

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 6 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350968

研究課題名(和文) 分子グラフティングによるアルブミン結合性ヒト型アダプタータンパク質の分子設計

研究課題名(英文) Design of Humanized Adaptor Proteins Exhibiting Albumin-Binding Affinity

研究代表者

本田 真也 (Honda, Shinya)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・副研究部門長

研究者番号：50344122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：次世代型バイオ医薬品として開発が進んでいるフラグメント抗体等の低分子化タンパク質の薬物動態改善に寄与する汎用技術の確立を目指して、ヒト血清アルブミン(HSA)に結合するヒト型アダプタータンパク質を分子グラフティング法で合理的にデザインし、合成した人工タンパク質の機能と構造に関するin vitro分子特性を評価した。その結果、13-15残基の置換にも関わらず二次構造が変異導入前と同様であること、血中安定性向上に必要なHSA結合親和性および結合特異性を獲得していることなどを明らかにした。これは、当該分子が低分子化バイオ医薬品の薬物動態改善のための有望なツールとなりうることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Attachment of a bacterial albumin-binding protein module is an attractive strategy for extending the plasma residence time of protein therapeutics. However, a protein fused with such a bacterial module could induce unfavorable immune reactions. To address this, we designed an alternative binding protein by imparting albumin-binding affinity to a human protein using molecular surface grafting. One of the designed proteins using human-derived 6 helix-bundle scaffold specifically binds to human serum albumin with adequate affinity. Despite 13-15 mutations, the designed proteins maintain the original secondary structure by virtue of careful grafting based on structural informatics. Competitive binding assays and thermodynamic analyses of the best binders show that the binding mode resembles that of the original bacterial protein module, suggesting that the contacting surface is mimicked well on the designed protein.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：分子設計 バイオテクノロジー バイオ医薬品 タンパク質工学 薬物動態 血中安定性 ヒト血清アルブミン

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品の成功を背景に、いわゆる beyond antibody の研究開発競争が国際的に激化している。そのトレンドの一つが低分子化である。抗体を凌ぐ低分子化タンパク質を提供できれば、抗体が巨大な糖タンパク質であることに伴う種々の問題（製造コスト、分子不均一性管理等）の回避が期待できるからである。一方で、これら低分子化タンパク質の共通の欠点は血中安定性の低さである。抗体は、ネオラテラル Fc 受容体 (FcRn) を介したリサイクリング機構により血中での半減期が長い。血中安定性は、医薬品の有効性や処方に直結するパラメータであることから、抗体医薬代替の実現にむけては、任意の低分子化タンパク質の薬物動態を改善する汎用技術の開発が求められている。

低分子化タンパク質の薬物動態改善技術としては、ポリエチレングリコール (PEG) 付加が実用化されており、すでに PEG 化サイトカイン(ペガシス®等)や PEG 化抗体フラグメント(シムジア®等)が承認されている。しかし、PEG の不均一性や活性への影響、化学修飾コストやさらなる半減期向上など、課題も多い。この解決に向けて、Andersen らは、細菌由来のアルブミン結合性ドメイン (ABD) をアダプターとして低分子化抗体に連結し、その血中半減期を大きく向上させることに成功した[1]。これは、ABD を介して低分子化抗体を HSA に間接的に結合させることで、HSA の高い血中安定性が反映するように工夫したものである (HSA は、抗体と同様、FcRn レセプターを介したリサイクリング機構により血中半減期が極めて長い)。しかし、ABD は、レンサ球菌由来のタンパク質であるため不測の免疫原性惹起が懸念されることから、薬剤としての開発は躊躇されている。

そこで本申請課題では、申請者らのこれまでの技術ポテンシャルを活用し、免疫原性リスクの小さい新規の HSA 結合性ヒト型アダプタータンパク質の開発研究を行った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、次世代型バイオ医薬品として開発が進んでいるフラグメント抗体等の低分子化タンパク質の薬物動態改善に寄与する汎用技術の確立を目指して、HSA に選択的に結合するヒト型アダプタータンパク質を開発し、その機能と構造に関する *in vitro* 分子特性を評価することである。具体的には、構造バイオインフォマティクスを活用して分子グラフィティン法によりヒト型アダプタータンパク質をデザインしたのち、合成したタンパク質が十分な立体構造安定性を維持し、かつ血中安定性向上に必要な HSA 結合親和性および結合特異性を獲得していることを実証することである。

