

博士論文

ドメイン蛋白質の コンホメーション安定性と コロイド安定性解析による 抗体凝集機構の解明

2016年3月

八桁 清樹

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

メディカル情報生命専攻 生命機能分子工学分野

指導教官 本田真也

目次

略語.....	5
第一章 緒言.....	7
1.1. 抗体医薬品の特性.....	8
1.2. 抗体医薬品の市場および製造・品質管理技術開発の重要性.....	8
1.3. 抗体医薬品の製造・品質管理における課題.....	9
1.4. 蛋白質の立体構造とコンホメーション安定性.....	9
1.5. 蛋白質の凝集反応と関連する二つの安定性.....	10
1.6. IgG1 の構造.....	10
1.7. 抗体ドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性.....	13
1.8. IgG1 のマルチドメイン構造とドメイン間相互作用.....	13
1.9. 研究目的と研究内容.....	14
第二章 ドメイン蛋白質の解析.....	15
2.1. 序論.....	16
2.2. 実験手法.....	16
2.2.1. ドメイン蛋白質の遺伝子配列を含むベクターの構築.....	16
2.2.2. C _H 1-C _L ヘテロダイマーの遺伝子配列を含むベクターの構築.....	16
2.2.3. ドメイン蛋白質の発現および精製.....	19
2.2.4. 溶液調整.....	20
2.2.5. 円偏光二色性スペクトル.....	20
2.2.6. 蛍光スペクトル.....	21
2.2.7. 動的光散乱.....	21
2.2.8. サイズ排除クロマトグラフィー.....	21
2.2.9. ブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動.....	22
2.2.10. コンホメーションと粒子径の経時的変化の測定.....	22
2.3. 解析手法.....	22
2.3.1. 特異値分解.....	22
2.3.2. Empirical phase diagram の作成.....	23
2.3.3. コンホメーション状態の存在比の算出.....	25
2.3.4. アミノ酸組成および配列、構造表面特性に基づく凝集性の解析.....	25
2.4. 実験結果.....	27
2.4.1. 円偏光二色性スペクトル測定によるドメイン蛋白質の二次構造解析	27

2.4.2.	内部トリプトファン蛍光スペクトル測定によるドメイン蛋白質の三次構造解析.....	33
2.4.3.	特異値分解によるコンホメーション状態の解析.....	39
2.4.4.	Empirical phase diagram による主要コンホメーション状態の可視化と分類.....	48
2.4.5.	ブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動およびサイズ排除クロマトグラフィーによる凝集体の検出.....	52
2.4.6.	動的光散乱測定と particle size diagram による凝集溶液条件の特定....	54
2.4.7.	凝集反応に関わる特定コンホメーション状態の検出.....	57
2.5.	考察.....	59
2.5.1.	Generalized phase diagram によるドメインの特性評価.....	59
2.5.2.	抗体定常領域ドメインのコンホメーション安定性の序列.....	62
2.5.3.	pH 4-5 の溶液条件における C _{H2} モノマーの a partially distorted state.....	64
2.5.4.	ドメインのコロイド安定性の序列.....	66
2.5.5.	各ドメインの抗体凝集への寄与.....	66
2.5.6.	ドメインのアミノ酸組成および配列、構造表面特性にもとづく凝集性の評価.....	67
2.6.	まとめ.....	73
第三章	Fc の解析.....	75
3.1.	序論.....	76
3.2.	実験手法.....	76
3.2.1.	Fc の遺伝子配列を含むベクターの構築.....	76
3.2.2.	wtFc 蛋白質の発現および精製.....	77
3.2.3.	溶液調整.....	78
3.2.4.	円偏光二色性スペクトル測定.....	78
3.2.5.	動的光散乱測定.....	78
3.3.	解析手法.....	78
3.3.1.	三状態転移解析.....	78
3.4.	実験結果.....	82
3.4.1.	円偏光二色性スペクトル測定による wtFc の二次構造解析.....	82
3.4.2.	特異値分解および三状態転移解析.....	85
3.4.3.	動的光散乱測定による wtFc の凝集解析.....	94
3.5.	考察.....	98
3.5.1.	wtFc を構成するドメインのコンホメーション安定性の独立的な振る	

舞い.....	98
3.5.2. wtFc を構成するドメインのコロイド安定性の相補的な振る舞い....	100
3.5.3. 凝集体構造に関する考察.....	100
3.6. まとめ.....	101
第四章 ドメイン間ジスルフィド結合を導入した環状化 Fc の解析.....	103
4.1. 序論.....	104
4.2. 実験手法.....	104
4.2.1. Fc の C 末端にシステイン残基の導入した Fc (cycFc) の遺伝子配列の設計および遺伝子クローニング、発現、精製.....	104
4.2.2. 溶液調整および、円偏光二色性スペクトル測定、動的光散乱測定..	105
4.3. 解析手法.....	105
4.3.1. ピュアスペクトルの算出と三状態転移解析.....	105
4.4. 実験結果.....	107
4.4.1. 円偏光二色性スペクトル測定による二次構造解析.....	107
4.4.2. 特異値分解と三状態転移解析.....	109
4.4.3. 動的光散乱による cycFc の凝集反応の解析.....	112
4.5. 考察.....	113
4.6. まとめ.....	114
第五章 総括.....	115
参考文献.....	118
謝辞.....	128

略語

ADCC, antibody dependent cellular cytotoxicity; APR, aggregation prone region; BN-PAGE, blue native polyacrylamide gel electrophoresis; CD, circular dichroism; CDC, complement dependent cytotoxicity; CDR, complementarity determining region; cycFc, cyclic Fc; DI, developability index; DLS, dynamic light scattering; DLVO 理論, Derjagulin-Landau-Verwey-Overbeek theory; DSC, differential scanning calorimetry; EPD, empirical phase diagram; Fab, fragment antigen binding; Fc, fragment crystallizable; HER2, human epidermal growth receptor; IgG1, immunoglobulin G 1; MMNN state, monomeric monodispersed non-native state; N state, native state; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; PPNN state, polymeric polydispersed non-native state; PSD, particle size diagram; RBS, ribosome binding region; RGB, red green blue; RMSD, root mean square deviation; SAP, spatial aggregation propensity; SDS-PAGE, poly acrylamide gel electrophoresis; SEC, size exclusion chromatography; SVD, singular value decomposition; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; TOF-MS, time of flight mass spectrometer; wtFc, wild type Fc.

第一章

緒言

1.1. 抗体医薬品の特性

抗体は、生体内で免疫反応に関与する蛋白質である。抗体は、標的となる抗原に対して優れた選択性と親和性を有する。また標的抗原の捕捉後には抗体依存性細胞傷害(ADCC)や補体依存性細胞傷害(CDC)などの生体内の免疫応答を誘導することにより、標的抗原やそれを発現する細胞を生体内から除去することができる(1, 2)。抗体医薬品とは、これら抗体の特性を巧みに利用したものであり、特定の病原性因子に選択的に結合する抗体を血中に投与し、病原性因子を的確に捕捉、除去することによって、治療効果を発揮する。例えば、関節リウマチに対する抗体医薬品であるアダリズマブは、関節リウマチの病原性因子である $\text{TNF-}\alpha$ に対し選択的に結合し、 $\text{TNF-}\alpha$ の受容体への結合を阻害することにより、炎症作用を抑制する効果をもつ(3)。また乳癌や胃癌に対する抗体医薬品であるトラスツズマブは癌遺伝子産物である HER2 に選択的に結合し、HER2 の生体内での働きを抑制することにより、癌細胞の増殖を抑制する(4)。抗体医薬品は、標的抗原に対する選択性に優れることから、低分子医薬品に比べて副作用が低減されと考えられ、また FcRn との結合を介したリサイクリング作用により血中半減期が比較的長いという長所を持つ(5, 6)。

1.2. 抗体医薬品の市場および製造・品質管理技術開発の重要性

近年、大型医薬品の特許切れが相次いだこともあり、世界医薬品売上の上位 10 品目の内、抗体医薬品はその半数以上を占めるようになった。現在、47 の抗体医薬品が米国と欧米で承認されており、開発段階にある抗体医薬品は 300 以上も存在することから、今後も様々な疾病に対して治療効果をもつ抗体新薬が市場に投入されることが予測される(7)。また近年流行したエボラウイルスや HIV などを含む感染症に対する抗体医薬品の開発(8, 9)とともに、それらの感染症患者在比較的多いアフリカやアジアなどへの販路拡大も促進されるものと考えられる。抗体医薬品の需要や販路の拡大により、抗体医薬品の大量生産、長距離輸送、長期保存の必要性が増大し、製造および品質管理技術の分野においては、今後も継続的な技術革新が求められると考えられる。例えば、抗体医薬品は液体または凍結乾燥品として販売され、また投与方法としては静脈投与が一般的である。そのため抗体は冷蔵または冷凍品として輸送される必要があり、輸送経路や医療施設には冷蔵や冷凍設備が完備されている必要がある。また処方には医療従事者による投与が必要であることから、患者は医療施設へと足を運ばなければならない。これらは抗体医薬品による治療コストの増加や治療機会の低下を招く恐れがある(10, 11)。近年では、プレフィルドシリンジを用いた自己注射による処方方法の開発(12)や、大腸菌やカイコ、植物などの異なる宿主を用いた抗体製造技術の開発(13-15)、経口や粘膜による投与方法の開発(16-18)など、抗体医薬品の利用拡大につながる技術開発が精力的に研究されている。抗体医薬品の生産性や利用性を向上させる技術開発によって、抗体医薬品を用いた治療におけるコスト低下や利用性を高めることは、新薬開発と並ぶほどに多

