

令和 3 年 8 月 21 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16063

研究課題名(和文) クライオ電子顕微鏡を用いた抗体IgG-Fc R複合体の構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis of antibody IgG-FcgR complex using cryo-electron microscopy

研究代表者

木吉 真人 (Kiyoshi, Masato)

国立医薬品食品衛生研究所・生物薬品部・研究員

研究者番号：60754314

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)：抗体医薬品がFcを介した薬理作用を発揮する際には、抗原、抗体、Fc 受容体(Fc R)の三者が複合体を形成する必要がある。溶液中の生体分子の構造を高い解像度で観察できるクライオ電子顕微鏡を用いて、抗体-Fc R複合体の高次構造解析を行った。構造決定のためには、抗体-Fc R複合体を調製した後、グリッド上でのタンパク質が凝集を回避できる条件の設定が重要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体や抗原抗体複合体とFc Rがどのような立体配座で結合しているか、その結合の分子メカニズムが明らかにするため、大腸菌を用いて、Fc Rの細胞外ドメインの発現、精製を行い、抗体との複合体を形成させた後、クライオ電子顕微鏡を用いて構造解析を行った。調製した抗原分子を添加し、抗原、抗体、Fc Rの三者複合体の構造解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Higher-resolution structural analysis of the antibody-FcgR complex was performed using a cryo-electron microscope that can observe the structure of biomolecules in solution. After preparing the antibody-FcgR complex, it was found that it is important to set the conditions under which the proteins on the grid can avoid aggregation for structural analysis.

研究分野：生命科学

キーワード：抗体 Fc R クライオ電子顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト Fc γ R 受容体(Fc γ R)ファミリーは、Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIb、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb の5つのサブタイプから成り、細菌などの異物排除、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)など、様々な免疫応答を担っている。抗原に結合した抗体(IgG)は、抗原抗体複合体を形成し、各種の免疫細胞上の Fc γ R によって認識される。Fc γ R は、抗原抗体複合体の結合により惹起されるシグナルを細胞内へと伝達するためのドメインに、Immunoreceptor Tyrosine-based Activating (Inhibitory) Motif (ITAM or ITIM)を持つ。細胞外の Fc γ R に抗原抗体複合体が結合した場合、この ITAM、ITIM が脾臓チロシンキナーゼ(SYK)によってリン酸化されてシグナルが伝達され、細胞が活性化または抑制される。これまでに、X線結晶構造解析における技術的な制約から、Fc と Fc γ R の複合体の結晶構造解析はなされているが、抗体と Fc γ R の複合体の結晶構造は明らかにされていない。さらに、Fc γ R の細胞内ドメインである α chain、 γ chain の高次構造解析は未だなされていない。そのため、抗原に結合した抗体が、どのような立体配座で Fc γ R と結合し、それに伴って α chain、 γ chain がどのように構造変化し、SYK がどうやってリクルートされて ITAM がリン酸化されるのか、一連の分子メカニズムは未だ解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、溶液中の生体分子の構造を高い解像度で観察できるクライオ電子顕微鏡を用いて、抗体-Fc γ R 複合体、及び α chain- γ chain 複合体の高次構造解析を行い、Fc γ R への抗原抗体複合体の結合から、どのように細胞内ドメインへと情報が伝えられ、細胞の活性化が起きるのかを明らかにすることにより、Fc γ R を介した免疫細胞活性化の分子メカニズムの解明を目指す。この研究により明らかになる分子メカニズムをもとに、効率よく Fc γ R を活性化する抗体を見出すことができれば、低用量で有効な抗体医薬品の開発につながる。

3. 研究の方法

大腸菌を用いて、Fc γ R の細胞外ドメインの発現、精製を行い、抗体との複合体を形成させた後、クライオ電子顕微鏡を用いて構造解析を行う。さらに、調製した抗原分子を添加し、抗原、抗体、Fc γ R の三者複合体の構造解析を目指す。これにより、抗体や抗原抗体複合体と Fc γ R がどのような立体配座で結合しているか、その結合の分子メカニズムが明らかとなる。大腸菌を用いて、Fc γ R の細胞外ドメイン、及び ITAM を含む細胞内ドメインの発現、精製を行った後、ナノディスクを用いて、cell-free 系での膜結合型 Fc γ R の構築を行う。クライオ電子顕微鏡を用いて、構造情報を明らかにする。また、抗原抗体複合体が結合した場合の ITAM の構造変化や、SYK との親和性測定を行う。

4. 研究成果

抗体と Fc γ R の細胞外ドメインとの複合体を形成させた後、クライオ電子顕微鏡を用いて構造解析を行った。構造解析に適した Fc γ R サブクラスの選定や、その変異体の開発を行った。また、安定性の高い抗体の選定、界面活性剤の添加などの条件検討を行った。条件検討の結果、やや産生から中性付近の pH で最も良い撮像を行えることが明らかになった (Figure 1)。負染色法による抗体-Fc γ R 複合体の撮像に成功した。さらに、調製した抗原分子を添加し、抗原、抗体、Fc γ R の三者複合体の構造解析を目指した。大腸菌を用いて、Fc γ R の細胞外ドメイン、及び ITAM を含む細胞内ドメインの発現、精製を行った。ナノディスクを用いて、cell-free 系での膜

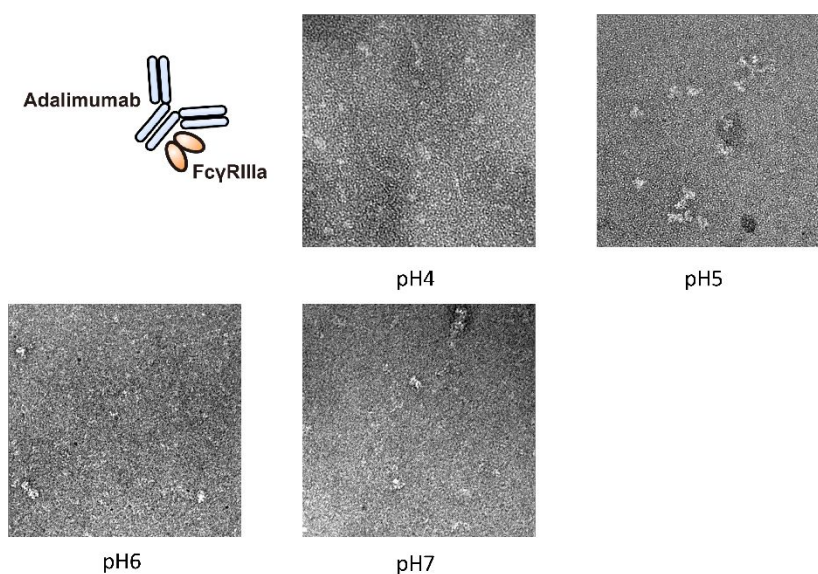


Figure 1. ネガティブステインによる抗体-Fc γ R との複合体の撮像の結果

結合型 Fc γ R の構築する条件検討を行った。構造決定のためには、抗体-Fc γ R 複合体を調製した後、グリッド上でのタンパク質が凝集を回避できる条件の設定が重要であることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------