

論文内容の要旨

論文題目

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

氏名 前田 真吾

要旨本文

概要：抗体分子の親和性は抗体医薬品や臨床検査薬の性能を決定する重要な特性である。従来抗体の親和性向上技術は CDR 改変によるものが一般的であったが、近年フレームワーク領域(FR3)に荷電アミノ酸を導入することで親和性を向上させる新たな技術が報告された。本技術は静電相互作用を促進することにより、結合速度定数を向上させる技術として知られているが、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。本研究では、異なる 2 種類の抗原に対する抗体を対象として FR3 変異体を作製し、速度論的および熱力学的パラメータを決定することで、その分子認識機構の解析を行った。その結果抗原の等電点 (pI) によらず、正電荷アミノ酸としてアルギニンを導入した変異体では、ともに結合速度定数が向上していた。また、遷移状態エンタルピーが有利になっている点も共通しており、相互作用におけるエネルギー障壁が低下することによって結合速度定数が向上している可能性が示唆された。また、分子動力学計算による動的構造解析では、アルギニン変異体において重鎖 CDR の相対配置が変化しており、CDR ループが自由度を増すことと親和性向上との関連が強く示唆された。

【背景】

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。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。特に臨床検査試薬では親和性が測定時間や測定感度を大きく左右する。

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、親和性改変は $k_{on} \cdot k_{off}$ それぞれの面からアプローチが可能である。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、進化分子工学を利用した方法が用いられてきた。

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的に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。このフレームワーク改変による親和性改変手法は結合速度定数の観点から親和性を向上させ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。

【目的】

本手法による親和性改変の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し、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。そのため本研究では、フレームワーク改変により親和性を向上させた抗体分子の認識機構について速度論的、熱力学的観点から議論するとともに、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。

【方法】

組換えタンパク質の発現・精製

抗体の特定の領域に 5 か所のアルギニン変異を導入した変異体を作製した。抗インスリン抗体については、他 3 種の荷電アミノ酸についてもそれぞれ変異体を作製した (D5, E5, K5 変異体)。また、HyHEL-10 に関しては、フレームワーク変異が CDR 内の Hot Spot に及ぼす影響を解析するため、Hot Spot を含む CDR 内の種々のアミノ酸を変異させた変異体抗体についても同様のアルギニン変異体を作製した。発現システムには Expi293 expression system (life technologies) を用いた。培養上製をプロテイン A カラムにて精製した後、Mouse IgG1 Fab and F(ab')₂ Preparation Kit (pierce) によって Fab 化した。

速度論及び熱力学パラメータの取得 (SPR)

速度論及び熱力学パラメータの取得のため、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) に置換し、ヒトインスリンもしくは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。熱力学的解析は、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ついては同様に 5 温度にて決定した速度論的パラメータ値に基づきアイリング近似式を用いて取得した。

分子動力学計算

抗原抗体反応における動的変化を解析するため、分子動力学計算を行った。初期構造として、PDB 登録されている HyHEL-10 とリゾチームの複合体構造 (PDB ID: 3D9A) を用いた。Apo 体の計算には、3D9A から抗原部分を除去した構造座標を用いた。MD engine として Gromacs 2016.3 を用い、CHARMM36m を力場として利用した。

TIP3P モデルに従い水分子を配置し、0.15 M NaCl の環境を想定してイオンを充填した。計算時の温度は 25 °C とし、200 ns の計算を実施した。解析には、初期構造からの変化量である RMSD 値を利用し、200 ns 間における CDR L1~L3 および H1~H3 の相対的配置の変化を解析した。

DSC 解析

変異導入による熱安定性を評価するため、DSC (示差走査熱量測定) により変性中点温度 (T_m 値) を決定した。Fab サンプルは SEC によってリン酸緩衝液に置換し、ベースライン測定には同様のリン酸緩衝液を使用した。昇温速度 60 °C/hour で 30°C から 100°C の温度範囲で測定した。