くの患者の治療に貢献するものと考えられる。

1.3. 抗体医薬品の製造・品質管理における課題

抗体は蛋白質の一種である。抗体の蛋白質としての物性に対する理解は、製造や品質管理の技術発展における基盤となる(19, 20)。抗体医薬品の製造・品質管理プロセスには、抗体の蛋白質として物性に由来するいくつかの解決すべき課題が存在する。例えば酸化や脱アミド化といった化学的修飾体、ポリペプチド鎖の切断により生じる断片体、本論文が研究対象とする抗体の非選択的かつ不可逆的な凝集体の形成である(20-22)。これらは抗体医薬品において不純物として分類され、高精度かつ効率的に分析および抑制、除去することが求められる。凝集体の形成は、抗体医薬品の製造効率を低下させ、また凝集体が体内に投与されることで免疫反応を引き起こす危険性がある(21, 23, 24)。凝集反応は、抗体医薬品の製造効率や品質・安全性を維持するために、抑制すべき重要な副反応であり、その分子論的な理解が求められる。抗体は、製造や保存プロセスにおける様々なストレスにより凝集反応を生じうる。抗体凝集を引き起こす物理的ストレスとして、熱や酸、振動、凍結乾燥、凍結融解などが挙げられ(20)、製造・保存プロセスにおいてはプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーやウィルス不活化のプロセスにおいて抗体を酸性 pH バッファー(pH 2.5 – 4.1)に曝す過程(22, 25-27)や、抗体の高濃度化の過程、輸送や保管時における振動や温度変化などが凝集体形成に関与すると考えられる。

1.4. 蛋白質の立体構造とコンホメーション安定性

蛋白質は、アミノ酸が連なったポリペプチド鎖から構成され、アミノ酸の主鎖および側鎖間の水素結合やイオン結合、疎水性相互作用と言った比較的弱い非共有結合を介して一定の立体構造(コンホメーション)を形成するという特性をもつ(28-33)。このコンホメーション中では、経時的なアミノ酸残基の主鎖や側鎖間の相互作用の解離会合およびポリペプチド鎖の微小なゆらぎが生じている。蛋白質溶液にはミクロな点で異なる多数のコンホメーションが存在し、一つの熱力学的に安定な状態(天然状態)として捉えることができる。この天然状態は特定の溶液条件下、一般的には中性 pH および室温に近い環境下において維持され、高温や酸性条件下では、立体構造が崩れ、ポリペプチド鎖のほどけた変性状態へと移行する。天然状態と変性状態間のエネルギー差(コンホメーション安定性)は比較的小さく(34)、また温度や pH 変化、塩などの添加剤などは蛋白質のコンホメーション安定性を変化させるため、蛋白質は環境条件に対してナイーブな物質であると考えられる(35)。蛋白質を医薬品として用いるためには、蛋白質がもつコンホメーション安定性を評価し、天然状態の維持に最適な溶液条件や保存条件を探索する必要がある(19, 36)。さらには蛋白質のコンホメーションの不安定化に寄与する要因を突き止め、エンジニアリング手法を見出すことが重要である。

1.5. 蛋白質の凝集反応と関連する二つの安定性

蛋白質のコンホメーション安定性の一部は、ポリペプチド鎖中の疎水性残基の側鎖を介した相互作用によって形成される疎水性コアのエントロピー的な安定性に由来する。天然状態を有する蛋白質は、疎水性コアを蛋白質構造内部に包埋し、さらに構造表面を親水性残基の側鎖で覆うことにより、高い分散性を維持している。蛋白質が変性状態に移行しポリペプチド鎖がほどけると、内部に埋もれている疎水性残基が構造表面に露出し、その疎水性領域を介した分子間の凝集反応が生じる。そのため、蛋白質の凝集のしやすさ(凝集性)は、変性状態への移行のしやすさに関連するコンホメーション安定性に大きく依存する。一方で、蛋白質を熱変性させた後に室温に戻した場合、凝集せずに天然状態を再び形成する蛋白質も存在する(37)。これは、変性状態における凝集速度が比較的遅く、分子間の凝集反応が起こる前にリフォールディング反応を生じる性質を有しているためと考えられる。変性状態における凝集速度の違いに関連する特性であるコロイド安定性も、蛋白質の凝集性に関与する物性として重要である(38-41)。本論文では、コロイド安定性の指標として一定時間後に形成された凝集体サイズを用いた。コロイド安定性に関与する蛋白質の物理化学的な原理については、DLVO 理論を基礎とした考え方が有用である(40, 42)。DLVO 理論は、コロイド間の凝集に関わる物性および凝集速度に関連するポテンシャルを、静電的反発力に由来する分子間斥力とファンデルワールス力に由来する分子間引力の和として表現する(43)。凝集速度は、二つのパラメーターの足し合わせの結果生じるエネルギー障壁の高さに対応すると考えられている。ただし蛋白質の凝集反応に関与する物性としては、ファンデルワールス以外にも、疎水性相互作用や誘起双極子を介した相互作用などが想定され、従来の DLVO 理論が適用できない場合があることが示唆されている(40, 41, 44, 45)。本研究では、酸性 pH 条件における凝集反応を解析することから、分子間斥力には荷電性残基に由来する静電的斥力、引力には変性により露出する疎水性残基の側鎖を介した疎水性相互作用が主に寄与すると想定した。溶液中のイオン濃度の増加は、荷電性残基による静電的斥力を低下させ、凝集速度および一定時間後に生じる凝集体サイズを増加させると考えられることから、コロイド安定性の低い場合にはより低濃度の NaCl 条件下で凝集体の形成が誘起されることが考えられる。

1.6. IgG1 の構造

イムノグロブリン G1(IgG1)は、抗体医薬品として上市されている抗体の内、最もよく使用されているアイソタイプの一つである(46)。図 1-1 に IgG1 の構造の模式図を示した。IgG1 は、重鎖および軽鎖と呼ばれるポリペプチド鎖をそれぞれ 2 本ずつ含む計 4 本のポリペプチド鎖から構成される蛋白質である(20)。重鎖-重鎖間および重鎖-軽鎖間には、分子間ジスルフィド結合が存在し、4 つの鎖は相互に連結している。重鎖と軽鎖

には、それぞれ4つ(V_H と C_{H1} 、 C_{H2} 、 C_{H3} ドメイン)および2つのドメイン(V_L と C_L ドメイン)が存在し、IgG1は計12個のドメインから構成される。消化酵素であるパパインをIgG1に対して反応させると、 C_{H1} と C_{H2} ドメインの間に存在するヒンジ領域と呼ばれる部位が選択的に切断され、IgG1は2種類のフラグメントに分解される。この内、 V_H と C_{H1} 、 V_L 、 C_L の4つのドメインを含む領域をFabと呼び、また C_{H2} と C_{H3} ドメインを2つずつ含む計4つのドメインからなる領域をFcと言う。Fab中の V_H と V_L ドメインには、抗原結合領域が存在し、この領域は相補性決定領域(CDR)と呼ばれ、異なる抗原を標的とする抗体ごとに異なるアミノ酸配列を有している。故に、この V_H と V_L ドメインは可変領域(V領域)と呼ばれ、それ以外の領域は定常領域(C領域)と呼ばれる。各ドメインの名称における1文字目(VまたはC)はそれぞれ可変領域か定常領域かの違いを、2文字目(HまたはL)はそれぞれ重鎖か軽鎖かの違いを示している。