3. 研究の方法

本研究は、以下の7項目に分けて段階的に

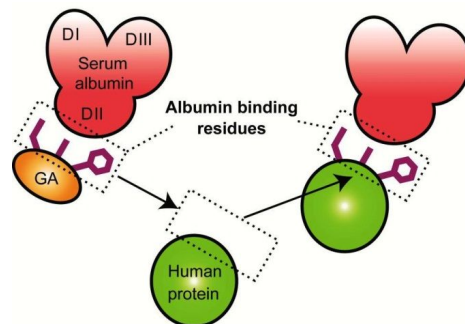
遂行した。

- (1) 複合体結晶構造データの解析とヒトタンパク質スキャホールドの選定
- (2) 移植残基の選別とアダプタータンパク質の設計
- (3) アダプタータンパク質および比較対象タンパク質の合成と精製
- (4) アダプタータンパク質の HSA 結合親和性の測定
- (5) アダプタータンパク質の構造安定性の測定
- (6) アダプタータンパク質の HSA 結合特異性の測定
- (7) アダプタータンパク質の相互作用熱力学解析

4. 研究成果

- (1) 複合体結晶構造データの解析とヒトタンパク質スキャホールドの選定

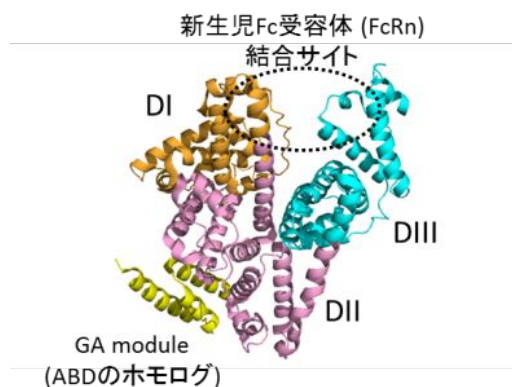
先行研究[1]において血中半減期の延長効果が実証されたのは、レンサ球菌由来のアルブミン結合性ドメイン (ABD) である。しかし、これについては立体構造の詳細が不明なので、そのホモログであるフィネゴルディア属由来の GA モジュールと HSA の複合体結晶構造データ (PDB:1tf0) を分子設計に利用した。GA モジュールの HSA 結合界面を空間的に再現するためには GA モジュールの主鎖構造と類似のヒトタンパク質をスキャホールドとして利用することが重要である。そこでまず、ヒトタンパク質のみからなる構造データセットをつくり、GA モジュールの HSA 結合界面の主鎖構造座標をクエリーとして類似の部分構造を有するヒトタンパク質を検索し、構造類似度を指標に複数のヒトタンパク質をスキャホールドとして選定した。



- (2) 移植残基の選別とアダプタータンパク質の設計

複合体結晶構造データと PISA システムを利用して、GA モジュールの HSA 接触残基を特定し、さらに接触面積や水素結合数などを指標に各接触残基の機能重要度を順位付けした。GA モジュールと上記で選定したスキャホールドを重ねあわせ、HSA 接触残基の位置に対応するヒトタンパク質の残基の情報（溶媒露出度、サイズの大小、側鎖の性質の類似度）を収集した。変異に伴うヒトタンパク質の立

体構造の不安定化を回避するため、上記の情報を総合した置換適切度を順位付けした。さらには、重ね合わせたモデルに HSA を加え、ヒトタンパク質のアミノ酸が HSA に衝突する危険度を順位付けした。以上の機能重要度、置換適切度、衝突危険度を総合的に判定し、ヒト型アダプタータンパク質のアミノ酸配列を決定した。