【結果・考察】

SPR 解析

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、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 の抗原はエピトープに正電荷を豊富に含むが、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おけ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より、遷移状態のエンタルピーが抗インスリン抗体では 78 kJ/mol から -1.4kJ/mol、HyHEL-10 では 16 kJ/mol から -55 kJ/mol に変化しており、いずれの場合においても遷移状態におけるエンタルピーを獲得していることが分かった。このことから、アルギニンを導入することで遷移状態が熱力学的に安定化し、速やかにエネルギー障壁を超えられるようになるため、結合速度定数が向上したと考えられる。

分子動力学計算

アルギニン変異導入による効果は、抗原抗体分子間の静電相互作用には依存しない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、抗体分子内部に変化が生じることで、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。野生型およびアルギニン変異体の抗体分子単独での動的な構造変化を解析するため、分子動力学計算を実施した。その結果、アルギニン変異体では重鎖 CDR ループの相対配置の動的変化が野生型に対して大きくなっており、CDR を中心とする分子表面の柔軟性が增大していることが示唆された。このような柔軟性の変化は、分子表面の水和構造の変化を誘起すると考えられる。遷移状態においては、脱水和によるエンタルピーの損が抑制されるため、エネルギー障壁は低下することになる。このような分子表面の柔軟性の変化は、遷移状態解析結果とも一致している。

DSC 解析

各 Fab の熱安定性を DSC により測定した。抗インスリン抗体および HyHEL-10 において、野生型の T_m は 76.8 °C、78.3°C であり、マウス抗体の一般的な Fab の値であった。一方でアルギニン変異体の T_m は、抗インスリン抗体、HyHEL-10 それぞれ、71.1 °C、75.7 °C であり、いずれにおいても野生型と比べて熱安定性が低下していた。このことから、5 か所の複数変異により、熱安定性は低下することが示された。またこの結果は、先述の分子動力学計算で得られた分子表面の柔軟性の向上とも一致する結果である。

【まとめ】

複数の抗体クローンを対象とした解析結果より、FR にアルギニンを導入することによる結合速度定数の向上技術には一般性があることが示唆された。また本手法による結合速度定数の向上は、CDR 内の特定のアミノ酸の結合状態には寄与しておらず、遷移状態の熱力学的な安定性の向上に起因することが明らかとなった。また、分子動力学計算結果からは、フレームワーク領域へのアルギニン変異導入により、CDR 表面の柔軟性の向上と水和構造の変化が示唆された。

本研究結果より、FR 改変による結合速度定数向上のメカニズムは CDR 表面の柔軟性の向上による始状態の不安定化と、エンタルピー依存的な遷移状態の安定化によるエネルギー障壁の低下によって達成されることが明らかとなった。本研究成果は、結合速度定数改善を目的とした抗体エンジニアリングにおいて、重要な設計指針を与えるものである。

本研究成果により、抗体の親性向上における新たな設計ストラテジーを提案することが可能となる。

【参考文献】

- 1) Fukunaga A., K Tsumoto. “Improving the affinity of an antibody for its antigen via Long-range electrostatic interactions.” *Protein Eng Des Sel.*, 26, 12, (2013), pp.773-80.
- 2) Makabe K., Kumagai I., “Thermodynamic Consequences of Mutations in Vernier Zone Residues of a Humanized Anti-human Epidermal Growth Factor Receptor Murine Antibody, 528.” *J Bio Chem.* 238, 2 (2007), pp. 1156-66
- 3) Peter J.,H, & Christelle, S. “Engineered antibodies.” *Nat Med.* 9, (2003), pp. 129-34
- 4) Schreiber G., “Kinetic studies of protein-protein interactions.” *Curr Opin Struct Biol.* 12, 1, (2002), pp. 41-7
- 5) Chen, Y., Wiesman C., “Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured Fab in complex with antigen.” *J Mol Biol.* 293, 4 (1999), pp. 865–81
- 6) Rothlisberger D., Pluckthun A. “Domain Interactions in the Fab Fragment: A Comparative Evaluation of the Single-chain Fv and Fab Format Engineered with Variable Domains of Different Stability.” *J. Mol. Biol.*, 347 (2005), pp. 773–789