

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06517

研究課題名（和文）抗P2X4抗体Fabの構造を基盤とした大腸菌発現の改良およびFabの高機能化

研究課題名（英文）Improvement of protein expression by Escherichia coli based on the structure of anti-P2X4 antibody Fab and development of its additional function.

研究代表者

阿部 義人（Abe, Yoshito）

国際医療福祉大学・福岡薬学部・教授

研究者番号：60315091

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）：我々は抗P2X4抗体のH鎖Ser35をアラニンに変異したH-S35AFabにおいて、結合親和性を変えずに回収量が6-7倍に増加することを見出している。そこでH鎖Ser35のアミノ酸変異による発現量、構造および安定性などの影響を調べた。その結果、抗体Fabの発現量が、H鎖の35番目のアミノ酸側鎖の疎水性に依存していること、さらには安定性と発現量は一概には比例しないことを見出した。また抗体FabとATP加水分解酵素を化学的に架橋した機能性抗体、また糖鎖もしくはPEGを付加した抗体の調製を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子化抗体Fabは安定性、抗原親和性が優れており、抗体医薬品の次世代フォーマットとして期待されている。Fabは大腸菌発現から得られたリコンビナントが医薬品にも使われているが、リコンビナントFabは各抗体依存的に発現量が少ないものも多い。よってアミノ酸変異を用いて、大腸菌発現量を理論的にコントロールできれば抗体製剤の発展に繋がっていく可能性があると考え、本研究を行った。

研究成果の概要（英文）：We established a method to prepare soluble anti-P2X4 Fab from Escherichia coli without using a time-consuming and laborious refolding system, and found that the amount of soluble Fab recovered increased 6-7-fold in H-S35AFab, where the H-chain Ser35 was mutated to alanine, without altering binding affinity. In this study, we investigated the cause of the increased expression of H-S35AFab by mutating Ser35 in the H-chain, as well as the changes in structure and stability. As a result, we discovered that the expression level of antibody Fab depends on the hydrophobicity of the 35th amino acid side chain of the H-chain, and that stability and expression level are not generally proportional. Additionally, we attempted to prepare functional antibodies by chemically cross-linking mutants of antibody Fab with cysteine and ATP-hydrolysing enzymes, and by adding sugar chains or polyethylene glycols to antibodies to inhibit aggregation.

研究分野：タンパク質科学

キーワード：抗P2X4抗体 タンパク質工学 タンパク質化学 大腸菌発現

## 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品は約 100 品目（研究当初は 80 品目）が日米欧で承認され、さらに数多くの抗体医薬品の臨床治験が現在行われている。抗体医薬品は通常 IgG がフォーマットとして利用されているが、可変領域だけを持った Fab、ScFv などの低分子化抗体も利用されている。Fab は抗体本来の可変領域を持つため ScFv と比較して安定性、抗原親和性ともに優れており、現在 3 品目の医薬品が日本で認可されている。Fab の調製には大腸菌発現から得られたリコンビナントが主に使われているが、リコンビナント Fab の発現量は各抗体によって異なり、回収率が少ないものも多い。

申請者らは以前 ATP 駆動型のイオンチャンネルである P2X4 受容体に対して、細胞外ドメインの一部を抗原とし、立体構造を認識する高親和性マウスモノクローナル抗体を作成した(Igawa et al., *Purinekinetic Signal.*, (2019), 15, 27-35.)。さらに、本抗体を大腸菌により発現、精製する方法を確立した(Igawa T et al., *J. Biochem.*, (2021), 169, 491-496.)。さらに抗体 H 鎖の可変領域(CDR)に位置している Ser35 をアラニンに変異させた Fab (H-S35AFab) は P2X4 への結合親和性を変えずに、発現量が 6~7 倍増加することを確認していた。そこで、本申請においては、さらに変異をかけることによって発現量増加が見込めるかどうか、また発現増加した Fab を用いた応用研究を目的としていた。

