

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06514

研究課題名（和文）ステレオタイプリウマトイド因子の分子認識基盤の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the molecular recognition of stereotype rheumatoid factor.

研究代表者

白石 充典（Shiroishi, Mitsunori）

東京理科大学・先進工学部生命システム工学科・准教授

研究者番号：00380527

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）：IGHV1-69由来リウマトイド因子（RF）であるYES8cとTS1，IGHV3-30由来RFであるRF-SJ1について，Fv-claspの形式で小型化し大量調製系を確立した。YES8cについてはFabと同様の結合性を示した。一方でRF-TS1のFv-claspはELISAとSPR解析で異なる結合性を示した。H鎖とL鎖の間の親和性が弱いことに起因する，抗原認識メカニズムである可能性が示唆される。またYES8cについて，L鎖のN末端が抗原認識に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ステレオタイプリウマトイド因子（RF）の元になる抗体の生殖系列遺伝子は、ウイルスや細菌毒素の中和抗体として頻繁に使われることが分かっており、慢性炎症と密接に関係していると言われている。ステレオタイプRFの普遍的な分子認識メカニズムを構造学的に明らかにすることで、慢性炎症から発展する種々の血液疾患に適した治療法の開発などに有益な情報をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have established a large-scale preparation system for YES8c, which is a rheumatoid factor (RF) derived from IGHV1-69, and RF-SJ1, which is an RF derived from TS1 and IGHV3-30, in the Fv-clasp format. YES8c Fv-clasp showed the same binding property as its Fab. On the other hand, Fv-clasp of RF-TS1 showed different binding in ELISA and SPR analysis. It is suggested that this may be due to the antigen recognition mechanism due to the weak affinity between the H chain and the L chain. For YES8c, it was suggested that the N-terminal of the L chain is involved in antigen recognition.

研究分野：タンパク質科学，構造生物学，生物物理学

キーワード：リウマトイド因子 自己抗体 分子認識 構造解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

リウマトイド因子 (RF) は IgG の Fc 領域に結合する自己抗体である。RF は長年関節リウマチの診断マーカーとして用いられてきた。一方、RF の免疫化学的特徴に関しては、B 細胞リンパ腫 (クリオグロブリン血症など) において血中に大量に放出された RF を用いて研究されてきた。慢性炎症性疾患や B 細胞リンパ腫において確認される RF は、ある決まった生殖系列遺伝子の組み合わせが頻出することが知られている。このように頻出する RF はステレオタイプリウマトイド因子と呼ばれ、特に IgG の Fc 領域を認識しやすい特徴を有していると考えられる。これまでのリウマトイド因子に関する研究では、アミノ酸配列の比較研究がほとんどであり、ほとんどの RF においては Fc に対する分子認識の構造的な理解は進んでいない。申請者は最近、マクログロブリン血症と関節リウマチを併発する患者由来のリウマトイド因子 YES8c と IgG1-Fc の複合体の結晶構造を 2.8Å 分解能で決定した (Shiroishi et al., J. Biol. Chem, 2018)。YES8c は生殖系列IGHV1-69/IGKV3-20の組み合わせからなるステレオタイプ RF である。申請者は立体構造からステレオタイプ RF の分子認識の特徴を提案した。

### 2. 研究の目的

リウマトイド因子 (RF) は IgG の Fc 領域に結合する自己抗体である。慢性炎症性疾患や B 細胞リンパ腫において確認される RF は、ある決まった生殖系列遺伝子の組み合わせが頻出することが知られている。このように頻出する RF はステレオタイプリウマトイド因子と呼ばれ、特に IgG の Fc 領域を認識しやすい特徴を有していると考えられる。

申請者は最近、生殖系列 IGHV1-69/IGKV3-20 の組み合わせからなるステレオタイプ RF である YES8c と IgG1-Fc の複合体の結晶構造を 2.8Å 分解能で決定し、立体構造からステレオタイプ RF の分子認識の特徴を提案した。本研究ではステレオタイプ RF が Fc に対して認識しやすい構造上の特徴とはどのようなものなのか、そしてそれらはステレオタイプ RF に共通の特徴であるのか、という点を明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

YES8c よりも高親和性であると考えられる IGHV1-69 由来 RF について、Fv-clasp および Fab の大量調製系を確立する。またステレオタイプ RF を産生する生殖系列として IGHV3-7 由来と IGHV4-59 由来のものが知られている。これらのステレオタイプ RF も IGHV1-69 と同様に血液疾患において高頻度で確認される。具体的な実験方法は以下の通りである。

#### (1) リウマトイド因子 Fv-clasp および Fab の大量調製

YES8c-Fc 複合体の結晶構造解析においては、分解能向上のためには結晶を大きく成長させる必要があり、かつ 2.8Å 分解能が限界であった。そこで各 RF について分解能の向上が期待できる Fv-clasp (Arimori et al., Structure, 2017, 図 3) の調製系も構築して結晶構造解析を行う。Fv-clasp は Fab と親和性および結合様式がほぼ同じであることが示されている。また本研究では RF を効率的に調製するために、大腸菌の分泌発現による RF-Fab の調製系を確立する。

