

博士論文

荷電アミノ酸導入による抗体親和性
改変とその分子認識機構の解析

東京大学大学院 工学系研究科
バイオエンジニアリング専攻

前田 真吾

【目次】

第 1 章：序論	1
第1節：本研究の概要	1
第2節：研究背景	4
1. 抗体分子の構造的特徴と抗体の産業利用	
2. タンパク質工学技術を用いた抗体の特性改変	
2-1. 熱力学的パラメータと抗体の特性解析	
2-2. タンパク質間相互作用における遷移状態解析	
2-3. 抗体分子の分子認識機能の改変	
・ CDR を対象とした抗体エンジニアリング	
・ Framework Region を対象とした抗体エンジニアリング	
3. FR3 への荷電アミノ酸導入による親和性向上技術	
第3節：研究の目的	14
第4節：本論文の構成	16
第 2 章：抗インスリン抗体における親和性解析及び遷移状態熱力学の解析	21
第1節：緒言	21

第2節：実験方法	22
----------	----

1. 組換えタンパク質の発現・精製
2. SPR による速度論的および熱力学的パラメータの取得
3. ELISA 測定
4. 示差走査熱量計 (DSC) による熱安定性測定

第3節：結果および考察	24
-------------	----

1. 荷電アミノ酸導入による速度論的パラメータの変化
2. 荷電アミノ酸導入変異体の遷移状態における熱力学的寄与
3. 荷電アミノ酸導入による熱安定性の変化

第4節：結言	28
--------	----

第3章：HyHEL-10 及び CDR 変異体を対象とした親和性解析	37
------------------------------------	----

第1節：緒言	37
--------	----

1. 概要
2. HyHEL-10 の分子認識機構
3. アルギニン側鎖の特性と役割

第2節：実験方法	43
----------	----

1. 組換えタンパク質の発現・精製
2. SPR による速度論的および熱力学的パラメータの取得
3. ELISA 測定
4. 示差走査熱量計 (DSC) による熱安定性測定

第3節：結果および考察 46

1. アルギニンクラスターによる結合速度定数向上効果
2. アルギニン導入による遷移状態の変化
3. アルギニン導入による熱安定性の変化

第4節：結言 60

第4章：MD シミュレーションを用いた親和性向上機構解析 63

第1節：緒言 63

1. 概要
2. 分子動力学計算の一般的手法
3. 分子動力学計算による抗体親和性研究

第2節：計算方法 66

1. 計算モデルの構築

2. MD シミュレーションの計算・解析

第3節：結果および考察	67
-------------	----

1. アルギニン導入における CDR の運動性 (Apo 体 MD 計算)

2. 複合体重鎖 CDR ループの相対配置 (Holo 体 MD 計算)

第4節：結言	93
--------	----

第5章：総括	97
--------	----

1. 総括

2. 技術応用と将来展望

参考文献	107
------	-----

謝辞	115
----	-----

第1章 序論

第1節 本研究の概要

抗体は生体分子の中でも強い親和性(K_d)と高い特異性を持つことを特徴とした分子である。抗体治療薬や臨床検査試薬などの医薬品では抗体が主原料として用いられており、原料性能が測定性能に大きく影響する。特に臨床検査試薬は免疫反応を利用した測定系であるため、抗体の特性の一つである親和性が測定時間や測定感度を大きく左右する(1-4)。

抗体の K_d は結合速度定数(k_{on})と解離速度定数(k_{off})により決定されるため、親和性改変については、 $k_{on} \cdot k_{off}$ それぞれの面から 2 通りのアプローチが考えられる。従来の親和性改変は主に k_{off} を改善する手法であり、CDR のラショナルな分子設計による手法や、分子進化工学を利用したファージディスプレイ法が一般的である(5,6)。しかしながら、これらの手法は CDR に変異を加えるためクローン依存性が高く、また改変抗体の取得にも時間を要するなど、汎用性や開発期間の面で課題が存在する。一方近年では、抗体の抗原認識に直接関与しないフレームワーク領域に荷電アミノ酸を変異導入することで結合速度定数が改善するという報告がなされた(7)。このフレームワーク改変手法は結合速度定数の観点から親和性を向上することが可能な唯一の方法であり、また CDR に変異を加えないことから、一般性の高い親和性改変手法として期待される。しかしながら、本技術に関する詳細な物理化学的解析の報告はなく、作用機構に関して十分に記述されていない。そのため本手法の親和性向上における分子認識機構を明らかにすることで、結合速度定数を改善するための設計指針を見

出すことが可能となり、新たな親和性改変ストラテジーを確立することができると考える。

本研究では、異なる 2 つの抗原に対して FR3 変異体を作製し速度論的解析を行いフレームワーク改変の効果を検証した。また、従来のタンパク質間相互作用研究では、親和性と遷移状態との関係が複数議論されている(8-10)。そのため、フレームワーク改変による結合速度定数の変化についても、遷移状態への寄与が関わっていると考えられるため、遷移状態における熱力学パラメータを解析した。また酵素の誘導適合に見られるように、タンパク質間相互作用における遷移状態では相互作用界面の結合最適化のために分子構造の動的変化が生じている(11,12)。そのため本研究においても、分子動力学計算により結合速度定数向上変異体における動的構造の変化を解析し、親和性向上における分子認識機構の解明を試みた。

対象抗体には、抗インスリン抗体および抗リゾチーム抗体 (HyHEL-10) を用いた。速度論的解析の結果、いずれの抗体においてもアルギニンを変異導入した変異体で結合速度定数が向上した。抗インスリン抗体では $2.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ から $7.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ に、HyHEL-10 では $3.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ から $1.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ となっていた。

HyHEL-10 はエピトープに正電荷を豊富に含むリゾチームを抗原とする抗体であるが、この場合においても正電荷であるアルギニンの導入により結合速度定数が向上した。したがって、フレームワーク領域へのアルギニン導入は、エピトープの電荷状態には依存せずに機能することも明らかとなった。そのためアルギニン変異体は、長距離での静電相互作用のみならず、近接的な抗原認識プロセスについても促進することが示唆された。

HyHEL-10 に関しては、抗原認識におけるホットスポットが先行研究で明らかとなっており、重鎖の 33 番目の Tyr の Ala 変異体(HY33A)は抗原認識能を失う。ホットスポットの抗原認識機能に対するフレームワーク変異の影響を解析するため、HY33A にアルギニン変異を導入した変異体 (HY33A-LFR3R5) を作

製し、速度論的解析を行った。その結果 HY33A-LFR3R5 は HY33A と同様に速度論的パラメータ算出には至らなかった。したがって、フレームワーク領域へのアルギニン導入による親和性向上は、ホットスポットによる抗原認識機能には影響を及ぼさないと考えられ、本技術による親和性向上は抗体の特異性を損なわないことが示唆された。

また熱力学的解析結果から、対象とした 2 つの抗体のいずれにおいてもアルギニンを変異導入することにより、遷移状態におけるエンタルピーを獲得し、抗インスリン抗体では 78 kJ/mol から -1.4 kJ/mol、HyHEL-10 では 16 kJ/mol から -55 kJ/mol となっていた。このことから、アルギニンを導入することにより、抗原抗体反応の遷移状態における過渡的複合体が安定化されることで、速やかにエネルギー障壁を超えて安定構造に至ることができるため、結合速度定数が向上したと考えられる。アルギニン変異導入による効果は、抗原のエピトープの等電点 (pI) には依存しない一般的な効果であると考えられたことから、アルギニン導入によって結合速度定数が向上した変異体では、抗体分子内部で相互作用形態が変化することで、遷移状態の安定化に見られるような、結合プロセスの変化を誘起していると考えられる。分子動力学計算により動的変化を解析した結果アルギニン変異体では野生型に対して重鎖 CDR ループの相対的配置が変化しており柔軟性が増大していた。このことから、アルギニン変異体において CDR ループの柔軟性が増大することと、遷移状態の変化による結合速度定数の向上との関連が強く示唆された。

本研究により、アルギニン変異導入による結合速度定数向上は CDR ループの運動性の変化に起因していることが明らかとなった。本研究成果は抗体の親和性向上における新たな設計ストラテジーを提唱可能とするものである。

第2節 研究背景

1. 抗体分子の構造的特徴と抗体の産業利用

抗体は Immunoglobulin (Ig) と呼ばれる分子量が 150 kDa のタンパク質である。抗原に対して特異的に結合する機能を有しており、生体内の免疫反応を担っている。抗体はアミノ酸配列や構造の保存性の違いにより、複数のサブクラス (IgM、IgA、IgG 等) に分けられる。中でも IgG は血中にもっとも多く存在し、抗体医薬などの産業利用が最も進んでいる抗体分子である(1-4)。

IgG を含めた抗体分子はいずれも 4 本のポリペプチド鎖から構成されており、2 本の重鎖 (それぞれ 50 kDa) と 2 本の軽鎖 (それぞれ 25 kDa) がジスルフィド結合と呼ばれる共有結合により 1 分子の IgG を形成している。重鎖、軽鎖はいずれも定常領域 (Constant Region: C 領域) と可変領域 (Variable Region: V 領域) と呼ばれる 2 つの領域に分けられる。C 領域はクローン間でアミノ酸配列の保存性が高い領域であり、分子構造を決定している。軽鎖の C 領域を CL 領域、重鎖の定常領域を CH 領域と呼ぶ。CH 領域はさらに CH1、CH2、CH3 の 3 領域に分けられる(13,14) (Fig. 1-1a)。V 領域はポリペプチド鎖の N 末側 110 アミノ酸程度の領域であり、軽鎖の V 領域を VL 領域、重鎖の V 領域を VH 領域と呼ぶ。VL および VH には、相補性決定領域 (Complementarity-determining regions: CDRs) と呼ばれる特に配列変化に富む 6 つのループ領域 (VH と VL に各 3 ループずつ) と、それらを連結する骨格領域 (Framework Region) が存在している。抗体分子は CDR 上のアミノ酸配列を変化させることにより個々の抗体分子 (クローン) 間で多様性を獲得し、抗原認識における特異性を創出している(15) (Fig. 1-1b)。

重鎖 CH2 と CH3 の 2 つの定常部からなる領域は Fc 領域 (Fragment, Crystallizable) と呼ばれ、ジスルフィド結合と複数の非共有結合によってホモ二量体を形成する。また、重鎖の VH、CH1 と軽鎖 (VL、CL) から

なる領域を Fab (fragment, antigen binding) と呼び、Fab は CL と CH 1 の間のジスルフィド結合と鎖間の複数の非共有結合でヘテロ 2 量体を形成する。

抗体分子は、免疫チェックポイント阻害薬に代表されるように、医薬品業界を中心として食品や化成品等で広く産業応用が進んでいる。遺伝子工学技術の発展により、抗体配列上の任意のアミノ酸に変異を加え抗体機能を改変することが可能となり、様々な用途や使用環境に応じてエンジニアリングが試みられている。その応用範囲は多岐にわたり、親和性・特異性などの抗原認識能に焦点を当てたもの(1,2,4,16)から、生産性・熱安定性などの抗体分子の特性を対象としたもの(17-20)、さらに ADCC や CDC 活性制御といった治療用抗体に特化したエンジニアリング(21,22)などが行われている。抗体エンジニアリングは治療薬への応用が活発であるが、抗体医薬品を用いた治療方法は近年変化を迎えている。従来のように画一的な治療方法により同一疾患に対して同一の治療を施すのではなく、一人一人の患者に適した治療を提供するという精密医療 (Precision Medicine) の概念が大きくなっている(Fig. 1-2)(23,24)。コンパニオン診断は治療薬の有効性や副作用を予測するための診断であり、薬剤に対する個人個人の反応性を診断することが可能なため、精密治療を推進するための診断として利用することができる(25,26)。そのため精密医療推進のためには、画期的な臨床検査薬の開発がこれまで以上に重要になってくる。診断薬も治療薬同様に抗体分子を原材料としていることから、抗体エンジニアリングにより、従来よりも高性能な臨床検査測定系を開発することが可能となる。特に臨床検査試薬は免疫反応を利用した測定系であるため、抗体の特性の一つである親和性が測定時間や測定感度を大きく左右する(27)。したがって抗体原料の親和性改変は、高性能な診断薬開発に直結するアプローチである。

2. タンパク質工学技術を用いた抗体の特性改変

2-1. 熱力学的パラメータと抗体の特性解析

抗体を始めとするタンパク質の反応は物理法則に支配されているため、様々な物理化学測定装置によりその特性が評価される。タンパク質は分子内および分子間において非共有結合や共有結合を形成し、これらの結合の形成・切断に際して熱が発生する。分子内および分子間における抗体の特性は、熱力学的パラメータとその測定量によって説明されるため、先述のような抗体エンジニアリングにおいては熱力学的解析結果に基づいた種々の改変が行われる(16,28–30)。

熱力学測定では一般的に、示唆走査熱量計 (Differential Scanning Calorimetry ; DSC) や等温滴定型カロリメトリー (Isothermal Titration Calorimetry ; ITC) といった熱量測定装置が用いられる。これらの熱量測定装置は、非共有結合の形成・切断時の熱量変化を直接測定することにより熱力学量を決定する。DSC は主にタンパク質の熱安定性評価に用いられ、変性温度 (T_m) やエンタルピー変化 (ΔH) が決定される。変性における熱力学的解析を行うことにより、安定化の自由エネルギーがエンタルピー依存性であるか、エントロピー依存性であるかを決定することができ、その結果安定性がどのような物理的な相互作用によって成り立っているのかの知見を得ることができる(31,32)。ITC も同様に熱量変化を直接測定する装置であり、相互作用形成に伴い発生する熱量を測定する。抗原と抗体などの分子間相互作用解析に用いられ、エンタルピー変化 (ΔH)、結合定数 (K_a) および反応の結合比 (N) が直接測定される。またそれらの測定値と以下の熱力学基本式を利用することで、その他の熱力学量を算出することができる。

$$\Delta G = - RT \ln K_a \quad (1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

ΔG : ギブズの自由エネルギー、R: 気体定数、T: 絶対温度

相互作用の熱力学を理解するうえで、ITCによって直接結合のエンタルピー変化 (ΔH) を決定する以外に、表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonance ; SPR) により決定された平衡定数から van't Hoff の式に基づいて間接的に結合の ΔH を決定する方法も用いられる。van't Hoff の式は熱力学の基本式(1)、(2)より、以下の(3)式に変形される。SPR により複数の測定温度で K_d を算出し、温度の逆数 ($1/T$) に対する平衡定数の対数をプロットすることで、傾きと切片から ΔH 、 ΔS を算出することができる。

$$\ln K_a = -\Delta H / RT + \Delta S / R \quad (3)$$

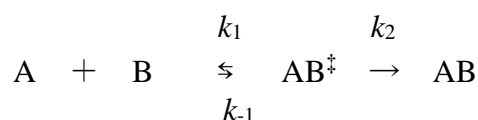
分子間相互作用における熱力学量から相互作用における構造的な寄与や水和の効果等が解析可能となるため、結合様式についての知見を得ることができる。このような熱力学的な知見は実際の創薬研究にも応用されておりドラッグデザインへの活用も進んでいる(33-35)。一般的にエンタルピー変化はファンデルワールス力や水素結合、イオン性相互作用から生じることが知られており、 ΔH が負の変化である相互作用は「エンタルピー得」といわれる。エントロピー変化について考えると、結合形成に伴ってタンパク質の動いている領域やアミノ酸側鎖の構造は規定されるため、構造エントロピーは減少する。この時エントロピー変化 ΔS は負となりエネルギー的には不利な貢献をするため、「エントロピー損」と呼ばれる。また、タンパク質の分子表面には多数の水分子が存在しており、秩序だった水素結合ネットワークを形成する。抗原抗体反応について考えると、表面にもともと存在していた水分子は、相互作用形成に伴って抗原と抗体との間に形成される非共有結合と置きかわるため溶媒に放出される。その結果水分子の乱雑さが増大することによって、エントロピーが増大し、 ΔS は負となるため、エネルギー的に有利な貢献をする。そのため、「エントロピー得」と呼ばれる。またこの時、水素結合の切断が生じるためエンタル

ピーは減少する。このように多くのタンパク質間相互作用では、エンタルピー変化量 (ΔH) とエントロピー変化量 (ΔS) の間には強い相関があることが知られており、エンタルピー・エントロピー補償則といわれる(36,37)。これまでの熱力学的解析の報告からは、多くの抗原抗体相互作用はエンタルピー駆動型であり、獲得されたエンタルピー得がエントロピー損によって失われるような相互作用であることが示されている(16,38–41)。

2-2. タンパク質間相互作用における遷移状態解析

分子間反応が進行する際の反応エネルギー座標において、最も高い自由エネルギーの状態は遷移状態として定義される。安定な複合体形成過程では、分子同士の衝突（過渡的複合体の形成）の後、正しい複合体界面の形成へ向けた配向の最適化が引き続いて起こる。静電相互作用はそのいずれにも関与し、遠距離で働く分子間引力による引き合いに加え、結合界面の配向制御を担う(42–44)。分子間引力の向上により分子衝突頻度が高められ、過渡的複合体形成効率が向上する。また、**electrostatic steering** と呼ばれる静電性配向制御の効果により、遷移状態において適切な配向制御がなされるようになる(Fig. 1-3) (45,46)。

SPR による解析は、タンパク質間相互作用においてリアルタイムで質量変化を観測する手法であるため、平衡定数のみならず相互作用における速度定数 (k) の情報が取得できる（結合速度定数 ; k_{on} 、解離速度定数 ; k_{off} ）という特徴がある。この速度定数の情報を利用して Eyring の式より遷移状態の熱力学量を算出することができる。2つの相互作用分子 A と B から複合体 AB が生成する反応における遷移状態 AB^\ddagger を仮定した場合の反応系は、各反応の速度定数を k として



と表され、この時遷移状態の平衡定数を K^\ddagger は以下となる。

$$K^\ddagger = [\text{AB}^\ddagger] / [\text{A}][\text{B}]$$

また反応速度定数 k と平衡定数 K^\ddagger の関係は

$$k = k_B T / h \times K^\ddagger$$

k_B ; ボルツマン定数 ($1.381 \times 10^{-23} \text{ J/K}$)

h ; プランク定数 ($6.626 \times 10^{-34} \text{ Js}$)

と表されるため、(3)式を用いて、

$$k = (k_B T / h) \exp(\Delta S^\ddagger / R - \Delta H^\ddagger / RT)$$

ΔS^\ddagger ; 遷移状態エントロピー

ΔH^\ddagger ; 遷移状態エンタルピー

となる。さらにこの式は

$$\ln(k / T) = \ln(k_B / h) \exp(\Delta S^\ddagger / R - \Delta H^\ddagger / RT)$$

と変換される。これが Eyring の式であり、異なる温度状態において速度定数 k の対数を $1/T$ に対してプロットすることで ΔH^\ddagger 、 ΔS^\ddagger が算出されるため、この手法を用いて遷移状態における物理状態を予測することが可能となる。遷移状態は相互作用プロセスを反映し、その熱力学量の変化を解析することで分子認識形態の変化を議論できるようになるため、遷移状態における熱力学的解析によって分子認識機構を解明する上で重要な情報を取得することができる(10,47)。

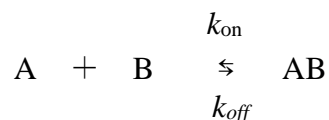
相互作用過程においてエネルギーが最も高い状態を遷移状態と定義したが、始状態と遷移状態とのエネルギー差を下げることで、複合体形成は速やかに進行すると考えられる。抗体の親和性改変においては、遷移状態の安定化に基づいたエンジニアリングも行われている(48,49)。

2-3. 抗体分子の分子認識機能の改変

・ CDR を対象とした抗体エンジニアリング

物性改変と同様に、抗体の抗原認識における側面からも熱力学的観点から研究が進んでおり、認識機構の解明とその改善による親和性・特異性改変エンジニアリングが活発に行われている。抗体の抗原認識は、CDR (Complementarity-determining regions) と呼ばれる抗原相補性決定部位が関与している。CDR は 6 つのループ構造により構成され、可変領域の中でも特に多様性に富む領域である。しかしながらその多様性にも関わらず、CDR ループの立体構造については、カノニカル構造と呼ばれる限られた主鎖構造しかとらないこと(50,51)、また CDR 上に出現するアミノ酸には偏りがあること(52)から、抗体の抗原認識は 6 つの CDR ループの相対的な配置、および CDR を構成するアミノ酸残基の側鎖が抗原認識能に重要であると考えられている。抗原認識に直接関わる CDR を改変し、直接的に抗原相補性を改変することによって抗原認識能改善するアプローチは親和性改変におけるエンジニアリングの中心である。

抗体 (分子 A) と抗原 (分子 B) の反応系は以下のように表され、



親和性 (K_d) は、結合速度定数 (k_{on}) および解離速度定数 (k_{off}) を用いて(4)式で表される。

$$K_d (M) = k_{off} (s^{-1}) / k_{on} (M^{-1}s^{-1}) \quad (4)$$

(4)式より抗体の親和性改変においては結合速度定数改変と解離速度定数の改変の2通りのアプローチが可能であることがわかる。一般的に単量体の抗原抗体の相互作用の結合速度定数はそれぞれの分子の拡散定数によって制御される(53)。分子間相互作用における最大の結合速度定数はおよそ $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 程度であるが、解離速度定数には制限がなく、抗体の親和性は一般的に解離速度定数により決定される。

CDR 改変エンジニアリングでは、進化分子工学を利用したファージディスプレイ法や、構造情報に基づくラショナルな設計手法が一般的である(6,19,54,55)。これらのエンジニアリングに関して、特異性および親和性の観点から抗原認識を記述するために熱力学的解析がなされており、相互作用における Tyr 残基の役割(56)やイオン結合・水素結合等の非共有結合が果たす熱力学的寄与(38,40)などが詳細に議論されている。このような熱力学情報に基づき CDR を改変することで、抗原に対する相補性を改善した抗体を取得することが可能となる。医薬品研究においては特にその利用が活発であり、熱力学情報に基づく開発戦略の有効性が示されている(33,57)。

・ **Framework Region を対象とした抗体エンジニアリング**

抗体の定常部は抗原との相補性を決定する領域である CDR に加え、CDR を連結する4つの FR により構成される。重鎖・軽鎖それぞれに N 末端側より FR1、FR2、FR3、FR4 の4領域が存在する(Fig. 1-1b)。FR は Fv 構造を決定する骨格構造を形成する領域であるため、熱安定性や凝集性など、分子特性の改変の観点からエンジニアリングが行なわれている(58,59)。また、CDR のカノニカル構造を支える足場の役割も担っているため、FR への変異導入が抗体の親和性や特異性に影響を与える例も知られている(60–62)。足場となる FR に変異を加えることで、CDR の構造や相対配置が変化し、それによって抗原との相補性が改善するため親和性が

向上する。したがって、このような従来知られている FR による親和性向上効果もまた、解離速度定数の改善によるものである。

近年、抗体の FR のうちの一つである FR3 への変異導入によって結合速度定数を大きく改変させる技術が報告された(7)。本技術の詳細に関しては後述するが、FR3 に抗原のエピトープ電荷と対になる電荷を有する荷電アミノ酸を導入することで親和性を向上させる手法である。分子間相互作用における結合速度定数は一般的にそれぞれの分子の拡散定数によって決定される。分子間の静電相互作用は遠距離で作用する相互作用であり、分子間の衝突頻度を高める(53,63)。上記の FR 改変技術もこの概念に基づいており、分子表面に露出している FR3 に荷電アミノ酸を複数導入することで、抗原抗体間の静電相互作用を増強させることで結合速度定数が向上すると考えられている。先述のように、抗体の親和性は、結合速度定数の成分と解離速度定数の成分で構成される。Fig. 1-4 に、エンジニアリングによってそれぞれの速度定数を改善した場合に単位時間あたりに形成される複合体数を模式的に示す。解離速度定数を改善した場合は、単位時間あたりに得られる複合体数に大きな変化は見られないが、一方で結合速度定数を改善した場合には複合体数が顕著に増加する。これは解離速度定数が複合体形成後の結合状態に依存しているのに対し、結合速度定数が結合前もしくは結合過程に依存しているためであると考えられる。先述の第 2 節 1 において、親和性改変は、高性能な診断薬開発に直結するアプローチとなりうることを述べたが、より短時間でより多くの抗原検出が求められる診断薬分野においては、特に結合速度定数の改善がより大きな効果を発揮すると考えられる。

3. FR3 への荷電アミノ酸導入による親和性向上技術

上述した FR 3 に荷電アミノ酸を導入することによる親和性改変技術は、結合速度定数を向上させることで抗体を高親和性化する唯一の技術である(7)。この先行研究では、変異導入の具体的方法と静電相互作用による結合速度定数向上の効果について述べられているため、以下にその方法と結果について概説した。

親抗体は 2 種類のマウス抗トロポニン I 抗体であり、ヒト心筋トロポニン I (cTnI) の塩基性領域 (CQPLELAGLGFAEL QDL)、酸性領域 (CRPAPAPIRRRSSNYRAYATEPHAKKKSKISASRKLQLKTLTLLQIAK) の 2 種類のペプチドそれぞれを免疫源として、ファージディスプレイ法を利用して反応性クローンを選択した。酸性エピトープに対する抗体を A1、塩基性エピトープに対する抗体を A2 とし、1) CDR 近傍に存在する領域に含まれるアミノ酸、2) 抗体分子表面に存在するアミノ酸、3) 溶媒に露出したアミノ酸、の 3 条件を満たす領域として、FR3 中の変異導入箇所を選択する。静電相互作用を利用するため、変異導入する荷電アミノ酸はエピトープ電荷と対になるように決定しており、エピトープが酸性である A1 に対しては塩基性アミノ酸である Arg および Lys、エピトープが酸塩基性の A2 に対しては酸性アミノ酸である Asp を変異導入した。作製した変異体に対して、SPR による速度論的解析、ELISA 法によるイオン強度依存的な反応性比較、DSC による熱安定性解析を行っている。

SPR を用いた速度論的解析の結果、A1 および A2 いずれの変異体に対しても結合速度定数が向上した。また ELISA 測定の結果、荷電アミノ酸を導入した変異体抗体と抗原との反応性は、イオン強度の増加に応じて低下しており、本技術による結合速度定数向上効果が静電相互作用に基づくものであることが示された。物性への影響については、DSC を用いた熱安定性解析によって変異導入によって熱安定性が低下することが確認されている。

本論文により、静電相互作用を利用することで抗体の結合速度定数を向上させることが可能であることが示されている。本知見を抗体エンジニアリングに応用することで、抗体の産業応用が促進されることが期待される。しかしながら、本技術による親和性向上の詳細なメカニズム解析は実施されていない。先述のように、抗原抗体相互作用の分子認識機構を詳細に解析するためには、熱力学的な解析が必須である。また、本論文で検討した分子形態は重鎖および軽鎖の可変部をリンカーで連結した 1 本鎖抗体 (single chain Fv; scFv) である。本文中ではその他の分子形態での適用可能性に関しても言及しているが、実際に改変効果が得られるか否かは未確認である。抗体を産業利用する際には、治療薬であれば IgG、診断薬であれば Fab の分子形態で利用される。また分子特性については、scFv は Fab や IgG などその他の分子フォーマットと比較して熱安定性が低くなるのが一般的である。そのため、将来的な産業応用の可能性や、変異導入による熱安定性に対するデメリットを考慮した場合、scFv 以外の分子形態で変異効果を立証することも重要となる。

本技術によって結合測定定数が向上した抗体は、短時間でも複合体形成量が高くなると考えられるため、迅速性や・高感度測定への要望が強い臨床検査薬のような産業分野への応用価値は高い。

第3節 研究の目的

FR への荷電アミノ酸導入によって抗体の結合速度定数が向上する。このフレームワーク改変手法は結合速度定数の観点から親和性を向上することが可能な唯一の方法である。抗原認識部位である CDR に変異を加えないこと、また FR は CDR に比べて比較的配列変化が少なく保存性がある領域であることから本手法は一般性の高い親和性改変手法として期待される。

FR 改変による結合速度定数向上効果は、静電相互作用を利用することによって分子どうしの衝突頻度が向上するためであると理解されている。しかしながら、前述のように分子間相互作用における静電相互作用の効果は、遷移状態においても重要な寄与を果たし、また抗原抗体反応においても親和性向上と遷移状態との関係性が報告されている(48)。遷移状態における熱力学的解析を実施し、反応プロセスに与える影響を詳細に解析することで親和性向上機構を明らかにすることが可能となる。

本技術に関しては、詳細な物理化学的解析の報告はなく、遷移状態への寄与を含めて作用機構に関しては十分に記述されていない。また、骨格領域である FR の改変によって CDR の抗原認識能は変化することも知られているが、本技術に関しては抗原認識能においても解析されていない。そのため本研究では、FR 改変における親和性向上の分子認識機構を明らかにすること、および CDR 上のホットスポット抗原認識への影響を解析することを目的とした。

研究では、抗インスリン抗体および抗リゾチーム抗体 (HyHEL-10) を対象として FR3 変異体を作製し、速度論的解析を行った。また、変異体における遷移状態への寄与を明らかにするため、遷移状態における熱力学パラメータを解析した。また酵素の誘導適合に見られるように、分子間相互作用においては、安定な結合形成のために分子構造の動的変化が生じている(46)。そのため本研究においても、分子動力学計算により結合速度定数向上変異体における動的構造の変化を解析し、親和性向上における分子認識機構の解明を試みた。

本研究によって FR 改変による親和性向上機構が明らかになることで、結合速度定数を改善するための設計指針を見出し、親和性向上に新たな改変ストラテジーを提案することが可能となる。

第4節 本論文の構成

本論文は第1章の序論、第5章の総括を含む5つの章から構成される。第1章では、抗体分子の特徴とその産業応用へ向けたエンジニアリング手法を概説した。また、今回の研究テーマであるFR改変技術における現状と研究課題について記載している。

第2章では、抗インスリン抗体を対象とした速度論的解析及び遷移状態解析結果について議論した。第3章では、抗リゾチーム抗体を対象として解析を行った。第2章の抗インスリン抗体の解析結果と合わせて、FR改変技術の一般性を議論した。また熱力学的解析結果から、変異における遷移状態の変化について議論した。また、抗リゾチーム抗体では、過去の研究成果から、CDR上のアミノ酸の抗原認識における役割が詳細に解析されている。特にHY33は抗原認識に必須であることが知られており、抗リゾチーム抗体の抗原認識におけるホットスポットとして同定されている。第3章では、これらホットスポットを含むCDRの種々のバリエーションを用いてFR改変を施し、親和性向上効果に対する影響をおよび遷移状態の変化を議論した。

第4章では、分子動力学計算を用いて動的構造解析を行った。FR改変における分子内部の構造変化について、初期構造からの変化量であるRMSD値を指標として解析を行った。CDR L1~L3およびH1~H3の相対的配置の変化を解析することで、親和性向上における認識機構について動的構造変化の観点から議論した。

第5章では本研究テーマにおける、各章のまとめを行った。また今回明らかになった研究結果より、結合速度定数向上を目的とした親和性改変における新たな設計ストラテジーを提案するとともに、本技術の産業分野への応用展開について議論することで本研究の総括とした。