## 2. 研究の目的

上記の研究背景をもとに以下 1) ~ 3) の研究を行うこととした。

1) H-S35AFab の発現量上昇の原因を調べるため、H 鎖 Ser35 を他のアミノ酸へ変異することでその発現量が変化するかどうかを確認することを目的とした。さらに物理化学手法を用いて野生型抗 P2X4 抗体 Fab (H-S35Fab) や他の変異体と比較し、その物性変化を調べ、発現量との相関を調べた。

2) 発現量の増加した H-S35AFab を利用し、Fab 表面のアミノ酸をシステインに変異させた抗 P2X4 抗体 Fab を調製し、ATP 加水分解酵素 (Apyrase) を化学架橋試薬を用いて Fab と架橋を行い、細胞表面に発現した P2X4 に ATP 加水分解酵素-Fab コンジュゲート体を作成することで、P2X4 の機能抑制が実際に可能かどうかを確認することを目的とした。

3) 抗体 L 鎖可変領域のアミロイド繊維形成において抗体 L 鎖への O-結合型糖鎖付加はアミロイド形成すなわちタンパク質凝集を抑制する (Abe et al., *Int. J. Biol. Macromol.* (2021), 166, 342-351.)。この情報に基づき糖鎖付加 Fab を作成し、Fab の凝集が抑制できるかどうかを調べる。大腸菌では糖鎖付加は起こらないため、糖鎖付加部位に対応するアミノ酸をシステインに置換し、化学修飾によって糖鎖を付加し、凝集性および安定性を調査することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) -1 抗体 Fab 変異体の発現、精製

抗体 Fab の各変異体は pCOLADuet ベクター (Novagen) に組み込み、このベクターで ShuffleT7 株 (New England Biolabs.) を形質転換した。H 鎖の C 末端には精製のため、His<sub>6</sub>-tag を付加している。37 度で菌増殖後、IPTG を添加し、25 度で 16 時間、発現誘導を行った。培養した菌は遠心分離にて回収し、超音波破碎した後、Ni<sup>2+</sup>-Sephrose カラムおよび陽イオン交換カラムにて精製した。菌体中の抗体 Fab の発現は抗マウス Fab 抗体を用いた Western blotting により検出した。また精製後の回収量は抗体 Fab の 280nm の吸光度から計算した。

### 1) -2 野生型および抗体 Fab 変異体の物性検討

抗体 Fab の熱安定性に関しては、CD (JASCO J-720W Spectro polarimeter) を用いて、指定温度でのインキュベーション後の 218 nm のモル分子楕円率の変化を用いて調べた。変性剤グアニジンに対する安定性は、0 M から 5 M までの濃度のグアニジンを加えた後、25 度で 48 時間インキュベーションを行い、各濃度での 350 nm と 330 nm の蛍光強度の比を用いて調べた。各抗体 Fab のラット P2X4 との解離定数に関しては、抗原として用いていたラット P2X4 のヘッドドメインをセンサーチップに固定化し、Biacore X100 (GE Healthcare 社) を用いて求めた。各抗体 Fab の分子サイズはサイズ排除クロマトグラフィー (TSKgel SuperSW mAb HTP 4.6ID x 15cm, 4 μm) を用いて調べた。さらに H-S35AFab に関しては、10mg/mL 以上の濃度で結晶化を行った。

## 2) ATP加水分解酵素-Fab コンジュゲート体の調製とその機能解析

L-(-7)C/H-S35AFab (L鎖のN末にCGGSGGS配列を導入したH-S35AFab) およびL-S153C/H-S35AFabの発現精製を行った。市販のジャガイモアピラーゼ(Sigma-Aldrich社)と架橋試薬(BMPS (N-β-maleimidopropyl-oxysuccinimide ester))を用いて、作成したFab変異体と架橋反応を行った。架橋後の反応物ができているかどうかは、ラットP2X4ヘッドドメイン(rP2X4HD)を固定化したELISAプレートに、反応物を加え、洗浄後、rP2X4HDに結合した架橋反応物がATP加水分解活性を持つかどうかを加えたATPから生じた無水リン酸をマカライトグリーンにて定量することで確認した。細胞表面上のP2X4に対する架橋反応物の効果は未反応のジャガイモアピラーゼを除去した後、ラットP2X4を発現させた1321N1細胞を用いて、ATP添加後のCa<sup>2+</sup>の取り込み量をFluo-4を用いた細胞イメージングにより定量し確認した。

