

論文の内容の要旨

論文題目 抗体ドメイン間相互作用を利用した酵素活性制御法に関する研究

氏名 岩井 宏徒

第1章：諸言

タンパク質の活性が基質あるいはそれ以外の分子(エフェクター)の結合によって制御されることをアロステリック制御と呼ぶ。自然界のほぼ全ての酵素は何らかのアロステリック制御を受けることで生体内における多様な生理機能を実現している。所望のエフェクターによってその触媒活性を自在に制御可能な人工アロステリック酵素の設計は古くからタンパク質工学における重要なテーマとなっており、また人工アロステリック酵素に既存の酵素に実現できないユニークな活性を持たせることができれば、バイオセンサー、バイオリアクター、さらには酵素によるプロドラッグ治療など、産業・医療への応用も期待される。

人工アロステリック酵素の設計法としてこれまで種々の方法論が検討されてきているが、エフェクター認識能をリガンド結合タンパク質に頼る例が一般的である¹⁾。しかしこの場合、エフェクターとして利用できる分子種が限られ、またリガンド結合タンパク質ごとに最適なアロステリック酵素を設計する必要がある。もし、多様な抗原認識能を有する抗体を酵素のアロステリック制御に利用できれば、任意の分子を検出し得る夢のセンサータンパク質の実現に近づけると考えられる。

酵素がアロステリック制御を受けるためには、エフェクター結合によりそのドメインに構造的または熱力学的な変化が及ぶことが重要とされる。抗原が抗体に結合する際に可変領域(Fv)の相補性決定領域(CDR)が構造変化する場合があることは知られているが、その影響は小さく酵素にアロステリック能を付与するには至らないとも考えられた。一方、我々の研究室を中心とした検討により、抗体Fvを構成する重鎖・軽鎖可変領域V_H、V_L間の相互作用は抗原結合によって顕著に安定化されることが明らかにされている。本研究では、この相互作用変化を利用することで、抗原をエフェクターとする人工アロステリック酵素が創出可能か検討した。

第2章：抗体ドメイン間相互作用に基づくペプチド認識抗体の試験管内親和性成熟

細胞工学や遺伝子工学の発達に伴い、抗体遺伝子を動物細胞から単離してバクテリオファ-

ジ等に提示し、*in vitro*で特異的抗体を選択する手法が実用化されている。タンパク質などの高分子抗原は物理吸着などで固相化した抗原に対する結合を指標に選択できる一方、ペプチドや低分子は固相化のための化学修飾やキャリアタンパク質への結合といった処理が不可欠であった。しかし、もしこれらが不適切な場合、反応の阻害や複合体結合性クローンの濃縮などの問題が生じる。そこで本研究では既報²⁾を参考に、抗体 V_H 、 V_L 間相互作用の抗原濃度依存的変化を利用し、抗原分子の修飾が不要でかつ効率的なペプチド認識抗体の選択を試みた。抗体ドメイン間相互作用を指標にした低分子認識抗体の選抜が可能であれば、同様の相互作用に基づく新規アロステリック酵素を用いてその酵素活性変化を指標に優れた変異体を選抜することも可能と期待され、そのための指針にもなりうる。

本章では、ヒトオステオカルシン(別名Bone gla protein; BGP)のC末端ペプチドを認識する抗体KTM219を選び、非修飾抗原ペプチドを用いた親和性成熟を試みた。BGPの健常人での血清中濃度は1 nM程度であるが、骨粗鬆症や副甲状腺機能亢進症などの疾患においては上昇することが知られ、バイオマーカーとして利用される。

KTM219の V_H にerror-prone PCRによりランダム変異を導入し、変異 V_H をM13ファージに提示して 10^8 程度の多様性を持つライブラリを作製した。 V_L はマルトース結合タンパク質(MBP)のC末端との融合タンパク質(MBP- V_L)として発現精製しビオチン化標識を施した。低濃度(0.95 nM)のBGP-C8ペプチド存在下でビオチン化MBP- V_L と結合するファージを選択する操作を繰り返したところ、従来の選抜法に比べ少ない選択回数で抗原特異的ファージが濃縮され、野生型 V_H と比べ抗原検出感度が約10倍に向上した変異体O2AG2が取得された。