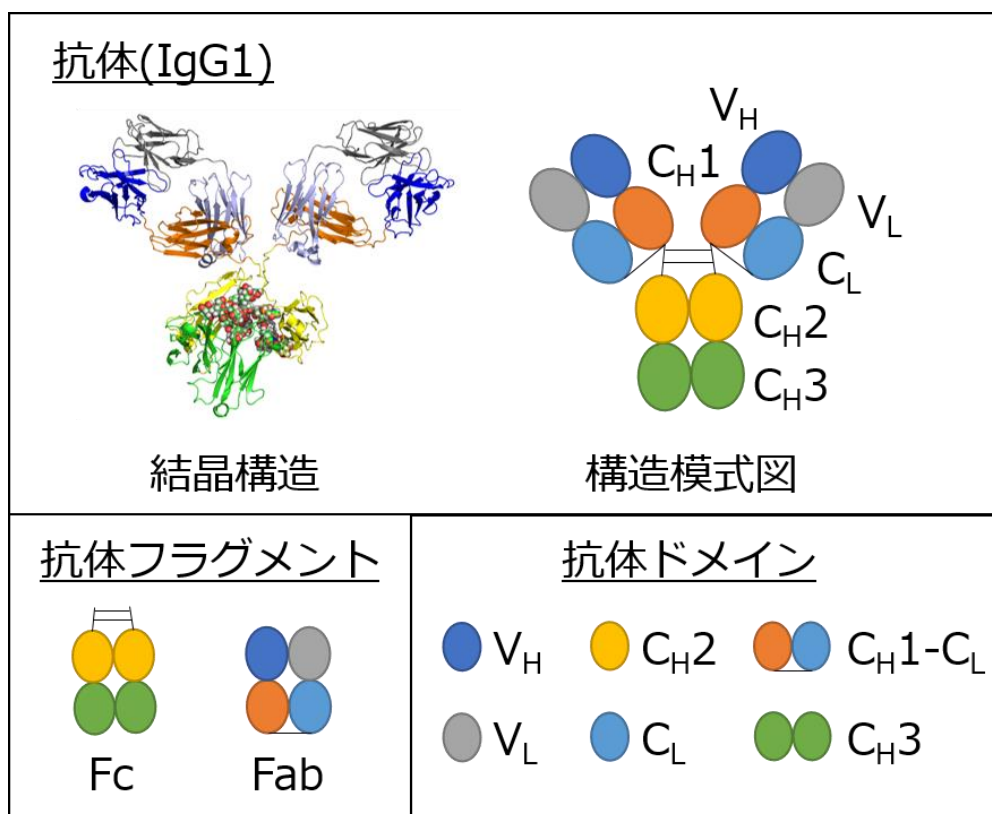


図 1-1 : 抗体(IgG1)の結晶構造および抗体構造に関する模式図を示した。結晶構造は、マウス由来 IgG1 の X 線結晶構造を参照した(PDBID: 1IGY(47))。

1.7. 抗体ドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性

抗体 IgG1 を構成する各ドメイン蛋白質は、それぞれ異なるコンホメーション安定性を有することが報告されている。示差走査型熱量測定装置(DSC)を用いた研究では、温度上昇に伴って、C_{H2} と C_{H3} ドメインが異なる温度で独立して変性する様子が観測される(48, 49)。中性 pH 条件(pH 6.0)では、C_{H2} ドメインは 70℃付近で変性し、次に Fab 領域が 57.2–81.6℃で、最後に C_{H3} ドメインが 83℃付近において変性する(48)。Fab 領域の熱安定性は、CDR のアミノ酸配列が異なる場合に異なる温度で変性する(48)。また各ドメインの熱変性温度は、溶液条件による影響を受け、例えば酸性 pH 条件では C_{H2} ドメインの熱変性温度が低下する(50)。また C_{H3} と C_{H2} ドメインの変性後のコロイド安定性も大きく異なることが示唆されている(51)。C_{H3} の熱変性は不可逆であり、熱変性に伴って凝集体を生じる。一方で、C_{H2} ドメインは、pH 4.8 において、低イオン濃度条件下では可逆的な熱変性を示すが、高濃度のイオンの存在下で不可逆となり、溶液中のイオン濃度は熱変性反応の可逆性に関与している。これらの報告から、抗体を構成する各ドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性は大きく異なり、溶液条件に応じて抗体の凝集反応に関与するドメインが異なることが示唆される。さらに先行して変性するドメインの凝集反応が、抗体全体の凝集反応を主導することが示唆される(52, 53)。各ドメインの固有のコンホメーション安定性とコロイド安定性を評価し、溶液条件に応じた抗体全体の凝集反応に寄与するドメインを特定・分類することができれば、抗体全体の凝集機構をドメインレベルの物性変化と凝集反応から理解できると考えられる。

1.8. IgG1 のマルチドメイン構造とドメイン間相互作用

IgG1 は複数種のドメインから成るマルチドメイン蛋白質であり、ドメイン間に生じる相互作用が IgG1 のコンホメーション安定性に影響を与えることが報告されている。C_{H3} ドメインは非共有結合を介してホモダイマーを形成し、コンホメーション安定性を向上させている(54)。C_{H1} ドメインは、単独ドメインとして存在する場合には中性溶液条件で変性状態を有する天然変性蛋白質であり、C_L ドメインとの相互作用を介して、構造形成を行うことが報告されている(55)。C_{H2} ドメインには N 結合型糖鎖が存在し、糖鎖を介した C_{H2} ドメイン間の相互作用が熱ストレスに対するコンホメーション安定性を増加させることが報告されている(56)。V_H-V_L ヘテロダイマーと C_{H1}-C_L ヘテロダイマーが連結した Fab を形成すると、V_H-V_L ドメインの変性剤に対するコンホメーション安定性が向上することが報告されている(57)。マルチドメイン構造の形成は、抗体全体のコンホメーション安定性に影響を与えることから、ドメインの変性反応に依存した凝集反応を抑制するものと予測される。また異なるコロイド安定性をもつドメインが連結した場合に、マルチドメイン全体のコロイド安定性および凝集反応にどのような影響を与えるかについての知見は少ない。抗体の凝集機構を解明するためには、マルチドメイン構造形成が各ドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性に与える影響と、

マルチドメイン構造を介した凝集プロセスを理解する必要があると考えられる。

1.9. 研究目的と研究内容

本論文では、抗体全体の凝集機構をドメインレベルの物性変化と凝集反応から理解し、また抗体がもつマルチドメイン構造の形成がドメインの物性や抗体全体の凝集反応に与える影響を明らかにすることを研究目的とした。

上記の研究目的を達成するため、以下の研究内容を実施した。

- (a) マルチドメイン構造形成に由来するドメイン間相互作用が排除された状態における各ドメイン固有の安定性を評価するために、各ドメインを単独の組換え蛋白質として合成し、広範な溶液条件下におけるコンホメーション状態と分散状態を解析することにより、抗体全体の凝集反応に寄与するドメインと凝集溶液条件の特定を行った。
- (b) マルチドメイン構造をもつ Fc のコンホメーション変化と凝集反応を解析し、その解析結果と単独ドメインの解析結果との比較を行うことで、Fc 中のドメインのコンホメーション変化に伴う凝集反応経路、およびドメイン間相互作用がコンホメーション安定性とコロイド安定性に与える影響を特定した。
- (c) Fc の C 末端に人為的なドメイン間相互作用を導入し、その効果が Fc の各ドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性、および Fc の凝集反応に与える影響を特定した。

第二章

ドメイン蛋白質の解析

2.1. 序論

本章では、抗体の定常領域を構成するドメインを独立した蛋白質(C_H2 モノマー、 C_H3 ホモダイマー、 C_L モノマー、 C_H1 - C_L ヘテロダイマー)として合成し、異種ドメイン間の相互作用が排除された単独ドメインとしての物性を解析した。各ドメインの広範な溶液条件(pH 2–8 および 0–300 mM NaCl)におけるコンホメーション状態と分散状態を分析し、酸および塩ストレスにより惹き起こされるコンホメーション変化および凝集反応を解析した。各ドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性の違いから、各溶液条件で抗体全体の凝集反応に大きく関与するドメインを特定した。また各ドメインのアミノ酸配列や構造表面の特性を解析し、各ドメインが異なる物性を示す要因について考察を行った。

2.2. 実験手法

2.2.1. ドメイン蛋白質の遺伝子配列を含むベクターの構築

Kappa 軽鎖を含むヒト由来イムノグロブリン G1 (IgG1)の定常領域ドメイン蛋白質(C_H2 モノマー、 C_H3 ホモダイマーおよび C_L モノマー)の遺伝子配列を設計した。可変領域のドメイン(V_H と V_L ドメイン)は CDR 配列が異なる場合に物性が変化することから、また C_H1 モノマーは実験遂行に十分な量の試料の合成が困難であったことから、本研究では解析を行わなかった。各ドメインの N 末端および C 末端アミノ酸残基は、IgG1 の結晶構造(PDBID: 1N8Z (58)および 3D6G (59))を参考に決定した。 C_L モノマーの C 末端システイン残基は、分子間ジスルフィド結合による多量体形成を防止するために削除した。各遺伝子配列には、N 末端のヒスチジンタグ配列および制限酵素切断部位が含まれている。 C_L モノマーの遺伝子配列は、オーバーラップ PCR 法により増幅した。コドンは大腸菌組換え蛋白質発現系に合わせ最適化を行った。 C_H2 モノマーと C_H3 ホモダイマーの遺伝子配列は、pFUSE-hIgG1-Fc1 プラスミド(InvivoGen)をテンプレートとして PCR 法により増幅した。PCR 法には、KOD-Plus-polymerase (TOYOBO)を使用した。 C_H2 モノマーと C_L モノマーに対して、NdeI と EcoRI を用いて制限酵素切断処理を行い、 C_H3 ホモダイマーに対しては NcoI と BamHI を用いた。作製した C_H2 モノマーと C_L モノマーの遺伝子配列を pET22b(+) (Novagen)に、 C_H3 ホモダイマーでは pET16b (Novagen)にライゲーションした。