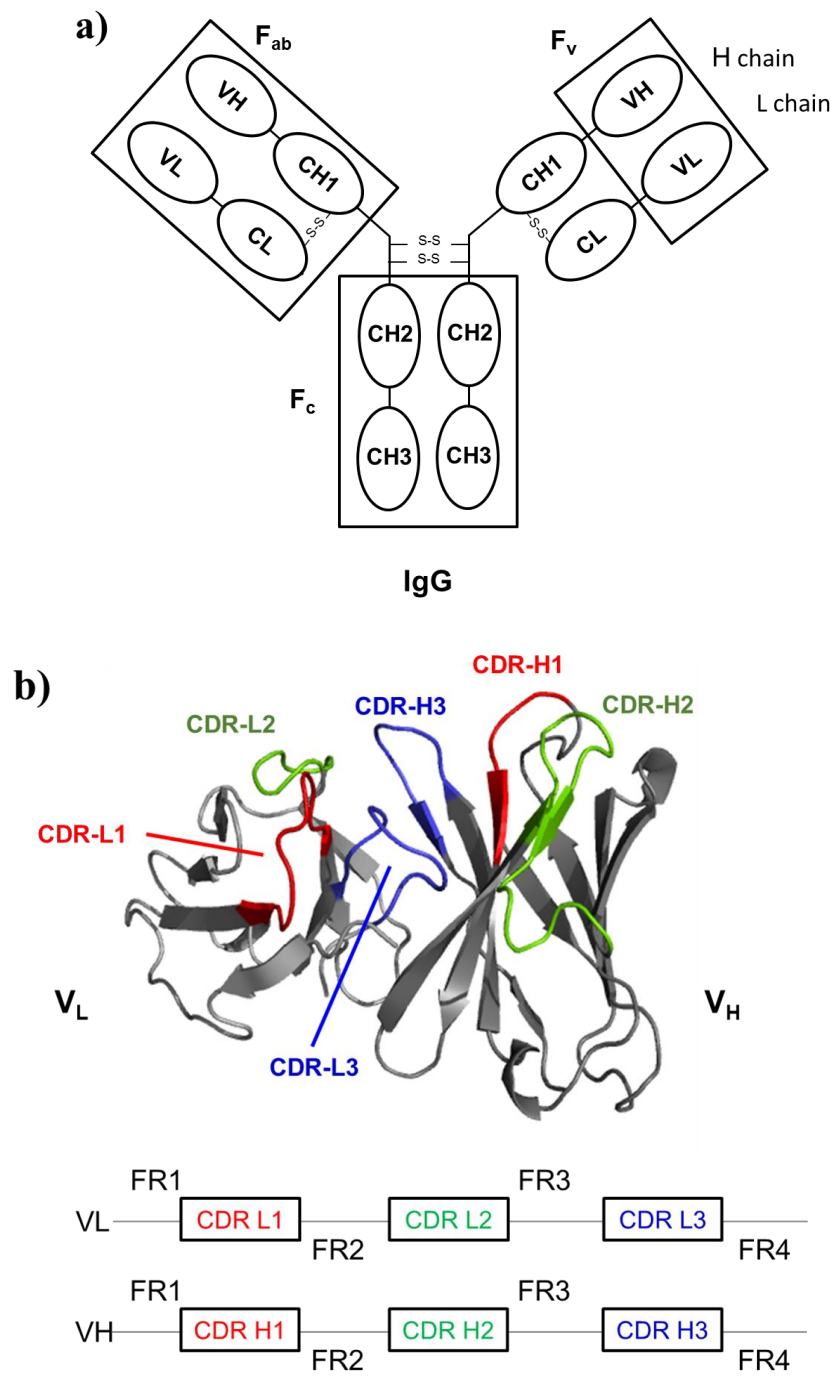


Fig. 1-1. a) IgG の構造。複数のフラグメントが存在する
b) Fv の 3 次構造と 1 次構造

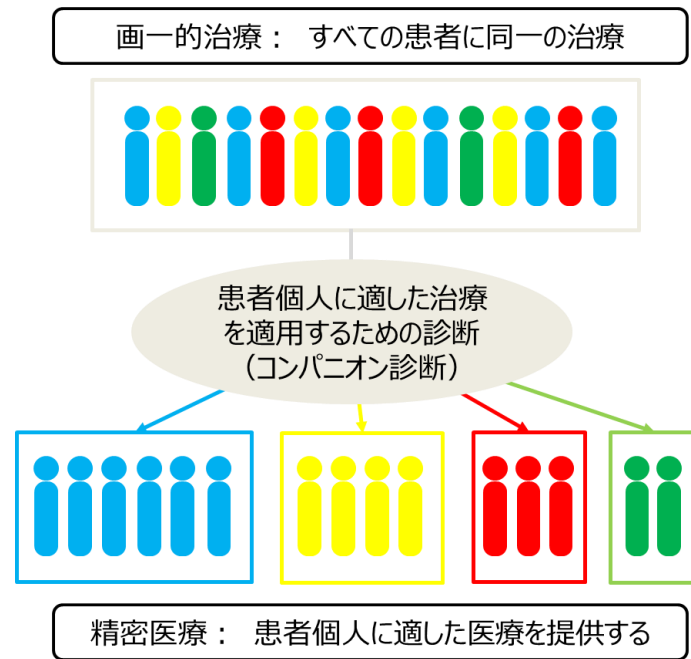


Fig. 1-2. 精密医療の実現におけるコンパニオン診断の位置づけ
コンパニオン診断が充実することで、精密医療が実現可能となる

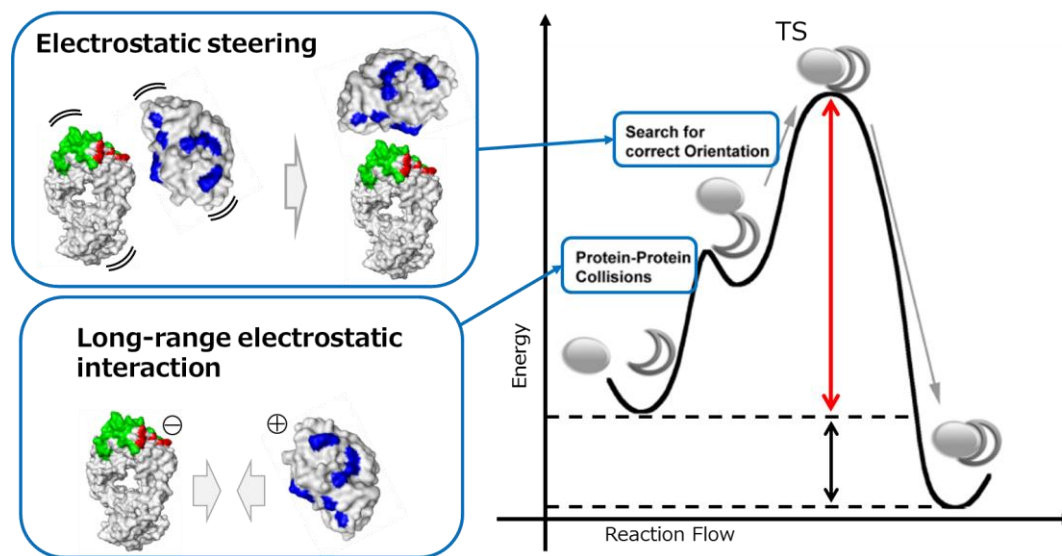


Fig. 1-3. 抗原抗体反応におけるエネルギー座標
衝突頻度、配向制御には静電相互作用が寄与する
相互作用過程においてもっともエネルギーが高く不安定な状態を遷移状態 (TS) と定義する。(赤矢印は始状態と遷移状態のエネルギー差)
エネルギー図は *James et al., PNAS. : 2009 vol. 106(8) 2559–64* より抜粋

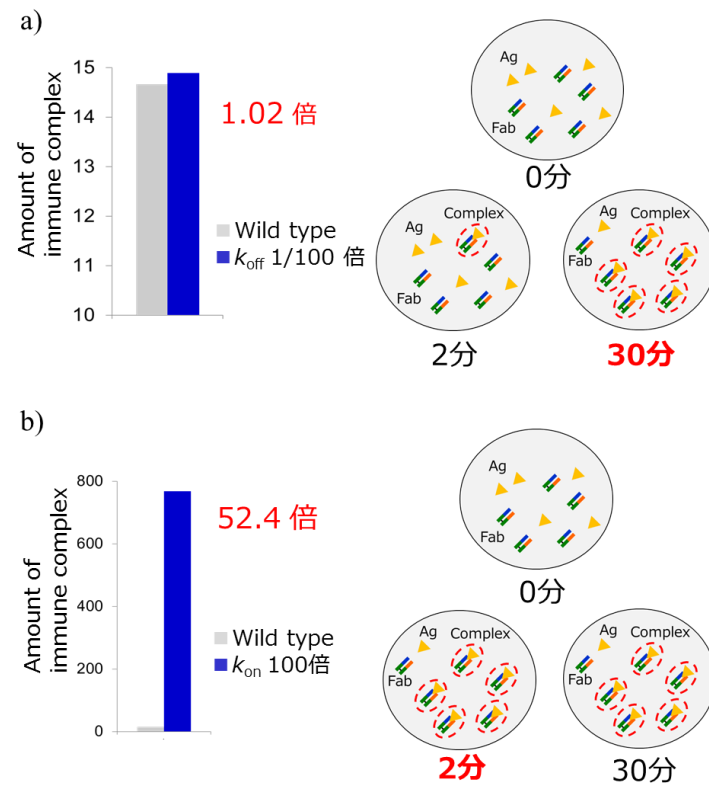


Fig. 1-4. 単位時間当たりの複合体数の変化

- c) 解離速度定数を 100 倍改善した場合の変化
 d) 結合速度定数を 100 倍改善した場合の変化

第2章 抗インスリン抗体における親和性解析及び遷移状態熱力学の解析

第1節 緒言

第1章でフレームワーク領域への変異導入による抗体親和性向上技術に関して概説した。本手法による親和性向上は、特異性を変化させずかつ結合速度定数を向上させることが可能な唯一の手法として注目される。しかしながら、その技術的汎用性や親和性向上における物理化学的解析については詳細に実施されていない。本章では、抗インスリン抗体を対象としてフレームワーク領域にアスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニンの4種の荷電アミノ酸を導入しその効果を検証した。また、熱力学的解析を行うことで荷電アミノ酸導入変異体の遷移状態における熱力学的寄与の変化を解析した。

その結果、正電荷アミノ酸導入により、親和性が向上するのみならず、アスパラギン酸、グルタミン酸といった負電荷アミノ酸の導入によって親和性が低下することが明らかとなった。また、正電荷アミノ酸による親和性改変抗体では、遷移状態における熱力学的パラメータが変化していた。

第2節 実験方法

1. 組換えタンパク質の発現・精製

モデル抗体として、抗インスリン抗体を用いて FR 改変を行った。抗インスリン抗体遺伝子については、シスメックス株式会社にて作製されたハイブリドーマより取得した。FR 変異体作製における変異箇所については、先行研究(1)に従って決定した。抗体への変異導入はすべて site-directed mutagenesis (Stratagene)にて行った。Fig. 2-1 に示す抗インスリン抗体 Fab 断片の FR3 上の特定の 5 箇所にアスパラギン酸、グルタミン酸、リジン、アルギニンの荷電アミノ酸 4 種を導入した。それぞれを Ins-LFR3D5、Ins-LFR3E5、Ins-LFR3K5、および Ins-LFR3R5 とした。発現ベクターには pcDNA 3.4 TOPO (life technologies)を用い、発現システムには Expi293TM expression system (life technologies) を用いた。37 °C で 5 日間培養した後、上清をプロテイン A カラム(GE healthcare)で精製した。Fab フラグメントの調製は Mouse IgG1 Fab and F(ab')₂ Preparation Kit (pierce) を用いた。得られた Fab フラグメントは Superdex200 Increase 10/300GL (GE healthcare) にてゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行った。

2. SPR による速度論的及び熱力学的パラメータの取得

速度論及び熱力学パラメータの取得のため、BIAcoreT200 (GE Healthcare)を用いた SPR 測定を実施した。精製された Fab は HBS-EP buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05 % surfactant P20)に緩衝液を置換し、ヒトインスリンが固定化された CM5 センサチップに流速 30 μ l/min にて添加した。センサグラムの解析には BIA evaluation software version 2.0.2.(GE Healthcare)を用い、1:1 Langmuir binding model によるグローバルフィッティングにより K_d を決定した。熱力学解析は、5 温度 (283.15 K, 288.15 K, 293.15 K, 298.15 K, 303.15 K) にて決定した K_d 値に基

づきファントフォッププロットより得た。また、遷移状態のエンタルピーにはアイリング近似式を用いた。

3. ELISA 測定

リン酸緩衝液で 2.5 $\mu\text{g/ml}$ となるように希釈したヒトインスリンを 96 ウェルのマキシソーププレートに 100 $\mu\text{l/well}$ となるように添加し、4 $^{\circ}\text{C}$ で 12 時間インキュベーションした。1 % w/v BSA を含むリン酸バッファーを 300 $\mu\text{l/well}$ となるように添加しブロッキングした。各変異体抗体を 0 mM, 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM および 1 M の NaCl を含むリン酸バッファーで 2 $\mu\text{g/ml}$ となるように調製し、100 $\mu\text{l/well}$ となるように添加した。室温で 1 時間振盪した後、0.05 % v/v Tween20 と 1 % w/v BSA を含むリン酸緩衝液を用いて 3 回洗浄した。次に HRP 標識抗マウス IgG 抗体を 100 $\mu\text{l/well}$ 添加し、室温で 1 時間振盪した後 3 回洗浄した。TMB 基質を添加し 10 分間静置した後、1N 硫酸で酵素反応を停止させ、450nm の吸光度を測定した。

4. 示差走査熱量計 (DSC) による熱安定性測定

DSC は、温度を一定速度で変化させた時に、試料の相転移（資料中の分子の熱変性）に関連した微小な熱変化を測定することで、分子の熱安定性を評価する方法の一つである。測定には Microcal 社の VP Capillary DSC を用いて分析した。各試料中、抗体濃度が 5 μM となるようにサンプルプレートに入れ、10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH7.3 をリファレンス試料として測定を行った。走査温度範囲は 30~100 $^{\circ}\text{C}$ で行い、走査速度は 1 $^{\circ}\text{C/min}$ とした。最終データはサンプル測定データからリファレンス測定データを引いた後、サンプル濃度による補正を行い、サンプル分子 1 mol あたりの比熱を計算した。また、各熱変性ピークの T_m 値は、比熱容量の極大値を与える温度とした。これら解析には OriginLab 社の Origin ソフト (versio.7.0) を使用した。

第3節 結果および考察

1. 荷電アミノ酸導入による速度論的パラメータの変化

抗インスリン抗体産生ハイブリドーマより取得した IgG 遺伝子を発現ベクター (pcDNA3.4) にクローニングした後、Expi293 発現システムにより発現させた。Protein A によるアフィニティ精製を行った。Fig. 2-2 に精製後の SDS-PAGE 画像を示した。還元状態で分子量 50 kDa および 25 kDa にバンドが確認されたためこれを IgG サンプルとした。精製サンプルは Mouse IgG1 Fab and F(ab')₂ Preparation Kit (Pierce) を用いて Fab 化した後、ゲルろ過クロマトグラフィーにより Fab 画を分離精製した。重鎖 VH・CH1、軽鎖 VL・CL より成る Fab フラグメントは分子量がおよそ 50 kDa となる。今回ゲルろ過クロマトグラフィーに使用した Superdex200 Increase 10/300GL (GE healthcare) では、該当の分子量のタンパク質は 16 ml 付近で溶出ピークが見られる。そのため、この付近のフラグメントを回収し Fab 分画とした (Fig. 2-3 a) ~ d))。

取得した Fab フラグメントに対して、荷電アミノ酸導入における抗原抗体反応への効果を検証するため、SPR を用いて速度論解析を実施した。Fig. 2-4 に野生型および各変異体の SPR のセンサグラムを示した。また、Table 2-1 に速度論的解析結果を示した。酸性アミノ酸を導入した変異体 Ins-LFR3D5 および Ins-LFR3E5 では、親和性 (K_d) 値がそれぞれ 4.4 倍、6.8 倍と低下していた。速度論的パラメータを比較すると、解離速度定数(k_{off})が 1.4 倍、0.80 倍であったのに対して、結合速度定数(k_{on})はそれぞれ 0.31 倍、0.11 倍と大きく低下していた。したがってこれらの親和性低下は、結合速度定数の低下により引き起こされたものである。荷電アミノ酸の導入により結合速度定数が低下するという知見は、本研究によって新たに得られた知見である。また塩基性アミノ酸を導入した Ins-LFR3K5 および Ins-LFR3R5 については、 K_d 値が 0.04 倍、0.009 倍となり親和性が大きく向上した。速度論的成分は、 k_{on} がそれぞれ 22 倍、2.9 倍に向上し、 k_{off} が 0.8

倍、0.03 倍であった。Ins-LFR3R5 以外の荷電アミノ酸導入変異体の解離速度定数が野生型に対して変化が見られなかったのに対し、Ins-LFR3R5 では、解離速度定数も改善する効果が確認された。

また、ELISA によってイオン強度の反応性に対する影響を評価した結果、イオン強度依存的に相対的な反応性が低下した。特に塩基性アミノ酸変異体である Ins-LFR3R5 への影響は顕著であり、相対反応性は最大で 40% 程度にまで低下した(Fig. 2-5)。

これらの結果より、FR への荷電アミノ酸導入により、親和性を向上させることができるのみならず、親和性を低下させることも可能であることが示された。Ins-LFR3K5 および Ins-LFR3R5 による親和性の向上結果は、塩基性アミノ酸導入によって、親和性の向上が可能であることを示している。天然に存在するタンパク質の正味の電荷は-5 から 5 に分布し(2)、インスリンの pH 7.4 での正味電荷は-3 である。また真核生物が発現する可溶性タンパク質の多くは低い pI を有し中性環境では負電荷を帯びる(3)。そのため、本手法のように正電荷であるアルギニン、リジンによって結合速度定数を向上させる手法は一般性が高いと考えられる。また、パラトープ、エピトープの構造的な相補性を改善することで親和性を改善する従来の戦略(4,5)は複合体の構造情報やホットスポットの情報が必須であるのに対し、本手法では抗体及び抗原の構造情報は必須ではないため、その点からも一般性は高いと考えられる。

一方でリジンとアルギニンの側鎖の違いによって速度論的パラメータの変化量が異なっており、そのメカニズムが異なっていることが示唆された。抗原抗体複合体の結合界面には複数の非共有結合が存在しており、非共有結合の有無が解離速度定数の大小と関係している(6)。そのため、Ins-LFR3R5 では静電相互作用による結合速度定数の向上に加え、Ins-LFR3K5 には見られない相互作用を形成することで解離速度定数も改善したと考えられる。

Table 2-1. 抗インスリン抗体及び変異体の速度論的パラメータ

	K_d (M)	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
Ins-WT	2.2×10^{-10}	$(2.5 \pm 0.01) \times 10^6$	$(5.5 \pm 0.01) \times 10^{-4}$
Ins-LFR3D5	9.7×10^{-10}	$(7.6 \pm 0.04) \times 10^5$	$(7.4 \pm 0.02) \times 10^{-4}$
Ins-LFR3E5	1.5×10^{-9}	$(2.8 \pm 0.01) \times 10^5$	$(4.2 \pm 0.01) \times 10^{-4}$
Ins-LFR3K5	8.0×10^{-12}	$(5.4 \pm 0.04) \times 10^7$	$(4.4 \pm 0.01) \times 10^{-4}$
Ins-LFR3R5	2.0×10^{-12}	$(7.2 \pm 0.05) \times 10^6$	$(1.5 \pm 0.01) \times 10^{-5}$

2. 荷電アミノ酸導入変異体の遷移状態における熱力学的寄与

第1章でも述べたように、分子間相互作用における遷移状態は配向制御や結合形成プロセスにおける重要な段階である(7)。荷電アミノ酸導入によって結合速度定数に変化を与えている本技術においては、遷移状態への寄与を明らかにすることが、改変メカニズムを解明するうえで重要な要素であると考えられる。

SPRを用いて、Eyringプロットにより遷移状態における熱力学的パラメータを取得した。各パラメータの比較を Fig. 2-6 a)および Table 2-2. に示した。変異導入により結合速度定数が低下した Ins-LFR3E5 および Ins-LFR3D5 については、エントロピー (ΔH^\ddagger) およびエントロピー (ΔS^\ddagger) いずれも変化が見られず、いずれの変異体についても野生型と同様にエントロピー (ΔS^\ddagger) が有利になり、かつエンタルピー (ΔH^\ddagger) が不利になることが遷移の駆動力であることが確認された。一方で結合速度定数が向上していた塩基性アミノ酸導入変異体 Ins-LFR3R5、Ins-LFR3K5 については、熱力学パラメータに顕著な変化が確認された。またその変化は Ins-LFR3R5、Ins-LFR3K5 それぞれで異なっており Ins-LFR3R5 では ΔH^\ddagger を獲得し、かつ ΔS^\ddagger を消失する結果となったのに対して、Ins-LFR3K5 では野生型で見られていた遷移状態における ΔS^\ddagger の貢献が大きくなっており、 ΔS^\ddagger 依存的な遷移状態の変化がより促進される結果であった。

また、同様に van't Hoff プロットにより、安定化状態での熱力学的パラメータを取得した (Fig. 2-6 b)、Table 2-2.)。その結果、Ins-LFR3E5 および Ins-LFR3D5 については、遷移状態と同様に、野生型と同様であり、エントロピー (ΔS) 駆動の相互作用であることが確認された。Ins-LFR3R5、Ins-LFR3K5 については、安定化状態においても変化が生じていたが、遷移状態とはことなりその変化は Ins-LFR3R5、Ins-LFR3K5 で共通しており、 ΔH を獲得しかつ ΔS を失う変化であった。

塩基性アミノ酸導入変異体で見られた ΔH の変化より、FR に導入した塩基性アミノ酸群の効果により、複合体がより安定化されていることが示唆された。一方で遷移状態においては Ins-LFR3R5 エンタルピー依存的、Ins-LFR3K5 ではエントロピー依存的な貢献がなされており、それぞれが全く異なる反応プロセスによって遷移状態を安定化していた。本結果は、塩基性アミノ酸が結合速度定数を向上させるという知見において、その分子認識機構はアルギニン、リジンそれぞれの側鎖によって異なることを示しているが、長距離での相互作用による過渡的複合体形成過程のみならず、近距離での結合最適化過程にも関与していることを示唆している。

Table 2-1. 抗インスリン抗体及び変異体の熱力学的パラメータ (kJ/mol)

	ΔH^\ddagger	$-T\Delta S^\ddagger$	ΔG^\ddagger	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG
Ins-WT	78	-42	36	23	-78	-55
Ins-LFR3D5	72	-32	40	55	-110	-50
Ins-LFR3E5	59	-18	41	16	-67	-51
Ins-LFR3K5	130	-100	30	-35	-27	-62
Ins-LFR3R5	-1.4	35	34	-52	-15	-67

3. 荷電アミノ酸導入による熱安定性の変化

変異導入における熱安定性の変化を、DSC を用いて解析した。野生型の変性中点 (T_m) は 76.8 °C であり、一般的なマウス抗体 Fab の T_m 値と同等であった(8)。変異体の測定結果を Fig. 2-7 に示した。いずれの変異体にお

いても、野生型と比べて熱安定性が低下していた。親和性が低下した Ins-LFR3D5、Ins-LFR3E5 の T_m の低下は、親和性が向上した Ins-LFR3R5 よりも顕著であり、最大で 9.9 °C の T_m 値の低下が確認された。Ins-LFR3K5 に関しては、サンプル調製時の濃縮過程において凝集塊を形成してしまい、評価に至らなかった。リジンの局所的な導入は、溶解度を極端に低下させてしまうような影響があると考えられる。これらの結果から、5 箇所の荷電アミノ酸導入により、熱安定性およびコロイド安定性は低下することが示された。多くの場合、熱安定性と親和性向上の間にトレードオフが見られるが(9,10)、アルギニンの導入による親和性向上手法は、熱安定性の大きな低下を伴わずに顕著な親和性向上を達成するものである。

第4節 結言

本章では、抗インスリン抗体を対象として FR への荷電アミノ酸導入による速度論的パラメータ変化を検証するとともに、遷移状態の熱力学的変化について解析した。速度論的解析結果から、塩基性アミノ酸導入によって結合速度定数が向上し、酸性アミノ酸導入によって結合速度定数が低下した。荷電アミノ酸導入により結合速度定数が向上するのみならず親和性を低下させ得ることが新たな知見として獲得された。

遷移状態解析結果からは、アルギニンもしくはリジンの荷電アミノ酸を FR に導入することにより、遷移状態エネルギーが安定化することが明らかとなった。アルギニンを導入した変異体ではエンタルピー依存的な変化、リジンを導入した変異体ではエントロピー依存的変化が生じており、遷移状態を安定化するメカニズムは導入するアミノ酸種によって異なっていた。これらの結果から、塩基性アミノ酸による親和性向上は、長距離静電相互作用を増強することにより分子の衝突頻度を高め、過渡的複合体の形成を促進するのに加え、遷移状態における結合の最適化プロセスにも関与していることが示唆された。

次章では、異なる等電点を有する他の抗原に対して **FR** 改変を実施し、知見の一般性を議論した。また、**CDR** 上のホットスポットに変異を加えることで抗原との結合状態を変化させたクローンに対して **FR** 改変を実施した。速度論的、熱力学的パラメータを比較することにより、改変による認識機構の変化を議論した。抗原との結合状態が異なることによる違いを解析することで、**FR** 改変における分子認識機構をより詳細に理解することができると考える。

Ins-WT	Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I S C <u>S A T S S V S Y M Y</u> W Y Q Q K P G
Ins-LFR3D5
Ins-LFR3E5
Ins-LFR3K5
Ins-LFR3R5

S S P K P W I Y <u>R T S N L S</u> S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E
..... D · D · D · · D · D ·
..... E · E · E · · E · E ·
..... K · K · K · · K · K ·
..... R · R · R · · R · R ·

D A A T Y Y C <u>Q Q Y H T Y P P T</u> F G G G T K L E I R R A D
.....
.....
.....
.....

Fig. 2-1. 抗インスリン抗体軽鎖の変異体配列
下線は CDR 領域（上から L1、L2、L3）

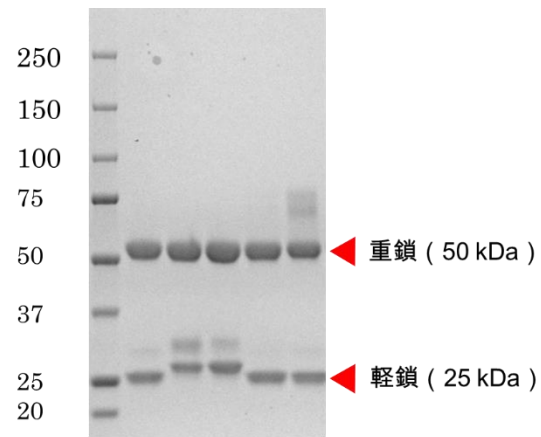


Fig. 2-2. Affinity 精製後 SDS-PAGE (Reduced)

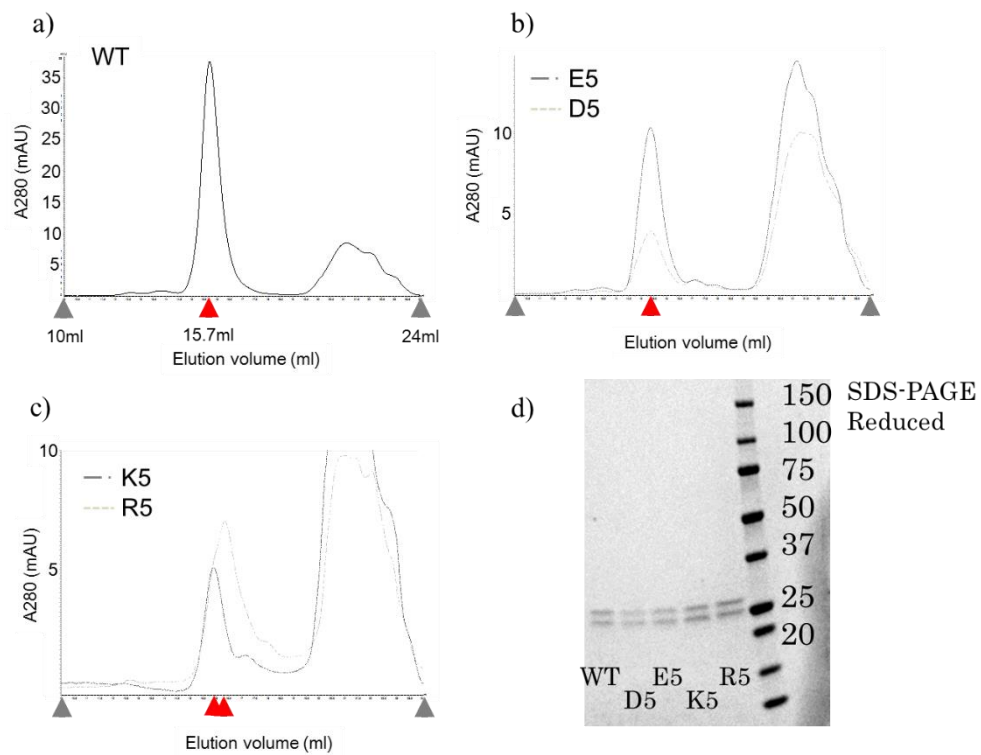


Fig. 2-3. IgG 消化後 SEC による Fab 断片の精製
a) ~ c) SEC クロマトグラム d) SEC 精製後 SDS-PAGE

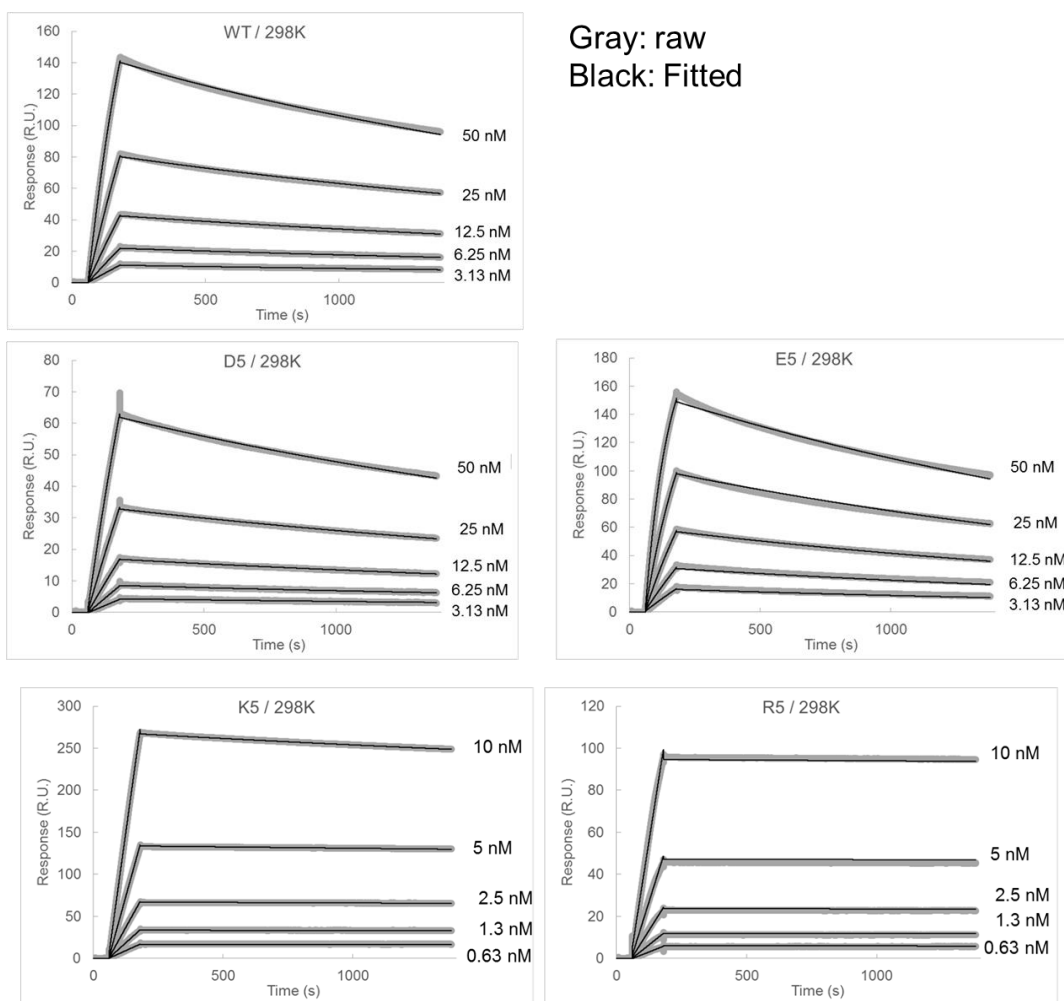


Fig. 2-4 野生型および変異体のセンサグラム

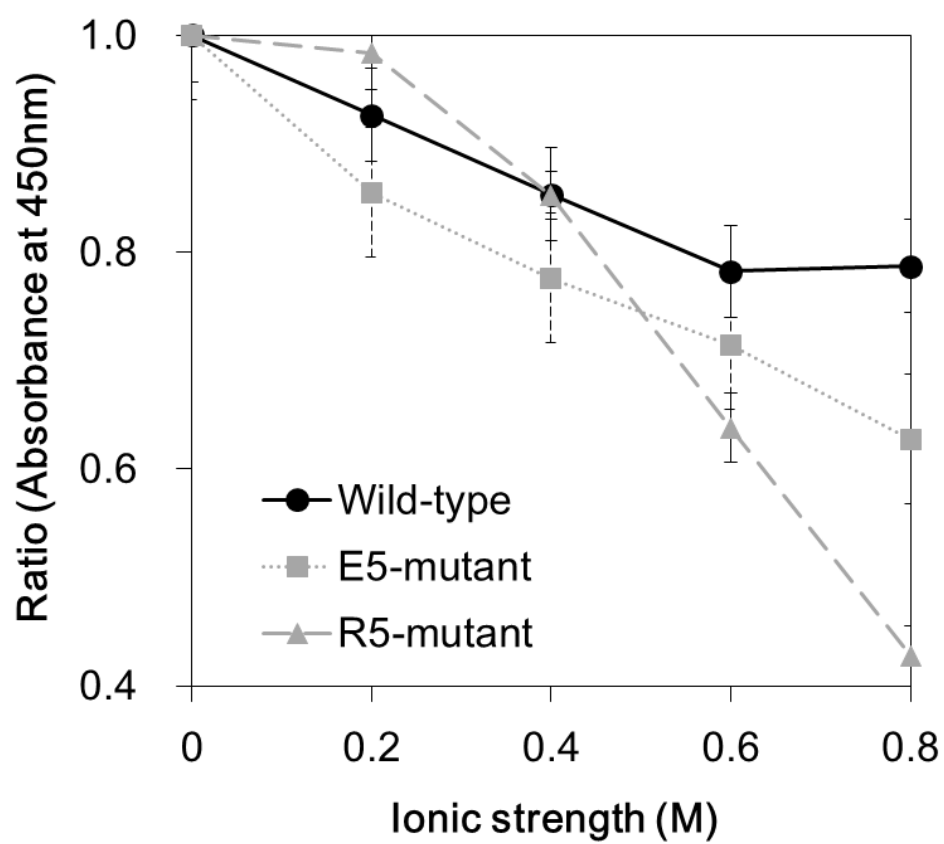


Fig. 2-5. ELISA 反応によるイオン強度依存性

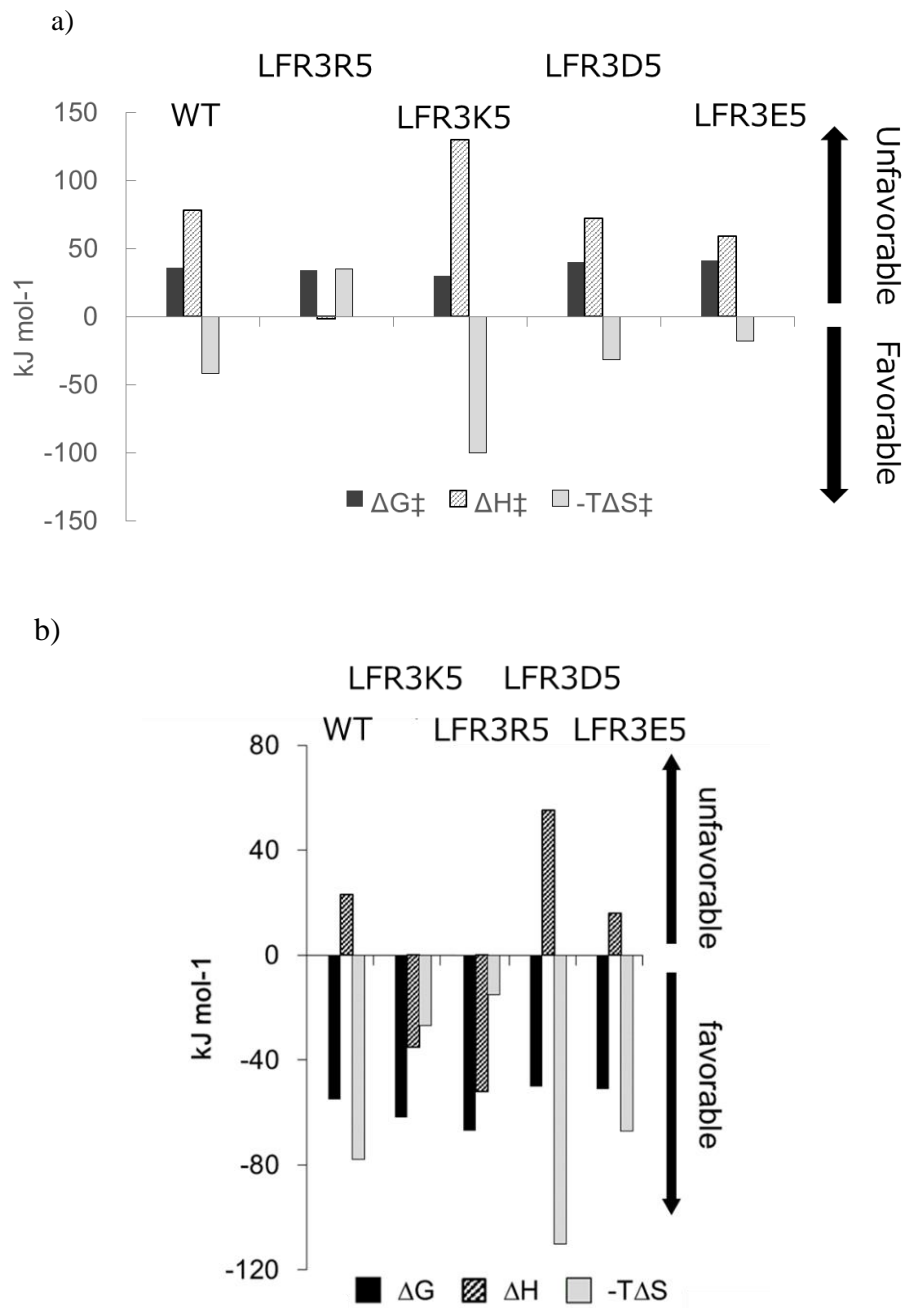
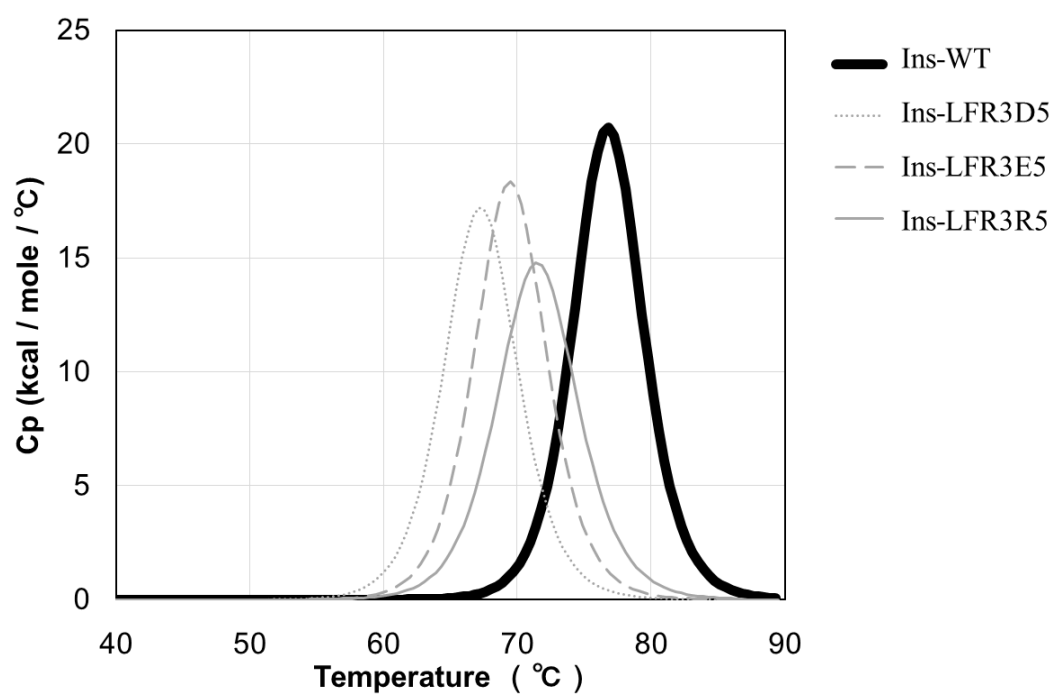