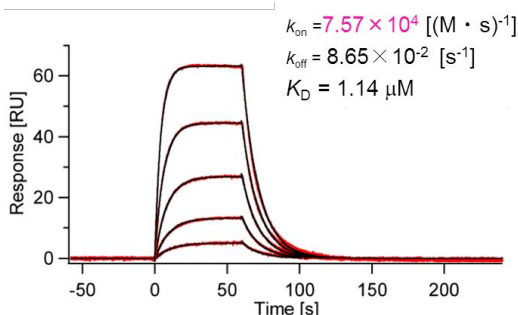
(3) アダプタータンパク質および比較対象タンパク質の合成と精製

設計した複数の

設計したアダプタータンパク質、および比較対象となる天然型ヒトタンパク質（ネガコン）、GA モジュール（ポジコン）を遺伝子組換え技術で調製した。まず、それぞれのアミノ酸配列に相当する人工遺伝子を、大腸菌での発現を促進するため、コドンと GC 含量を最適化したうえ設計し、これを化学合成により調達した。この遺伝子を市販の高発現ベクターに挿入し、大腸菌を形質転換した。培養溶菌後の可溶性画分から目的物を回収し、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーで高純度に精製した。精製品は、SDS-PAGE と質量分析法で同定した。

(4) アダプタータンパク質の HSA 結合親和性の測定

設計したアダプタータンパク質が目的とする HSA 結合活性を獲得していることを表面プラズモン共鳴 (SPR) 法で確認した。HSA をアミンカップリングでセンサーチップに固定化して、濃度の異なる試料溶液をインジェクトし、各々の解離定数を求めた。

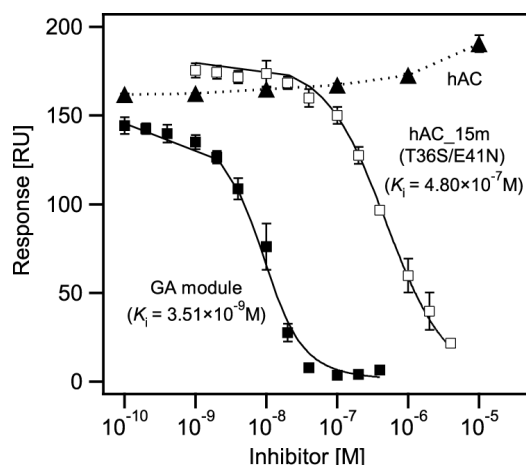


(5) アダプタータンパク質の構造安定性の測定

アダプタータンパク質が正しくフォールドし、元の天然型ヒトタンパク質と同等な立体構造を形成していることを円偏光二色性 (CD) 法で確認した。また、その構造安定性も同機で定量的に評価した。試料溶液の温度を一定速度で昇温し、得られた熱変性曲線を解析し、熱変性温度、変性エンタルピー、変性エントロピーを求めた。

(6) アダプタータンパク質の HSA 結合特異性の測定

アダプタータンパク質の HSA 結合活性が選択的であることを表面プラズモン共鳴 (SPR) 法で確認した。アダプタータンパク質が GA モジュールと HSA の結合を濃度依存的に阻害することから、アダプタータンパク質が GA モジュールと同一の結合サイトを認識していることが明らかになった。



(7) アダプタータンパク質の相互作用熱力学解析

アダプタータンパク質と HSA の相互作用を熱力学的に解析した。SPR 法測定を異なる温度で行って、結合のエンタルピー変化、エントロピー変化、結合比熱変化を定量的に評価した。その結果、アダプタータンパク質と HSA の結合は、エンタルピードリブンで、かつエントロピー的にも好ましい相互作用となっていることを明らかにした。

以上の *in vitro* 分子特性解析により、13-15 残基の置換にも関わらず二次構造が変異導入前と同様であること、血中安定性向上に必要な HSA 結合親和性および結合特異性を獲得していること、アダプタータンパク質と HSA の相互作用ではエンタルピー・エントロピーの双方が結合に寄与しており、この熱力学的特徴は GA module-HSA 間結合においても同様であることなどを明らかにした。これは、当該分子が低分子化バイオ医薬品の薬物動態改善のための有望なツールとなりうることを示すものである。

<引用文献>

[1] Andersen JT et al., *J. Biol. Chem.*, 286(7), 5234-5241 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

Watanabe H., Yageta S., Imamura H., Honda S., Biosensing Probe for Quality Control Monitoring of the Structural Integrity of Therapeutic Antibodies, *Analytical Chemistry*, 88 (20), 10095-10101 (2016). 査読有, 10.1021/acs.analchem.6b02526