2.2.2. C_H1 - C_L ヘテロダイマーの遺伝子配列を含むベクターの構築

C_H1 - C_L ヘテロダイマーは、大腸菌内で C_H1 モノマーと C_L モノマーを共発現させることによって合成した。共発現ベクターの設計には、Colisdeo と Wang の研究を参考にした(60)。遺伝子配列上に、 C_L モノマー、 C_H1 モノマーの順番でそれぞれの遺伝子配列を並べ、その二つの遺伝子配列間にリボソーム結合配列を含むスペーサー配列を挿入した。 C_H1 モノマーの遺伝子配列は、オーバーラップ PCR 法により増幅した。 C_H1 モノマーの

遺伝子配列には、N 末端のヒスチジンタグ配列および制限酵素切断部位が含まれている。ドメイン間ジスルフィド結合を形成させるために、C_{H1}-C_L ヘテロダイマーの 2 つのドメインのアミノ酸配列の C 末端にはシステイン残基を含んでいる。設計した遺伝子配列は PCR 法により増幅した。C_{H1}-C_L ヘテロダイマーの遺伝子配列設計の概要を図 2-1 に示す。

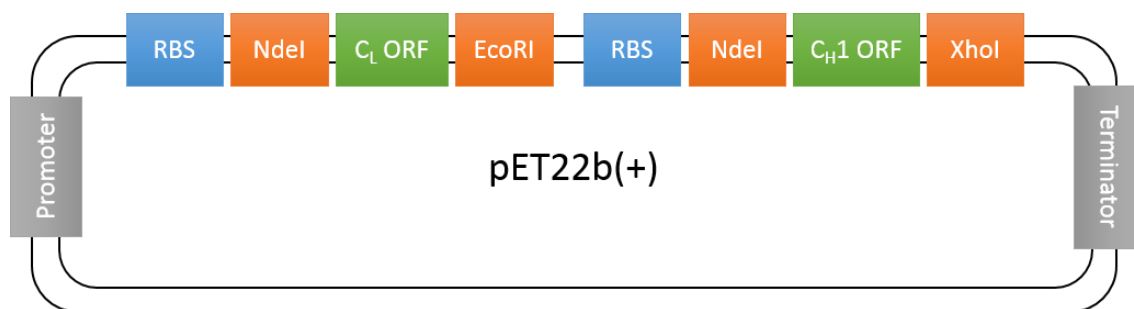


図 2-1 : C_{H1}-C_L ヘテロダイマーの遺伝子配列設計の概要を示す。RBS はリボソーム結合サイトを示す。

以下に、各ドメイン蛋白質の分子量およびモル吸光係数、遺伝子配列、アミノ酸配列を示す。

C_{H2} モノマー

分子量

12,839

モル吸光係数

16,620 dm³mol⁻¹cm⁻¹

遺伝子配列

ATGCATCACCACCACCATCACGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCC
AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT
GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGC
ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC
AGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAT
AA

アミノ酸配列

MHHHHHHGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

C_{H3} ホモダイマー

分子量

13,249 (単量体)

モル吸光係数

17,900 dm³mol⁻¹cm⁻¹ (単量体)

遺伝子配列

ATGGGCCATCATCATCATCATATAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT
ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCGGGTAA

アミノ酸配列

MGHHHHHHKGPQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

C_L モノマー

分子量

12,744

モル吸光係数

10,930 dm³mol⁻¹cm⁻¹

遺伝子配列

ATGCATCACCACCACCATCACAAACGTACTGTTGCGGCGCCAAGCGTCTTTATTTTCC
CGCCAAGTGATGAACAGCTGAAATCCGGCACCGCCAGTGTTGTTTGTGTTAAATA
ATTTTTATCCGCGGGAAGCTAAAGTCCAATGGAAAGTCGATAATGCCCTGCAGTCTG
GAAACTCCCAAGAAAGCGTCACGGAACAGGATAGCAAGGATAGCACTTACAGCCTG
AGTTCAACTCTGACTCTGTCAAAAGCGGATTATGAGAAACATAAAGTGTATGCATGC
GAAGTAACCCATCAAGGTCTGAGCAGCCCAGTTACAAAAAGCTTTAACCAGGGGCGA
ATAA

アミノ酸配列

MHHHHHHHKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE

C_{H1}-C_L ヘテロダイマー

分子量

24,288 (ヘテロ二量体)

12,144 (単量体換算)

モル吸光係数

20,700 dm³mol⁻¹cm⁻¹ (ヘテロ二量体)

10,350 dm³mol⁻¹cm⁻¹ (単量体換算)

遺伝子配列 (下線部はスぺーサー配列を示す。)

ATGCATCACCACCACCATCACAAACGTACTGTTGCGGCGCCAAGCGTCTTTATTTTCC
CGCCAAGTGATGAACAGCTGAAATCCGGCACCGCCAGTGTTGTTTGTGTTTAAATA
ATTTTTATCCGCGGGAAGCTAAAGTCCAATGGAAAGTCGATAATGCCCTGCAGTCTG
GAAACTCCCAAGAAAGCGTCACGGAACAGGATAGCAAGGATAGCACTTACAGCCTG
AGTTCAACTCTGACTCTGTCAAAAGCGGATTATGAGAAACATAAAGTGTATGCATGC
GAAGTAACCCATCAAGGTCTGAGCAGCCCAGTTACAAAAAGCTTTAACCAGGGGCGA
ATGTTAAGAATCTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCATCACCACCACCATC
ACTCTACTAAGGGCCCGTCAGTTTTTCCATTGGCTCCGAGTTCTAAGTCCACCTCTGG
CGGAACCGCGGCCCTGGGCTGTCTAGTGAAAGATTATTTTCCCGAACCCGTAACAGT
TTCTTGGAATAGCGGAGCTCTAACCTCAGGTGTCCATACCTTCCCAGCCGTCTTACAG
TCAAGTGGCCTATACAGTTTGTCAAGCGTTGTTACCGTACCAAGCTCCTCGTTGGGC
ACCCAGACCTATATTTGCAACGTGAATCACAAAGCCCTCAAATACCAAAGTAGATAAA
AAAGTGGAGCCAAAAAGCTGCTAA

アミノ酸配列

C_L ドメイン

MHHHHHHKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
NSQESVTEQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

C_{H1} ドメイン

MHHHHHHSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

2.2.3. ドメイン蛋白質の発現および精製

各ドメイン蛋白質の遺伝子配列を含むベクターを用いて、*Escherichia coli* OrigamiTMB (DE3) (Novagen)の形質転換を行った。100 µg/mL アンピシリン、20 µg/mL カナマイシン、20 µg/mL テトラサイクリンを含む Luria-Bertani 培地で大腸菌を培養した。組換え蛋白質の発現は、IPTG を終濃度が 1 mM となるように添加することにより誘導した。25℃で一晩培養後、菌体を遠心分離により回収し、超音波破碎を行った。遠心分離後の破碎液の上清に対して、His GraviTrapTM (GE Healthcare)を用いて、アフィニティークロマト

グラフィーを行った。精製蛋白質に対して、Resource S カラム(GE Healthcare)を用いて陽イオン交換クロマトグラフィーを行った。平衡化バッファーには 20 mM MES バッファー pH 6.0 を用い、溶出バッファーには 1 M NaCl を含む 20 mM MES バッファー pH 6.0 を用いた。次に精製蛋白質を限外濾過により濃縮した後、superdex75 (10 / 300)カラム(GE Healthcare)を用いて、サイズ排除クロマトグラフィーを行った。平衡化バッファーには、20 mM クエン酸リン酸バッファー pH 7.0 および 150 mM NaCl を用いた。精製した蛋白質の同定と純度は、トリシン SDS-PAGE と TOF-MS を用いて確認した。

本研究では、ドメイン蛋白質合成に大腸菌を用いているため、C_H2 モノマーには糖鎖は付加されない。抗体中における糖鎖は、抗体のコンホメーション安定性を増加させ、凝集反応の抑制に寄与することが報告されている。例えば、Zheng らは、ヒト IgG1 の糖鎖を PNGase の酵素反応処理により除去し、糖鎖が IgG1 の安定性と凝集反応に与える影響を解析した(56)。この場合、糖鎖の除去は、二次および三次構造に変化を及ぼさないが、DSC を用いた解析において糖鎖がない C_H2 ドメインの変性温度が 6–8℃低下し、また蛋白質変性剤であるグアニジン塩酸を用いた解析では、変性中点におけるグアニジン濃度が 0.6 M 減少することが示されている。さらに 40℃における加速試験では、糖鎖がない場合には、3 か月の反応時間後における凝集体の割合が数%以上増加することが示されている。また More らは、糖鎖がない Fc では C_H3 ドメインが熱変性する 80℃以上の温度において 350 nm の吸光度測定による濁度が上昇し凝集体が形成されるが、糖鎖が付加された Fc では凝集体の形成が確認されないことを報告しており(61)、糖鎖付加が変性状態におけるコロイド安定性の向上に寄与していることが示唆されている。一般的に CHO 細胞で合成された抗体に付加される糖鎖には多様性があり(62)、糖鎖が Fc の物性に与える影響が糖鎖構造により異なることが報告されている(61)。本研究では、ドメイン蛋白質のコンホメーション変化とそれに伴う凝集反応機構を解析することを主眼としているため、多様性をもつ糖鎖の付加によりもたらされる物性の変動を排除するために、糖鎖を含まない C_H2 モノマーおよび Fc 蛋白質(第三章)を解析することとした。