Fig. 2-6. 熱力学的パラメータ比較
a). 遷移状態での比較 b). 安定化状態での比較



Sample	T_m (°C)
Ins-WT	76.8
Ins-LFR3D5	66.9
Ins-LFR3E5	69.6
Ins-LFR3K5	-
Ins-LFR3R5	71.1

Fig. 2-7. 変異導入による熱安定性の変化
Ins-LFR3K5 は溶解度が低く測定できなかった

第3章 HyHEL-10 及び CDR 変異体を対象とした親和性解析

第1節 緒言

1. 概要

第2章では、抗インスリン抗体を対象として速度論的、熱力学的それぞれの観点から、親和性改変効果とそのメカニズムについて議論した。抗原 pI が 5.3 であるインスリンに対して、抗インスリン抗体の FR3 に塩基性アミノ酸残基であるアルギニンもしくはリジンを導入することで結合速度定数が向上した。またこれらの変異体においては、遷移状態を安定化することによって親和性向上を達成していることが明らかとなった。遷移状態における寄与はアルギニン、リジンで異なっており、アルギニン変異体がエンタルピー依存型であるのに対し、リジンではエントロピー依存型となっていた。

本章では、pI が 11.0 と塩基性でありエピトープ表面に正電荷を豊富に含む、ニワトリリゾチーム (HEL) を抗原とする抗リゾチーム抗体 (HyHEL-10) を対象として速度論的解析、熱力学的解析を行った。HyHEL-10 は抗原認識機構における熱力学的観点からの研究が報告されており、抗原認識における CDR 上のアミノ酸の寄与が詳細に解析されている。抗原認識に関わる CDR 上のアミノ酸変異体に対しても同様の FR 改変を実施し、FR 改変による CDR の抗原認識機構の変化を解析した。これらの結果より、FR

改変による親和性向上効果とそのメカニズムの一般性を議論することを目的とした。

2. HyHEL-10 の分子認識機構

抗リゾチーム抗体 (HyHEL-10) はニワトリリゾチームを抗原とするマウス由来の抗体である。ニワトリリゾチームは分子量 14.7 kDa のタンパク質であり、等電点は 11.0 と中性環境下では塩基性を帯びるタンパク質である。リゾチーム上の HyHEL-10 のエピトープ部分は塩基性に富む領域である (Fig. 3-1)。第 1 章では、抗原抗体相互作用における熱力学的解析の重要性について述べたが、HyHEL-10 では CDR の変異導入解析が盛んに行なわれており、X 線結晶構造解析と熱力学的解析を組み合わせることで、抗原認識機構が官能基レベルで詳細に議論されている。

CDR に存在するアミノ酸の種類には偏りが見られるが、中でも Tyr は出現頻度が高く、抗原認識に関与する場合が多い。HyHEL-10 の CDR にも Tyr 複数存在しており、それぞれの変異体解析によって抗原認識に関わる Tyr の同定されている。その結果から Tyr は、①水酸基による水素結合の形成、②芳香環によるファンデルワールス相互作用、③ NH- π 相互作用・ π - π 相互作用形成、④芳香環を用いた協同的抗原認識、を可能にすることが明らかとなっている(1)。抗原抗体反応における反応エネルギーは、基本的にはエンタルピー-エントロピー補償則に従うが、この補償則から外れ親和性に大きく寄与している部位を **energetic hot-spot** という。また抗原複合体結晶構造解析からは、Tyr の芳香環が形成する NH- π 相互作用と π - π 相互作用がエントロピー損を最小限に抑えることで、親和性に大きく寄与していることが明らかとなっている(1,2)。このように Tyr は芳香環と水酸基が持つ性質を利用して、多様な相互作用を形成するため、抗原認識における特異性・親和性の創出において重要な寄与を果たす。HyHEL-10 では軽鎖 50 番目、重鎖 33 番目および重鎖 50 番目の Tyr がホットスポット

に当たり、Ala に置換することで親和性が著しく低下する。本研究では、これらの hot-spot に加え、その他抗原認識に関与する Tyr について変異体を作製し解析を行った。先行研究より解析された Tyr 変異体の熱力学測定結果の概要を表 3-1 に示した。また、そこから明らかにされた Tyr の役割について以下に概説する。

重鎖 33 番 Tyr (HY33)

HY33 は HyHEL-10 / HEL 反応の hot-spot の一つであり、抗原の Lys-97 の側鎖と水素結合を形成する。Ala への変異 (HY33A) によって親和性が著しく低下し、Phe への変異 (HY33F) によって親和性 (K_a) は $42 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ から $7.1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ に減少する。複合体結晶構造解析の結果から、HY33F における Phe の芳香環の配向は野生型における Tyr の芳香環の配向と同じであることがわかっている(3)。熱力学的解析の結果からは、HY33 と K97HEL の水素結合の消失に伴い $\Delta\Delta H$ 18.3kJ/mol のエンタルピー変化が生じる。また、HY33 への変異導入は、CDRH2 の配向を大きく変える可能性にも言及されており、HY33 は抗原結合における CDRH2 の配向制御に重要であると考えられている。

重鎖 50 番 Tyr (HY50)

HY50 もまた hot-spot の一つであり、この Tyr の水酸基は抗原の Arg-21 の側鎖および Ser-100 の側鎖と合計 3 つの水素結合を形成する。HY33 と同様に、Ala への変異 (HY50A) によって親和性が著しく低下し、Phe への変異 (HY50F) によって親和性は (K_a) は $42 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ から $2.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ に減少する。HY50 は複数の水素結合形成に関与しているため、この水酸基の除去によって大きなエンタルピー変化が生じている。

重鎖 53 番 Tyr (HY53)

HY53 の Ala 変異体 (HY53A) では、エンタルピー、エントロピーともに消失する。複合体結晶構造から抗原の Asp-101 の温度因子が低下するこ

とが確認されている(3)ため、この Tyr は抗原の Asp-101 周辺領域の構造安定性に関与していると考えられている。HY53A は HY33A や HY50A のように抗原との親和性に顕著な影響を与えないが、抗原との相互作用界面の安定性の低下によってエントロピー、エンタルピー変化を生じる。

重鎖 58 番 Tyr (HY58)

結晶構造解析結果から、HY58 の芳香環は、抗原の Arg-21 とカチオン- π 相互作用を形成し、水酸基は水を介して水素結合を形成する。Ala 変異 (HY58A) によって親和性は 16 倍程度低下するが、Phe の変異ではエネルギー的にも構造的にも変化は見られないため、水素結合による寄与よりも特に芳香環によるカチオン- π 相互作用が結合に重要であることが知られている(3)。

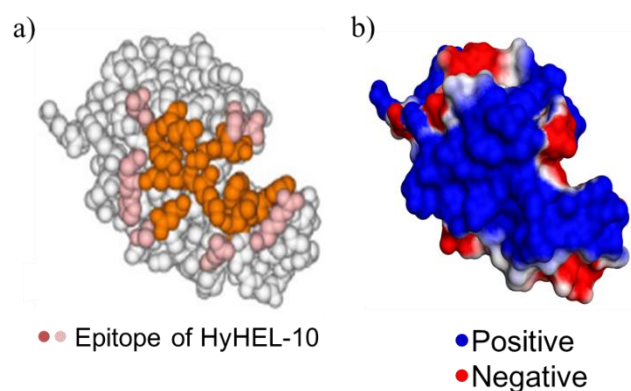


Fig. 3-1. リゾチーム上のHyHEL-10のエピトープ表面とその電荷分布
a) Shiroishi et al., 2007より転載
b) Discovery Studio (ver. 4.5; BIOVIA)によって表面電荷を表示

Table 3-1. HyHEL-10 Fv における熱力学的パラメータ比較表

	K_a ($\times 10^7 \text{ M}^{-1}$)	ΔG	$\Delta\Delta G$	ΔH	$\Delta\Delta H$	$T\Delta S$	$T\Delta\Delta S$
		kJ/mol					
HyHEL-10	42	-50.2	—	-91.5	—	-41.3	—
HY33A	—	—	—	—	—	—	—
HY33F	7.1	-45.6	4.6	-73.2	18.3	-27.6	13.7
HY50A	—	—	—	—	—	—	—
HY50F	2.9	-43.1	7.1	-59.8	31.7	-16.7	24.6
HY53A	30	-49.3	0.9	-75.6	15.9	-26.3	15.0
HY58A	2.6	-43.1	7.1	-72.3	19.2	-29.2	12.1

3. アルギニン側鎖の特性と役割

アルギニンは塩基性アミノ酸の一種であり、側鎖には3個の炭素とグアニジウム基を有している。中性環境下ではプロトン化されており正電荷を帯び、グアニジウム基は π 電子を有する平面構造をとる。アルギニンは、タンパク質の凝集・会合体形成抑制や精製におけるカラムクロマトグラフィーの分離性能の改善において添加剤として利用されている。これらの効果は、アルギニン側鎖の多様な相互作用形成に起因したものである(4-9)。アルギニン側鎖は、その特性から水素結合、イオン結合、カチオン- π 相互作用、 π - π 相互作用等の様々な相互作用形成を可能とする(10-12)。さらに側鎖のグアニジウム基については、平面構造の直上と直下が脱水和されていることが示されており、アルギニン側鎖が疎水性相互作用も可能とすることが示唆されている(13-15)。塩基性アミノ酸としての特徴のみならず、芳香族、疎水性アミノ酸としての特性も有していることで、アルギニンは多様な相互作用形成を可能とする。アルギニンの相互作用は、抗原抗体相互作用においても確認されている(16,17)。

第2章ではFRへの塩基性アミノ酸導入実験として、アルギニン、リジンを対象とした変異導入を行った。その結果、アルギニンの変異導入効果は、リジンの効果とは異なるものであった。親和性向上効果のみならず、物性に与える影響の観点から、将来的な実用性を考慮してアルギニンの変異導入によって得られた知見の一般性を議論していくことが求められる。

第2節 実験方法

1. 組換えタンパク質の発現・精製

抗リゾチーム抗体 (HyHEL-10) Fab をコードする遺伝子配列を全合成 (GenScript) により取得した。FR 変異体作製における変異箇所については、抗インスリン抗体と同様に先行研究(18)に従って決定した。抗体への変異導入はすべて site-directed mutagenesis (Stratagene) にて行った。Fig. 3-2 に示すように FR3 上の特定の 5 箇所にアスパラギン酸、アルギニンを導入した。また、第 1 節で述べた HyHEL-10 の CDR 上の Tyr 変異体 (HY33A、HY33F、HY50A、HY50F、HY53A、HY58A) に対しても同様に FR 変異を実施した。それぞれを HYHEL-LFR3D5、HYHEL-LFR3R5、HY33A-LFR3R5、HY33F-LFR3R5、HY50A-LFR3R5、HY50F-LFR3R5、HY53A-LFR3R5、HY58A-LFR3R5 とした。発現ベクターには pcDNA 3.4 TOPO (life technologies) を用い、発現システムには Expi293TM expression system (life technologies) を用いた。37 °C で 5 日間培養した後、上清を Ni-NTA カラム (GE healthcare) で精製した。Superdex200 Increase 10/300GL (GE healthcare) にてゲルろ過クロマトグラフィーによる精製を行い、Fab フラグメントを取得した。

	CDR L1																			
HYHEL-WT	D	I	V	L	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	T	P	G	N	S	V	S
HYHEL-LFR3D5
HYHEL-LFR3R5
	CDR L2																			
	N	N	L	H	W	Y	Q	Q	K	S	H	E	S	P	R	L	L	I	K	Y

	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	S	I	N	S	V	E	T
	.	.	D	.	D	.	D	D
	.	.	R	.	R	.	R	.	.	R	.	R
	CDR L3																			
	S	N	S	W	P	Y	T	F	G	G	G	T	K	L	E	I	K	.	.	.

Fig. 3-2. HyHEL-10の変異体配列 (軽鎖)

2. SPR による速度論的及び熱力学的パラメータの取得

測定条件は抗インスリン抗体と同様の方法を用いた。速度論及び熱力学パラメータの取得のため、BIAcoreT200 (GE Healthcare) を用いた SPR 測定を実施した。精製された Fab は HBS-EP buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.05 % surfactant P20) に緩衝液を置換し、ニワトリリゾチームが固定化された CM5 センサチップに流速 30 μ l/min にて添加した。センサグラムの解析には BIA evaluation software version 2.0.2.

(GE Healthcare) を用い、1:1 Langmuir binding model によるグローバルフィッティングにより K_d を決定した。熱力学解析も同様に、5 温度で決定した K_d 値に基づき van't Hoff プロットより得た。また、遷移状態の熱力学的解析には Eyring 近似式を用いた。

3. ELISA 測定

測定条件は抗インスリン抗体と同様の方法を用いた。リン酸緩衝液で 2.5 μ g/ml となるように希釈したニワトリリゾチームを 96 ウェルのマキシソーププレートに 100 μ l/well となるように添加し、4 $^{\circ}$ C で 12 時間インキュベーションした。1 % w/v BSA を含むリン酸バッファーを 300 μ l/well となるように添加しブロッキングした。各変異体抗体を 0 mM, 200 mM, 400 mM, 600 mM, 800 mM および 1 M の NaCl を含むリン酸バッファーで 2 μ g/ml となるように調製し、100 μ l/well となるように添加した。室温で 1 時間振盪した後、0.05 % v/v Tween20 と 1 % w/v BSA を含むリン酸緩衝液を用いて 3 回洗浄した。次に HRP 標識抗 His タグ抗体を 100 μ l/well 添加し、室温で 1 時間振盪した後 3 回洗浄した。TMB 基質を添加し 10 分間静置した後、1N 硫酸で酵素反応を停止させ、450 nm の吸光度を測定した。

4. 示差走査熱量計 (DSC) による熱安定性測定

測定条件は抗インスリン抗体と同様の方法を用いた。DSC 測定には Microcal 社の VP Capillary DSC を用いて分析した。各試料中、抗体濃度が 5 μM となるようにサンプルプレートに入れ、10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH7.3 をリファレンス試料として測定を行った。走査温度範囲は 30~100 $^{\circ}\text{C}$ で行い、走査速度は 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ とした。最終データはサンプル測定データからリファレンス測定データを引いた後、サンプル濃度による補正を行い、サンプル分子 1 mol あたりの比熱を計算した。また、各熱変性ピークの T_m 値は、比熱容量の極大値を与える温度とした。これら解析には OriginLab 社の Origin ソフト (versio.7.0) を使用した。

第3節 結果および考察

1. アルギニンクラスターによる結合速度定数向上効果

取得した HyHEL-10 Fab フラグメントのゲルろ過クロマトグラフィーおよび SDS-PAGE の結果を Fig. 3-3 に示した。抗インスリンの場合と同様に、SPR により速度論的解析を実施した。Table 3-2 および Fig. 3-4 に親和性解析結果とそれぞれのセンサグラムを示す。塩基性アミノ酸導入変異体である HYHEL-LFR3R5 で親和性 (K_d) 値が野生型に対して 0.01 倍と顕著に高くなっていることが示された。また、 k_{on} は 68.6 倍、 k_{off} は 0.82 倍となっており、これまでの FR 改変と同様に結合速度定数の向上に伴って親和性が向上していることが示された。一方で酸性アミノ酸導入変異体である HYHEL-LFR3D5 に関しては、抗インスリン抗体と同様に親和性の低下が確認されたが、速度定数における寄与は異なっていた。

抗インスリン抗体と同様に、ELISA によってイオン強度の反応性に対する影響を評価した。結果を Fig. 3-5 に示す。イオン強度依存的に相対的な反応性が低下した。HYHEL-LFR3R5 では、相対反応性は最大で 60%程度まで低下した。そのためアルギニン導入変異体は、静電相互作用を利用して抗原との反応性を高めていることが確認できる。

先行文献の抗トロポニン抗体および本研究における抗インスリン抗体の結果では、抗原エピトープもしくは抗原分子全体の pI より想定される電荷状態に依存して、その対となる電荷を有する荷電アミノ酸を変異導入することによって結合速度定数が向上したため、これらの効果は抗原抗体間に生じる遠距離静電相互作用の増強によって説明することができる。しかしながら HyHEL-10 の抗原である HEL は塩基性アミノ酸含有率が高く pI は 11.0 であるため、中性条件下では正電荷を帯びる。そのため HyHEL-10 における速度論的解析結果は、本技術における結合速度定数向上において、必ずしも遠距離の静電相互作用が優先しないことを示唆している。

次に、CDR 上の変異体との組み合わせによる親和性改変結果を Table 3-3 に示す。また、SPR センサグラムを Fig. 3-5 に示す。先行研究で明らかであったように、CDR のそれぞれの Tyr への変異導入によって解離速度定数が影響を受け親和性が低下した (HY33F、HY50F、HY53A、HY58A)。これに対して FR にアルギニンを導入した場合、いずれの変異体に対しても親和性は向上した (HY33F-LFR3R5、HY50F-LFR3R5、HY53A-LFR3R5、HY58A-LFR3R5)。HY50F-LFR3R5 に対しては、アルギニン導入前ですでに非特異結合によるシグナルが確認され、同一条件での SPR 解析ができなかった。アルギニン導入後においても度やはり非特異的な結合の残存が確認されたため、解析パラメータの取得には至らなかった。しかしながら、SPR のセンサグラムより、明らかにレスポンスシグナルが向上しているため、他の変異体と同様に親和性は向上していると考えられる。解析可能であったすべての場合において、解離速度定数に対する影響よりも結合速度定数への影響が顕著であったことから、FR へのアルギニン導入による効果が結合速度定数を選択的に向上させることが示された。

Hot-spot を Ala に変異した HY33A および HY50A では、親和性が著しく低下しており、SPR による親和性解析が困難であった。これに対して FR にアルギニンに変異導入した場合 Fig. 3-7 に示すように結合領域において非特異的なシグナルの向上が確認されるが、全体的なシグナルからは抗原との結合を保持できていないことが明らかであった。そのため、FR 改変による親和性改変においては、CDR 上の特定のアミノ酸残基の役割には影響を与えないことが確認された。

抗原以外のタンパク質に対する反応性を確認するため、BSA を固定化したセンサチップに対する反応性を検証した。BSA の等電点は 4.7 であるため、中性条件下では負電荷を帯びるタンパク質である。SPR によるセンサグラムを Fig. 3-8 に示す。その結果、結合領域においてレスポンスが確認

されるが、HY33A や HY50A の場合と同様に、やはり特異的な相互作用を形成していないのは明らかであった。

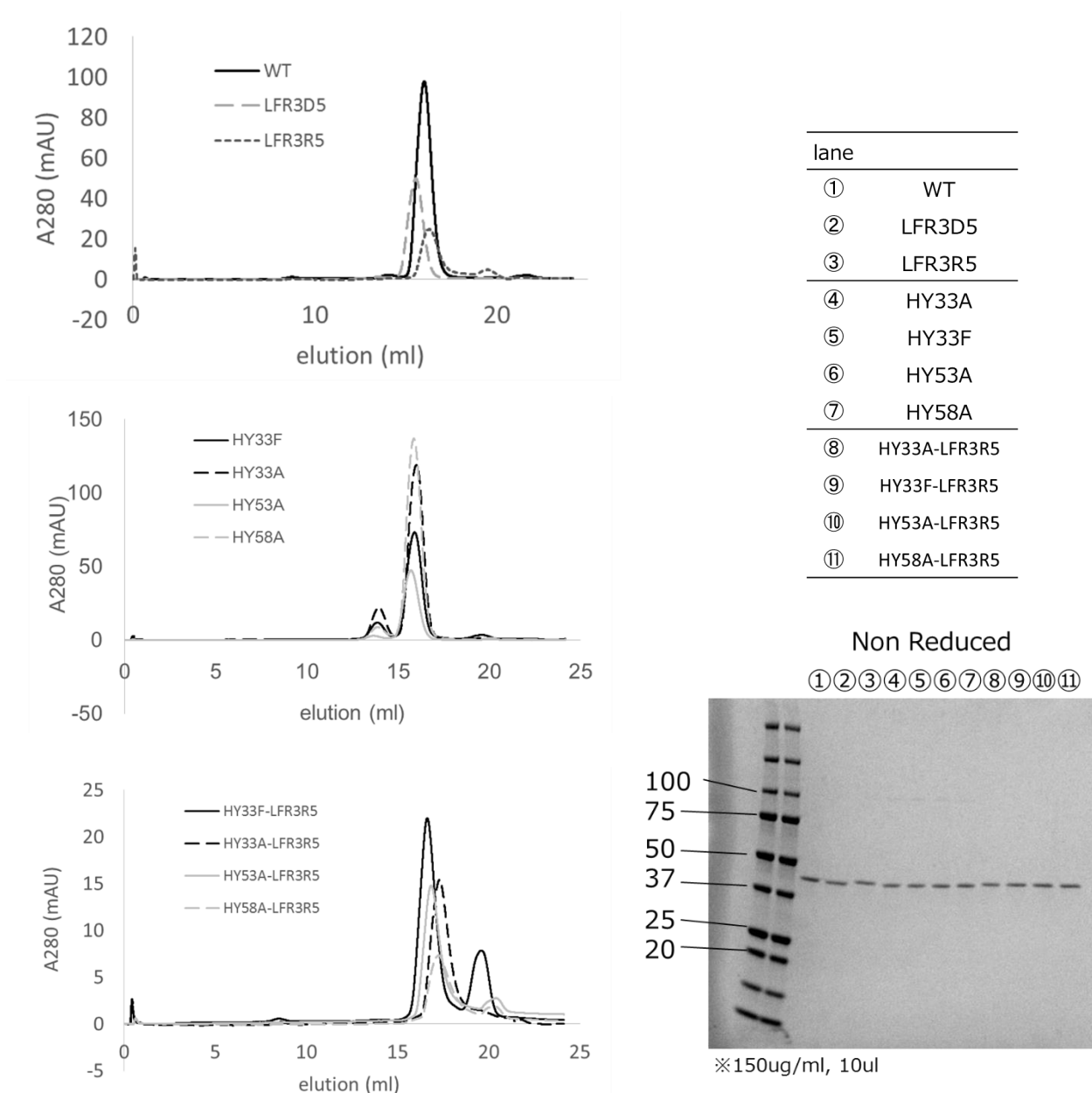


Fig. 3-3. Fab断片のSEC精製クロマトグラムとSDS-PAGE

Table 3-2. HyHEL-10 及び変異体の速度論的パラメータ

	K_d (M)	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
HYHEL-WT	2.3×10^{-10}	$(4.9 \pm 0.01) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.01) \times 10^{-4}$
HYHEL-LFR3R5	2.8×10^{-12}	$(3.3 \pm 0.01) \times 10^7$	$(9.4 \pm 0.02) \times 10^{-5}$
HYHEL-LFR3D5	4.5×10^{-10}	$(6.1 \pm 0.01) \times 10^5$	$(2.7 \pm 0.01) \times 10^{-4}$

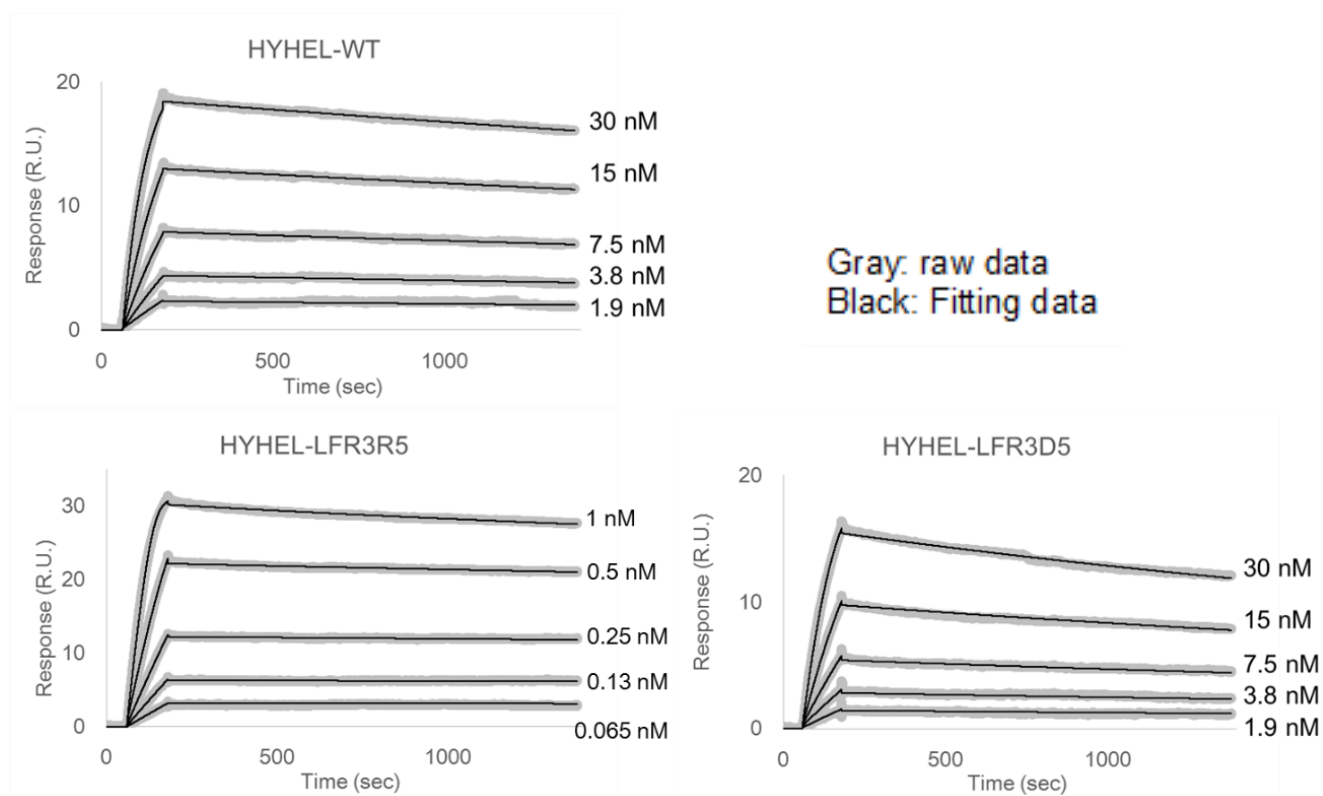


Fig. 3-4. 野生型および変異体のSPRセンサグラム

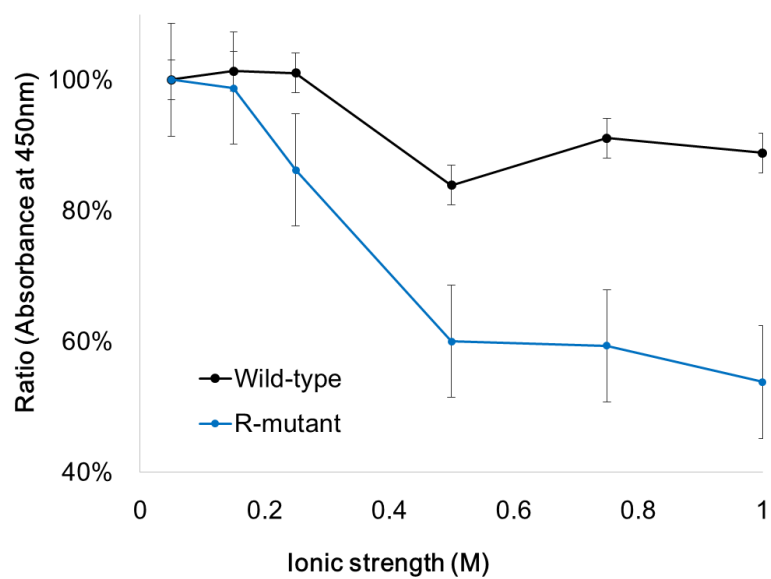


Fig. 3-5. ELISA反応によるイオン強度依存性

Table 3-3. HyHEL-10 及び変異体の速度論的パラメータ

	K_d (M)	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)
HY33F	8.4×10^{-10}	$(2.9 \pm 0.01) \times 10^5$	$(2.4 \pm 0.02) \times 10^{-4}$
HY33F-LFR3R5	1.0×10^{-11}	$(1.3 \pm 0.01) \times 10^7$	$(1.3 \pm 0.01) \times 10^{-4}$
HY50F	—	—	—
HY50F-LFR3R5	—	—	—
HY53A	1.8×10^{-10}	$(1.8 \pm 0.01) \times 10^6$	$(3.3 \pm 0.02) \times 10^{-4}$
HY53A-LFR3R5	1.2×10^{-11}	$(5.7 \pm 0.01) \times 10^6$	$(6.8 \pm 0.01) \times 10^{-5}$
HY58A	3.4×10^{-9}	$(5.7 \pm 0.03) \times 10^5$	$(1.9 \pm 0.01) \times 10^{-3}$
HY58A-LFR3R5	6.3×10^{-11}	$(1.4 \pm 0.01) \times 10^7$	$(8.5 \pm 0.01) \times 10^{-4}$

