離することで、運動性の低下が示

唆された。これは先行研究で、抗原非存在下（抗原結合前）での運動性が、抗原存在下（抗原結合後）よりも大きいことと一致しなかった。その要因としては、弱酸性 pH での C6 scFv の構造変化などが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishiguchi Akihiro, Numoto Nobutaka, Ito Nobutoshi, Azuma Takachika, Oda Masayuki	4. 巻 114
2. 論文標題 Three-dimensional structure of a high affinity anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl antibody possessing a glycine residue at position 95 of the heavy chain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 545 ~ 552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molimm.2019.09.001	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

1. 著者名 Yamaoka Takanori, Kamatari Yuji O., Maruno Takahiro, Kobayashi Yuji, Oda Masayuki	4. 巻 84
2. 論文標題 Structural and functional evaluation of single-chain Fv antibody HyC1 recognizing the residual native structure of hen egg lysozyme	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 358 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1683441	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西口 明宏、沼本 修孝、伊藤 暢聡、東 隆親、織田 昌幸
2. 発表標題 抗ニトロフェニル抗体の親和性成熟過程における抗原認識変化の構造基盤
3. 学会等名 日本農芸化学会関西支部第508回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Oda, Takachika Azuma
2. 発表標題 Increased antigen binding affinity and decreased thermal stability of an anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl antibody possessing a glycine residue at position 95 of the heavy chain
3. 学会等名 The 33th Annual Symposium of The Protein Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西口 明宏、沼本 修孝、伊藤 暢聡、東 隆親、織田 昌幸
2. 発表標題 抗二トロフェニル抗体の親和性成熟型一本鎖Fv抗体の抗原認識機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西口 明宏、佐藤 優穂、山岡 敬典、東 隆親、織田 昌幸
2. 発表標題 抗体の親和性成熟に伴う不安定化と抗原結合に伴う安定化
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西口 明宏、東 隆親、織田 昌幸
2. 発表標題 抗体の親和性成熟における抗原結合能と熱安定性の変化
3. 学会等名 第56回熱測定討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www2.kpu.ac.jp/life_envirom/biophys_chem/oda-ref.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------