2.2.4. 溶液調整

緩衝液は、20 mM クエン酸リン酸バッファーもしくは 20 mM グリシンバッファーを用いた。pH 条件(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8)および NaCl 濃度条件(0, 50, 100, 150, 200, 250, 300)を組み合わせた計 49 種類の溶液条件のバッファーを作製した。蛋白質濃度は 50 μM とした。透くん(日本ジェネティクス)を用いて、4℃で 18-20 時間透析することにより、試料の溶液条件を調整した。

2.2.5. 円偏光二色性スペクトル

分析機器は、J-805 Spectropolarimeter (Jasco)を用いた。蛋白質濃度は 50 μM、測定温度は 20℃、バンド幅は 1 nm、レスポンスは 8 sec、測定範囲は 260-195 nm、データ取込

間隔は 0.1 nm、走査速度は 10 nm / min とした。セル長 0.02 cm の円筒型石英セルを使用した。測定した CD スペクトルからバッファの CD スペクトルを差し引くことでベースライン補正を行った。pH 2 – 3 の蛋白質試料に対しては独立した 2 回の測定を行い、その他の pH 条件に対しては 1 回ずつ測定を行った。

2.2.6. 蛍光スペクトル

分析機器は FP-6500 Spectrofluorometer (Jasco)を用いた。蛍光プローブであるトリプトファン残基は、C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモダイマーのアミノ酸配列では 2 個ずつ、C_{H1} モノマーと C_L モノマーでは 1 個ずつ含まれている。蛋白質濃度は 10 μM、励起側バンド幅は 3 nm、蛍光側バンド幅は 5 nm、レスポンスは 1 sec、測定範囲は 300 – 450 nm、データ取込間隔は 1 nm、励起波長は 295 nm、操作速度は 50 nm/min、セル長は 1 cm、測定温度は 20 °C とした。pH 2 – 3 の蛋白質試料に対しては独立した 2 回の測定を行い、その他の pH 条件に対しては 1 回ずつ測定を行った。

2.2.7. 動的光散乱

分析機器は、Zetasizer Nano S (Malvern)を用いた。蛋白質濃度は 50 μM、測定温度は 20°C、散乱角度は 173° とした。サンプル量 12 μl の石英セルを使用した。Zetasizer Software を用いて自己相関関数から拡散係数とキュムラント平均粒子径を算出した。pH 2 – 4 の蛋白質試料に対しては独立した 2 回の測定を行い、その他の pH 条件に対しては 1 回ずつ測定を行った。測定した計 49 条件の平均粒子径を用いて particle size diagram (PSD)を作成した。以下の式に従い平均粒子径の標準化を行った。

$$\tilde{d}_{\text{pH,NaCl}} = \frac{d_{\text{pH,NaCl}} - d_{\text{min}}}{d_{\text{max}} - d_{\text{min}}} \times 256$$

$\tilde{d}_{\text{pH,NaCl}}$ と $d_{\text{pH,NaCl}}$ はそれぞれ各 pH および NaCl 濃度条件における標準化および測定平均粒子径である。 d_{max} および d_{min} はそれぞれ全ドメインの全溶液条件における粒子サイズの最大粒子径と最小粒子径である。各溶液条件の標準化粒子サイズが大きいほど濃い赤色を示す様に Excel VBA (Microsoft)を用いて配色を行った。また各ドメインの 49 条件の標準化粒子サイズに対し階層的クラスター解析を行い、凝集溶液条件の分類を行った。クラスター間の距離の測定方法はウォード法で行い、距離の測度はユークリッド距離を用いた。計算には R を用いた。

2.2.8. サイズ排除クロマトグラフィー

分析装置は、AKTA purifier (GE Healthcare)を用いた。カラムは Superdex75 (10 / 300) (GE Healthcare)を用いた。平衡化バッファーには 150 mM NaCl を含む 20 mM クエン酸

リン酸バッファーpH 7 および 300 mM NaCl を含む 20 mM クエン酸リン酸バッファー pH 3、20 mM グリシンバッファーpH 2.0 を用いた。

2.2.9. ブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動

サンプルバッファーの組成は 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8、40%グリセロール、1%クマシーブリーリアントブルーG-250 とし、サンプルバッファーと蛋白質溶液を 1:1 で混合した。ポリアクリルアミドゲルは、4 – 20%のグラジエントゲル(Bio-Rad)を用いた。陽極バッファーの組成は、25 mM Tris-HCl pH 8.3、192 mM グリシン、0.02%クマシーブリーリアントブルーG-250 とし、陰極バッファーの組成は 25 mM Tris-HCl pH 8.3、192 mM グリシンとした。

2.2.10 コンホメーションと粒子径の経時変化の測定

蛋白質試料を 20 mM クエン酸リン酸バッファーpH 3 に 4℃で 18 – 20 時間透析した。透析後、透析に使用したバッファーを用いて、蛋白質濃度を 54 μ M に調製した。4 M NaCl 溶液を、蛋白質濃度および NaCl 濃度をそれぞれ終濃度 50 μ M および 300 mM NaCl となるように添加した。NaCl 溶液添加後は、CD スペクトルと動的光散乱の測定を開始し(ラグタイム約 2 分)、コンホメーションと粒子サイズの経時変化を測定した。各測定機器の測定条件は上記と同様の条件で行った。独立した測定を 2 回ずつ実施した。

2.3. 解析手法

2.3.1. 特異値分解

測定した円偏光二色性スペクトルおよび内部トリプトファン蛍光スペクトルの波長 i のシグナル強度(x_i)の標準化を以下の式に従い行った。

$$\tilde{x}_i = \frac{x_i - \bar{x}_i}{s}$$

\tilde{x}_i 、 \bar{x}_i はそれぞれ波長 i の標準化およびデータセットにおける平均シグナル強度、 s はデータセット全体の標準偏差である。特異値分解(SVD)は、以下の式に従う (63)。

$$\mathbf{A} = \mathbf{U}\mathbf{S}\mathbf{V}^T$$

\mathbf{A} は標準化したスペクトルデータを含む行列である。各列は、測定した各溶液条件に対応し、各行は波長 i のシグナル強度に対応する。本章では、1 つのドメイン蛋白質について pH と NaCl 濃度の異なる計 49 条件のスペクトルデータを解析に使用した。CD スペクトルデータを用いた解析では \mathbf{A} は 66 行、49 列からなる行列、蛍光スペクトルデー

タを用いた解析では **A** は 151 行、49 列からなる行列となる。**S** は特異値を含む行列、**U** は左特異ベクトルを含む行列、**V** は右特異ベクトルを含む行列である。**T** は転置行列を示す。**S** に含まれる特異値は、**U** および **V** に含まれるの特異ベクトルの相対的な寄与の大きさを示す。**U** の各列には、測定スペクトルデータの構成に寄与しているスペクトル成分が含まれ、寄与の高い順に並んでいる。**V** の各列は、**U** 中の各スペクトル成分の各溶液条件における存在比を含む。**A** は、**U** 中の寄与の高いスペクトル成分と **V** 中のそれら寄与の高いスペクトル成分の存在比をかけ合わせることで再構成することができる。SVD の計算には、Igor (Wavemetrics)を用いた。特異値分解より得られた各主成分の寄与を考察するため、得られた特異値より寄与率を、右特異ベクトルから自己相関係数を算出し、また特異値および特異ベクトルを用いてスペクトルの再構成を行い測定スペクトルと間の RMSD を算出した(64, 65)。第 j 主成分の寄与率(C_j)の算出は、以下の式に従う。

$$C_j = \frac{\sigma_j^2}{\sum_{k=1}^l \sigma_k^2}$$

σ_j^2 は、第 j 主成分の特異値の二乗値を示す。右特異ベクトルにおける自己相関係数(C_V)の算出は、以下の式に従う。

$$C_V = \sum_{p=1}^{n-1} v_{p,q} v_{p,q+1}$$

$v_{p,q}$ は p 行 q 列における右特異ベクトルの値を示す。 m と n はそれぞれ CD スペクトルの測定波長数と測定した溶液条件数を示す。各 pH において 0 – 300 mM NaCl の条件変化における自己相関係数を算出した。

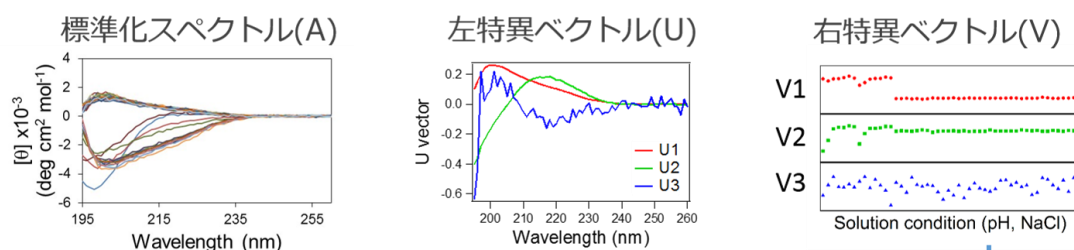
2.3.2. Empirical Phase Diagram の作成

計算から得られた上位 3 つの右特異ベクトルを用いて EPD を作成した。ただし、下位のベクトルが、ノイズと判定された場合は、有意な上位のベクトルのみを用いて EPD を作成した。ノイズ判定には、特異値から算出した寄与率と、特異ベクトルから算出した自己相関係数、および RMSD を用いた。EPD ではベクトルの値に応じて RGB カラーモードの輝度を割り当てるが、前処理として、まず以下の式に従い、各右特異ベクトルの値の標準化を行った。

$$\tilde{v}_{p,q} = \frac{(v_{p,q} - v_{p,\min})}{(v_{p,\max} - v_{p,\min})} \times 256$$