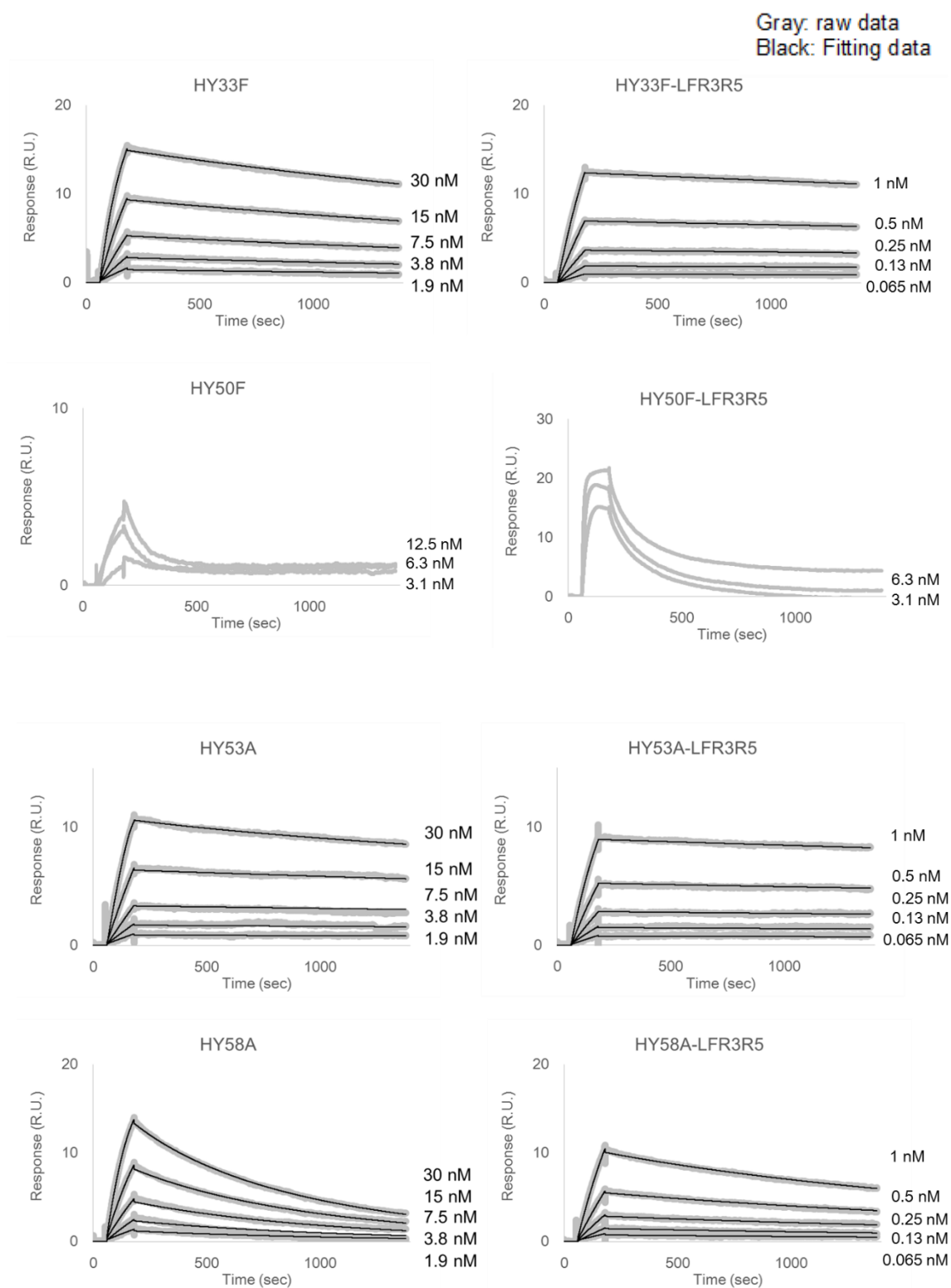


Fig. 3-6. CDR中のTyr 残基の変異とFR3変異の組み合わせにおけるSPRセンサグラム

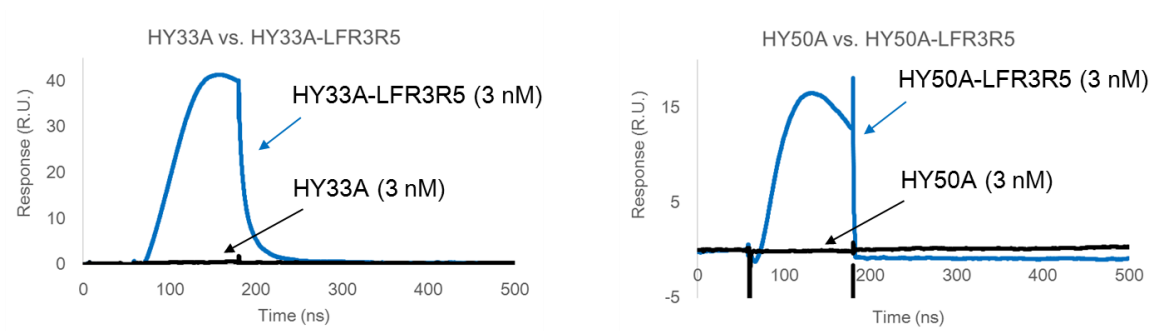


Fig. 3-7. hot-spot のAla変異とFR3へのアルギニン導入の影響

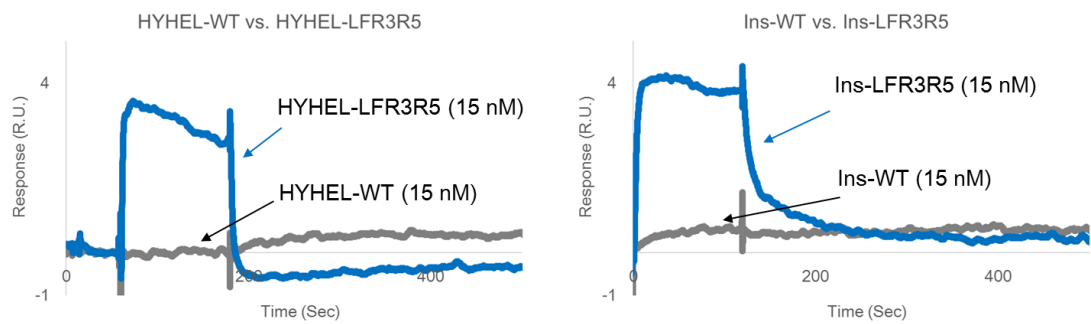


Fig. 3-8. 固定化BSAに対する反応性

2. アルギニン導入による遷移状態の変化

抗インスリン抗体の場合と同様に、SPR を用いて遷移状態における熱力学的パラメータを取得した。野生型およびアルギニン導入変異体における熱力学的パラメータ値を Table 3-4 に示した。また Eyring プロットおよびパラメータ比較を Fig. 3-9 に示した。その結果 HYHEL-LFR3R5 の熱力学パラメータに顕著な変化が確認され、遷移状態において ΔH^\ddagger を獲得し、かつ ΔS^\ddagger を消失する結果となった。これは、抗インスリン抗体のアルギニン導入変異体である Ins-LFR3R5 と同様の結果であり、アルギニン導入による結合速度定数向上において、遷移状態の変化はエンタルピーを獲得することによってエネルギー障壁を低下させることであるという知見には、一般性があると考えられる。

同様に van't Hoff プロットにより、安定化状態での熱力学的パラメータを取得した (Fig. 3-10、Table 3-4)。その結果、安定化状態における熱力学的な寄与に関しても、抗インスリン抗体の場合と同様であり、 ΔH を獲得しかつ ΔS を失う変化であった。そのため、抗原抗体反応において、複合体形成状態がより安定化されているという知見もアルギニン変異導入の効果として一般性があると考えられる。

次に、CDR 上の変異体である HY33F および HY58A に関しても同様に熱力学的解析を実施し、遷移状態における熱力学的寄与を解析した。各クローンの Eyring プロットを Fig. 3-11 に示す。また、パラメータ比較を Fig. 3-12 および Table 3-5 に示す。HY33F と HY33F-LFR3R5 の変化に関してみると、変異導入に伴って ΔH^\ddagger を獲得し ΔS^\ddagger が不利になり、これまでの解析と共通した結果となっていたため、これまで見てきたように遷移状態においてアルギニン導入時のみ非共有結合を形成することで構造的な自由度が低下していると考えられる。またこの時エンタルピー変化 $\Delta\Delta H^\ddagger$ は 65 kJ/mol であり、HYHEL-WT および HYHEL-LFR3R5 の $\Delta\Delta H^\ddagger$ 71kJ/mol とほぼ相同である。

次に、HY58A の熱力学的パラメータの変化を考えると、野生型や HY33F の場合と異なっており、HY58A と HY58A-LFR3R5 の間に顕著な差が見られなかった。しかしながら、HY58A と HY58A-LFR3R5 とともに野生型、HY33F と異なっており、エントロピー依存的な遷移状態の変化が確認された。エントロピー変化を生じる要因としては、脱水和に伴う水分子の乱雑さの向上に加え、相互作用界面の構造変化についても考慮する必要がある。CDR 上の HY58 は芳香環によるカチオン- π 相互作用によって抗原認識への寄与を果たしていることが知られている。そのためこの領域における構造的制約は大きいと考えられ、変異導入によるカチオン- π 相互作用の消失とその周辺の構造環境の変化が大きくなったと考えられる。また、アルギニンの変異導入によって変化を生じなかったことから、アルギニン変異体の遷移状態の効果は、脱水和を積極的に促進しないことが示唆される。

複合体形成前の始状態の分子表面は水和構造をとっており、結合形成に伴って、相互作用分子との結合に置き換わる。結合形成に際して脱水和することで一時的に不安定な状態が存在するが、この状態がエネルギー障壁を生む要因である。相互作用形成におけるエネルギー座標は、Fig. 3-13 のように簡略化して示すことができるが、①で示されるようなエネルギー障壁を下げるためには、遷移状態において非共有結合を増加することでエンタルピーを獲得するか、始状態において水分子との安定な相互作用をなくし、脱水和によるエンタルピーの消失を抑えることが必要となる (Fig. 3-13 中②もしくは③)。HY58A の遷移状態解析の結果は、アルギニン導入によって脱水和には大きく寄与しないことが示唆されるため、アルギニン導入による遷移状態の変化は、始状態の水和構造を変化させることが大きな要因であると考えられる。

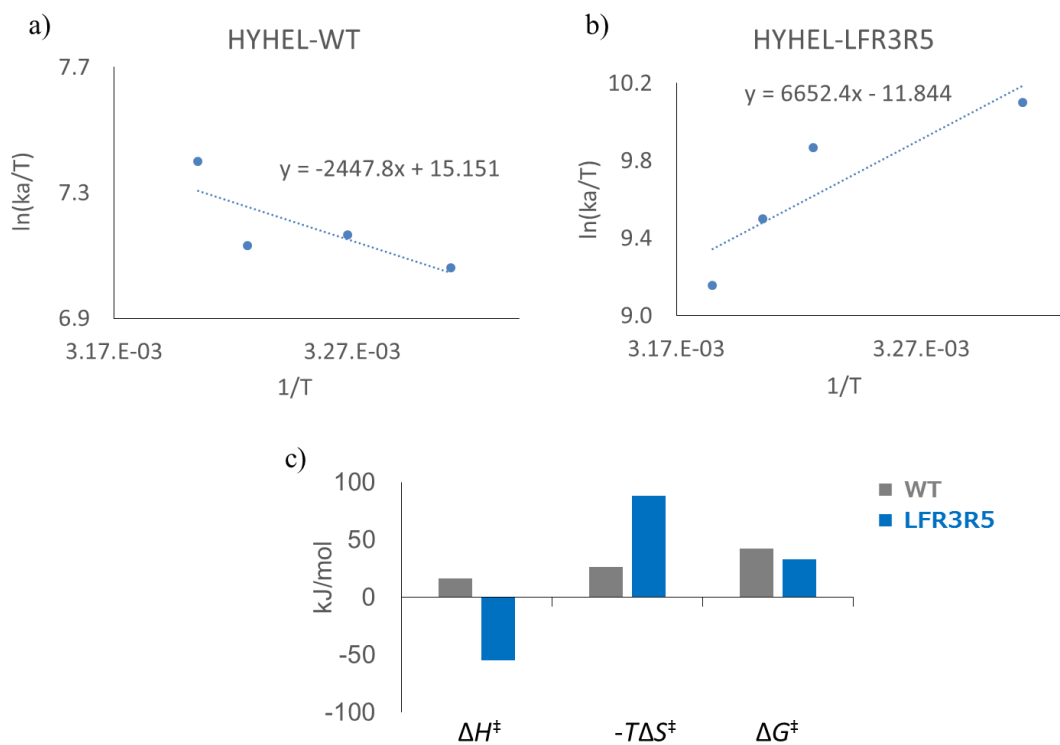


Fig. 3-9. a), b) WTおよびLFR3のEyring プロット. c) 熱力学的パラメータ比較

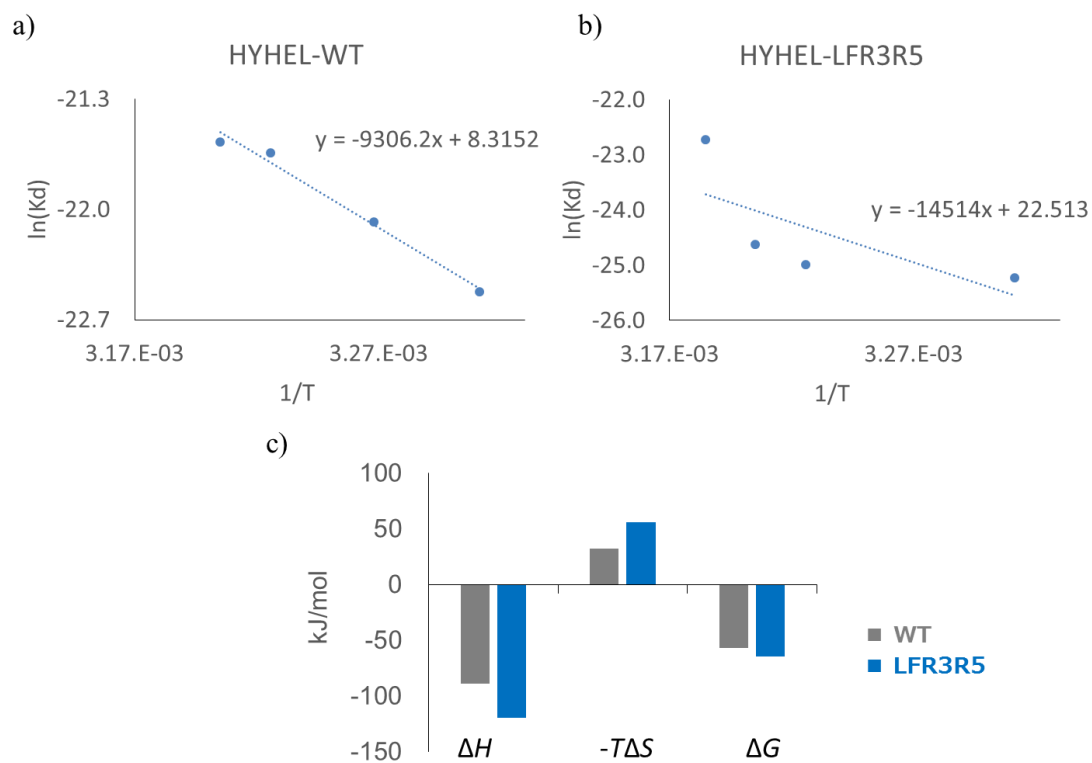


Fig. 3-10. a), b) WTおよびLFR3のvan't Hoff プロット. c) 熱力学的パラメータ比較

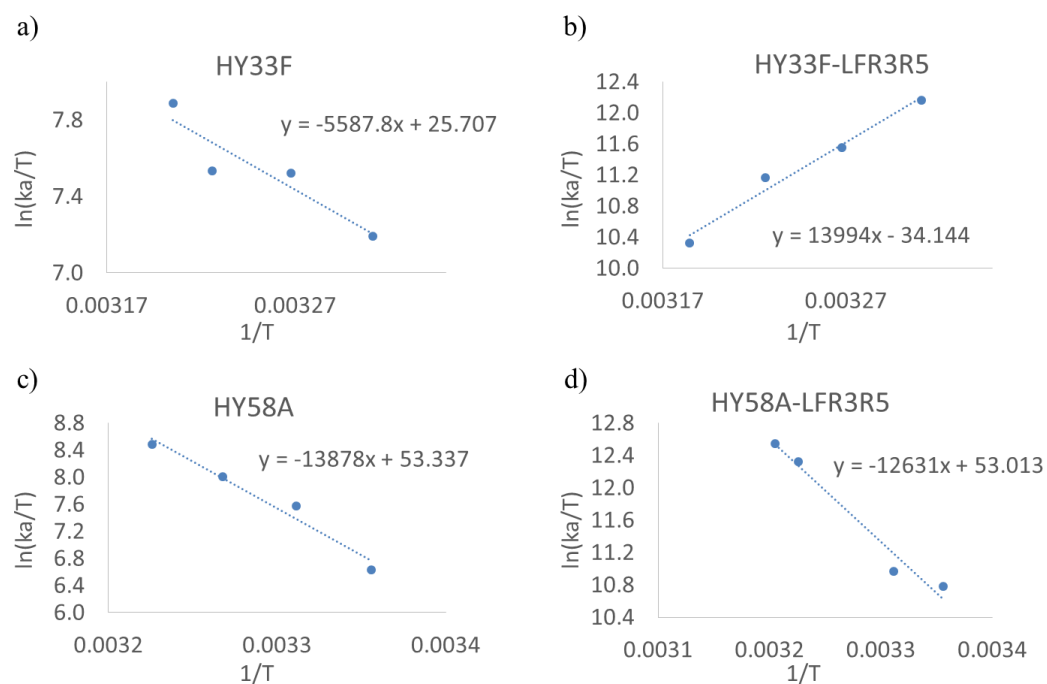


Fig. 3-11. CDR変異体の Eyring プロット

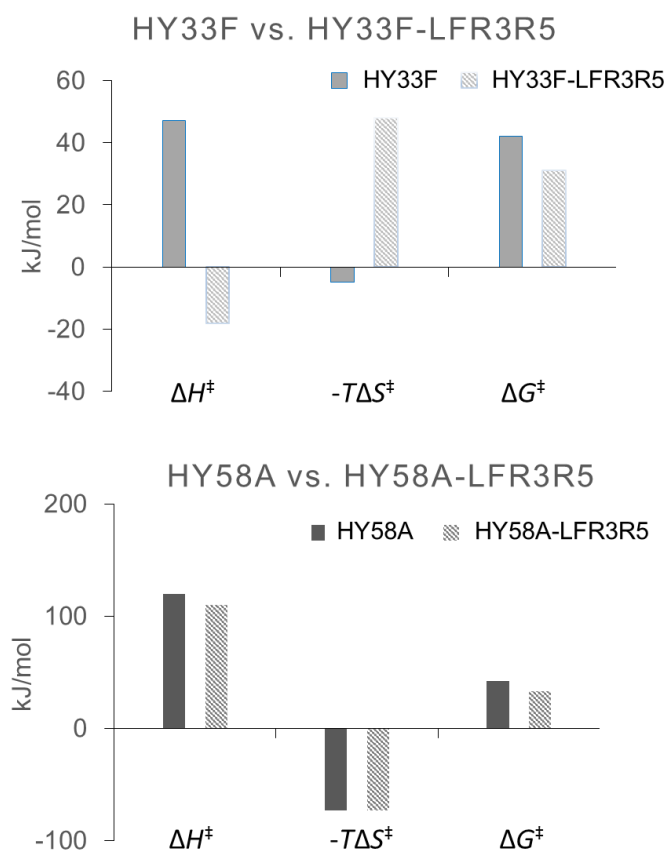


Fig. 3-12. CDR変異体の遷移状態における熱エネルギーパラメータ比較

Table 3-4. 抗リゾチーム抗体及び変異体の熱力学的パラメータ (kJ/mol)

	ΔH^\ddagger	$\Delta\Delta H^\ddagger$	$-T\Delta S^\ddagger$	$-T\Delta\Delta S^\ddagger$	ΔG^\ddagger	ΔH	$-T\Delta S$	ΔG
WT	16	-	26	-	42	-89	32	-57
LFR3R5	-55	-71	88	-62	33	-120	56	-65

Table 3-5. CDR 変異体の遷移状態における熱力学的パラメータ (kJ/mol)

	ΔH^\ddagger	$\Delta\Delta H^\ddagger$	$-T\Delta S^\ddagger$	$-T\Delta\Delta S^\ddagger$	ΔG^\ddagger
HY33F	47	31	-4.8	30.8	42
HY33F-R5	-160	-176	190	-166	25
HY58A	120	104	-73	-47	42
HY58A-R5	110	94	-73	-47	33

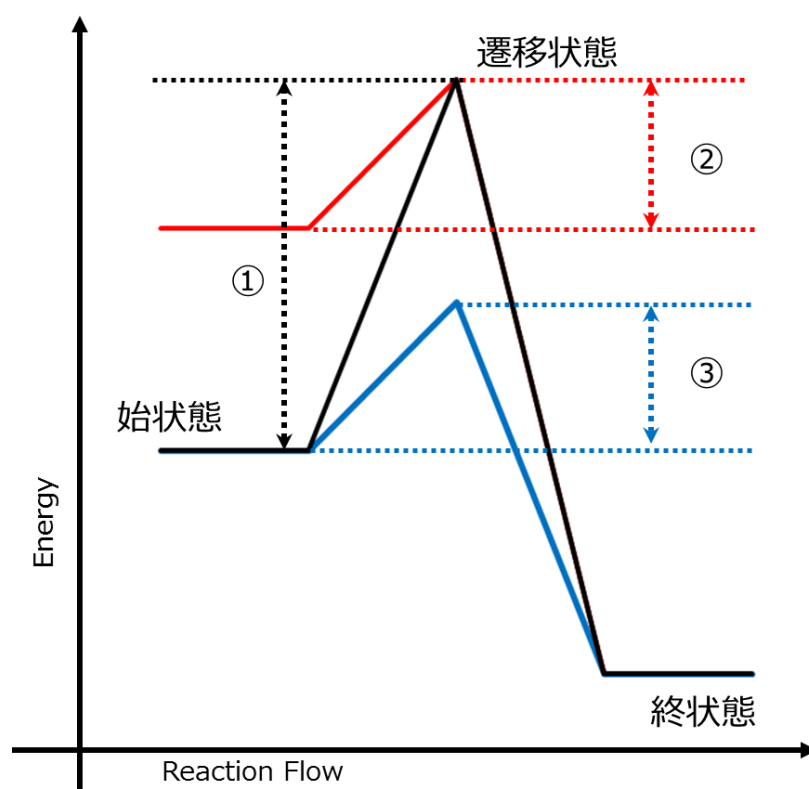


Fig. 3-13. 抗原抗体反応のエネルギー座標の模式図

破線矢印はエネルギー障壁（①は野生型エネルギー障壁）
エネルギー障壁を下げることで、反応は速やかに進行する

3. アルギニン導入による熱安定性の変化

抗インスリン抗体と同様に、DSC を用いて変異導入における熱安定性の変化を解析した。野生型の変性中点 (T_m) は 78.3 °C であり、抗インスリン抗体と同様に一般的なマウス抗体 Fab の T_m 値であった(19)。変異体の測定結果を Fig. 3-14 及び Table 3-6 に示した。いずれの変異体においても、アルギニンの変異導入によって熱安定性が低下しており、CDR 上の Tyr 変異に関わらず、アルギニン導入によって構造安定性が低下していることが示唆された。抗インスリン抗体の場合では、アルギニン導入に伴って T_m 値が 5.7 °C 低下していたが、抗リゾチーム抗体への影響は 2.7 °C にとどまっていた。そのため本技術による親和性向上手法は、熱安定性の大きな低下を伴わずに顕著な親和性向上を達成することを可能とする。

熱安定性の低下と親和性の向上との関連性を見ると、変異導入による親和性向上の効果は、抗インスリン抗体の場合で 2.2×10^{-10} M から 2.0×10^{-12} M (91 倍)、抗リゾチーム抗体の場合で 2.3×10^{-10} M から 2.8×10^{-12} M (121 倍) と、いずれの場合でも共通して 2 ケタ近い向上を達成している。一方で HY53A について考慮すると、変異導入による熱安定性の低下は 2.7°C であり野生型の抗リゾチーム抗体における変化と同様であったのに対し、親和性変化は 1.8×10^{-10} M から 1.2×10^{-11} M (6.7 倍) と野生型に対しては小さい変化であった。

変異導入に伴って熱安定性が低下し親和性が向上しているため、反応エネルギー座標の観点から見れば、始状態の不安定化による終状態とのエネルギー差が親和性向上と関係することが示唆される。しかしながら熱安定性の程度と親和性向上の程度との相関は低いため、必ずしも始状態の不安定化が FR 変異による親和性向上の本質ではないと考えられる。しかしながら、いずれの変異体においても始状態のエネルギー状態に変化が生じていることは明らかである。第 3 節-2 において、始状態における水和構造の

変化を議論したが、 T_m 値の変化から示される始状態の不安定化についても、このような分子表面の水和構造の変化を示唆するものである。

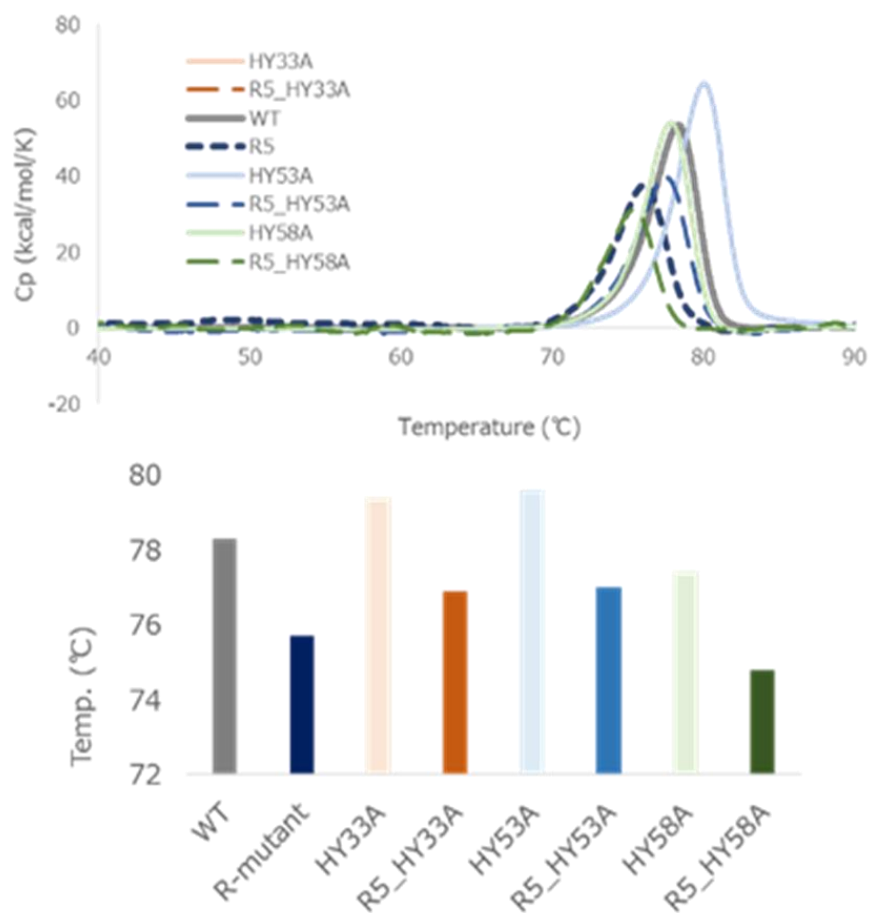


Fig. 3-14. アルギニン変異導入による熱安定性変化

Table 3-6. 各変異体の T_m 値

Fab	T_m (°C)
HYHEL-WT	78.3
HYHEL-LFR3R5	75.7
HY33A	79.4
HY53A	79.6
HY58A	77.4
HY33A-LFR3R5	76.9
HY53A- LFR3R5	77.0
HY58A- LFR3R5	74.8

第4節 結言

HyHEL-10 は $pI = 11.0$ のニワトリリゾチームを抗原とする抗体であり、そのエピトープは塩基性に富む。本章では、HyHEL-10 を対象として FR へのアルギニン導入による速度論的パラメータ変化を検証した。また、遷移状態の熱力学的変化について解析し、抗インスリン抗体による解析結果より得られた知見の一般性を議論した。

解析の結果、FR3 にアルギニンを導入した変異体 LFR3R5 において親和性が向上した。また、CDR 上の複数の Tyr 残基と FR のアルギニン変異との組み合わせ実験の結果からは、FR 改変による親和性改変は CDR 上の特定のアミノ酸残基の役割には影響を与えないことが確認された。

HyHEL-10 の改変による親和性改変は結合速度定数の向上に伴うものであり、これまでの FR 改変による親和性向上効果と共通していた。先行文献の抗トロポニン抗体および本研究における抗インスリン抗体の結果より、抗原エピトープもしくは抗原分子全体の pI より想定される電荷状態に依存して、その対となる電荷を有する荷電アミノ酸を FR3 に変異導入することによって親和性が向上した。これらの効果は抗原抗体間に生じる静電相互作用によって説明されるが、HyHEL-10 の結果からは結合速度定数向上において、必ずしも静電相互作用が優先しないことが示された。熱力学的解析結果からは、FR にアルギニンを導入することによって、遷移状態におけるエンタルピーを獲得しており、エネルギー的に安定化されていた。エンタルピー依存的な遷移状態の変化は、抗インスリン抗体の場合と共通しているため、FR 改変の効果は遷移状態の安定化によるものであるという知見の一般性が確認された。

相互作用におけるエネルギー障壁を下げるためには、非共有結合を増加することでエンタルピーを獲得するか、始状態において水分子との安定な相互作用をなくし、脱水和によるエンタルピーの消失を抑えることが必要となる。

HY58A と HY58A-LFR3R5 の遷移状態解析結果からは、アルギニン導入によっ

て脱水和には大きく寄与しないことが示唆されたため、FR 改変による遷移状態の変化は、始状態の水和構造を変化させ、エンタルピー損を抑制することが大きな要因であると考えられる。

DSC による熱安定性測定の結果からは、アルギニンの変異導入によって熱安定性が低下したが、この変化もまた始状態における水和構造の変化を示唆している。抗リゾチーム抗体に関するこれらの結果より、FR 改変による結合速度定数向上は、分子間における静電相互作用の増強よりも複合体形成過程におけるエネルギー障壁の低下が主要因となって達成されることが考えられる。

次章では MD 計算による動的構造解析を行い、継時的な構造変化を観察することを試みた。野生型とアルギニン導入変異体に対して、始状態における分子運動の変化を直接観察することで、FR 改変における分子認識機構を詳細に解析することができると考える。

第4章 MD シミュレーションを用いた親和性向上機構解析

第1節 緒言

1. 概要

第2章、第3章では、抗インスリン抗体、抗リゾチーム抗体及びその CDR 内アミノ酸変異体を対象として FR への変異導入実験を行った。抗インスリン抗体、抗リゾチーム抗体での改変結果より、アルギニン変異導入によって相互作用の遷移状態エネルギーが安定となっていることが示された。抗リゾチーム抗体の CDR 内アミノ酸変異との組み合わせによって、遷移状態の変化は分子表面に存在する水和構造の変化によるものであることが示唆された。水和構造はタンパク質分子表面の構造的ゆらぎに依存していると考えられるため、アルギニン導入によって分子内部の構造的ゆらぎが誘起されていると考えられる。

本章では抗体分子内部の動的变化を観察するために分子動力学計算を用いた解析を行った。その結果、重鎖を中心とする CDR のループ構造の相対配置に変化が生じており、アルギニンを変異導入した場合のみ相対配置に動的变化が生じていた。この変化によって、CDR 周辺の水和構造は変化し、抗原結合に伴う脱水和によるエントロピー損の影響がなくなったことが、遷移状態エネルギーを低下させることにつながったと考えられる。

2. 分子動力学計算の一般的手法

生体高分子の機能を理解する上で分子動力学 (Molecular Dynamics; MD) 計算による動的構造解析が頻繁に利用されている。その適用範囲は広く酵素反応や抗原抗体反応、分子モーターなど巨大分子系を取り合うシミュレーションで特に利用されている。分子動力学法は原子間に働く力と時間変位から、古典力学におけるニュートンの運動方程式(1)式を解くことで、時間と共に変化する原子位置 (構造変化) を求める方法である。

$$m_i \times d^2 r_i / dt^2 = \nabla_i U(r_1 \dots r_N) \quad i = 1 \sim N \quad (1)$$

m_i ; 原子 i の質量

r_i ; 原子 i の位置

U ; 計全体のポテンシャルエネルギー

各時間における構造情報はトラジェクトリと呼ばれ、時系列でトラジェクトリを繋げることで継時的な構造変化を作成する。立体構造は、計算対象とする系を構成する全原子の位置に対応する。

機器による測定では、さまざまな方法で物質の構造やダイナミクスを反映した物理量を得ることができるが、実際に運動している原子の様子を直接観察することはできない。これに対して MD 計算は、系の全自由度に対する原子の軌跡を得るため、構造や分子運動を直接観察することが可能となる。

3. 分子動力学計算による抗体親和性研究

タンパク質の相互作用メカニズムの解明やエンジニアリングを行う上で、分子動力学計算を用いた立体構造モデリング技術が活用されている。特に創薬分野においては抗体を中心に利用が活発であり、治療薬開発における重要な基盤技術の一つとして位置づけられている(1-3)。分子動力学計

算の有用性はナノ秒マイクロ秒のタイムスケールで継時的な動的構造変化が観察できることであるため、タンパク質分子の柔軟性と相互作用の親和性との相関が複数の研究で解析されている。

HIV-1 プロテアーゼ変異体の薬剤耐性メカニズムの解明を試みた研究では、変異体の結晶構造は野生型と類似していたにもかかわらず、MD 計算によって野生型よりも柔軟性が高くなったことが示されている。その結果 HIV-1 プロテアーゼと阻害剤との水素結合が減少し阻害剤との親和性が低下した。そのため、相互作用部位の柔軟性を低下させ、阻害剤との安定な結合状態を作り出すことが、効果的な阻害剤設計に有用であることが述べられている(4)。