さらに、O2AG2の4箇所の変異残基に飽和変異を導入した 10^8 程度の多様性を有する二次ライブラリを作製して同様の選抜を行ったところ、野生型 V_H に比べ抗原検出感度が約300倍に向上した変異体R4A10が取得された。変異型 V_H と V_L の抗原ペプチドに対する結合を表面プラズモン共鳴法により解析したところ、その結合定数 K_D は野生型での137 nMに対しR4A10では17.2 nMと向上傾向が認められ、本選抜法が抗体の親和性成熟に有効であることが示された。

第3章：抗体ドメイン間相互作用を利用した円順列変異酵素の活性制御

円順列変異(Circular permutant; cp)とは、タンパク質のN、C末端を直接あるいは短いアミノ酸リンカーで連結し、もともとの末端と異なる任意の位置に新規のN、C末端を創出する手法で、特に酵素においてその触媒活性や構造安定性を変化させた変異体を作成するのに用いられる。Guntasらは大腸菌TEM1- β -ラクタマーゼ(BLA)の円順列変異体(Circularly permuted BLA; cpBLA)をMBPの配列中に挿入し、マルトースに応答し酵素活性が向上する融合タンパク質を報告している³⁾。本章では、抗BGP抗体KTM219の V_H 、 V_L をcpBLAのN、C末端に柔軟なリンカーを介して連結した融合タンパク質Fv-cpBLAを作成し、抗体への抗原結合によってcpBLAの酵素活性制御が可能か検討した。

大腸菌BL21(DE3)pLysSにおいてFv-cpBLAはその多くが細胞質不溶性画分に発現しており、不溶性タンパク質を6 Mグアニジン塩酸塩により可溶化した後に、金属アフィニティ精製、段階

の透析による巻き戻し、および酸化型グルタチオンによるジスルフィド結合誘導を行うことで、十分な純度の精製タンパク質が取得された。精製したFv-cpBLAはFvと同様の抗原結合能を有しており、その酵素活性は抗原BGP-C7ペプチド濃度依存的に上昇した。Fv-cpBLAを用いることで約60分間の反応で1 nM程度のペプチドを検出でき、一方で抗原以外の化合物を添加した際には明確な酵素活性上昇は観察されなかったことから、Fv-cpBLAが抗原を特異的に検出可能なセンサータンパク質として機能することが示された。

酵素反応の経時変化をミカエリスメンテン式に近似し、代謝回転数 k_{cat} およびミカエリス定数 K_m を算出したところ、Fv-cpBLAの k_{cat} は抗原非存在時に比べ1.1 μ Mの抗原ペプチド存在下において約26%向上していた。この反応をリガンド結合の協奏作用を考慮したHillの方程式に近似した場合には、 k_{cat} の抗原依存的な上昇は約2.1倍であった。以上の結果より、抗原によりFv-cpBLAの触媒反応速度が向上することが示唆された。

また、Fv-cpBLAが抗生物質アンピシリン(Ap)を加水分解することを利用して、融合タンパク質発現大腸菌の増殖を指標にFv-cpBLAの選抜が可能か検討した。低分子農薬イミダクロプリド(ICP)を認識する抗体の V_H 、 V_L をもとにFv-cpBLAを設計し、さらに V_H 、 V_L とcpBLAをつなぐリンカーをヘリックスリンカーに組換えた上で連結部位の残基をランダム化したライブラリを作成した。ライブラリを導入した大腸菌を39.4 nMのICPおよび100 μ g/mLのApを含むLB培地中にて培養したところ、複数のクローンがICPを含む培地でのみ増殖した。選抜されたクローンから得られた変異型Fv-cpBLAがICP依存的な酵素活性上昇を示したことから、本手法で抗原をエフェクターとする人工アロステリック酵素の選抜が可能ことが示唆された。