$\tilde{v}_{p,q}$ と $v_{p,q}$ は、各 pH および NaCl 濃度条件 q における第 p 右特異ベクトルの標準化した値と計算値である。 $v_{p,\min}$ および $v_{p,\max}$ は、それぞれ解析したデータセットの全溶液条件における第 p 右特異ベクトル中の最小値および最大値である。上式により算出した各右特異ベクトルの標準値の大きさに応じて RGB の輝度を決定した。第一右特異ベクトルは赤色、第二右特異ベクトルは緑色、第三右特異ベクトルは青色に対応する。ベクトルがノイズデータの場合は、色の割り当てを行わない。3つの右特異ベクトルの標準値が全て0の場合は黒色に、256の場合は白色となる。異なる溶液条件間で類似した色が観測される場合、類似したコンホメーション状態を有していることを示している。RGBによる配色は Excel VBA (Microsoft) を用いて行った。最後に EPD 上に存在する主要コンホメーション状態を分類するため、EPD 作成に使用した右特異ベクトルの標準値に対して階層的クラスタ分析を行い、測定した溶液条件内に存在する主要コンホメーション状態を分類し、その境界線を EPD 上に黒または白の太線を引くことにより表現した。クラスタ間の距離の測定方法はウォード法で行い、距離の測度はユークリッド距離を用いた。計算には R を用いた。EPD の作成に関する概要を図 2-2 に示す。

特異値分解 $A = USV^T$



Empirical phase diagram (EPD)

複数のコンホメーション状態を色の違いとして表現する手法

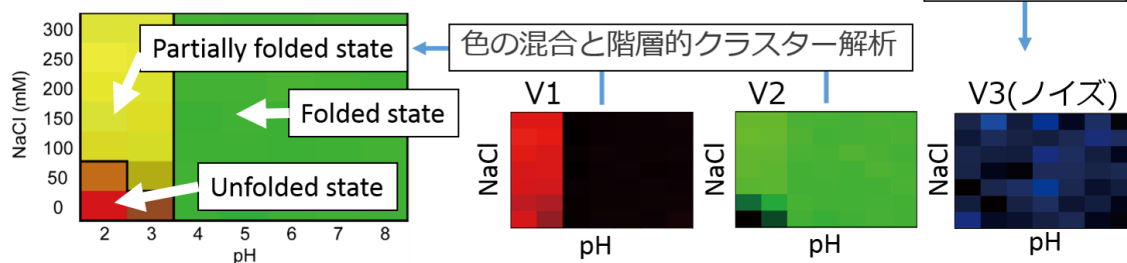


図 2-2 : Empirical phase diagram の作成方法

2.3.3. コンホメーション状態の存在比の算出

測定した溶液条件のうち、pH 7、150 mM NaCl 条件、および pH 2、0 mM NaCl 条件、pH 3、300 mM NaCl 条件の CD スペクトルを、それぞれ天然状態(N 状態)および単量体単分散非天然状態(MMNN 状態)、多量体多分散非天然状態(PPNN 状態)におけるピュアスペクトルであると仮定し、測定した各溶液条件における、各状態の存在比を算出した。それぞれの状態の存在比は、以下のフィッティング式を測定 CD スペクトルに対し最小二乗法によりフィットすることにより算出した。

$$CD_{pH,NaCl} = f_N CD_N + f_{MMNN} CD_{MMNN}$$

および、 $f_N + f_{MMNN} = 1$

$$CD_{pH,NaCl} = f_N CD_N + f_{MMNN} CD_{MMNN} + f_{PPNN} CD_{PPNN}$$

および、 $f_N + f_{MMNN} + f_{PPNN} = 1$

$CD_{pH,NaCl}$ は各 pH および NaCl 条件において測定した CD スペクトルを示す。 CD_N および CD_{MMNN} 、 CD_{PPNN} はそれぞれ N 状態および MMNN 状態、PPNN 状態のピュアスペクトルを示す。 f_N および f_{MMNN} 、 f_{PPNN} はそれぞれ N 状態および MMNN 状態、PPNN 状態の存在比を示す。上式は、測定した溶液条件中に 2 つの状態のみ観測された場合に、下式は 3 つの状態が観測された場合にフィッティングに使用した。計算には Igor (Wavemetrics)を用いた。

2.3.4 アミノ酸組成および配列、構造表面特性に基づく凝集性の解析

アミノ酸組成に基づいた各ドメインの凝集性の評価は、Goh らおよび Thomas らが報告した特定のアミノ酸組成に基づいて実施した(66, 67)。アミノ酸配列特性に基づいた凝集性の解析には、既報のアルゴリズムを用い、Aggrescan および PASTA、Zygggregator、Tango を用いた(68-74)。解析条件は、各解析プログラムのデフォルト値を使用した。ただし、Zygggregator の解析プログラムでは pH 条件を 3.0 にセットし、Tango での解析では pH を 3.0 および温度を 293.15K にセットした。各アルゴリズムの出力値である Na4 vSS (Aggrescan)および best energy (PASTA)、Zagg (Zygggregator)、the Agg parameter (Tango) を各ドメインの凝集性を評価するパラメーターとして使用した。結晶構造データよりアミノ酸配列における二次構造情報を抽出し、計算結果と比較した。構造表面特性に基づいた凝集性の解析には、Spatial aggregation propensity (SAP)と Developability index (DI)の二つのアルゴリズムを用いた(75-77)。SAP および DI による解析は、マサチューセッツ工科大学 molecular engineering laboratory の Trout 教授と Lauer 氏にご協力いただき、計算を実施していただいた。SAP による解析には、Fab と Fc の結晶構造 (PDBID: 1N8Z (58) および 3D6G (59))を基に作成した各ドメインの立体構造を用いた。SAP の解析には、各

ドメインの N 末端のメチオニンおよびヒスチジンタグの寄与は含まれていない。各アルゴリズムの SAP 半径は 10\AA とした。DI の解析では、PROPKA 3.3.を用いて各ドメインの pH 3 における pK_a を算出した(78)。 β 値は 25°C における 20 mM ヒスチジン溶液での値を使用した。

2.4. 実験結果

2.4.1. 円偏光二色性スペクトル測定によるドメイン蛋白質の二次構造解析

紫外域波長の円偏光二色性スペクトル(CD スペクトル)を測定し、pH 2 – 8 および 0 – 300 mM NaCl の溶液条件範囲における各ドメインの二次構造特性を解析した。

各ドメインの測定 CD スペクトルでは、pH 4 – 8 および 0 – 300 mM NaCl の溶液条件範囲において、 β シート型の CD スペクトルが観測された(図 2-3 および図 2-4)。CD スペクトルの大きな変化が観測されないことから、この溶液条件範囲において天然型二次構造が維持されていると考えられる。pH 2 または pH 3 では、全てのドメインでランダムコイル型の CD スペクトルが観測され、酸変性を生じた(図 2-4)。酸変性状態では、NaCl 濃度の違いに応じた CD スペクトルの変化が観測された(図 2-5 および図 2-6)。各ドメインの各溶液条件における CD スペクトルの吸収極大および極小波長を表 2-1 にまとめた。 C_{H3} ホモダイマーでは、pH 2 – 3 において NaCl 濃度上昇に伴い、吸収極小波長が 205 nm 周辺にシフトした(図 2-5a と e および図 2-6a と e)。 C_{H2} モノマーでは、pH 2 – 3 において NaCl 濃度の上昇に伴い、200 nm 周辺における吸収極小波長の強度が増加した(図 2-5b と f および図 2-6b と f)。 C_L モノマーでは、pH 3 および 50 mM NaCl 条件で 202 nm 周辺における吸収極大波長の強度が減少した(図 2-5c と g)、また pH 2 においては NaCl 濃度上昇に伴い、200 nm 周辺における吸収極小波長の強度が増加した(図 2-6c と g)。 C_{H1} - C_L ヘテロダイマーでは、pH 3 および 50 mM NaCl 条件下で 202 nm 周辺における吸収極大波長の強度が減少したが、100 mM 以上の NaCl 濃度条件下では、NaCl 濃度上昇に伴って強度が増加した(図 2-5d と h)。また pH 2 では、NaCl 濃度の上昇に伴い、200 nm 周辺における吸収極小波長の強度が増加した(図 2-6d と h)。各ドメインで観測された NaCl 濃度上昇に伴った CD スペクトルの変化は、荷電性アミノ酸残基側鎖とイオンとの相互作用により、蛋白質分子内の荷電側鎖間の斥力が弱まり、部分的な折りたたみ構造の形成が生じていることに由来すると考えられる(79)。