抗体研究においては、親和性成熟と CDR のループの Flexibility に着目した議論が盛んである(2,5)。抗体は CDR 上のアミノ酸を多様に変化させることで多種多様な抗原との相補性を獲得する。6 つある CDR のうち、L1、L2、L3、H1、H2 は比較的保存性が高く、カノニカル構造と呼ばれる特定のコンフォメーションをとる一方で、H3 は最も多様性に富む領域である。親和性成熟前のナイーブ抗体と成熟抗体を対象とした MD 計算では、成熟抗体において CDRH3 ループの運動性の低下が確認されている(6-12)。したがって、親和性成熟の過程において、CDR が構造の多様性を失い剛性を高めていくことが、抗体が特定の抗原に対して親和性と特異性を獲得していくためのアプローチであると考えられている。実際、複数の実験的手法によってもナイーブ抗体と成熟抗体の運動性の変化が確認されており、親和性成熟に伴って抗体の運動性はやはり低下することが示されている(13-16)。

第2節 計算方法

1. 計算モデルの構築

抗リゾチーム抗体および抗原-抗体複合体の結晶構造は、PDB に登録されている X 線結晶構造解析データ (PDB ID; 3D9A) を使用した。複合体の初期構造は、結晶構造の原子配置から適切な水素原子を加えることによって構築した。また、複合体は周期的境界条件のもと直方体状の箱の中に配置され、CHARMM-36m および TIP3P モデルを用いてイオン化 (0.15 M NaCl) および水和した。抗原未結合状態の Apo 体の初期構造に関しては、3D9A の原子配置から抗原部分を除去することで再構築した。また、アルギニン導入変異体の原子座標は、野生型の Apo 体および Holo 体の軽鎖 63 番、65 番、67 番、70 番 72 番を一次配列上でアルギニンに変異導入することで再構築した。

2. MD シミュレーションの計算・解析

MD シミュレーションは、GROMACS 2016.31 を用いて実行し、CHARMM-36m を分子力場に適用した。本研究で MD 計算に用いた初期構造のうち、野生型の Holo 体以外の原子配置は再構築されたものであるが、Fig. 4-1 の計算フローに示すように、初期の原子配置に対してエネルギー極小化計算および平衡化計算を事前に実施することで、準安定な原子配置となっていると仮定し初期構造とした。MD 計算は野生型、変異体それぞれに対して 298.15K の温度条件の下、各 200 ns の計算を実施した。0.002 ps を 1 step として計算を行ったため、200 ns の計算で取得される総トラジェクトリ数、つまりモデル構造の数は 1×10^8 個である。初期構造が計算条件において十分に安定化していない場合、計算の初期において大きな構造変化が生じる要因となる。そのため計算結果の解析の際には、初期トラジェクトリのいくつかを除外して解析するのが一般的である。本研究で用いた初期構造は再構築されたモデル構造であることを考慮し、初期の 20 ns を

除外したトラジェクトリを解析に用いた。MD 計算の初期には大きな可視化プログラムは UCSF Chimera (RBVI) 用いた。継時的な構造変化の指標として、トラジェクトリ毎の主鎖 C α の RMSD 値を比較した。野生型および変異体の RMSD 値の平均値および標準偏差より分子の運動性を比較した。

第3節 結果および考察

1. アルギニン導入における CDR の運動性 (Apo 体 MD 計算)

野生型およびアルギニン導入変異体 (HyHEL-LFR3R5) について 200ns の MD 計算を実施した。全アミノ酸の C α の RMSD 値を Fig. 4-2 (野生型 ; WT) および Fig. 4-3 (アルギニン変異導入 ; LFR3R5) に示した。Fig. 4-2 a) 、Fig. 4-3 a) は RMSD 値の頻度を表しており、Fig. 4-2 b) ~ d) 、Fig. 4-3 b) ~ d) はそれぞれの繰り返し計算毎の RMSD 値の時間変化を示している。また、全原子中で運動性の高い領域を選択するため、Ca の RMSF (Root Mean Square Fluctuation ; 根平均二乗ゆらぎ) を比較した (Fig. 4-4(WT), 4-5(LFR3R5))。野生型および LFR3R5 いずれの場合も、RMSD 値は 2.4 – 3.0 Å を推移しており、変異導入による差はほとんど見られない。また RMSF の比較においても、顕著に運動性が高くなる領域は確認できなかった。そのためアルギニン変異導入による全体構造の変化は小さいと考えられ、親和性向上効果には局所的な運動性が関与していると考えられた。

第3章で見られたように、LFR3R5 では CDR ループの運動性が向上していることが考えられる。そのため、6 本の各 CDR ループの RMSD を比較することで CDR ループに生じるゆらぎの変化を評価した。軽鎖 CDR の結果

を Fig. 4-6 ~ 4-8 に示した。CDR 以外の FR 部分を重ね合わせた後、各 CDR ループの RMSD 値を解析した。

軽鎖の CDR の比較からは、野生型、および LFR3R5 いずれの場合にも顕著な変化は確認されなかった。RMSD 値の平均値および標準偏差 (SD) の比較からも変化は見られなかった (Table 4-1)。

次に、重鎖 CDR の解析結果を Fig. 4-9 ~ 4-11 に示した。H1 および H3 の運動性に関しては、軽鎖の場合と同様に野生型、LFR3R5 いずれにおいても顕著な変化は見られなかった。いずれの場合においても SD 値は低値となっていることから、これらのループの運動性は低いと考えられる。

RMSD 平均値については、野生型の計算結果のうち 1 回で H1 が 1.59 Å、H3 が 1.63 Å と大きな値をとっていたが、アルギニン変異体では確認されなかった。これらの計算結果は、野生型の Apo 体の H1 および H3 ループ構造は、複合体のループ構造とは異なる構造をとり得ることを示しており、その構造はゆらぎを持たない安定な構造であることを示している。一方でアルギニン変異体ではそのような変化が見られないことから、アルギニン変異体の H1 および H2 ループの構造は複合体のループ構造により近いと考えられるため、抗原結合に伴う構造変化を必要とせず、エントロピー損による影響が軽減されていると考えられる。

CDRH2 に関して考慮すると野生型、LFR3R5 の両方で変化が見られ、大きな RMSD 平均値と SD 値を示す計算結果がそれぞれ 1 回ずつ確認された。RMSD を計算する際の鋳型構造として、抗原複合体の結晶構造である 3D9A を用いている。そのため RMSD 値の大きさは、Apo 体における構造と複合体構造との間の差異の大きさを表しており、H2 ループ構造は抗原結合に伴って構造変化を生じやすい領域であると考えられる。また、この時の SD 値も大きな値をとっているため、H2 は変異の有無にかかわらず運動性が高い領域であると考えられる。

各 CDR ループ単独での動的構造は、変異導入による差異がほとんど見られなかった。抗体は CDR ループ単独の多様性だけでなく、ループ間の相対配置を変化させることで多様な抗原認識を行っている。アルギニン変異導入におけるループ間の相対配置の変化を解析するため、軽鎖内および重鎖内でのそれぞれのループ部分の相対的な RMSD 値を算出した (Fig. 4-12-14(軽鎖)、Fig. 4-15-17(重鎖))。また RMSD 平均値および SD 値を Table 4-2 に示した。

軽鎖については、CDR ループ構造の場合と同様に、野生型および LFR3R5 の間で差が見られなかった。また RMSD の平均値および SD 値に関しても変化が少なく、3 回の計算ともに安定した値を示した。したがって軽鎖については、CDR 単独のループ構造及び相対配置ともに変化を生じさせない安定構造をとっていると考えられる。一方で重鎖については、軽鎖の場合とは異なった変化が確認された。H1 に対する H2 の変化については重鎖では 3 回中 1 回で他の 2 回とは異なる変化が確認された (Fig. 4-15 b)。この時の相対的な RMSD 値は 1.0 Å から 2.6 Å 付近まで分布し SD 値は 0.67 Å であったのに対し、その他の 2 回については 1 - 1.5 Å 付近に収束し、SD 値は 0.48、0.34 であった。これに対して LFR3R5 の変化は、3 回中 2 回の計算で 1 Å から 3 Å まで幅広い RMSD 値が分布しており SD 値は 0.81 Å、1.12 Å となっていた。また、残りの 1 回についても SD 値は 0.80 Å であった。そのため H1 に対する H2 の相対的な運動性は、アルギニンを変異導入した場合において向上していることが示唆された。

また、H2 に対する H3 の相対配置を考慮すると、野生型、LFR3R5 いずれの場合においても 3 回中 1 回の結果において高い運動性を有している結果であった (野生型 SD : 1.82、アルギニン変異体 SD : 1.97)。そのため、H2 に対する H3 の相対配置は変異導入の有無によらず変化しやすい領域であると考えられる。H3 に対する H1 の相対配置に関しても、野生型とアルギニン変異体との間に差異は見出されなかった。RMSD 値は野生型、アル

ギニン変異体ともに 1 Å から 3 Å 付近まで幅広く分布しており、SD 値は 0.6 Å 付近の値であった。そのため、H2 に対する H3 の相対配置と同様に、この領域もまた高い運動性を有する領域であり、その傾向はアルギニン変異導入によっても変化しないことが確認された。

分子動力学計算においては、全原子配置の時間変化について、運動方程式を解くことで決定する。その際に原子の初期座標と相互作用空間（力場）の設定、および各原子に与えられる初速度の変化によって運動方程式の解は変化する。本研究においては 3 回の独立した計算を実施しており、初期構造の原子座標と用いた力場に関しては共通であるが、初速度については各原子に対してランダムに与えられている。このように独立した計算を行ったにもかかわらず、軽鎖 CDR について変異導入による差異は確認されなかった。この結果はこの領域が安定構造をと手織り、動的な変化に乏しいことを意味する。またその特徴は FR への変異導入によっても変化しないことを示唆している。また、重鎖においても、CDRH1 に対する H2 の相対配置以外の解析値については、顕著な差を示さなかった。H2 や H3 は野生型においても変化しやすく運動性の高い領域であり、その特徴は変異導入によって変化しない。これに対して H1 に対する H2 の相対的な RMSD 値については、野生型 (Fig. 4-15-a) の頻度分布をみると WT-2 および WT-3 では 1 Å 付近によく収束しているため、軽鎖同様に安定構造をとりやすくなっていると考えられる。これに対して変異導入後 (Fig. 4-15-e) では、R5-2、R5-3 で明らかに動的变化が向上している。また、R5-1 に関しても RMSD の分布は 5 Å までブロードであり、必ずしも 1 つの安定構造に収束しないことを示している。他の CDR ループが変異導入によって大きく変化しなかったのに対して、この領域の変化は特徴的であるといえる。

重鎖 DCR の H1 と H2 の相対配置の柔軟性が向上していることが示唆されたが、これは抗体の CDR 近傍の分子表面の構造の多様性が増していることを意味している。多様な構造をとり得るということは、分子表面に安定

な水和構造が存在しえないと考えられる。これは第3章での熱力学的解析により得られた知見とも一致しており、脱水和による不利なエントロピー貢献がなくなったと考えられる。

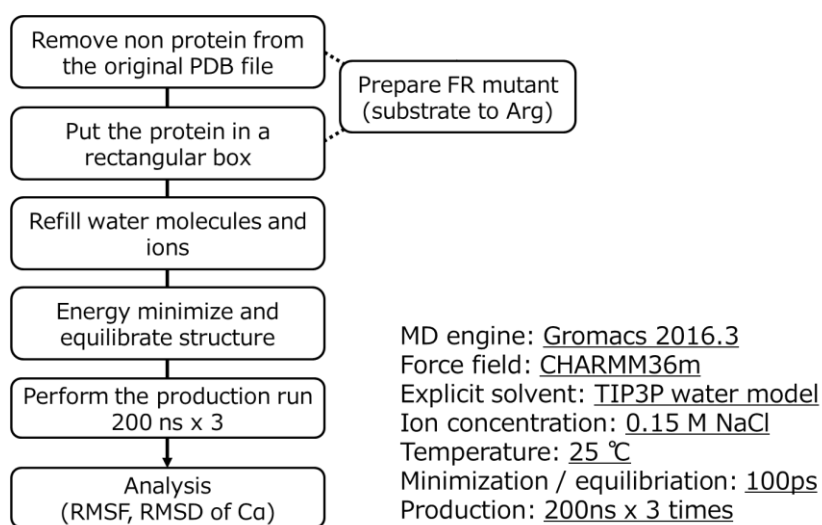


Fig. 4-1. MD 計算条件と初期構造構築から解析までのフロー

Energy minimization および Equilibration についても 3 回独立して実施し、それぞれに対して Production を実施した

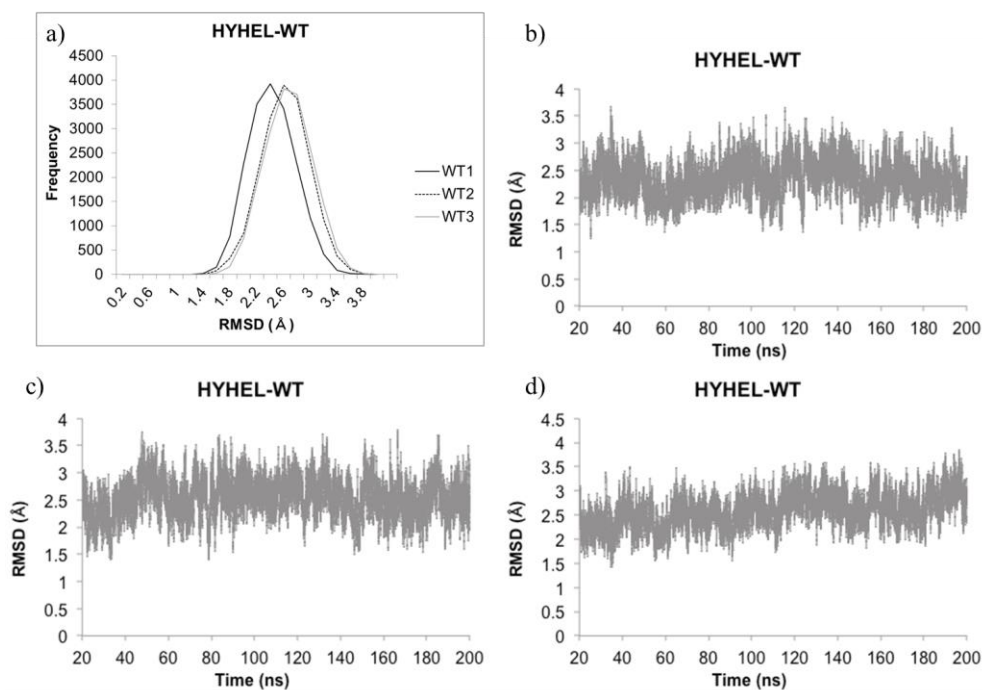


Fig. 4-2. 200 ns 間での全 $C\alpha$ の RMSD. a) 頻度分布 b) – d) RMSD 値の経時変化
a) の WT1-WT3 独立した計算回数であり、それぞれ b)-d)に対応する

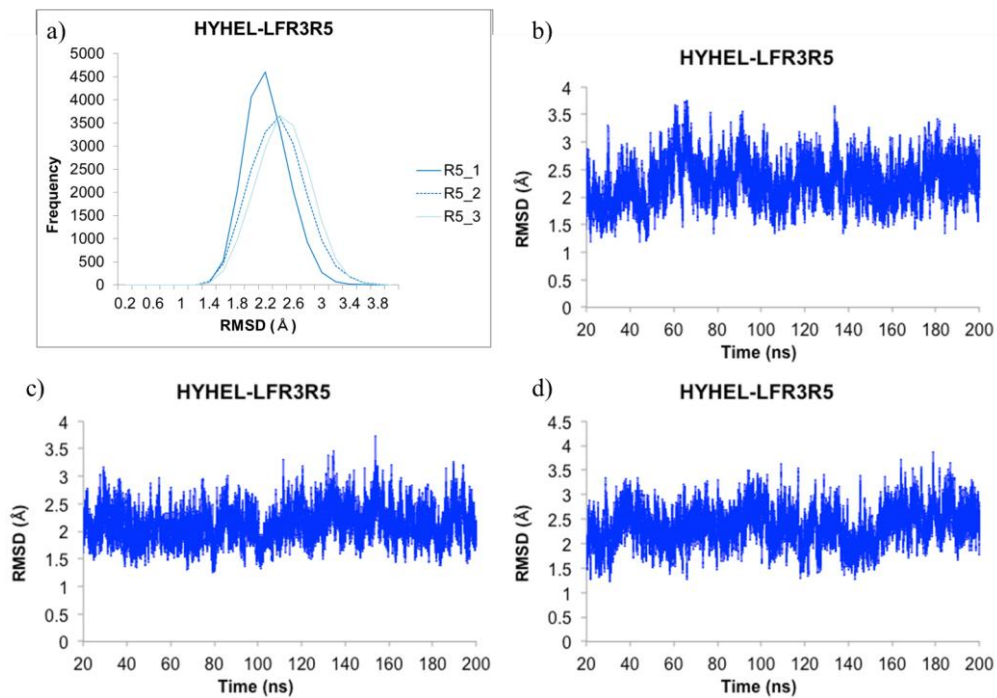


Fig. 4-3. 200 ns 間での全 $C\alpha$ の RMSD. a) 頻度分布 b) – d) RMSD 値の経時変化
a) の R5_1-R5_3 は独立した計算回数であり、それぞれ b)-d)に対応する

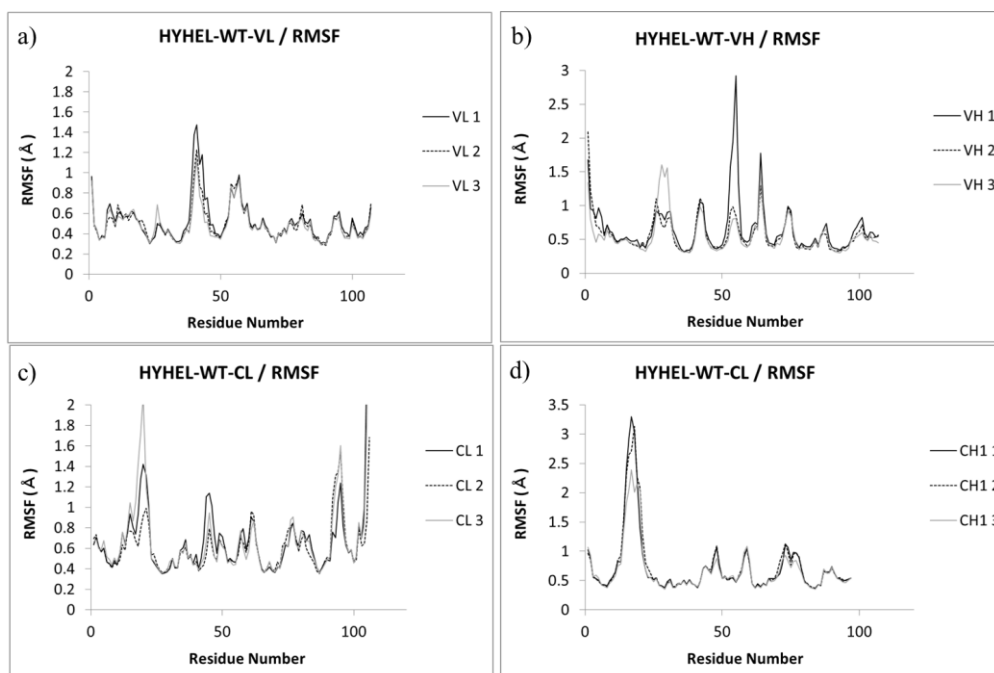


Fig. 4-4. 野生型における 200 ns 間での全 $C\alpha$ の RMSF.

a) 軽鎖可変部 (VL) b) 重鎖可変部 (VH) c) 軽鎖定常部 (CL) d) 重鎖定常部 (CH1)
VL1-3, VH1-3, CL1-3, CH1-3 は独立計算回数 (各番号はそれぞれ同一の計算結果に基づく)

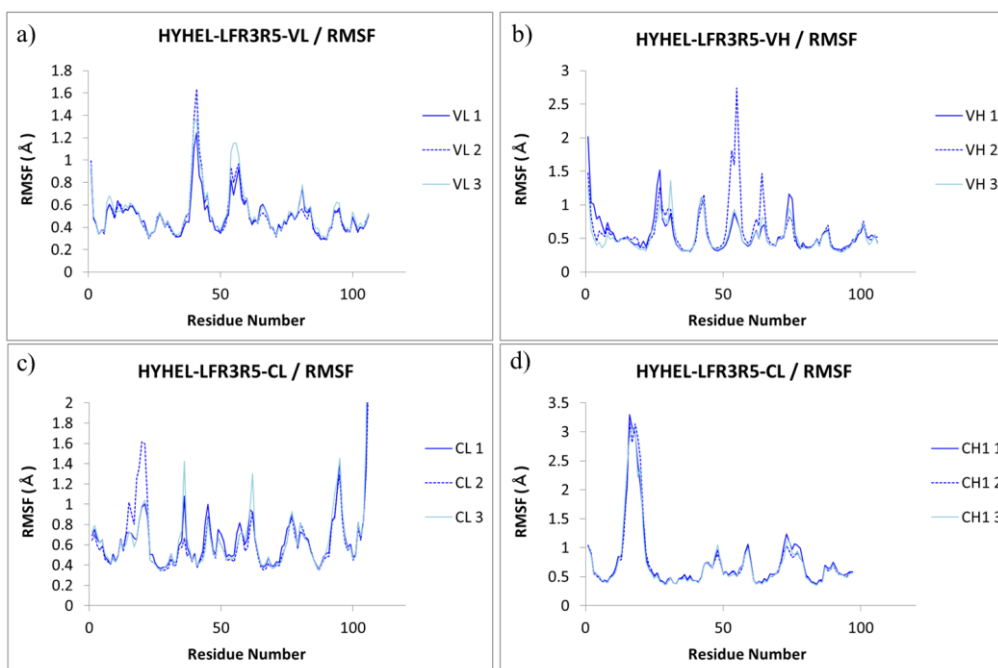


Fig. 4-5. LFR3R5 における 200 ns 間での全 $C\alpha$ の RMSF.

a) 軽鎖可変部 (VL) b) 重鎖可変部 (VH) c) 軽鎖定常部 (CL) d) 重鎖定常部 (CH1)
VL1-3, VH1-3, CL1-3, CH1-3 は独立計算回数 (各番号はそれぞれ同一の計算結果に基づく)

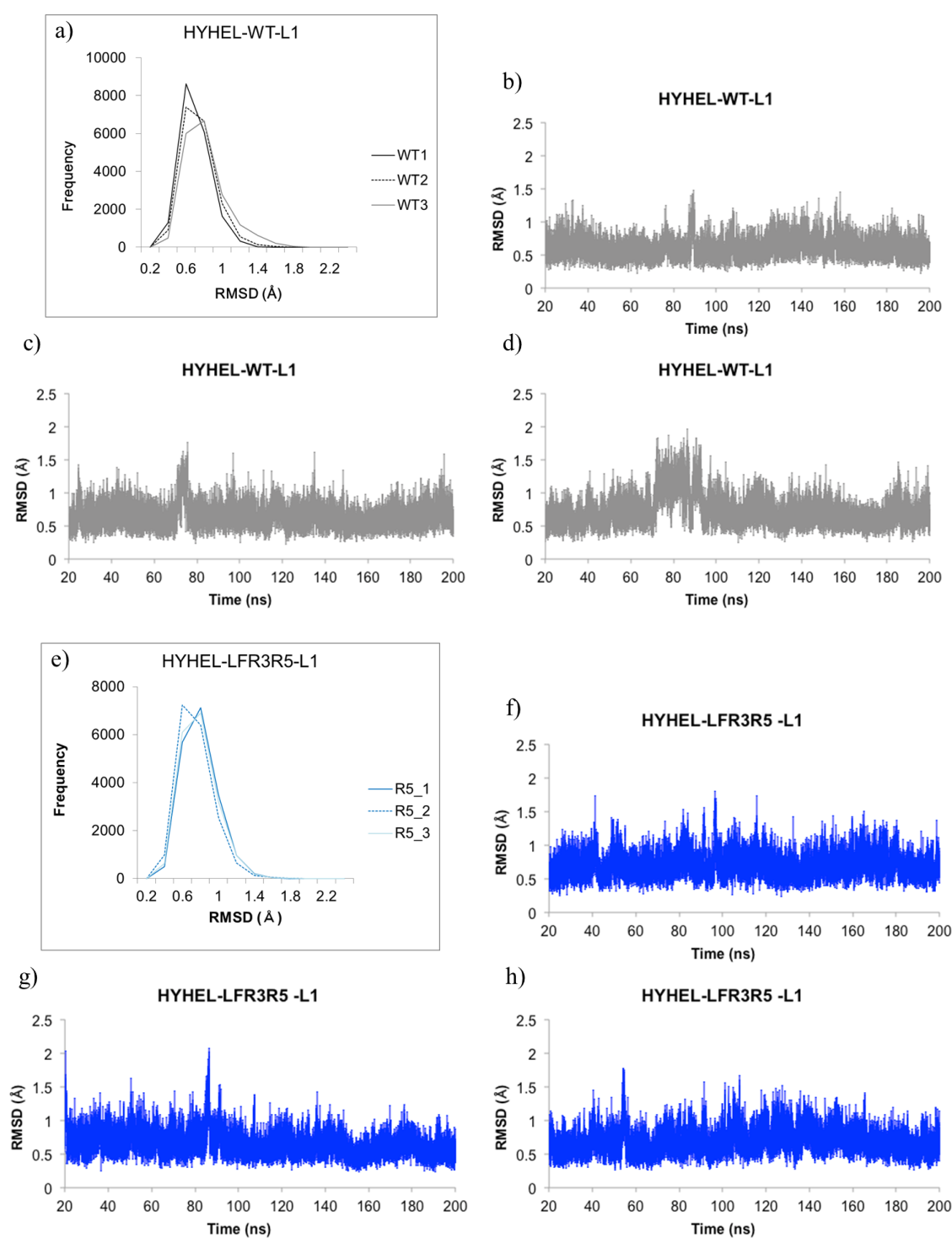


Fig. 4-6. 軽鎖 CDRL1 Ca の RMSD 値. a) 野生型の頻度分布 e) アルギニン変異体の頻度分布
 b)–d) 野生型の RMSD 値推移 f)–h) アルギニン変異体の RMSD 値推移
 a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 – R5_3 は f) – h) にそれぞれ対応

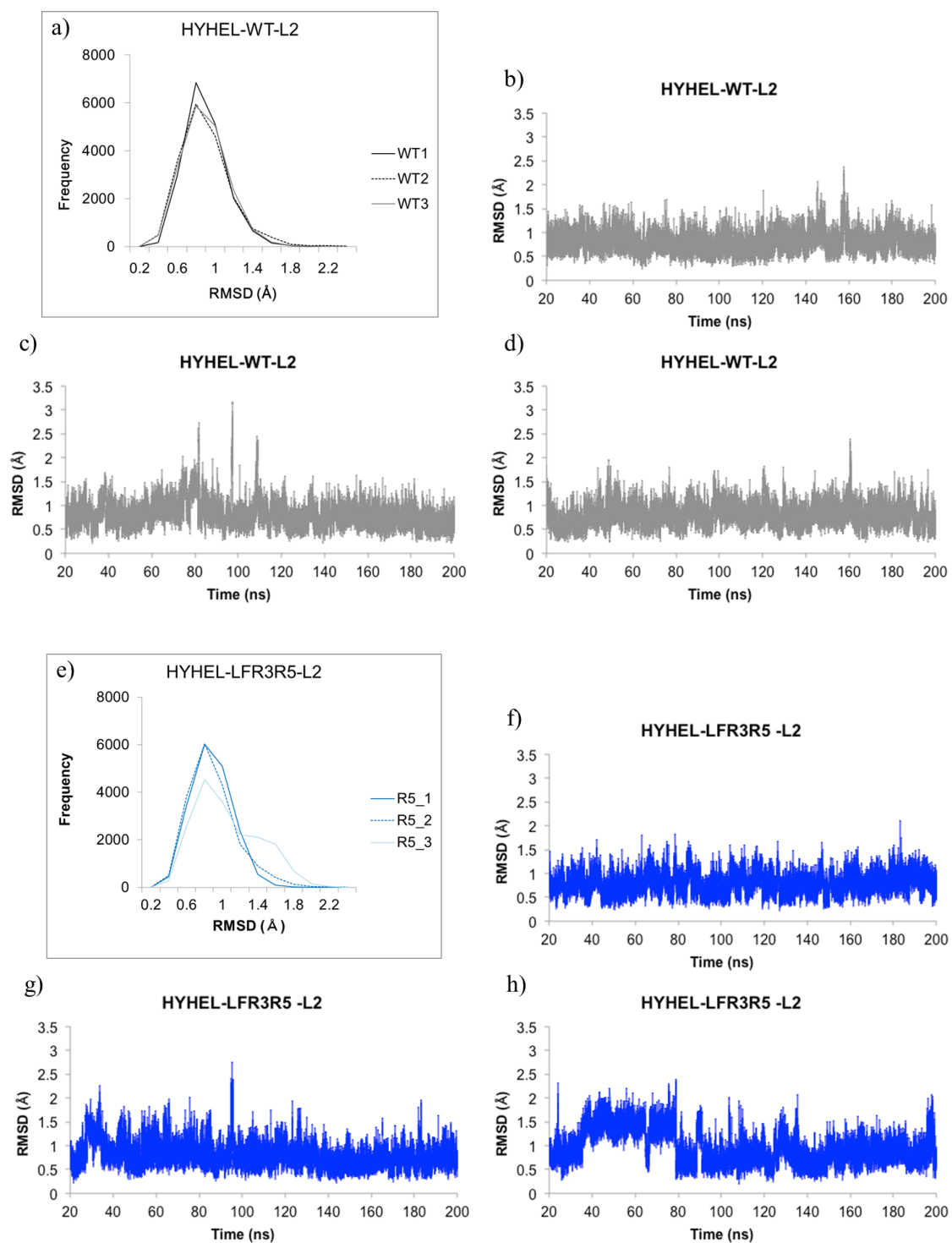


Fig. 4-7. 軽鎖 CDRL2 Cα の RMSD 値. a) 野生型の頻度分布 e) アルギニン変異体の頻度分布
 b)–d) 野生型の RMSD 値推移 f)–h) アルギニン変異体の RMSD 値推移
 a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 – R5_3 は f) – h) にそれぞれ対応

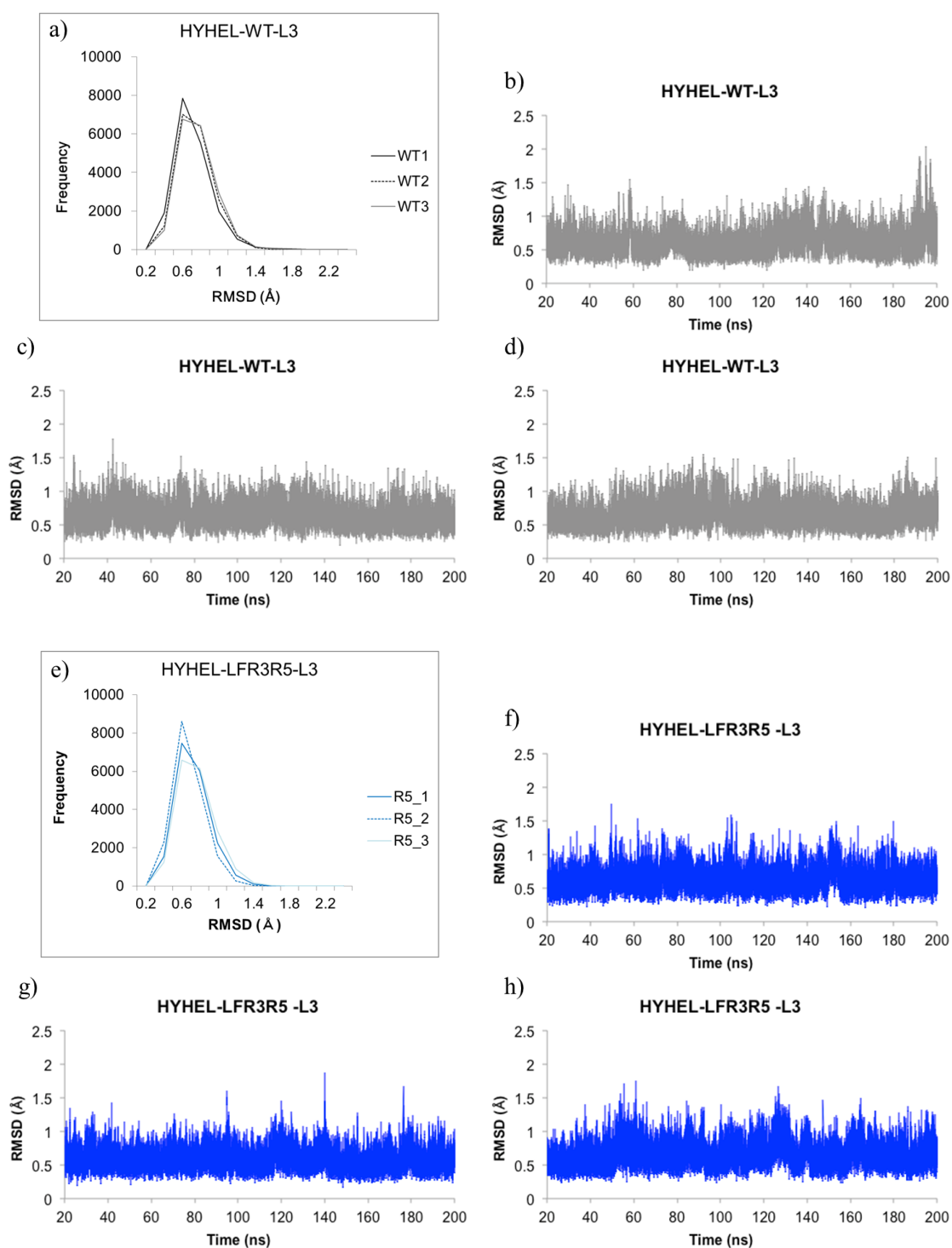


Fig. 4-8. 軽鎖 CDRL3 Cα の RMSD 値. a) 野生型の頻度分布 e) アルギニン変異体の頻度分布
 b)–d) 野生型の RMSD 値推移 f)–h) アルギニン変異体の RMSD 値推移
 a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 – R5_3 は f) – h) にそれぞれ対応