## 3) ポリエチレングリコール付加Fabの調製

L-K45C/H-S35AFabの発現精製を行った。Methyl-PEG12-MaleimideをDMSOで可用化し、作成したFab変異体と反応させた。反応はSDS-PAGEによって分子量の差で確認した。

## 4. 研究成果

### 1) -1抗体Fab変異体の発現、精製

A. Western blottingを用いた少量培養での発現量確認  
各種変異体の発現量を比較的簡便に検出するため、抗マウスFab抗体を用いたWestern blottingを用いて評価した(図1)。LB培地2mLに対し培養し、IPTG誘導後、集菌し、解析すると、抗体Fabとして立体構造を持っていないものまでバンドとして確認される。そこで、60℃で10分間インキュベーション後に遠心し、その上清を解析すると、Fabの変性温度は80度付近であることがわかっているため、安定な立体構造を持っているFabだけを解析できる。実験の結果、48kDaに抗体Fabのバンドが確認され、精製後に解析した野生型(H-S35Fab)よりもH-S35AFabの方が発現量が多い結果を本方法でも再確認することができた。さらに、H-S35AFabの35番目のアラニンを変異する(野生型に戻す)とその収量が再度減少した。すなわちH鎖のS35のアラニンへの変異は抗体Fabの発現量に関わることを確認することができた。

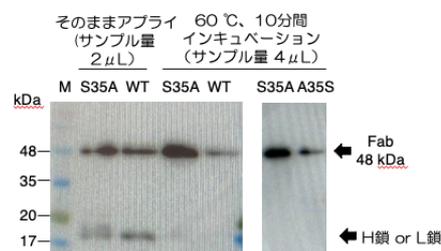


図1.各変異体リコンビナントFab発現量の確認

### B. H鎖Ser35変異体の発現量の解析

H鎖セリン35を各種アミノ酸(バリン、ロイシン、システイン、スレオニン、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸)に変異させたものを調製し、上記の評価法を用いて発現量を比較した(図2)。この結果、グリシン、アスパラギン、アスパラギン酸など親水性アミノ酸に変異させたFab(H-S35GFab、H-S35DFab、H-S35NFBab)は48kDaに抗体Fabのバンドを検出できなかった。一方で、バリン、ロイシン、システイン、スレオニンに変異したFab(H-S35VFBab、H-S35LFBab、H-S35CFab、H-S35TFab)はバンドを検出できたが、その変異によって発現量が異なることが確認された。そこで、各変異体をLB培地500mLで培養し、精製後の回収量を確認したところ、Western blottingの結果と同様の傾向が見られた。アミノ酸側鎖の疎水性度(Monera et al., J. Protein Sci. (1995), 1, 319-329.)を横軸にして、精製後の回収量を縦軸として、プロットしたところ、アラニンより疎水性が低いアミノ酸に変異すると回収量は減少し、さらにアラニンより疎水性が高いアミノ酸に変異しても回収量は減少した(図3)。