表 2-1 : CD スペクトルの吸収極大波長および吸収極小波長

domain	pH	NaCl (mM)	maximum (nm)	minimum (nm)
C _H 3 homo-dimer	7	150	198	218, 229
	3	0	-	200
	3	300	-	205
	2	0	-	200
	2	300	-	204
C _H 2 monomer	7	150	203	214
	3	0	-	199
	3	300	-	210
	2	0	-	200
	2	300	-	200
C _L monomer	7	150	202	217
	3	0	202	217
	3	300	202	215
	2	0	-	199
	2	300	-	200
C _H 1-C _L hetero-dimer	7	150	202	217
	3	0	202	215
	3	300	203	215
	2	0	-	199
	2	300	-	200

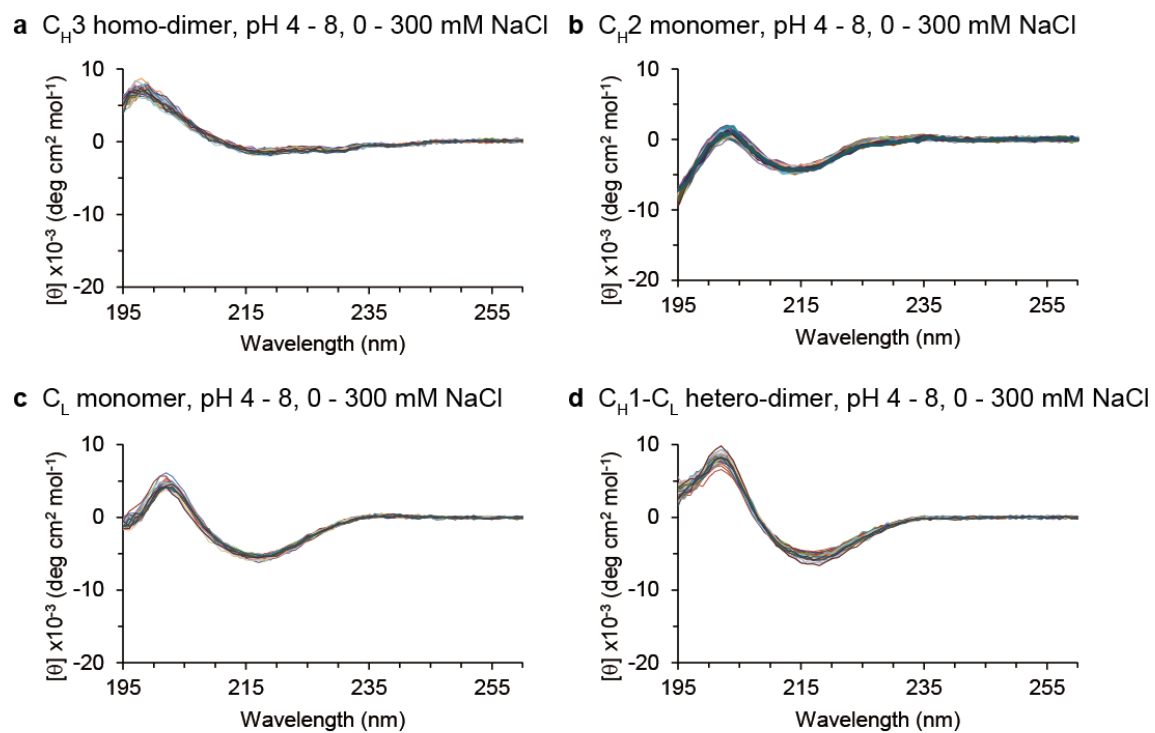
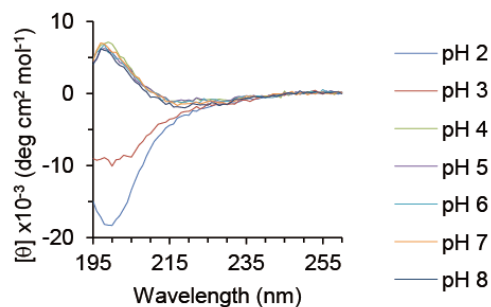
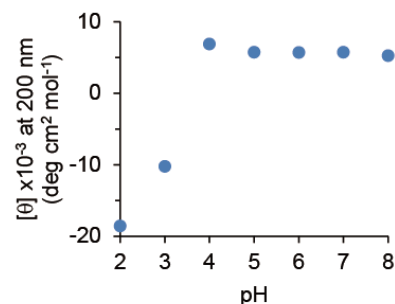


図 2-3 : pH 4 - 8 および 0 - 300 mM NaCl の計 35 条件において測定した C_H3 ホモダイマー(a)および C_H2 モノマー(b)、 C_L モノマー(c)、 C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の CD スペクトルを示した。

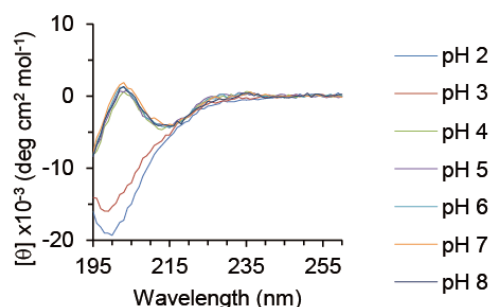
a C_H3 homo-dimer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



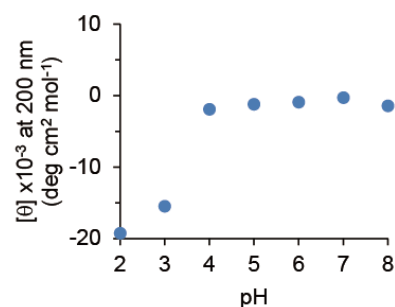
e C_H3 homo-dimer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



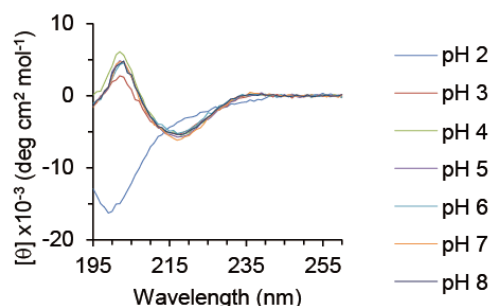
b C_H2 monomer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



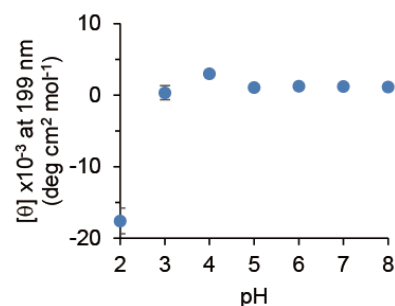
f C_H2 monomer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



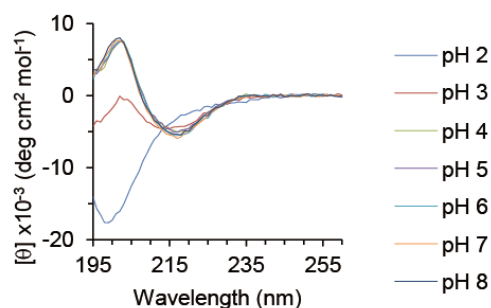
c C_L monomer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



g C_L monomer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



d C_H1-C_L hetero-dimer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



h C_H1-C_L hetero-dimer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl

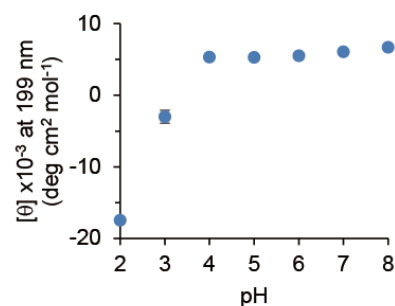


図 2-4 : pH 2-8 および 0 mM NaCl の計 7 条件において測定した C_H3 ホモダイマー(a) および C_H2 モノマー(b)、C_L モノマー(c)、C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の CD スペクトルを示した。(e)-(h)では各ドメインの CD スペクトルの吸収極小波長における CD 強度をプロットした。pH 2-3 の条件では独立した測定を二回を行い、その平均強度と誤差を示した。