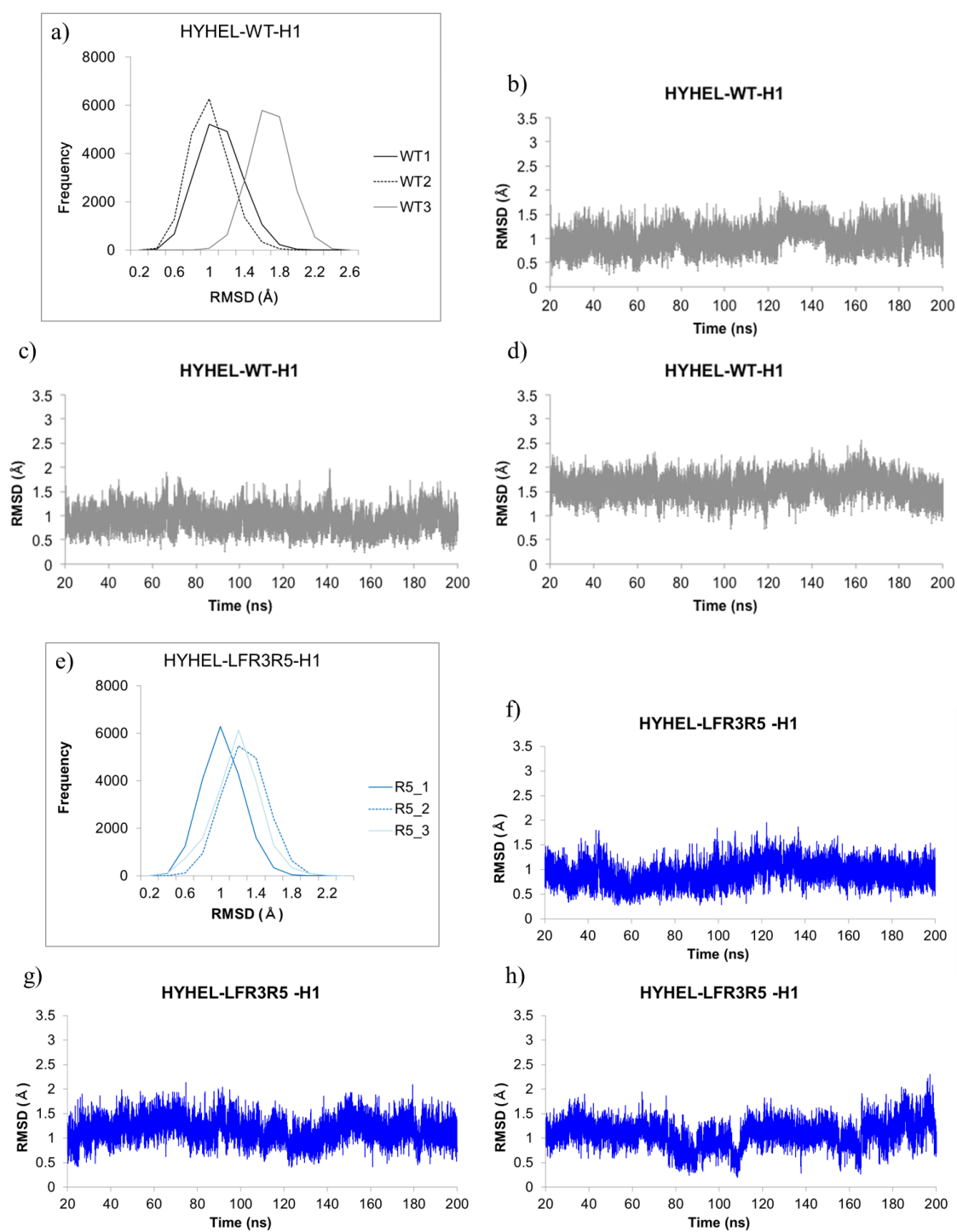


Fig. 4-9. 軽鎖 CDRH1 Ca の RMSD 値. a) 野生型の頻度分布 e) アルギニン変異体の頻度分布
b)–d) 野生型の RMSD 値推移 f)–h) アルギニン変異体の RMSD 値推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 – R5_3 は f) – h) にそれぞれ対応

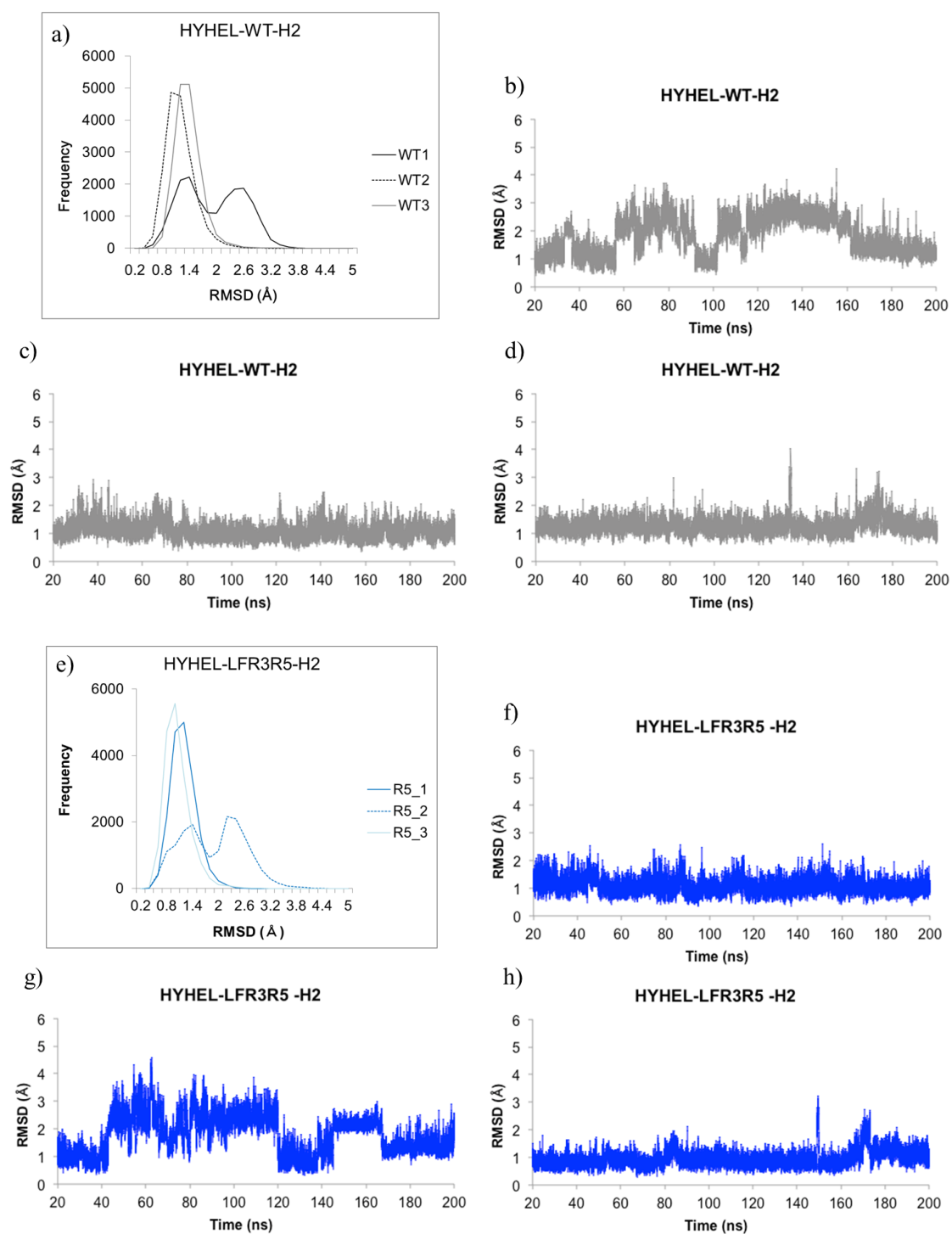


Fig. 4-10. 軽鎖 CDRH2 Ca の RMSD 値. a) 野生型の頻度分布 e) アルギニン変異体の頻度分布
b)–d) 野生型の RMSD 値推移 f)–h) アルギニン変異体の RMSD 値推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 – R5_3 は f) – h) にそれぞれ対応

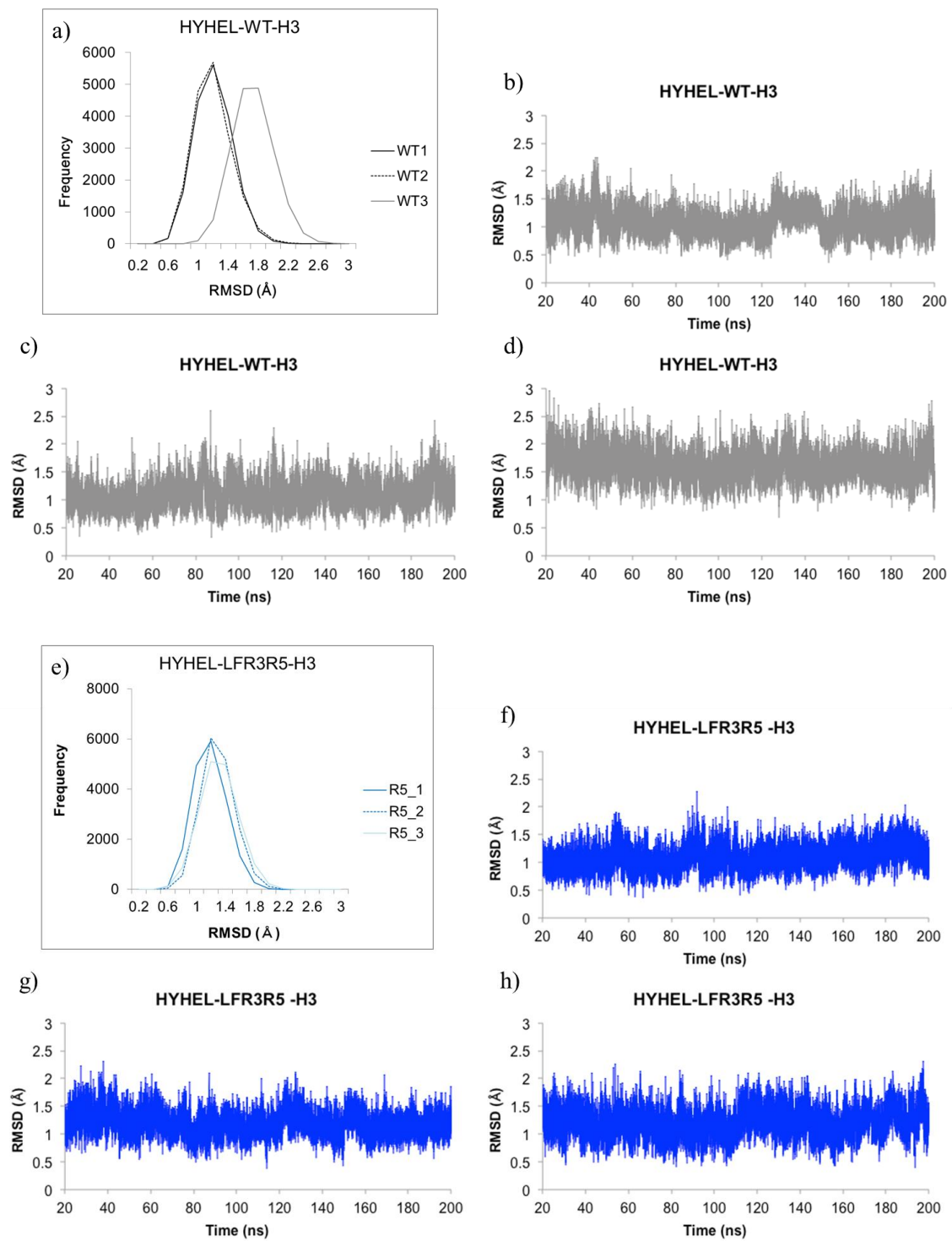


Fig. 4-11. 軽鎖 CDRH3 C α の RMSD 値. a) 野生型の頻度分布 e) アルギニン変異体の頻度分布
b)–d) 野生型の RMSD 値推移 f)–h) アルギニン変異体の RMSD 値推移
a) における WT1 - WT3 は b)–d) に、e) における R5_1 – R5_3 は f)–h) にそれぞれ対応

Table 4-1. 各 CDR ループおよび FR3 の RMSD の平均値および SD 値

	Average (Å)					
	WT			R5		
	1	2	3	1	2	3
CDRL1	0.60	0.64	0.71	0.69	0.65	0.68
CDRL2	0.80	0.80	0.80	0.78	0.80	0.96
CDRL3	0.61	0.64	0.66	0.62	0.58	0.66
LFR3	0.56	0.59	0.60	0.73	0.71	0.71
LFR3loop	0.57	0.58	0.62	0.78	0.75	0.76
CDRH1	1.02	0.90	1.59	0.92	1.17	1.08
CDRH2	1.83	1.09	1.27	1.09	1.79	0.95
CDRH3	1.11	1.10	1.63	1.09	1.19	1.21

	SD (Å)					
	WT			R5		
	1	2	3	1	2	3
CDRL1	0.16	0.18	0.23	0.19	0.19	0.19
CDRL2	0.22	0.27	0.24	0.22	0.27	0.36
CDRL3	0.20	0.19	0.19	0.18	0.17	0.20
LFR3	0.14	0.14	0.15	0.19	0.18	0.18
LFR3loop	0.19	0.20	0.22	0.25	0.24	0.25
CDRH1	0.25	0.22	0.22	0.23	0.24	0.26
CDRH2	0.67	0.31	0.29	0.29	0.71	0.30
CDRH3	0.24	0.25	0.27	0.23	0.23	0.26

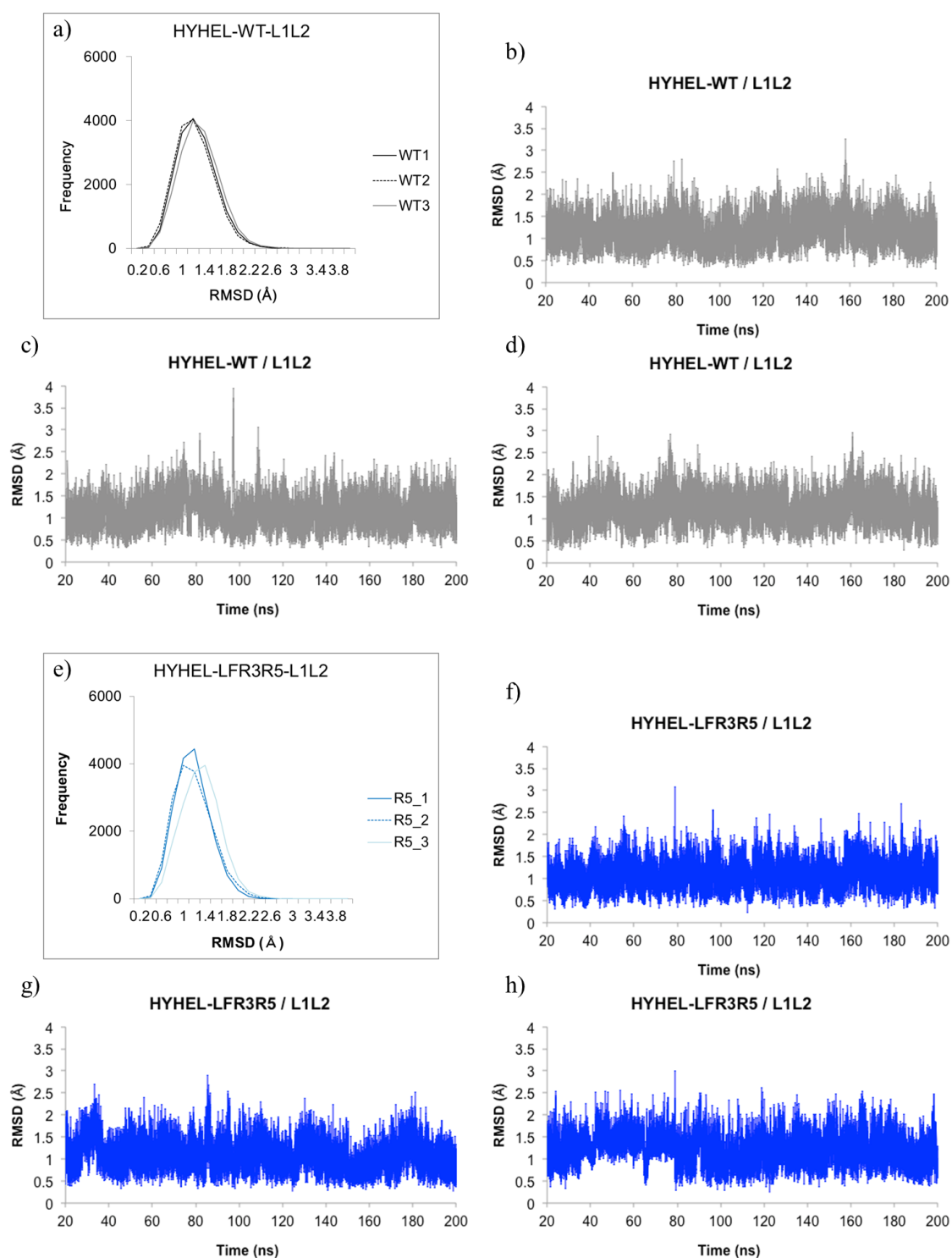


Fig. 4-12. 200 ns における $C\alpha$ の RMSD の経時変化. CDRL1 に対する CDRL2 の RMSD 値を示す.
a, e) 頻度分布 b) - d) 及び f) - h) RMSD 値の推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 - R5_3 は f) - h) にそれぞれ対応

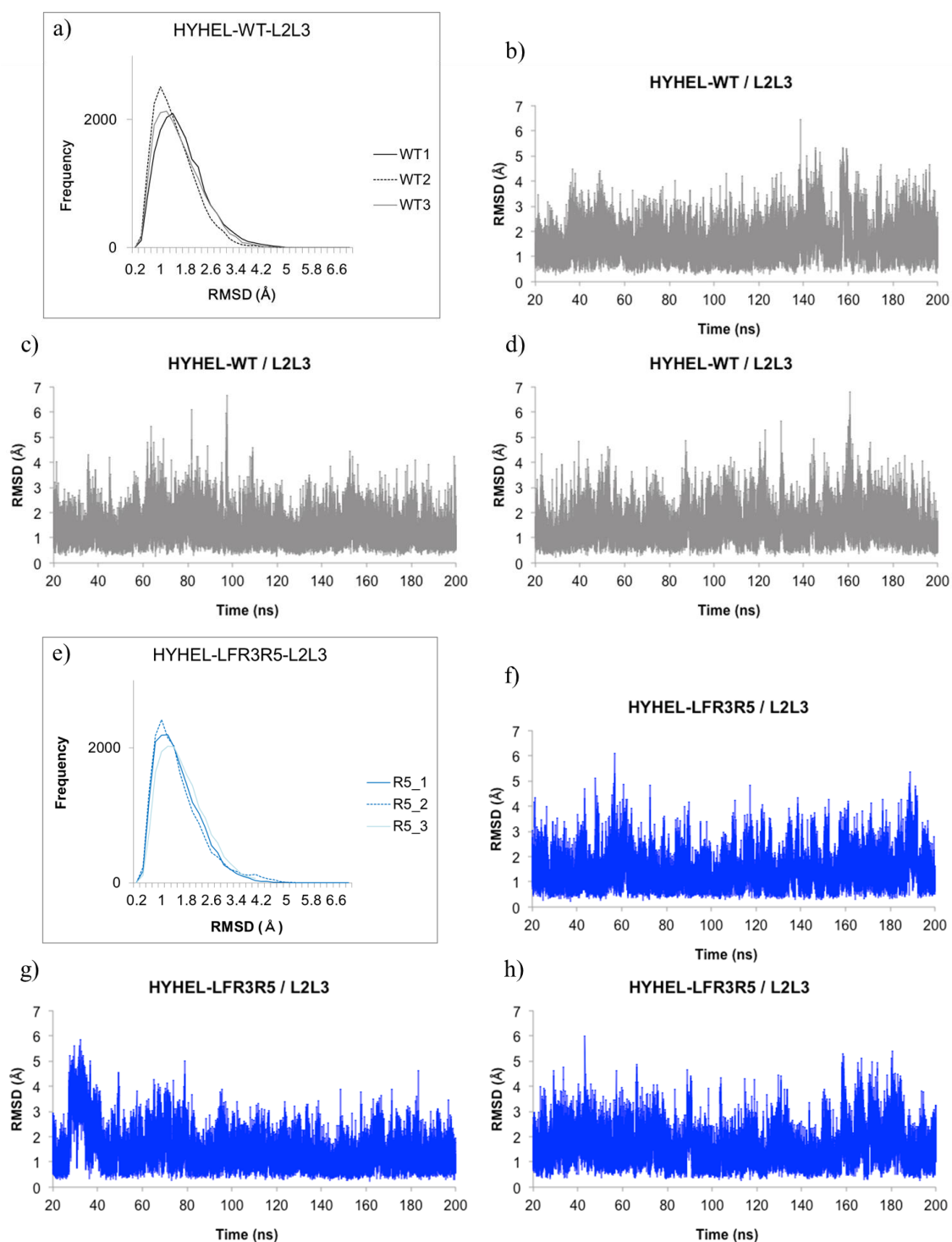


Fig. 4-13. 200 ns における C α の RMSD の経時変化. CDRL2 に対する CDRL3 の RMSD 値を示す.
a, e) 頻度分布 b) - d) 及び f) - h) RMSD 値の推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 - R5_3 は f) - h) にそれぞれ対応

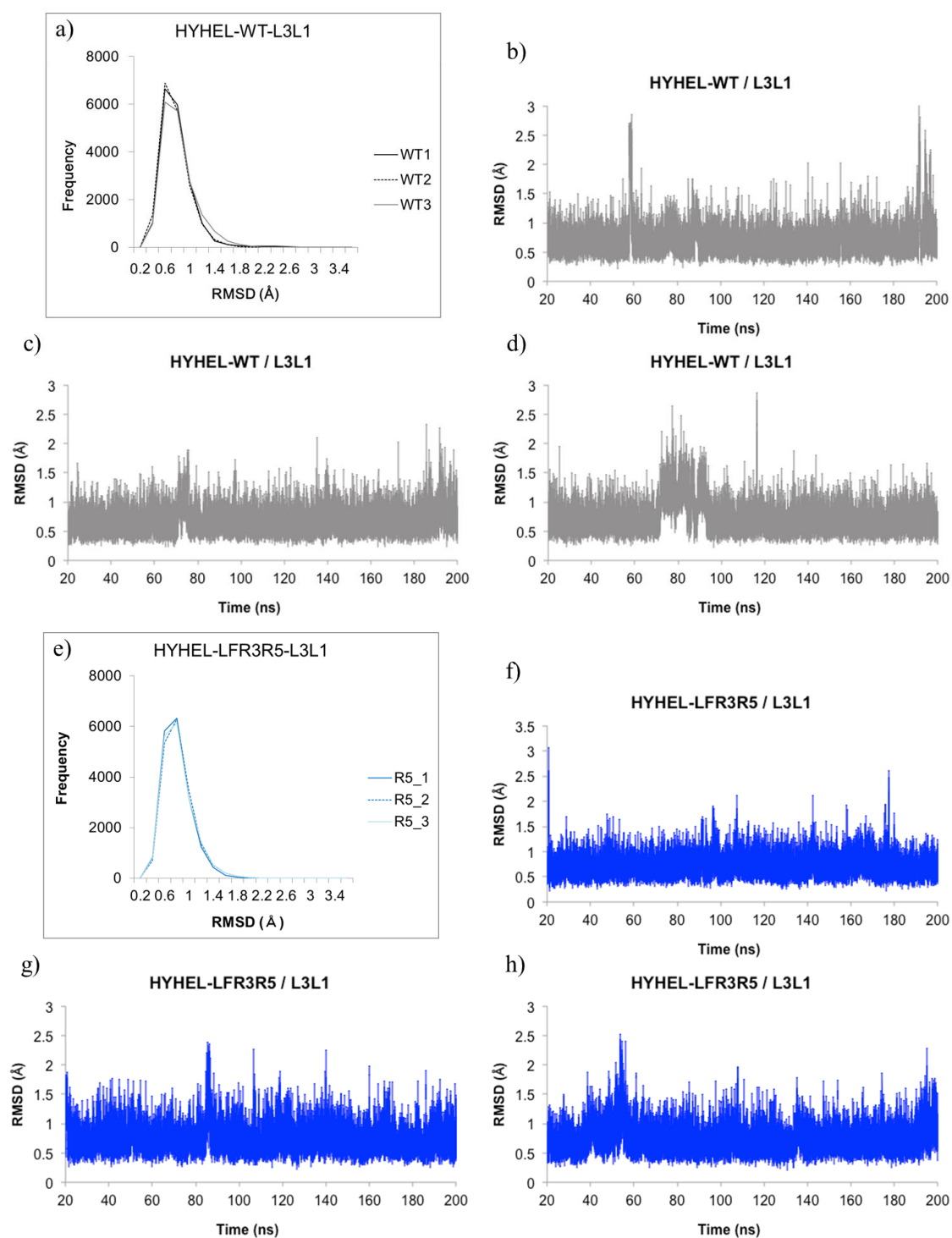


Fig. 4-14. 200 ns における $C\alpha$ の RMSD の経時変化. CDRL3 に対する CDRL1 の RMSD 値を示す.
a, e) 頻度分布 b) - d) 及び f) - h) RMSD 値の推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 - R5_3 は f) - h) にそれぞれ対応

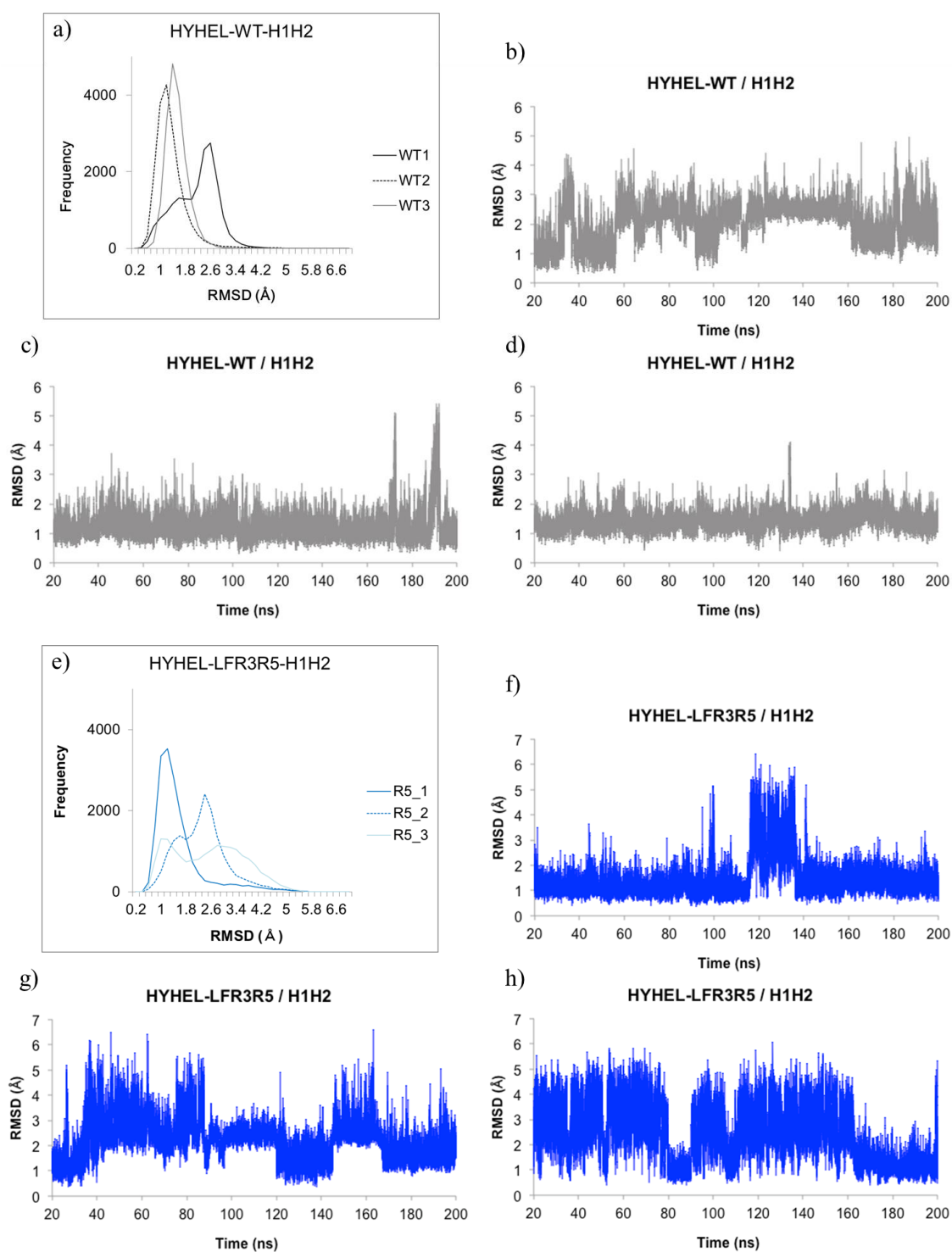


Fig. 4-15. 200 ns における C α の RMSD の経時変化. CDRH1 に対する CDRH2 の RMSD 値を示す.
a, e) 頻度分布 b) - d) 及び f) - h) RMSD 値の推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 - R5_3 は f) - h) にそれぞれ対応

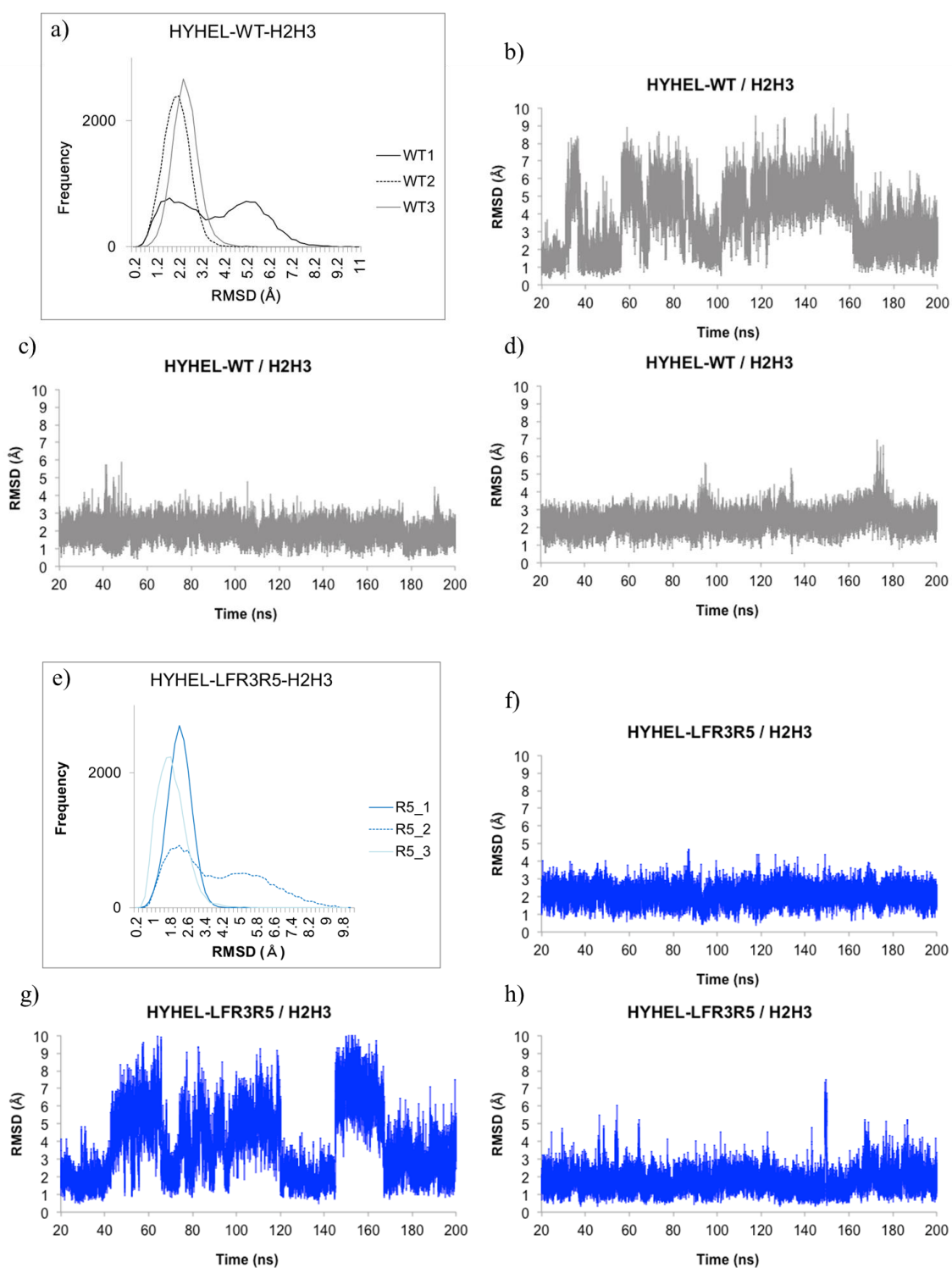


Fig. 4-16. 200 ns における C α の RMSD の経時変化. CDRH2 に対する CDRH3 の RMSD 値を示す.
a, e) 頻度分布 b) - d) 及び f) - h) RMSD 値の推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 - R5_3 は f) - h) にそれぞれ対応