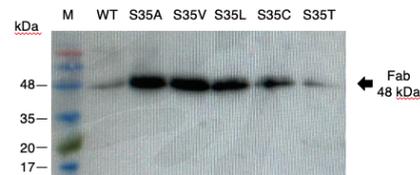


図2.各変異体リコンビナントFab発現量の確認

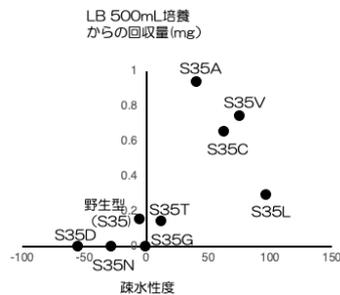


図3.変異体の精製後の回収量と35番目のアミノ酸の疎水性

## 1) -2 野生型および抗体 Fab 変異体の物性検討

### A. H 鎖 Ser35 変異体の抗原結合、二次構造、分子サイズ

野生型および H-S35AFab、H-S35V Fab、H-S35L Fab 変異体に関して、構造、機能に変化が生じているかを調べた。各抗体 Fab の二次構造を CD を用いて調べたところ、そのスペクトルはほとんど変化なかった (図 4)。さらに各 Fab 変異体と rP2X4HD 間の解離定数は、野生型および H-S35AFab、H-S35V Fab、H-S35L Fab 変異体においてそれぞれ、0.81、1.3、2.6、1.5 (nM) であり、結合親和性は変化していなかった。またサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、各変異体の分子サイズを調べたところ、いずれも同様の分子サイズ (分子量マーカーとの比較により、約 60000 kDa) を示した。

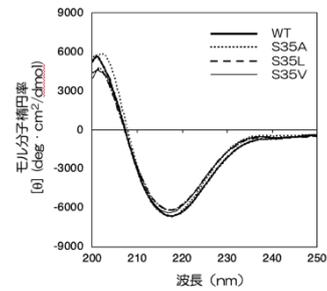


図4. 各変異体のCDスペクトル

### B. H 鎖 Ser35 変異体の安定性

野生型および H-S35AFab、H-S35V Fab、H-S35L Fab 変異体に関して CD スペクトルを用いて温度依存的なスペクトル変化により、熱安定性を調べた。熱変性変化から求めた  $T_m$  値はそれぞれ野生型および H-S35AFab、H-S35V Fab、H-S35L Fab 変異体においてそれぞれ、80.4、80.5、74.5、71.1 (°C) であった。また、Trp 蛍光の変化により、変性剤グアニジンに対する安定性を調べた。グアニジン変性の  $C_{1/2}$  値はそれぞれ野生型 (H-S35Fab) および H-S35AFab、H-S35V Fab、H-S35L Fab 変異体においてそれぞれ、3.27、3.44、3.10、2.76 (M) であった。これらの結果、野生型と H-S35AFab の安定性はほとんど変わらず、H-S35V Fab、H-S35L Fab の順に不安定となった。さらに、3.5 M グアニジン存在下での野生型と H-S35AFab の変性速度を調べたところ、野生型と H-S35AFab とではほとんど変化なかった。

### C. H 鎖 Ser35 変異体の高次構造

各変異体の高次構造を調べるため、結晶化を行い X 線結晶構造解析を目指した。回収量の多い H-S35AFab を 10 mg/mL に調製し、シッティングドロップ法により結晶化を行ったところ、薄い板状結晶は得られたが良好な回折の得る結晶を得ることはできなかった。そこで、AlfaFold2 による構造モデリングを野生型および H-S35AFab、H-S35L Fab について行った。その結果、野生型の H 鎖の Ser35 は周囲の疎水性残基に囲まれているが、その  $\gamma$ OH 基は近傍の H 鎖の Trp47 のインドール環の NH 基と水素結合できる距離 (N-O 間が 3.3 Å) にあり、水素結合している可能性が示唆された (図 5、左)。H-S35AFab の側鎖のメチル基は周囲の疎水性残基に囲まれ、ファンデルワールス接触しており、その構造を野生型と重ね合わせても同じ構造であった (図 5、中央)。H-S35L Fab は周囲の疎水性残基と相互作用しているものの、かさ高いロイシン残基が存在するため、周囲の側鎖および主鎖の位置が野生型および H-S35AFab と比べずれていた (図 5、右)。