第4章：酵素活性のアロステリック制御に適した新規円順列変異抗体ドメインの創出

前章で述べた通り、Fv-cpBLAは抗原濃度依存的な酵素活性上昇を示したが、その応答性は必ずしも十分でなかった。cpBLAなどの円順列変異酵素は、もともと安定なループを切断してN、C末端を作成しており、新規末端部位の構造安定性が酵素活性に強く影響すると予想された。抗体 V_H 、 V_L を円順列変異酵素のN、C末端に直接連結し、かつ抗原結合によってその末端を近接、安定化できる変異体を作成できれば、より効果的に酵素活性を制御できる可能性がある。そこで我々は、Brinkmannらの報告⁴⁾を参考に、 V_H 、 V_L ドメイン界面近傍の3-3b間ループを新規N、C末端とする円順列変異抗体ドメインcircularly permuted V_H 、 V_L (cp V_H 、cp V_L)を設計した。

KTM219についてcp V_H 、cp V_L を設計し、これらをその結晶構造がKeらにより報告されたcpBLA(RG13型)⁵⁾のN、C末端に連結したcpFv-cpBLAを作成した。cpFv-cpBLAは大腸菌SHuffle® T7 Express lysYを用いた発現系において、Fv-cpBLA同様細胞質不溶性画分から精製タンパク質を調製できた。cpFv-cpBLAの酵素活性は0.80 nMの抗原ペプチドBGP-C10を添加することでわずかに上昇した。さらにこの時、反応溶液中に尿素やTriton X-100など適量の変性剤ないし界面活性剤を添加すると、抗原非存在時のcpFv-cpBLAの触媒活性が顕著に低下するものの、抗原添加時の活性低下は比較的軽微であることが明らかとなった。このように反応条件を最適化させることにより抗原応答性が顕著に向上し、0.24 nMのBGP-C10ペプチドを特異的に検出できた。また、1.2

M尿素存在下においてcpFv-cpBLAの k_{cat} は抗原存在時に約4.7倍に向上し、従来型Fv-cpBLAに比べ優れた抗原依存性が得られることが確認された。一方、円順列変異を導入しない V_H 、 V_L とcpBLAを直接またはヘリックスリンカーを用いて連結させた融合タンパク質では抗原依存的活性上昇はいずれの条件においても観察されず、cpBLAの活性制御における酵素末端間距離の重要性が示唆された。

第5章：結言

抗体 V_H 、 V_L ドメイン間相互作用の抗原依存的変化を利用することで抗BGP抗体の親和性成熟が可能なることを示し、抗原ペプチドの検出感度が約300倍に向上した V_H 変異体R4A10を選抜した。また、抗BGP抗体のドメイン間相互作用に着目し、円順列変異酵素cpBLAのN、C末端に V_H 、 V_L を融合することで酵素活性制御が可能なることを見いだした。また、抗体による円順列変異酵素の活性制御に抗体ドメインの末端間距離が重要なことを明らかにし、制御に適した新規円順列変異抗体ドメインcp V_H 、cp V_L を設計した。さらに界面活性剤や変性剤などで酵素の安定性を変化させることで、融合タンパク質の酵素活性の抗原応答性を顕著に向上できることを明らかにした。以上本論文において、多くの分子に応答してその触媒活性が向上する抗体-酵素融合体の一般的な設計法と、その簡便高感度な免疫診断への応用の可能性を提案した。

参考文献

- (1) Makhlynets, O. V. et al., *Biochemistry* **54**, 1444-1456 (2015).
- (2) Tsumoto, K. et al., *Prot. Eng.* **10**, 1311-1318 (1997).
- (3) Guntas, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 32, 11224-11229 (2005).
- (4) Brinkmann, U. et al., *J. Mol. Biol.* **268**, 107-112 (1997).
- (5) Ke, W. et al., *PLOS ONE* **7**, e39168 (2012).