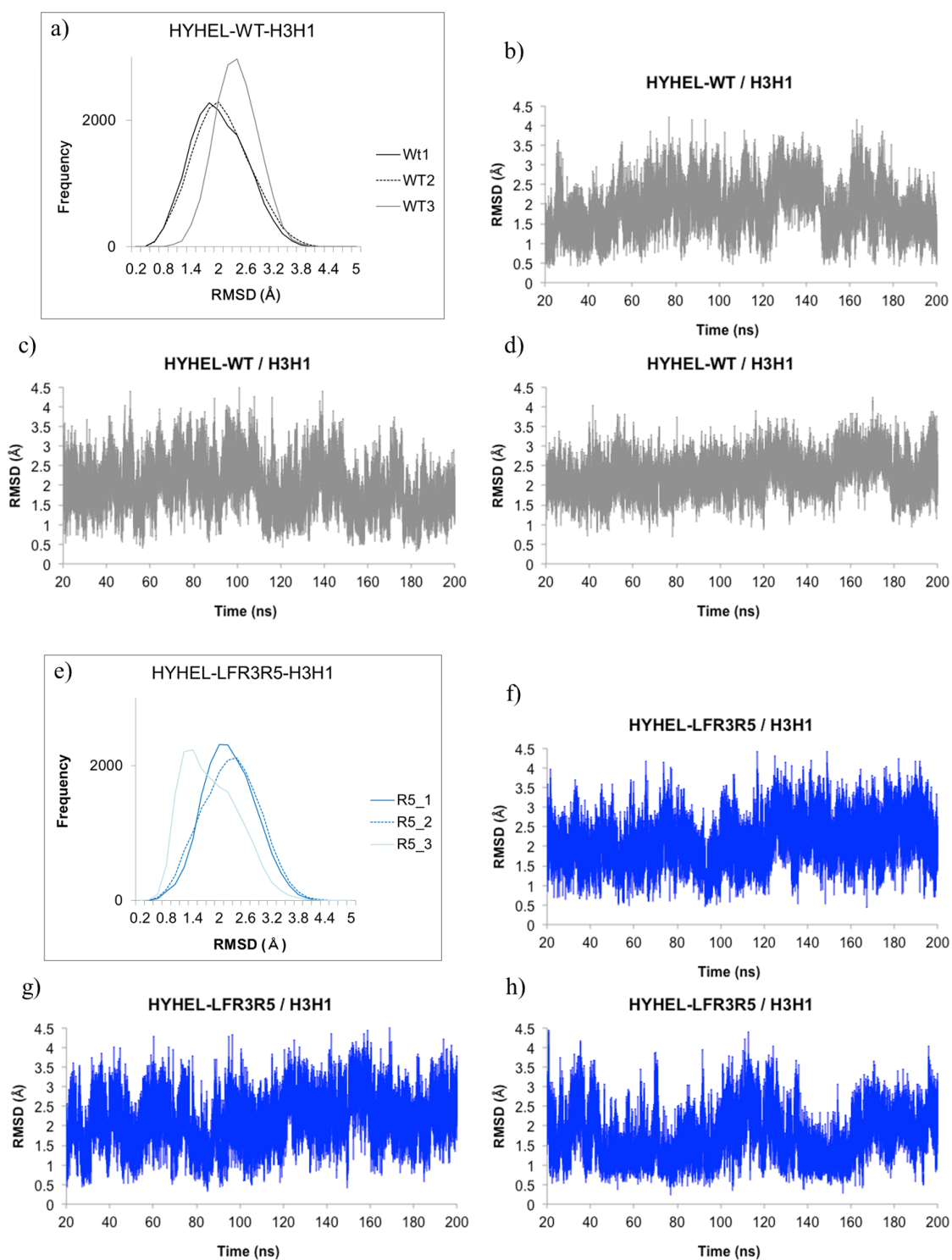


Fig. 4-17. 200 ns における C α の RMSD の経時変化. CDRH3 に対する CDRH1 の RMSD 値を示す.
a, e) 頻度分布 b) - d) 及び f) - h) RMSD 値の推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 - R5_3 は f) - h) にそれぞれ対応

Table 4-2. 各 CDR ループの相対配置に対する RMSD の平均値および SD 値

	Average (Å)					
	WT			R5		
	1	2	3	1	2	3
L1 vs L2	1.16	1.13	1.21	1.07	1.08	1.22
L2 vs L3	1.59	1.37	1.50	1.44	1.45	1.58
L3 vs L1	0.69	0.66	0.72	0.70	0.73	0.72
H1 vs H2	2.04	1.23	1.42	1.45	2.21	2.43
H2 vs H3	3.74	2.00	2.40	2.11	3.83	1.75
H3 vs H1	1.91	1.98	2.29	2.14	2.17	1.72

	SD (Å)					
	WT			R5		
	1	2	3	1	2	3
L1 vs L2	0.34	0.35	0.36	0.32	0.35	0.35
L2 vs L3	0.76	0.67	0.73	0.72	0.81	0.75
L3 vs L1	0.26	0.22	0.27	0.23	0.24	0.25
H1 vs H2	0.67	0.48	0.34	0.80	0.81	1.12
H2 vs H3	1.82	0.59	0.59	0.54	1.97	0.69
H3 vs H1	0.61	0.63	0.47	0.59	0.65	0.64

2. 複合体重鎖 CDR ループの相対配置 (Holo 体 MD 計算)

抗原結合状態である Holo 体に対しても MD 計算を同様に実施した。Apo 体においてアルギニン変異導入時 (LFR3-R5) の変化が特に顕著であった重鎖 CDR ループの相対配置について Fig. 4-18-20 に示した。また、この時の RMSD 平均値、SD 値を Table 4-3 に示した。Holo 体における RMSD 値の平均値は野生型では 1.04 ± 0.12 Å (H1 vs H2)、 1.29 ± 0.06 Å (H2 vs H3)、 1.65 ± 0.16 Å (H3 vs H1) であり、LFR3R5 では 0.98 ± 0.10 Å (H1 vs H2)、 1.38 ± 0.05 Å (H2 vs H3)、 1.60 ± 0.09 Å (H3 vs H1) となった。また SD 値は野生型では、 0.43 ± 0.10 Å (H1 vs H2)、 0.43 ± 0.04 Å (H2 vs H3)、 0.47 ± 0.06 Å (H3 vs H1) であり、LFR3R5 では 0.45 ± 0.15 Å (H1 vs H2)、 0.46 ± 0.03 Å (H2 vs H3)、 0.45 ± 0.03 Å (H3 vs H1) であった。これらの変化量は野生型、LFR3R5 ともに Apo 体における RMSD 平均値、SD 値の変化量に比べて同等かそれ以下の値であった。RMSD 値が小さいことは初期構造からの変化が小さいことを表しており、これは RMSD 計算の鋳型とした 3D9A が複合体構造の結晶構造であるためである。また、柔軟性の指標となる SD 値も低下しており、これは抗原結合に伴って CDR 間の相対配置が安定化されたことを表している。また、LFR3R5 の RMSD 値、SD 値の変化量が野生型と同等であったことから、Apo 体では H1-H2 間の相対配置の柔軟性向上によって野生型以上に不安定となった LFR3R5 が、抗原結合に伴って野生型と同等まで安定化されたことが示唆される。

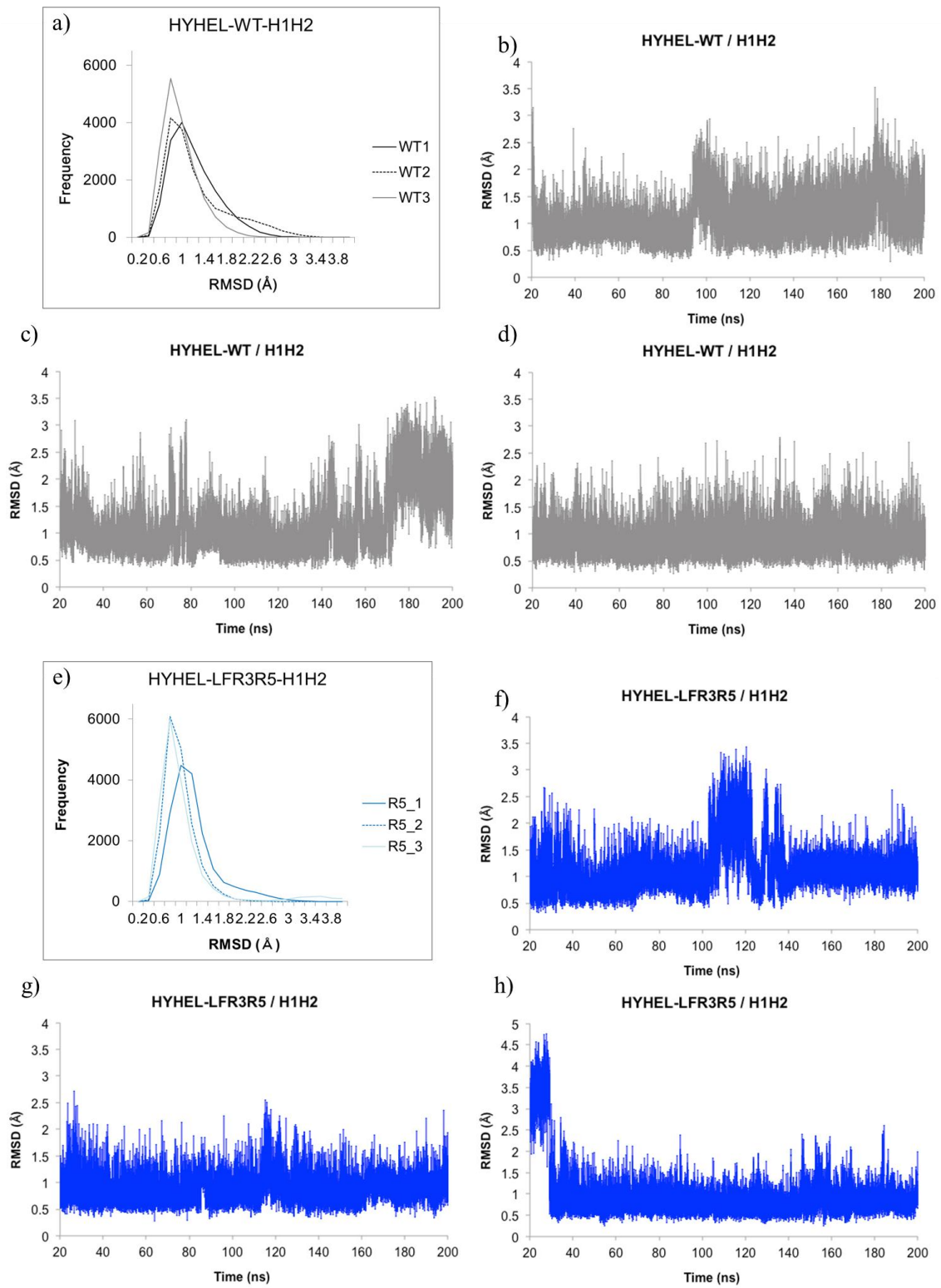


Fig. 4-18. Holo 体での 200 ns における C α の RMSD の経時変化. H1 に対する H2 の RMSD 値を示す.
a, e) 頻度分布 b) - d) 及び f) - h) RMSD 値の推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 - R5_3 は f) - h) にそれぞれ対応

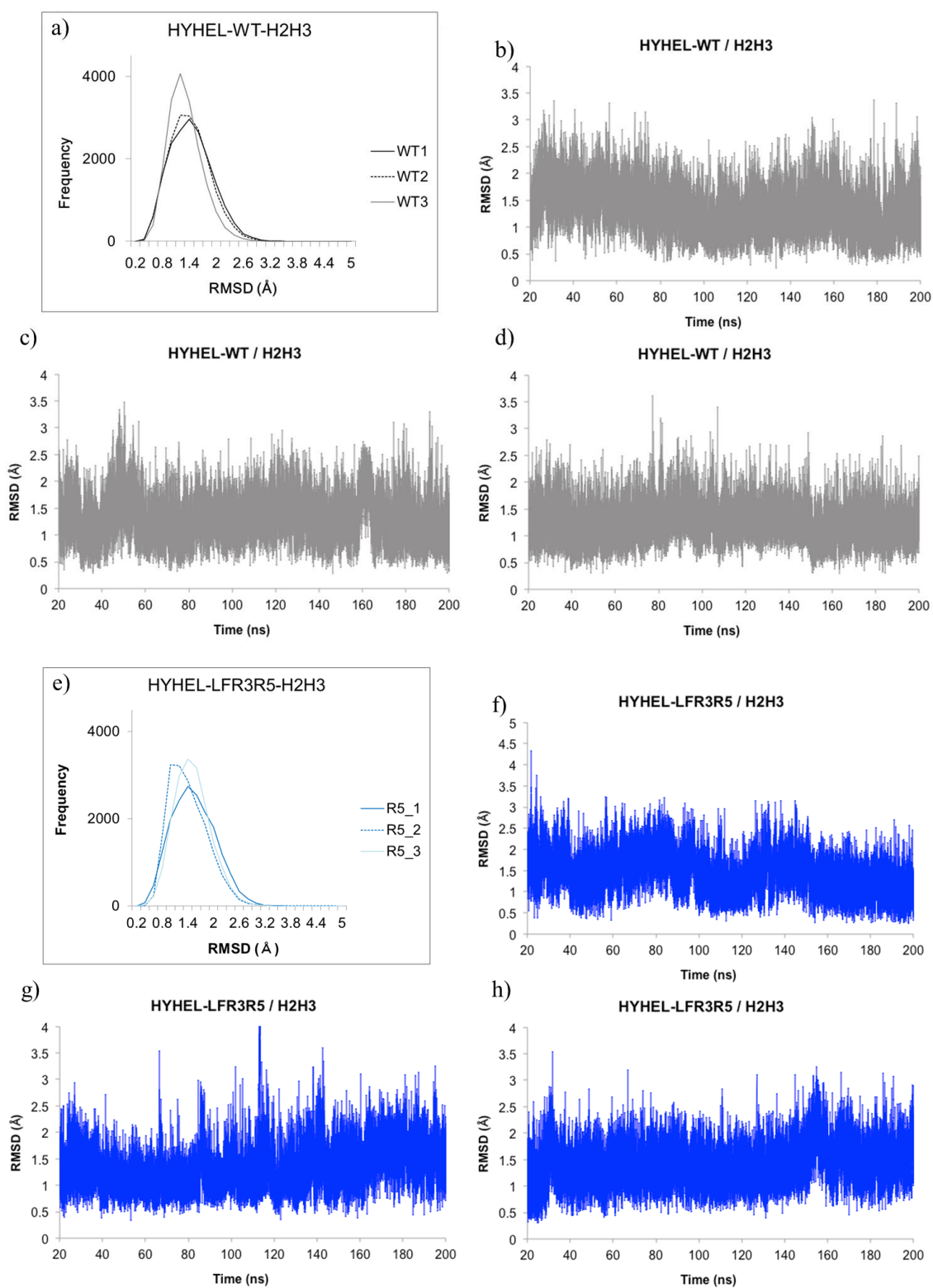


Fig. 4-19. Holo 体での 200 ns における C α の RMSD の経時変化. H2 に対する H3 の RMSD 値を示す.
a, e) 頻度分布 b) - d) 及び f) - h) RMSD 値の推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 - R5_3 は f) - h) にそれぞれ対応

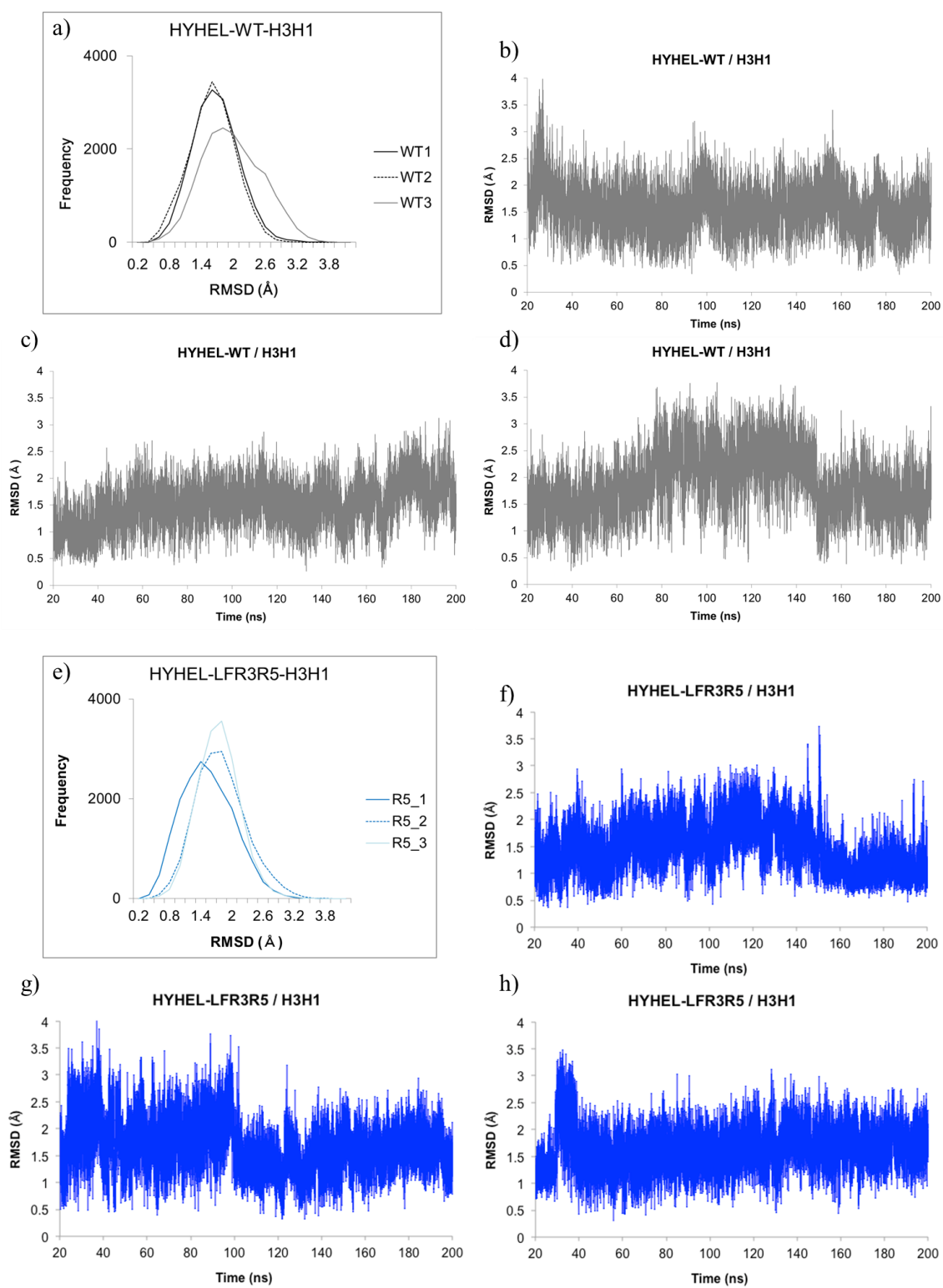


Fig. 4-20. Holo 体での 200 ns における C α の RMSD の経時変化. H3 に対する H1 の RMSD 値を示す.
a, e) 頻度分布 b) - d) 及び f) - h) RMSD 値の推移
a) における WT1 - WT3 は b) - d) に、e) における R5_1 - R5_3 は f) - h) にそれぞれ対応

Table 4-3. Holo 体での重鎖 CDR ループの相対配置

RMSD の平均値および SD 値

	Average					
	WT			R5		
	1	2	3	1	2	3
H1 vs H2	1.11	1.14	0.88	1.12	0.87	0.96
H2 vs H3	1.34	1.31	1.21	1.44	1.31	1.40
H3 vs H1	1.57	1.50	1.88	1.48	1.69	1.64

	SD					
	WT			R5		
	1	2	3	1	2	3
H1 vs H2	0.42	0.57	0.32	0.44	0.27	0.64
H2 vs H3	0.46	0.44	0.37	0.50	0.45	0.42
H3 vs H1	0.44	0.42	0.56	0.46	0.49	0.41

第4節 結言

HYHEL-10 の野生型および LFR3R5 を対象として、MD 計算による動尾的構造変化を観察した。Apo 体に対する計算結果から、LFR3R5 では重鎖 CDR の柔軟性が向上していることが示唆された。各 CDR のループ単独での変化は確認されなかったが、相対的なループ配置を見ると、特に H1 に対する H2 の相対配置がより柔軟に変化しやすくなっていた。抗体は親和性成熟過程において、CDR を構成するアミノ酸を様々に変化させることで抗原に対する親和性・特異性を高める(3,17)。FR への変異導入は、CDR のアミノ酸の構成は変化していないため、それぞれの CDR の柔軟性には影響を与えない。しかしながらループ間の相対配置という、より大きな単位での変化を引き起こしていた。相対配置が柔軟に変化することで、CDR ループで構成される抗原結合部位の表面の水和構造が変化し、野生型では存在していた水分子は LFR3R5 では存在できなくなると考えられる。

抗原抗体複合体の反応におけるエネルギー図は Fig. 4-21 a) のように表すことができる。第 1 章で述べたように、図中①のように、始状態と終状態のエネルギー差が負に大きい場合、反応は複合体形成へと向かうため親和性は高くなる。またその時のエネルギー障壁は②で表され、②をいかに速やかに超えられるかが反応速度を左右する一因である。

遷移状態でのエネルギー障壁②を下げるためには非共有結合を増加することでエンタルピーを獲得するか、始状態において水分子との安定な相互作用をなくし、脱水和によるエンタルピーの消失を抑えることが必要となる。第 3 章の熱力学的解析からは、FR 改変による遷移状態の変化は、始状態の水和構造を変化させることによるものであることを議論した。また熱安定性の低下もまた、始状態の変化を示唆するものであった。本章における Apo 体の MD 計算より、LFR3R5 では重鎖 CDR についてループ間の柔軟性が高くなる結果が得られた。ループ間の柔軟性向上は分子表面の水和構造の変化を引き起こすと考えられるため、安定な水分子が少なくなることで遷移状態において脱水和による不

利なエネルギー貢献がなくなる。このように MD 計算の結果もまた、熱力学的解析と同様に初期構造の変化と脱水和によるエンタルピー損の抑制が FR 改変による親和性向上に寄与していることを示唆していた。また、実験的に示されていた T_m 値の変化もこの柔軟性の変化が少なからず寄与していると考えられる。

最終的な親和性の大小は、始状態と終状態とのエネルギー差 (Fig. 4-21 における①) で決定されるため、複合体形成後の安定性もまた重要である。Holo 体の MD 計算結果からは、終状態における RMSD 値の変化は野生型と LFR3R5 との間に差異はないことが確認されたため、終状態におけるエネルギーは変異導入によって変化しないことが示唆された。したがって Apo および Holo の計算結果から示唆される LFR3R5 の反応のエネルギー座標は Fig. 4-21 b) の青線で示すように変化すると考えられる。始状態がより不安定になることで変異体の反応におけるエネルギー障壁は②'へと変化し LFR3R5 の結合速度定数が向上したと考えられる。

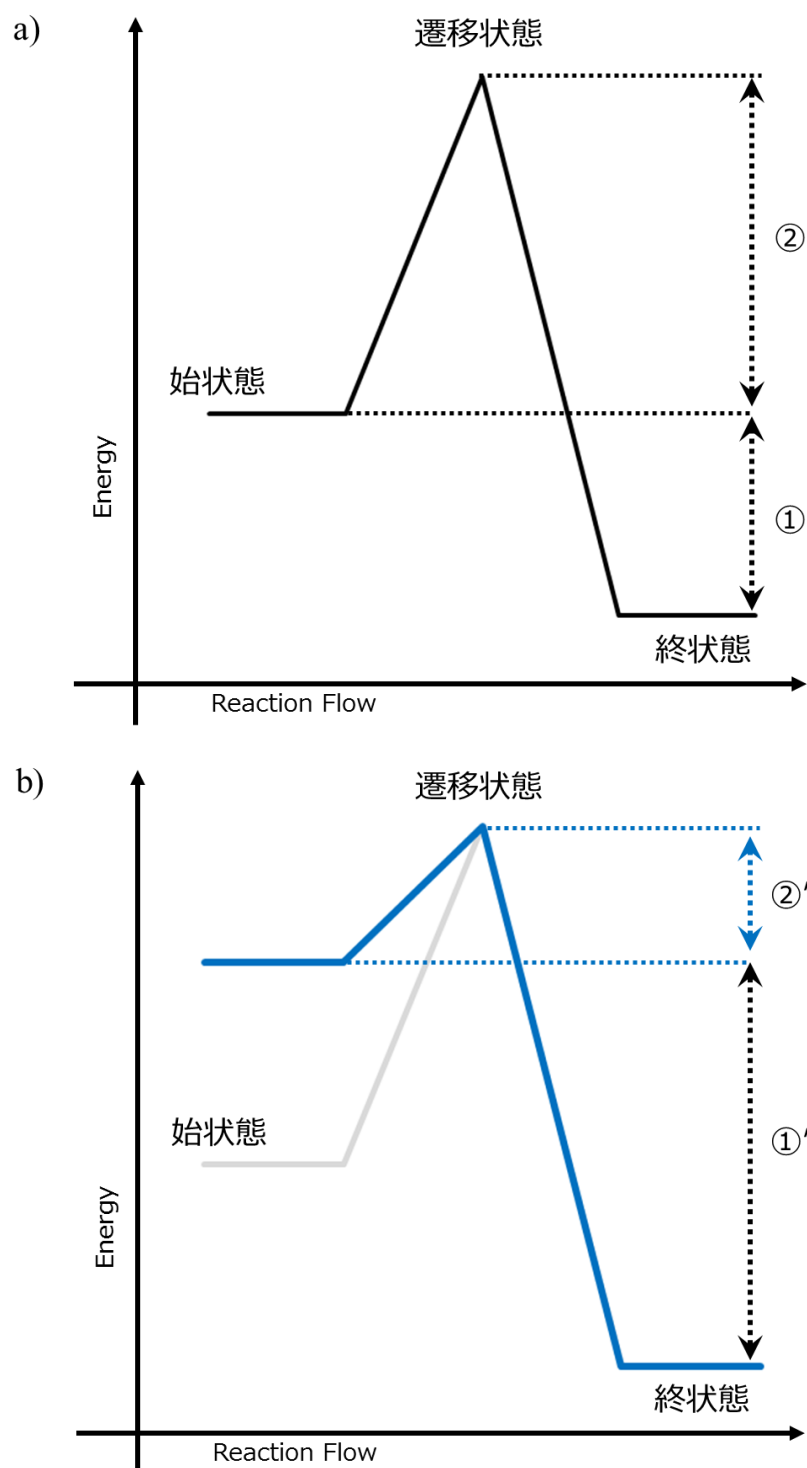


Fig. 4-21. 抗原抗体反応における反応エネルギー座標の模式図

a) 野生型のエネルギー座標 b) MD 計算結果に基づく変異体のエネルギー座標
破線矢印はエネルギー差を示す
エネルギー障壁が②→②'と低下することで、反応は速やかに進行する

第5章 総括

1. 総括

抗体は抗体治療薬や臨床検査試薬などの医薬品で主原料として用いられており、その特性は測定性能に大きく影響する。特に臨床検査試薬は免疫反応を利用した測定系であるため、抗体の特性の一つである親和性が測定時間や測定感度に直結する因子である(1,2)。

抗体の K_d は結合速度定数(k_{on})と解離速度定数(k_{off})により決定されるため、親和性改変については、 $k_{on} \cdot k_{off}$ それぞれの面から 2 通りのアプローチが考えられる。従来の親和性改変は主に k_{off} を改善する手法であり、CDR のラショナルな分子設計による手法や分子進化工学を利用したファージディスプレイ法が一般的である(3,4)。また近年では、抗体の抗原認識に直接関与しないフレームワーク領域に荷電アミノ酸を変異導入することで結合速度定数が改善するという報告がなされている(5)。

このフレームワーク改変手法は結合速度定数の観点から親和性を向上することが可能な唯一の方法であり、また CDR に変異を加えないことから、一般性の高い親和性改変手法として期待される。しかしながら、本技術に関する詳細な物理化学的解析の報告はなく、作用機構に関して十分に記述されていない。本手法による分子認識機構を明らかにすることで、結合速度定数を改善するための設計指針を見出すことが可能となり、新たな親和性改変ストラテジーを確立することができると考えている。

本研究では、異なる 2 つの抗体に対して FR3 変異体を作製し速度論的解析を行いフレームワーク改変の効果を検するとともに、熱力学的解析を行うことによって、遷移状態におけるエネルギー的な寄与を明らかにした。

さらに分子動力学計算を行うことによって、動的構造の変化を解析した。これらの解析結果に基づき、FR 改変による親和性向上における分子認識機構の解明を試みた。

第2章では、抗インスリン抗体を対象として FR への荷電アミノ酸導入による速度論的パラメータ変化を検証するとともに、遷移状態の熱力学的変化について解析した。速度論的解析結果から、塩基性アミノ酸導入によって結合速度定数が向上し、酸性アミノ酸導入によって結合速度定数が低下した。荷電アミノ酸導入により結合速度定数が向上するのみならず親和性を低下させ得ることが新たな知見として獲得された。

遷移状態解析結果からは、アルギニンもしくはリジンの荷電アミノ酸を FR に導入することにより、遷移状態エネルギーが安定化することが明らかとなった。アルギニンを導入した変異体ではエンタルピー依存的な変化、リジンを導入した変異体ではエントロピー依存的な変化が生じており、遷移状態を安定化するメカニズムは導入するアミノ酸種によって異なっていた。これらの結果から、塩基性アミノ酸による親和性向上は、長距離静電相互作用を増強することにより分子の衝突頻度を高め、過渡的複合体の形成を促進するのに加え、遷移状態における結合の最適化プロセスにも関与していることが示唆された。

第3章では、HyHEL-10 を対象として FR へのアルギニン導入による速度論的パラメータ変化を検証した。また、遷移状態の熱力学的変化について解析し、抗インスリン抗体による解析結果より得られた知見の一般性を議論した。解析の結果、FR3 にアルギニンを導入した変異体 LFR3R5 において親和性が向上した。親和性向上が結合速度定数の向上に伴うものであるという点では、これまでの FR 改変による結果と共通していた。しかしながら、抗原の電荷状態に関しては、これまで得られていた知見とは異なる結果となった。先行文献の抗トロポニン抗体および本研究における抗インスリン抗体の結果より、抗原エピトープもしくは抗原分子全体の pI より想

定される電荷状態に対して対になる電荷を有する荷電アミノ酸を FR3 に変異導入することによって親和性は向上した。これらの結果は抗原抗体の分子間に生じる静電相互作用によって説明されてきたが、抗リゾチーム抗体の結果は結合速度定数向上において、必ずしも遠距離の静電相互作用が優先しないことを示唆していた。また、CDR 上の複数の Tyr 残基と FR のアルギニン変異との組み合わせ実験の結果からは、FR 改変による親和性改変効果は、CDR 上の特定のアミノ酸残基の役割には影響を与えないことが確認された。特に抗体の hot-spot による抗原認識能には変化を与えず、変異導入後であっても抗原との特異的結合維持のためには hot-spot が必須であることが示された。

熱力学的解析では、FR 変異によって遷移状態における熱力学的な安定性の向上が確認された。この安定化はエンタルピー依存적であり抗インスリン抗体で得られた知見と一致しいため、その一般性が確認された。FR 改変による結合速度定数の向上は遷移状態におけるエネルギー障壁の低下によって達成され则认为られる。相互作用におけるエネルギー障壁を下げるためには、非共有結合を増加することでエンタルピーを獲得するか、始状態における水和構造を変化させ、脱水和によるエンタルピーの消失を抑えることが必要となる。HY33F や HY58A と FR 変異との組み合わせでは、それぞれの変異体で遷移状態における熱力学的寄与が異なったことから、始状態における CDR 近傍の表面構造もしくは水和構造の変化が結合速度定数向上変異体の相互作用プロセスにかかわっていることが示唆された。

第 4 章では、HyHEL-10 の野生型およびアルギニン導入変異体

(LFR3R5) を対象として、MD 計算による動的構造変化を解析した。抗原非結合状態 (Apo 体) に対する計算結果から、LFR3R5 では特に重鎖 CDRH1 に対する CDRH2 の相対配置がより柔軟に変化しやすくなっていた。CDR の相対配置が柔軟に変化することで、CDR を中心とした抗原結合部位周辺の水和構造は変化すると认为られる。その結果遷移状態におい

て、脱水和による不利なエンタルピーの貢献が抑制され、エネルギー障壁が低下したと考えられる。また、CDR ループの相対配置が柔軟に変化し得ることは、遷移状態における結合の最適化プロセスにおいてより多くの候補構造をとり得ると考えられるため、複合体形成をより速やかにするという点において有利であると考えられる。

最終的な親和性の大小は、Fig. 5-1 a)の①で示される始状態と終状態のエネルギー差に左右される。不安定な遷移状態を経て複合体形成に至るためには、終状態のエネルギーは始状態に対して安定である必要がある。Holo体のMD計算結果からは、終状態におけるRMSD値の変化は野生型とLFR3R5との間に差異はないことが確認されたため、終状態のエネルギー状態は変異導入によって変化しないことが示唆された。

抗インスリン抗体、抗リゾチーム抗体いずれにおいても、変異導入に伴って熱安定性の低下が確認されている。実験的に得られた T_m の変化は、分子全体の熱安定性を反映したものであり、局所的な変化を議論することはできないが、MD計算結果によって示されたCDRループの柔軟性向上も T_m 値低下の一要因であると考えられる。

また、抗トロポニン抗体を対象とした先行研究や本研究における抗インスリン抗体、抗リゾチーム抗体それぞれにおいて、イオン強度依存的なELISA反応性の変化が確認された。この結果自体はFR改変体の抗原抗体反応が静電相互作用を積極的に利用していることを示すものである。しかしながら、CDR近傍の水和構造の変化とあわせて考えれば、分子間に働く静電相互作用のみを反映するのではなく、分子内部に生じた変化を反映していると考えられる。FRへの荷電アミノ酸変異のように分子内部に局所的な電荷の偏りが生じた場合、抗体分子の分極が変化するため、野生型と異なる電場が生じる。そのため、分子表面の水分子の配向の変化や、それに伴う水和構造の変化が生じると考えられる。この点からも、FRへの荷電アミノ酸導入のメカニズムが、抗原との分子間相互作用の増強に