#### (2) リウマトイド因子の相互作用解析

ELISA および表面プラスモン共鳴 (SPR) により RF と IgG-Fc の相互作用を解析する。ELISA による相互作用解析では、Fc をプレートに固定し、そこに His-tag などのタグを有する RF-Fab または Fv-clasp を結合させ、二次抗体でシグナルを検出する。また Biacore を用いた相互作用解析では、センサチップに IgG-Fc をアミンカップリングにより固定化し、RF-Fab または RF の Fv-clasp を流して結合を観察する。

#### (3) リウマトイド因子-Fc 複合体の結晶構造解析

調製した RF の Fab 断片あるいは Fv-clasp は IgG-Fc と複合体を形成させて、蒸気拡散法にて結晶化を行う。結晶化は市販のマトリックススクリーニングキットを用いて基本となる結晶化条件を探索し、さらに条件を最適化することで、構造解析に適した良質な結晶を作製する。得られた結晶は凍結し、放射光施設にて X 線回折データの収集を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) リウマトイド因子 Fv-clasp の調製

IGHV1-69 生殖系列遺伝子由来の RF の 1 つである YES8c について、その結合様式を詳細に調べるために Fv-clasp の作製を行った。VL-SARAH および VH-SARAH を大腸菌で封入体として大量発現し、リフォールディングにより Fv-clasp(v0) の調製を行った。金属イオンアフィニティー

(IMAC) 精製およびイオン交換クロマトグラフィーにより、高純度の YES8c Fv-clasp(v0) をミリグラムスケールで調製することができた。また大腸菌分泌発現系による YES8c Fv-clasp 発現系を構築し、こちらもミリグラムオーダーで調製可能であった。リフォールディングで調製した Fv-clasp の N 末端はメチオニンであるが、分泌発現により調製した Fv-clasp の N 末端は本来の抗体分子と同じ残基である。

IGHV1-69 生殖系列遺伝子由来の RF の 1 つである RF-TS1 について Fv-clasp の調製を行った。VH-SARAH の発現量が低く封入体がほとんど得られなかったが、N 末端付近のコドンが大腸菌に最適化することで劇的に発現量が向上した。リフォールディングにより RF-TS1 Fv-clasp(v0) を調製し、IMAC 精製ならびにイオン交換クロマトグラフィー精製により、ミリグラムオーダーで調製した。また L 鎖と H 鎖の間にジスルフィド結合を導入した RF-TS1 Fv-clasp(v2) についても、同様にリフォールディングによりミリグラムスケールで調製することができた。

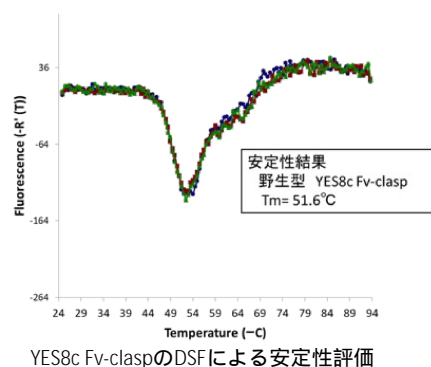
IGHV1-69 生殖系列遺伝子由来の RF の 1 つである M11 について、Fv-clasp の調製を試みたが、リフォールディング後の分子が不安定であり、現在のところ大量調製には至っていない。IGHV3-30 由来の RF である RF-SJ1 の Fv-clasp(v0) について、数 mg の精製タンパク質を得ることができた。

## (2) リウマトイド因子 Fab の大腸菌分泌発現系による調製

申請者らはリウマトイド因子 Fab を、簡便に大量調製するために、大腸菌を用いた分泌発現系の構築を試みた。YES8c Fab については培地 1L あたり約 1.5 mg の精製した Fab を調製できた。また RF-TS1 Fab については、当初は培地 1L あたり約 0.01 mg 程度の収量であったが、コドンの最適化などを行うことで発現が向上し、現時点では培地 1L あたり 0.2 mg の収量を得ている。RF-TS1 Fab については、コンストラクトの改良などによる発現向上を検討中である。

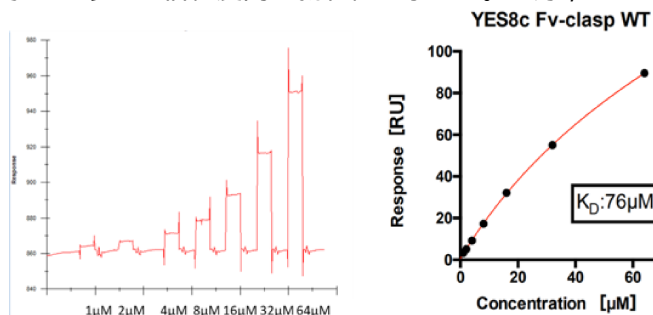
## (3) リウマトイド因子の熱安定性解析、ならびにヒト IgG-Fc に対する相互作用解析