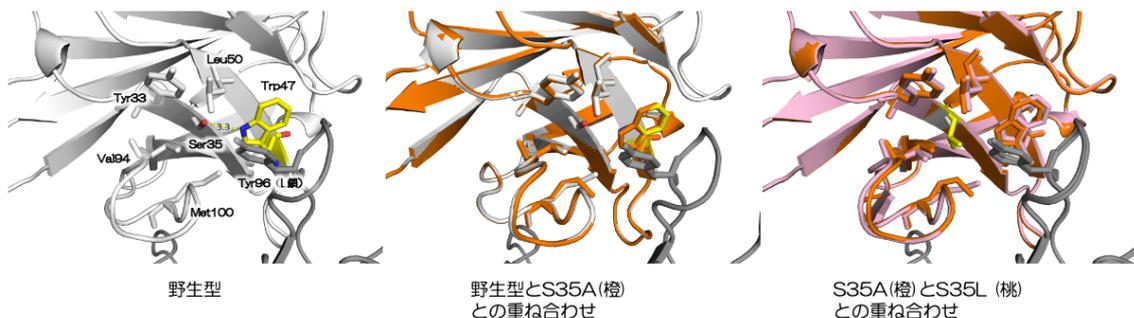


図5. AlfaFold2による各変異体の構造モデリング

### D. H 鎖 Ser35 変異体の発現量に関する考察

以上の結果から、H-S35AFab において H 鎖 35 番目のアラニン側鎖が周囲の疎水性残基とファンデルワールス相互作用することにより安定性が向上し、フォールディングが良くなり、発現量が向上していることが考えられる。1) -1B で示すように、アラニンより疎水性が高いアミノ酸に変異すると発現量は低下した。このことは、アラニンより側鎖が大きなバリン、システイン、ロイシンなどではその嵩高さによって、高次構造に歪みが生じ、これが構造不安定性の原因となり、発現量が低下したと考えられる。側鎖の大きさが大きくなるほど、安定性、発現量は低下することからこの考えは支持される。H-S35L Fab のモデル構造をよく見ると、このような構造の歪みは L 鎖の Tyr96 にも影響を与えているように見える。よって構造の歪みが H 鎖内部もしくは H 鎖-L 鎖間の相互作用に影響を与え、H-S35L Fab の安定性が低下したのではないかと考察している。一方で、H 鎖 35 番目を親水性アミノ酸に変異させた Fab の発現量は概ね低下しているに関わらず、野生型 (H-S35Fab) の安定性は

H-S35AFab と同じであった。このことは Fab の安定性と発現量が一概に比例しないことを意味しているものと考えられる。これらの研究内容は各種学会で発表しており、今後論文としてまとめていく予定である。

### 2) ATP 加水分解酵素-Fab コンジュゲート体の調製とその機能解析

発現量の多い H-S35AFab をもとに L(-7)C/H-S35AFab および L-S153C/H-S35AFab となるように遺伝子変異を行い、その後発現精製を行った。各変異体は双方ともに H-S35AFab の半分程度の回収量であった。これらの変異体と市販のジャガイモアピラーゼ (Sigma Aldrich) を用いて、架橋基の長さが異なる NH 基-SH 基間の架橋試薬である GMBS、BMPS、HMCS (Dojindo) を用いて架橋反応を行った。この中で L(-7)C/H-S35AFab と BMPS の組み合わせが最も架橋効率は良く、架橋反応物を確認できたが、その回収量は少なかった。

その後、種々の反応条件の検討を行った後、架橋反応物を回収し、未反応のジャガイモアピラーゼを除去した。この架橋反応物を用いて、ラット P2X4 を発現させた 1321N1 細胞の  $Ca^{2+}$  の取り込み量を Fluo-4 を用いた蛍光細胞イメージングにより定量した (研究分担者: 山下担当)。その結果、明らかな ATP 加水分解酵素-Fab コンジュゲート体による  $Ca^{2+}$  の取り込み量の阻害効果は確認できず、今後の更なる架橋効率の向上および細胞への  $Ca^{2+}$  取り込みの実験条件などの検討が必要であることが示唆された。ヘテロ分子間架橋に関しては、さらに効率的に行うため、令和 6 年度からの基盤研究 (C) 「構造予測による新規タンパク質オリゴマー分子のデザインとその実験的検証」でも検討を重ねていく予定である。