よるものではなく、抗体分子単独の相互作用形態の変化に起因することが示唆される。

第1章で述べたように、効率よく速やかに複合体形成を完了するためには、Fig. 5-1 a)の②で示されるエネルギー障壁をいかに下げるかが課題となる。これまで述べてきたように、FR 改変によって結合速度定数が向上した変異体では、エンタルピー依存的な遷移状態の安定化と、CDR を含む分子表面の柔軟性の向上と水和構造の変化に伴う始状態の不安定化によってエネルギー障壁を低下させる (Fig. 5-2 b) ②')。従って、CDR ループの相対配置の柔軟性向上によって始状態を局所的に不安定にすること、遷移状態において脱水和によるエンタルピー損が抑制されること、またエンタルピーックな遷移状態の安定性向上が FR 改変による結合速度定数向上のメカニズムであると考えられる。

本研究により、結合部位周辺の柔軟性を高め抗原結合における遷移状態を安定化させることが結合速度定数を向上させる主な要因であることが示された。また、CDR ループそのものに柔軟性を与えるのではなく、始状態における CDR ループ間の相対配置の柔軟性が変化していたこと、終状態では野生型と同等であったという点も、FR のような CDR 外領域に変異を加えたことの利点であり、それによって抗原に対する特異性を失うことなく親和性を向上することが可能であったと考えられる。始状態において CDR 表面に存在する水和構造は崩すが、複合体形成後に存在する抗原との相互作用には変化を与えないということが、特異性を失うことなく結合速度定数を向上させるために必要となる。FR3 へのアルギニン導入とその解析によって観察されたこの知見は、結合速度定数を選択的に向上させるための新たな抗体設計の指針となることが期待される。

本研究では、特にアルギニン変異体に焦点をあて、結合速度定数向上のメカニズム解明を試みた。第4章で行った分子動力学計算では、CDR 周辺の動的構造の変化と結合速度定数向上との関連を示す重要な知見が得られ

た。分子表面の柔軟性の向上と水和構造の変化についても議論し、始状態を不安定にすることでエネルギー障壁を低下させ得ることを示したが、水和構造の解析のためには MD 計算結果に対して、水分子を含めた解析を行う必要がある。分子表面で常に無数に存在し常に入れ替わる水分子を対象とした解析は困難であるが、より詳細な反応メカニズムの理解のためには必須であると考えている。

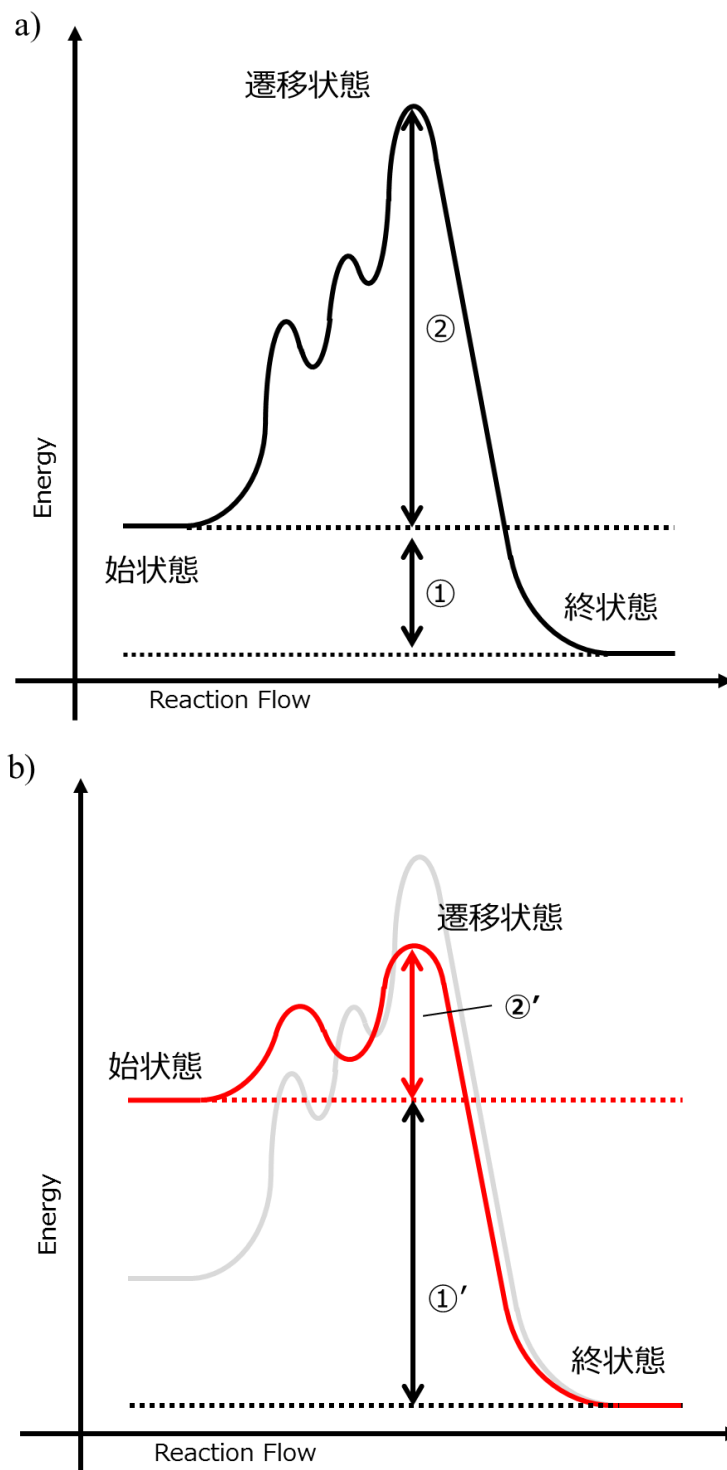


Fig. 5-1. 抗原抗体反応におけるエネルギー座標

a) 野生型におけるエネルギー座標.

②で示す障壁を効率よく超えることで、複合体形成が促進される

b) 変異体において変化したエネルギー座標

2. 技術応用と将来展望

本研究成果による知見に基づけば、抗原結合部位周辺に柔軟性をもたせるための設計が重要になるが、分子内部の運動性は構造安定性にも影響する。そのため、いかに CDR 周辺に限定して柔軟性を与えるかが結合速度定数向上へ向けた分子設計において重要となる。そのためには、本研究でも利用したように MD 計算による動的構造解析が必須となる(6)。

現状では、抗体の全配列に対して網羅的に変異導入し動力学計算を実施するのは困難である。本技術による改変実績を蓄積し、柔軟性向上のために必要な要素を抽出することで、変異導入の候補を決定することができる。絞り込まれた候補の中から、最もよい変異パターンを MD 計算結果に基づき決定することが、効率よく結合速度定数向上の変異体を決定する開発方針であると考ええる。クローン毎の配列の違いや特性の違いによって選択される変異候補は異なる可能性も高い。将来的にあらゆるクローンに対して同様の戦略で開発を進めるためにも、今後複数の抗体クローンに対して改変を試み、その結果を蓄積していくことが必要であると考ええる。また、今回検証した FR3 への変異導入は、結合速度定数を向上し得る一方で、発現量の低下や凝集性向上、コロイド安定性の低下といった影響が顕著に表れる。このような物性面への変化は、応用する産業分野によっては致命的となる場合があるため、*in silico* スクリーニングやファージディスプレイなど進化分子工学的手法と組み合わせることによって改善を検討していく必要がある。

結合速度定数大きな抗体はより速やかに抗原抗体複合体を形成すると考えられるため、第 1 章で述べたように迅速・高感度を必要とする臨床検査試薬の開発において特に有用である。従来の測定系に比べて、より短い時間で同程度の測定感度を有する測定試薬開発に応用することができれば、既存の臨床検査における短時間化のメリットのみならず、ベッドサイド診療、POCT (Point of care testing) といった、より迅速性・効率性が求め

られる診断分野での応用価値は高い。また、従来よりも低い濃度領域で抗原を検出することができれば、より侵襲性の低いリキッドバイオプシーを対象とした診断において大きな利点となる。加えて病態変化における抗原量の変化をより早期に検出することも可能となるため、治療予後モニタリング・早期診断による予防医療や、精密医療への貢献に対しても期待される。本研究の成果は、臨床検査業界をはじめとした医薬品産業の発展に貢献できるものと考えている。

参考文献

【第 1 章】

1. Gregory P. Adams, Robert Schier, Keith Marshall, Ellen J. Wolf, Adrian M. McCall JDM, Weiner and LM. Increased Affinity Leads to Improved Selective Tumor Delivery of Single-Chain Fv Antibodies. *Cancer Res.* 1998; 58(3): 485-90
2. Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med.* 2003;9(1):129-34.
3. Jackson H, Bacon L, Pedley RB, Derbyshire E, Field A, Osbourn J, Allen D. Antigen specificity and tumour targeting efficiency of a human carcinoembryonic antigen-specific scFv and affinity-matured derivatives. *Br J Cancer.* 1998;78(2):181-8.
4. Batra SK, Jain M, Wittel UA, Chauhan SC, Colcher D. Pharmacokinetics and biodistribution of genetically engineered antibodies. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;13(6):603-8.
5. A. Pini LB. Phage Display of Antibody Fragments. *Curr Protein Pept Sci.* 2000;1(2):155-69.
6. Roovers RC, Henderikx P, Helfrich W, Linden E Van Der, Reurs A, Bruine AP De, Arends JW, de Leij L, Hoogenboom HR. High-affinity recombinant phage antibodies to the pan-carcinoma marker epithelial glycoprotein-2 for tumour targeting. *Br Journal Cancer.* 1998; 78(11): 1407-16.
7. Fukunaga A, Tsumoto K. Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions. *PEDS.* 2013;1-8.
8. Alsallaq R, Zhou HX. Energy landscape and transition state of protein-protein association. *Biophys J.* 2007;92(5):1486-502.
9. Alsallaq R, Zhou H. Article Prediction of Protein-Protein Association Rates from a Transition-State Theory. *Structure.* 2007; 15(2):215-24.
10. Horn JR, Sosnick TR, Kossiakoff AA. Principal determinants leading to transition state formation of a protein – protein complex , orientation trumps side-chain interactions. *PNAS.* 2008; 106(8): 2559-64
11. Gabdoulline RR, Wade RC. Simulation of the Diffusional Association of Barnase and Barstar. *Biophys J.* 1997;72(5): 1917-29.
12. Raman CS, Jemmerson R, Nall BT, Allen MJ. Diffusion-Limited Rates for Monoclonal Antibody Binding to Cytochrome. *Biochemistry.* 1992; 31(42): 10370-10379.
13. Braden BC PR. Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB Jounl.* 1995;9(1):9-16.
14. Davies DR, Cohen GH. Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(1):7-12.
15. P.M.Colman. Structure of Antibody-Antigen Complexes: Implications for Immune Recognition - ScienceDirect. *Adv Immunol.* 1988; 43: 99-132.
16. Tsumoto K, Ueda Y, Maenaka K, Watanabe K, Ogasahara K, Yutani K, Kumagai I. Contribution to antibody-antigen interaction of structurally perturbed antigenic residues upon antibody binding. *J Biol Chem.* 1994;269(46):28777-82.
17. Tsumoto K, Nishimiya Y, Kasai N, Ueda H, Nagamune T, Ogasahara K, Yutani K, Tokuhisa K, Matsushima M, Kumagai I. Novel selection method for engineered antibodies using the mechanism of Fv fragment stabilization in the presence of antigen. *Protein Eng.* 1997;10(11):1311-8.

18. Tsumoto K, Shinoki K, Kondo H, Uchikawa M, Juji T, Kumagai I. Highly efficient recovery of functional single-chain Fv fragments from inclusion bodies overexpressed in *Escherichia coli* by controlled introduction of oxidizing reagent - Application to a human single-chain Fv fragment. 1998; 219(1-2): 119-29.
19. McConnell AD, Zhang X, Macomber JL, Chau B, Sheffer JC, Rahmanian S, Hare E, Spasojevic V, Horlick RA, King DJ, Bowers PM. A general approach to antibody thermostabilization. *MAbs*. 2014;6(5):1274–82.
20. Rouet R, Lowe D, Christ D. Stability engineering of the human antibody repertoire. *FEBS Lett*. 2014;588(2):269–77.
21. Satoh M, Iida S, Shitara K.. Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies. *Expert Opin Biol Ther*. 2006; 6(11): 1161–73.
22. Satoh NY-O and M. Production of therapeutic antibodies with controlled fucosylation. *MAbs*. 2009;1(3):230–6.
23. The personalized medicine report. 2017.
24. Matthew W. Gillman S and RAH. Precision Treatment and Precision Prevention. *JAMA Pediatr*. 2017;170(1):9–10.
25. Jørgensen JT, Trøst J. Companion diagnostics : the key to personalized medicine Companion diagnostics : the key to personalized medicine. *Expert Rev*. 2015; 15(2): 153-6.
26. Horn EJ, Terry SF. Precision Medicine Generating Real-World Evidence for Companion Diagnostics. *Genet Test Mol biomrkers*. 2012;16(2):75–6.
27. Ducancel F, Muller BH. Molecular engineering of antibodies for therapeutic and diagnostic purposes. *MAbs*. 2012;4(4):445–57.
28. Akiba H, Tsumoto K. Thermodynamics of antibody - Antigen interaction revealed by mutation analysis of antibody variable regions. *J Biochem*. 2015;158(1):1–13.
29. Tiller KE, Li L, Kumar S, Julian MC, Garde S, Tessier PM. Arginine mutations in antibody complementarity- determining regions display context-dependent affinity / specificity trade-offs. *JBC*. 2017;292(6):16638–52.
30. Yanaka S, Moriwaki Y, Tsumoto K, Sugase K. Elucidation of potential sites for antibody engineering by fluctuation editing. *Sci Rep*. 2017; 7: 1–10.
31. Li T, Verma D, Tracka MB, Casas-finet J, Livesay DR, Jacobs DJ, et al. Thermodynamic stability and flexibility characteristics of antibody fragment complexes. *Protein Pept Lett*. 2015;21(8):752–65.
32. Shinozaki N, Hashimoto R, Fukui K, Uchiyama S. Efficient generation of single domain antibodies with high affinities and enhanced thermal stabilities. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–11.
33. Freire E. A Thermodynamic Guide to Affinity Optimization of Drug Candidates. *Chem Biol Drug Des*. 2009; 74(5): 468–472.
34. Ladbury JE, Klebe G, Freire E. Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: A hot tip. 2010;9(1):23-7
35. Akihiro Kobe, Jose M. M. Caaveiro, Shinya Tashiro, Daisuke Kajihara, Masato Kikkawa, Tomoya Mitani and Kohei Tsumoto. Incorporation of Rapid Thermodynamic Data in Fragment-Based.pdf. *Med Chem*. 2013;56(5):2155–9.
36. Christopher A. Hunter and Salvador Tomas. Cooperativity, Partially Bound States, and Enthalpy-Entropy Compensation. *Cell Chem Biol*. 2003; 10(11): 1023–32.

37. Ernest Grunwald and CS. Solvent Reorganization and Thermodynamic Enthalpy-Entropy Compensation. *JACS*. 1995; 117(21): 5687-5692.
38. Tsumoto K, Ogasahara K, Ueda Y, Watanabe K, Yutani K, Kumagai I. Role of salt bridge formation in antigen-antibody interaction: Entropic contribution to the complex between hen egg white lysozyme and its monoclonal antibody HyHEL10. *JBC*. 1996;271(51):32612–6.
39. Shiroishi M, Yokota A, Tsumoto K, Kondo H, Nishimiya Y, Horii K, Matsushima M, Ogasahara K, Yutani K, Kumagai I. Structural evidence for entropic contribution of salt bridge formation to a protein antigen-antibody interaction. The case of hen lysozyme-HyHEL-10 Fv complex. *JBC*. 2001;276(25):23042–50.
40. Yokota A, Tsumoto K, Shiroishi M, Kondo H, Kumagai I. The role of hydrogen bonding via interfacial water molecules in antigen-antibody complexation: The HyHEL-10-HEL interaction. *JBC*. 2003;278(7):5410–8.
41. Takechi-Haraya Y, Nadai R, Kimura H, Nishitsuji K, Uchimura K, Sakai-Kato K, Kawakami K, Shigenaga A, Kawakami T, Otaka A, Hojo H, Sakashita N, Saito H et al. Enthalpy-driven interactions with sulfated glycosaminoglycans promote cell membrane penetration of arginine peptides. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2016;1858(6):1339–49.
42. Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL. An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *PNAS*. 1993;90(1):5128–32.
43. Pontius BW. Close encounters: why unstructured, polymeric domains can increase rates of specific macromolecular association. *Trends Biochem Sci*. 1993;18(5):181–6.
44. Wade RC, Gabdoulline RR, Luty BA. Species dependence of enzyme-substrate encounter rates for triose phosphate isomerases. *Proteins Struct Funct Genet*. 1998;31(4):406–16.
45. Wade RC, Gabdoulline RR, Lüdemann SK, Lounnas V. Electrostatic steering and ionic tethering in enzyme – ligand binding : Insights from simulations. *PNAS*. 1998;95(11):5942–9.
46. Frisch C, Fersht AR, Schreiber G. Experimental Assignment of the Structure of the Transition State for the Association of Barnase and Barstar. *JMB*. 2001; 308(1): 69-77
47. Deganutti G, Zhukov A, Deflorian F, Federico S, Spalluto G, Cooke RM, Moro S, Mason JS, Bortolato A. Impact of protein–ligand solvation and desolvation on transition state thermodynamic properties of adenosine A2A ligand binding kinetics. *In Silico Pharmacol*. 2017;5(1):16.
48. Kiyoshi M, Caaveiro JMM, Miura E, Nagatoishi S, Nakakido M, Soga S, Shirai H, Kawabata S, Tsumoto K. Affinity Improvement of a Therapeutic Antibody by Structure-Based Computational Design : Generation of Electrostatic Interactions in the Transition State Stabilizes the Antibody-Antigen Complex. *PLoS One*. 2014;9(1):1–9.
49. Oda M, Ito N, Tsumuraya T, Suzuki K, Sakakura M, Fujii I. Thermodynamic and Structural Basis for Transition-State Stabilization in Antibody-Catalyzed Hydrolysis. *JMB*. 2007; 369(1); 198–209.
50. Cyrus Chothia, Arthur M. Lesk, Anna Tramontano, Michael Levitt, Sandra J. Smith-Gill, Gillian Air, Steven Sheriff, Eduardo A. Padlan, David Davies,

- William R. Tulip, Peter M. Colman, Silvia Spinelli, Pedro M. Alzari, Roberto J. Poljak. Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature*. 1989;342(6252):877–83.
51. Shirai H, Nakajima N, Higo J, Kidera A, Nakamura H. Conformational sampling of CDR-H3 in antibodies by multicanonical molecular dynamics simulation. *J Mol Biol*. 1998;278(2):481–96.
 52. Mian IS, Bradwell AR, Olson AJ. Structure, function and properties of antibody binding sites. *JMB*. 1991; 217(1): 133-51.
 53. Northrup SH. Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation. *PNAS*. 1992;89(8):3338–42.
 54. Nishimiya Y, Tsumoto K, Shiroishi M, Yutani K, Kumagai I. Thermodynamic consequences of grafting enhanced affinity toward the mutated antigen onto an antibody. The case of anti-lysozyme antibody HyHEL-10. *JBC*. 2000;275(17):12813–20.
 55. Freire E. A Thermodynamic Approach to the Affinity Optimization of Drug Candidates. *Chem Biol Drug Des*. 2010;74(5):468–72.
 56. Kouhei Tsumoto, Kyoko Ogasahara, Yoshitaka Ueda, Kimitsuna Watanabe Katsuhide Yutani, Izumi Kumagai. Role of Tyr Residues in the Contact Region of Anti-lysozyme Monoclonal Antibody HyHEL10 for Antigen Binding. *JBC*. 1995;270(4):18551–7.
 57. Ohtaka H, Schön A, Freire E. Multidrug Resistance to HIV-1 Protease Inhibition Requires Cooperative Coupling between Distal Mutations. *Biochemistry*. 2003; 42(46): 13659–66.
 58. Perchiacca JM, Ladiwala ARA, Bhattacharya M, Tessier PM. Aggregation-resistant domain antibodies engineered with charged mutations near the edges of the complementarity-determining regions. *PEDS*. 2012;25(10):591–601.
 59. Pliickthun A. Stability of engineered antibody fragments. *Stud Org Chem*. 1993; 47: 81-90.
 60. Xiang J, Sha Y, Jia Z, Prasad L, Delbaere LTJ. Framework Residues 71 and 93 of the Chimeric B72.3 Antibody are Major Determinants of the Conformation of Heavy-chain Hypervariable Loops. *JMB*. 1995;253(3):385–90.
 61. Tramontano A, Chothia C, Lesk AM. Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the VH domains of immunoglobulins. *JMB*. 1990;215(1):175–82.
 62. Haidar JN, Yuan QA, Zeng L, Snavely M, Luna X, Zhang H, Zhu W, Ludwig DL ZZ. A universal combinatorial design of antibody framework to graft distinct CDR sequences a bioinforma. *Proteins*. 2012;80(3):896–912.
 63. Robert A. Alberty, Gordon G. Hammes. Application of the Theory of Diffusion-controlled Reactions to Enzyme Kinetics. *J Phys Chem*. 1958;62(2):154–9.

【第2章】

1. Fukunaga A, Tsumoto K. Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions. *PEDS*. 2013;1–8.
2. D. Requião R, Fernandes L, de Souza HJA, Rossetto S, Domitrovic T, Palhano FL. Protein charge distribution in proteomes and its impact on translation. *PLoS Comput Biol*. 2017;13(5):1–21.

3. Schwartz R, Ting CS, King J. Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within the three domains of life. *Genome Res.* 2001;11(5):703–9.
4. Lars-Oliver Essen A. The de novo design of an Antibody. *JMB.* 1994;238(2):226–44.
5. Hoogenboom HR, Chames P. Natural and Designer Binding Sites Made By Phage Display Technology. *Trends in Immunology.* 2000;21(8):371–8.
6. Shiroishi Mitsunori, Tsumoto Kouhei, Yoshikazu Tanaka, Akiko Yokota, Takeshi Nakanishi, Kondo Hidemasa, Izumi K. Structural Consequences of Mutations in Interfacial Tyr Residues of a Protein Antigen-Antibody Complex. *JBC.* 2007;282(9):6783–91.
7. Horn JR, Sosnick TR, Kossiakoff AA. Principal determinants leading to transition state formation of a protein – protein complex , orientation trumps side-chain interactions. *PNAS.* 2009; 106(8): 2559-64.
8. Chennamsetty N, Voynov V, Kayser V, Helk B, Trout BL. Design of therapeutic proteins with enhanced stability. *PNAS.* 2009;106(29): 11937-42.
9. Julian MC, Lee CC, Tiller KE, Rabia LA, Day EK, Schick AJ, Tessier PM. Co-evolution of affinity and stability of grafted amyloid-motif domain antibodies. *PEDS.* 2015;28(10):339–50.
10. Tiller KE, Li L, Kumar S, Julian MC, Garde S, Tessier PM. Arginine mutations in antibody complementarity- determining regions display context-dependent affinity / specificity trade-offs. *JBC.* 2017;292(6):16638–52.

【第 3 章】

1. Kouhei Tsumoto, Kyoko Ogasahara, Yoshitaka Ueda, Kimitsuna Watanabe, Katsuhide Yutani, Izumi Kumagai. Role of Tyr Residues in the Contact Region of Anti-lysozyme Monoclonal Antibody HyHEL10 for Antigen Binding. *JBC.* 1995;270(4):18551-7.
2. Shiroishi Mitsunori, Tsumoto Kouhei, Yoshikazu Tanaka, Akiko Yokota, Takeshi Nakanishi, Kondo Hidemasa, Izumi K. Structural Consequences of Mutations in Interfacial Tyr Residues of a Protein Antigen-Antibody Complex. *JBC.* 2007;282(9):6783–91.
3. Shiroishi M, Tsumoto K, Tanaka Y, Yokota A, Nakanishi T, Kondo H, et al. Structural consequences of mutations in interfacial Tyr residues of a protein antigen-antibody complex: The case of HyHEL-10-HEL. *JBC.* 2007;282(9):6783–91.
4. Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo JS Arakawa T. Role of Arginine in Protein Refolding, Solubilization, and Purification. *Biotechnol Prog.* 2004; 20(5): 1301–8.
5. Ejima D, Tsumoto K, Arakawa T. Biotech Applications of Arginine. *BioProcess.* 2005; 20-28
6. Kohei Tsumoto, Daisuke Ejima, Yoshiko Kita, Tsutomu Arakawa. Review_ Why is Arginine Effective in Suppressing Aggregation. *Protein Pept Lett.* 2005; 12(7): 613-9
7. Kouhei Tsumoto, Daisuke Ejima, Kazuo Nagase, Tsutomu Arakawa. Arginine improves protein elution in hydrophobic interaction chromatography_ The cases of human interleukin-6 and activin-A. *J Chromatogr A.* 2007; 1154(1-2): 81–6.

8. Nakakido M, Tanaka Y, Mitsuho M, Kudou M, Ejima D, Arakawa T Tsumoto K. Structure-based analysis reveals hydration changes induced by arginine hydrochloride. *Biophys Chem*. 2008; 137(2-3): 105–9.
9. Tsumoto K, Ejima D, Senczuk AM, Kita Y, Arakawa T. Effects of Salts on Protein – Surface Interactions : Applications for Column Chromatography. *J Pharm Sci*. 2007;96(7):1677–90.
10. Borders CL Jr, Broadwater JA, Bekeny PA, Salmon JE, Lee AS, Eldridge AM, Pett VB. A structural role for arginine in proteins : Multiple hydrogen bonds to backbone carbonyl oxygens. *Protein Sci*. 1994; 3(4) 541-8.
11. Lee D, Lee J SC. What stabilizes close arginine pairing in proteins. *Phys Chem Chem Phys*. 2013;15(16):5844–53.
12. Timothy Lynagh VVK and SAP. Unique Contributions of an Arginine Side Chain to Ligand Recognition in a Glutamate-gated Chloride Channel. *JBC*. 2017;3940–6.
13. Philip E. Mason, George W. Neilson, John E. Enderby, Marie-Louise Saboungi, Christopher E. Dempsey, Alexander D. MacKerell and JWB. The Structure of Aqueous Guanidinium Chloride Solutions - *Journal of the American Chemical Society (ACS Publications)*. ACS. 2004;11462–70.
14. Miller BR, Demarest SJ, Lugovskoy A, Huang F, Wu X, Snyder WB, et al. Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies. *PEDS*. 2010;23(7):549–57.
15. Armstrong CT, Mason PE, Anderson JLR, Dempsey CE. Arginine side chain interactions and the role of arginine as a gating charge carrier in voltage sensitive ion channels. *Sci Rep*. 2016: 21759: 1–10.
16. K iyoshi M, Caaveiro JMM, Miura E, Nagatoishi S, Nakakido M, Soga S, Shirai H, Kawabata S, Tsumoto K. Affinity Improvement of a Therapeutic Antibody by Structure-Based Computational Design : Generation of Electrostatic Interactions in the Transition State Stabilizes the Antibody-Antigen Complex. *PLoS One*. 2014;9(1):1–9.
17. Tiller KE, Li L, Kumar S, Julian MC, Garde S, Tessier PM. Arginine mutations in antibody complementarity- determining regions display context-dependent affinity / specificity trade-offs. *JBC*. 2017;292(6):16638–52.
18. Fukunaga A, Tsumoto K. Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions. *PEDS*. 2013;1–8.
19. Chennamsetty N, Voynov V, Kayser V, Helk B, Trout BL. Design of therapeutic proteins with enhanced stability. *Pnas*. 2009;106(29): 11937-42.

【第4章】

1. Kuroda D, Shirai H. Computer-aided antibody design. *PEDS*. 2012;25(10):507–21.
2. Kuroda D, Shirai H, Jacobson MP, Nakamura H. Computer-aided antibody design. *PEDS*. 2012;25(10):507–21.
3. Shirai H, Kidera A, Nakamura H. H3-rules : identification of CDR-H3 structures in antibodies. *FEBS Lett*. 1999; 455(1-2): 188–97.
4. Leonis G., Steinbrecher T. PM. A Contribution to the Drug Resistance Mechanism of Darunavir, Amprenavir, Indinavir, and Saquinavir Complexes with HIV-1 Protease Due to Flap Mutation I50V. *J Chem inf Model*. 2013;53(8):2141–53.

5. Jeliaskov JR, Sljoka A, Kuroda D, Tsuchimura N, Katoh N, Tsumoto K, Gray JJ. Repertoire Analysis of Antibody CDR-H3 Loops Suggests Affinity Maturation Does Not Typically Result in Rigidification. *Front Immunol.* 2018;9(413): 1-17.
6. Schmidt AG, Xu H, Khan AR, Donnell TO, Khurana S, King LR. Preconfiguration of the antigen-binding site during affinity maturation of a broadly neutralizing influenza virus antibody. *PNAS.* 2013;110(1):1-6.
7. Chong LT, Duan Y, Wang L, Massova I, Kollman PA. Molecular dynamics and free-energy calculations applied to affinity maturation in antibody 48G7. *PNAS.* 1999; 96(25): 14330-14335.
8. Thorpe IF, Iii CLB. Molecular evolution of affinity and flexibility in the immune system. *PNAS.* 2007;104(21):8821-6.
9. Wong SE., Sellers BD. JM. Effects of somatic mutations on CDR loop flexibility during affinity maturation. *Proteins.* 2011;79(3):821-9.
10. Li T, Tracka MB, Uddin S, Casas-finet J, Jacobs DJ. Rigidity Emerges during Antibody Evolution in Three Distinct Antibody Systems : Evidence from QSFR Analysis of Fab Fragments. *PLoS Comput Biol.* 2015;1-23.
11. Di Palma F. TA. Dynamics behind affinity maturation of an anti - HCMV antibody family influencing antigen binding. *FEBS Lett.* 2017;591(18):2936-50.
12. Miyazaki S, Shimura J, Hirose S, Sanokawa R, Tsurui H, Wakiya M, Sugawara H, Shirai T. Is structural flexibility of antigen-binding loops involved in the affinity maturation of anti-DNA antibodies ? *Int Immunol.* 1997;9(5):771-7.
13. Adhikary R, Yu W, Oda M, Romesberg FE. Protein Dynamics and the Diversity of an Antibody. *JBC.* 2012;287(32):27139-47.
14. Davenport TM, Gorman J, Joyce MG, Zhou T, Guttman M, Moquin S, Yang Y, Zhang B, Doria-Rose NA, Hu SL, Mascola JR, Kwong PD, Lee KK. Somatic Hypermutation-Induced Changes in the Structure and Dynamics of HIV-1 Broadly Neutralizing Antibodies. *Structure.* 2017;24(8):1346-57.
15. Megan C. Thielges., Jörg Zimmermann., Wayne Yu., Masayuki Oda. Floyd E. Romesberg. Exploring the energy landscape of antibody-antigen complexes protein dynamics, flexibility, and molecular recognition. *Biochemistry.* 2008;47(27):7237-47.
16. Adhikary R, Yu W, Oda M, Walker RC, Chen T, Stanfield RL, Wilson IA, Zimmermann J, Romesberg FE. Adaptive mutations alter antibody structure and dynamics during affinity maturation. *Biochemistry.* 2016;54(11):2085-93.
17. Shirai H, Kideral A, Nakamura H. Structural classification of CDR-H3 in antibodies. *FEBS Lett.* 1996; 399(1-2): 1-8.

【第 5 章】

1. Gregory P. Adams, Robert Schier, Keith Marshall, Ellen J. Wolf, Adrian M. McCall JDM, Weiner and LM. Increased Affinity Leads to Improved Selective Tumor Delivery of Single-Chain Fv Antibodies. *Cancer Res.* 1998; 58(3): 485-90
2. Hudson PJ, Souriau C. Engineered antibodies. *Nat Med.* 2003; 9(1): 129-34.
3. A. Pini LB. Phage Display of Antibody Fragments. *Curr Protein Pept Sci.* 2000; 1(2): 155-69.
4. Roovers RC, Henderikx P, Helfrich W, Linden E Van Der, Reurs A, Bruine AP De, Arends JW, Leij L de, HR Hoogenboom. High-affinity recombinant phage antibodies to the pan-carcinoma marker epithelial glycoprotein-2 for tumour targeting. *Br Journal Cancer.* 1998;78:1407-16.
5. Fukunaga A, Tsumoto K. Improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions. *PEDS.* 2013; 1-8.
6. Kuroda D, Shirai H. Computer-aided antibody design. *PEDS.* 2012; 25(10): 507-21.

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の執筆にあたり、多大なるご指導・ご鞭撻を賜りました東京大学大学院工学系研究科 津本浩平教授に心より感謝申し上げます。タンパク質工学に関する幅広い知識に加え、企業人として基礎研究に携わることの意義や、先端研究で得られた知識・技術を産業応用していくうえでの重要な知見をご教授いただきましたこと、切に感謝いたします。研究活動、大学生活において様々なご配慮とお心遣いをいただき、また多岐にわりご尽力いただいたおかげをもちまして、研究活動を進めることができました。併せて感謝申し上げます。誠にありがとうございました。

本論文を執筆するに当たり、大変有益なご助言とご教示を賜りました、東京大学大学院工学系研究科 高井まどか教授、河原正浩准教授、長門石曉特任准教授、東京大学・先端科学技術研究センター 山口哲志講師に心より感謝申し上げます。

研究室への不定期的な訪問にもかかわらず、本研究の遂行において多大なるご助言、ご教示をいただきました、東京大学大学院工学系研究科 中木戸誠助教、黒田大祐助教に感謝申し上げます。また研究室活動において多岐に亘るご支援ご協力を賜りました、津本研究室の皆様に深くお礼申し上げます。

博士後期課程の入学にあたりご配慮いただき、入学後もご助力いただきました、シスメックス株式会社 一口毅部長、大橋建也部長、野田健太課長、福永淳主任研究員、井出信幸主任研究員、江島大輔アドバンスドアドバイザー、ならびに要素技術開発第二部の皆様に感謝いたします。

研究を進めるにあたり、ご支援・ご協力をいただきながらここにお名前を記すことのできなかった多くの方々に心より感謝申し上げます。

最後に、社会人博士として学ぶことに対する私の考えを尊重し、温かく見守ってくれた両親をはじめ、近くで支え激励してくれた家族に心より感謝いたします。