調製したリウマトイド因子の Fv-clasp について、蛍光物質 SYPRO Orange を用いた示差走査蛍光法 (DSF) による熱安定性解析を行った。リフォールディングにより調製した YES8c Fv-clasp(v0) の融解温度 ( $T_m$ ) は約 52 であった。H 鎖と L 鎖の間にジスルフィド結合を導入した YES8c Fv-clasp(v2) の  $T_m$  は約 70 であり、大幅に熱安定性が向上していた。大腸菌分泌発現系により調製した YES8c Fv-clasp(v0) の  $T_m$  は約 52 であり、リフォールディングにより調製したものと同様の熱安定性であった。一方でリフォールディングで調製した RF-TS1 Fv-clasp(v0) については、蛍光値の大きな上昇が 2 段階で見られ、約 40 と約 58 の 2 つの  $T_m$  を示した。ジスルフィド結合を導入した RF-TS1 Fv-clasp(v2) の変化は 1 段階であり、 $T_m$  は約 60 であった。大腸菌の分泌発現系により調製した YES8c Fab の  $T_m$  は約 77 であった。RF-TS1 Fab においては 2 段階の変化が確認され、 $T_m$  は 63 と 74 であった。



YES8c Fv-clasp の DSF による安定性評価

ヒト IgG としてリツキシマブを用いて、各リウマトイド因子との相互作用解析を、ELISA および表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) を用いて行った。SPR 法には Biacore T100 (Cytiva 社) を用いた。YES8c Fv-clasp(v0) については、ELISA の結果、リフォールディングで調製した分子よりも分泌発現系で調製した分子のほうが高い親和性が示された。SPR 法により解離定数を比較したところ、分泌発現により調製した分子のほうが 3 倍程度高い親和性を示した。一方、RF-TS1 Fv-clasp(v0) は、YES8c よりも高い結合性が ELISA により確認されたが、SPR 法では  $K_d$  を算出できないほど低い親和性であった。また RF-TS1 Fv-clasp(v2) は RF-TS1 Fv-clasp(v0) よりも、ELISA と SPR とともに、ヒト IgG-Fc に対する親和性は低かった。大腸菌分泌発現系で調製した YES8c Fab は、カイコ-バキュロウイルス発現系により調製した YES8c よりも若干高い親和性を示した。



Biacore T100 による YES8c Fv-clasp(v0) とヒト IgG の相互作用解析

## (4) リウマトイド因子の結晶化

リウマトイド因子の抗原となるヒト IgG-Fc は、リツキシマブをパパインで消化し、Protein A レジン精製、およびその後のゲルろ過精製により調製を行った。RF-TS1 Fv-clasp(v0)および RF-TS1 Fv-clasp(v2)は、TEV プロテアーゼを用いて His-tag を切断し、リバース IMAC およびイオン交換クロマトグラフィーで精製を行った。RF-TS1 Fv-clasp(v0)と Fc を混合し、結晶化スクリーニングを行ったところ、数条件にて結晶が見られた。結晶化条件を最適化したところ結晶が生成したが、大きく成長した結晶を SDS-PAGE による分析を行ったところ Fc のみの結晶であることがわかった。また RF-TS1

Fv-clasp(v2)単独での結晶化を試みたところ、スクリーニングキットにて多数の条件で結晶が得られた。そのうち数条件について最適化を行い、X線解析に資する厚みをもつ結晶を得た。これらの結晶を用いて、Photon Factory (つくば)



RF-TS1 Fv-clasp(v2)単独の結晶とX線回折像

にて放射光を用いた X線回折実験を行った。最大分解能は 7 Å 程度であった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiroishi M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Structural Basis of a Conventional Recognition Mode of IGHV1-69 Rheumatoid Factors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Adv Exp Med Biol.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/5584_2020_510	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 Kuroki K, Matsubara H, Kanda R, Miyashita N, Shiroishi M, Fukunaga Y, Kamishikiryo J, Fukunaga A, Fukuhara H, Hirose K, Hunt JS, Sugita Y, Kita S, Ose T, Maenaka K.	4. 巻 203
2. 論文標題 Structural and Functional Basis for LILRB Immune Checkpoint Receptor Recognition of HLA-G Isoforms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Immunol.	6. 最初と最後の頁 3386-3394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.1900562	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 Shinozaki Chinatsu, Kohno Keita, Shiroishi Mitsunori, Takahashi Daisuke, Yoshikawa Yu, Abe Yoshito, Hamase Kenji, Nakakido Makoto, Tsumoto Kohei, Inoue Kazuhide, Tsuda Makoto, Ueda Tadashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Improvement of the affinity of an anti-rat P2X4 receptor antibody by introducing electrostatic interactions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-03784-w	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西崎恵菜美, 白石充典
2. 発表標題 Preparation and crystallization of Fv-clasp of the rheumatoid factor RF-TS1
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本真瑠人、船田涼馬、瀧亮太、白石充典
2. 発表標題 Fv-clasp化したリウマトイド因子YES8cの大量調製と評価
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西崎恵菜美、白石充典
2. 発表標題 リウマトイド因子RF-TS1 Fv-claspの大量調製と評価
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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

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