Imamura H., Honda S., Kinetics of Antibody Aggregation at Neutral pH and Ambient Temperatures Triggered by Temporal Exposure to Acid, *Journal of Physical Chemistry B*, 120 (36), 9581-9589 (2016). 査読有, 10.1021/acs.jpcc.6b05473

Watanabe H., Honda S., Adaptive Assembly: Maximizing the Potential of a Given Functional Peptide with a Tailor-Made Protein Scaffold, *Chemistry & Biology*, 22 (9), 1165-1173 (2015). 査読有, 10.1016/j.chembiol.2015.07.015

Yageta S., Lauer T., Trout B., Honda S., Conformational and Colloidal Stabilities of Isolated Constant Domains of Human Immunoglobulin G and Their Impact on Antibody Aggregation under Acidic Conditions, *Molecular Pharmaceutics*, 12 (5), 1443-1455 (2015). 査読有, 10.1021/mp500759p

Tsukamoto M., Watanabe H., Ooishi A., Honda S., Engineered protein A ligands, derived from a histidine-scanning library, facilitate the affinity purification of IgG under mild acidic conditions, *Journal of Biological Engineering*, 8, 15 (2014). 査読有, 10.1186/1754-1611-8-15

Oshiro S., Honda S., Imparting Albumin-Binding Affinity to a Human Protein by Mimicking the Contact Surface of a Bacterial Binding Protein, *ACS Chemical Biology*, 9, 1052-1060 (2014). 査読有, 10.1021/cb400946m

〔学会発表〕(計 48 件)

本田 真也、アダプティブアセンブリ：低親和性ペプチドを高親和性タンパク質に成長させる分子育種技術、日本薬学会第 136 年会(招待講演) 2016 年 03 月 29 日、パシフィコ横浜(横浜)
本田 真也、高品質生産を保证するための原薬不均一性評価技術の開発、第 67

回日本生物工学会大会(招待講演) 2015 年 10 月 27 日、城山観光ホテル(鹿児島)
本田 真也、渡邊 秀樹、進化分子工学による構造と機能の共創出、第 15 回日本蛋白質科学会年会(招待講演) 2015 年 06 月 26 日、あわぎんホール(徳島)
本田 真也、産学官連携による抗体医薬の製造技術開発、日本薬学会第 135 年会(招待講演) 2015 年 03 月 26 日、神戸学院大学/兵庫医療大学(神戸)

大城 理志、本田 真也、The approach to the function-stability tradeoff in the protein design: A case of the design of a humanized protein by mimicking the bacterial albumin-binding protein, 第 52 回日本生物物理学会年会(招待講演) 2014 年 09 月 27 日、札幌コンベンションセンター(札幌)

大城 理志、本田 真也、Design of an Albumin-Binding Human Protein by Mimicking the Contact Surface of a Bacterial Albumin-Binding Domain, 第 52 回日本生物物理学会年会、2014 年 09 月 27 日、札幌コンベンションセンター(札幌)

本田 真也、次世代バイオ医薬品の品質保証のための分析評価技術開発、化学工学会第 46 回秋季大会(招待講演) 2014 年 09 月 18 日、九州大学伊都キャンパス(福岡)

Oshiro S., Honda S., Imparting Albumin-Binding Affinity to a Human Protein by Mimicking the Contact Surface of a Bacterial Binding Protein, The 28th Annual Symposium of The Protein Society, 2014/July/28, Manchester Grand Hyatt SD (San Diego, USA)

〔図書〕(計 2 件)

本田 真也、技術情報協会、HPLC, GC の測定条件設定テクニックと解析 事例集、(2016)、379 (216-219)

本田 真也、技術情報協会、吸着・分離材料の設計、性能評価と新しい応用、(2015)、524 (492-502)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕

ホームページ等

https://unit.aist.go.jp/bmd/result/file/vol14_12_p17.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本田 真也 (HONDA, Shinya)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・副研究部門長
研究者番号：50344122

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

渡邊 秀樹 (WATANABE, Hideki)
産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員
研究者番号：90422089

(4) 研究協力者

大城 理志 (OSHIRO, Satoshi)
東京大学大学院・新領域創成科学研究科メ
ディカルゲノム専攻・大学院生