### 3) ポリエチレングリコール付加 Fab の調製

糖鎖付加修飾用化合物は高価なため、比較的安価で性質の似ているポリエチレングリコール修飾用化合物 (Methyl-PEG12-Maleimide, TCI) を代用し、修飾条件の検討に用いた。タンパク質凝集を抑制する糖鎖付加部位は抗体 Fab の L 鎖の 45 番目の Lys に相当する。そこで 45 番目の Lys をシステインに変異した L-K45C/H-S35AFab を作成し、発現精製した。その収量は LB 培地 500mL あたり 0.6mg であった。L-K45C/H-S35AFab と 2) で作成した L(-7)C/H-S35AFab を用いて、Methyl-PEG12-Maleimide による修飾反応を行った。それぞれの変異体に分子サイズの増加したバンドがみられたことから、ポリエチレングリコールの付加反応が起こっていることが確認された。未反応のバンドが残っており、今後反応条件 (pH、反応時間、温度など) の条件検討を重ね、十分にポリエチレングリコールが付加する条件を確立したのち、糖鎖付加修飾用化合物を反応させ、その凝集性、安定性などの物理的性質を調べていく予定である。

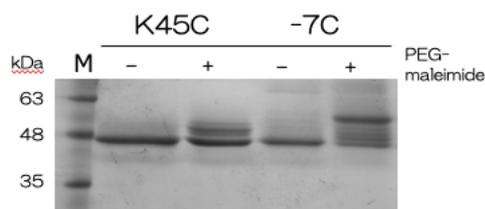


図6. システイン変異体とPEG-maleimideとの反応物の解析

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Boonyayothin Wanuttha, Sinnung Sirorut, Shanmugaraj Balamurugan, Abe Yoshito, Strasser Richard, Pavasant Prasit, Phoolcharoen Waranyoo	4. 巻 12
2. 論文標題 Expression and Functional Evaluation of Recombinant Anti-receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand Monoclonal Antibody Produced in Nicotiana benthamiana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 683417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.683417	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 Phakham Tanapati, Bulaon Christine Joy I., Khorattanakulchai Narach, Shanmugaraj Balamurugan, Buranapraditkun Supraee, Boonkrai Chatikorn, Sooksai Sarintip, Hirankarn Nattiya, Abe Yoshito, Strasser Richard, Rattanapisit Kaewta, Phoolcharoen Waranyoo	4. 巻 12
2. 論文標題 Functional Characterization of Pembrolizumab Produced in Nicotiana benthamiana Using a Rapid Transient Expression System	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 736299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2021.736299	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 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 131
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 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 Inoue Shogo, Ikeda Yohei, Fujiyama Saki, Ueda Tadashi, Abe Yoshito	4. 巻 1871
2. 論文標題 Oligomeric state of the N-terminal domain of DnaT for replication restart in Escherichia coli	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics	6. 最初と最後の頁 140929 ~ 140929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2023.140929	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部義人
2. 発表標題 立体構造を基盤としたantiP2X4抗体Fab生産法の改良
3. 学会等名 第12回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部義人
2. 発表標題 ATP受容体P2X4の機能を抑制する誘導体化抗体の創製
3. 学会等名 第11回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部義人
2. 発表標題 立体構造を基盤としたantiP2X4抗体Fab生産法の改良
3. 学会等名 第13回国際医療福祉大学学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部義人、御供田将士、植田正
2. 発表標題 抗P2X4抗体Fabの立体構造を基盤とした大腸菌発現系の改良
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023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
研究 分担 者	山下 智大  (Yamashita Tomohiro)  (30645635)	九州大学・薬学研究院・講師    (17102)	

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			
タイ	チュラロンコン大学			