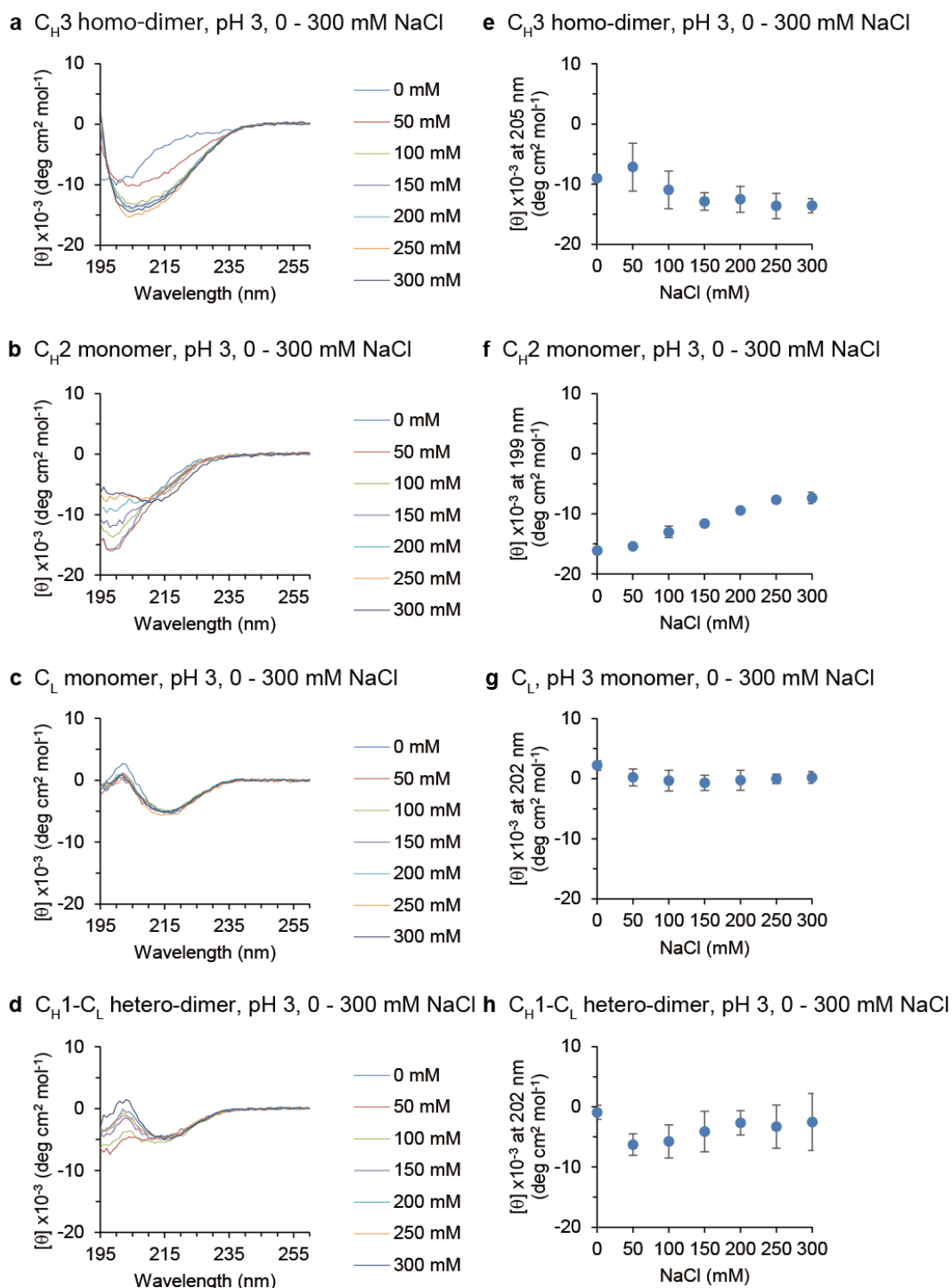


図 2-5 : pH 3 および 0 - 300 mM NaCl の計 7 条件において測定した C_H3 ホモダイマー(a) および C_H2 モノマー(b)、C_L モノマー(c)、C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の CD スペクトルを示した。(e) - (h)では各ドメインの CD スペクトルの変化を最も反映する波長の CD 強度をプロットした。独立した測定を二回を行い、その平均強度と誤差を示した。

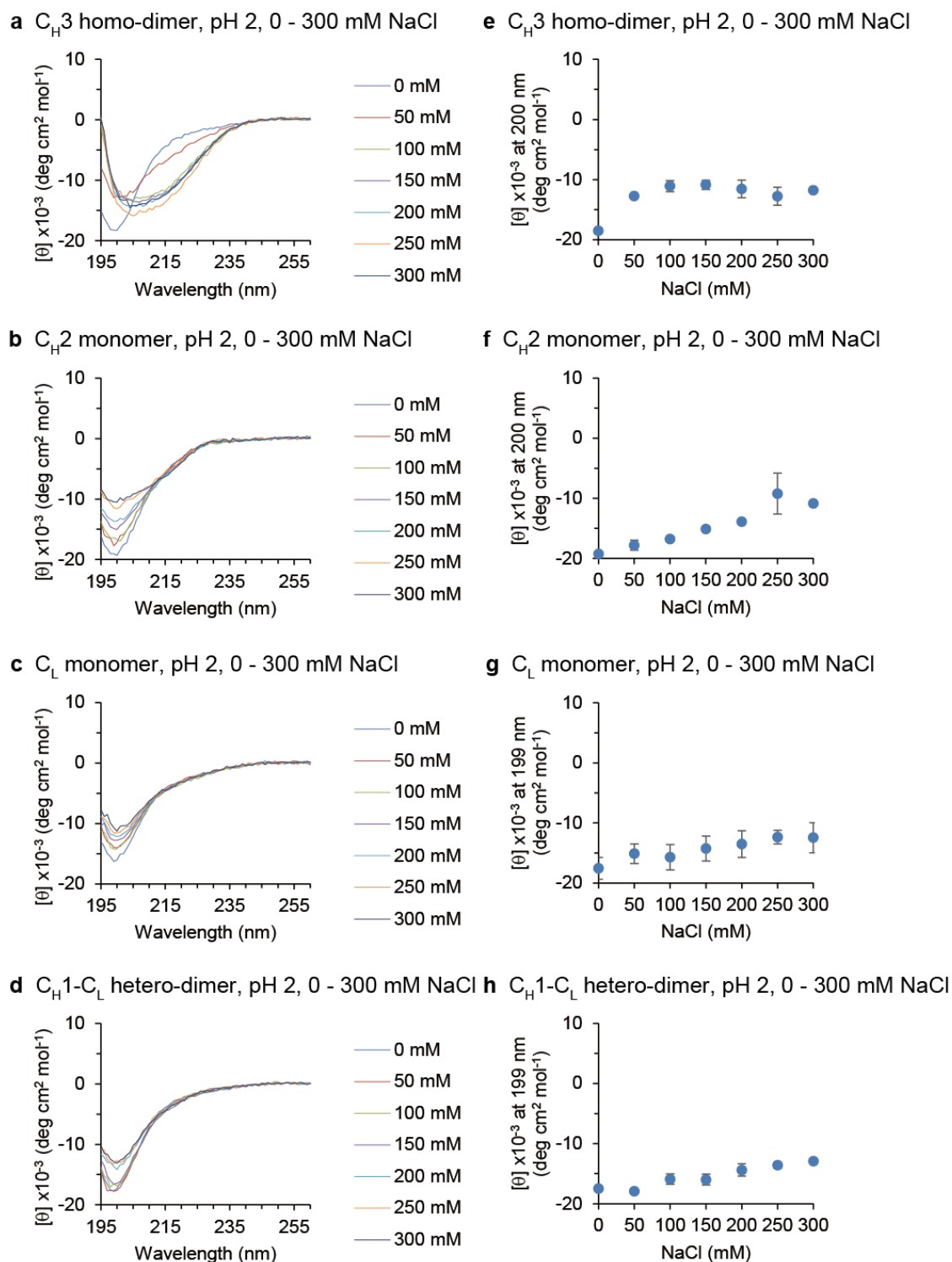


図 2-6 : pH 2 および 0 - 300 mM NaCl の計 7 条件において測定した C_H3 ホモダイマー(a) および C_H2 モノマー(b)、C_L モノマー(c)、C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の CD スペクトルを示した。(e) - (h)では各ドメインの CD スペクトルの吸収極小波長における CD 強度をプロットした。独立した測定を二回行い、その平均強度と誤差を示した。

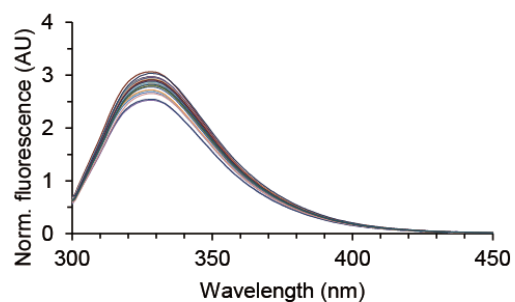
2.4.2. 内部トリプトファン蛍光スペクトル測定によるドメイン蛋白質の三次構造解析

内部トリプトファン蛍光スペクトルを測定し、pH 2–8 および 0–300 mM NaCl の溶液条件範囲における各ドメインの三次構造特性を解析した。C_{H3} ホモダイマーおよび C_{H2} モノマーのアミノ酸配列には 2 つのトリプトファン残基が、C_L モノマーおよび C_{H1}-C_L ヘテロダイマーには 1 つのトリプトファン残基が含まれている。pH 4–8 および 0–300 mM NaCl の溶液条件範囲では、全てのドメインにおいて蛍光スペクトルの変化が小さいことから、天然型三次構造が維持されていると考えられる(図 2-7 および図 2-8)。ただし、C_{H2} モノマーでは、pH 8 から pH 4 にかけて蛍光極大波長が 333 nm から 335 nm へわずかにシフトした(図 2-8b と f)。また C_L モノマーおよび C_{H1}-C_L ヘテロダイマーでは、蛍光強度が低い値を示した(図 2-7c と d および図 2-8c,d,g,h)。これは、これらのドメインの構造内部に存在するトリプトファン残基側鎖の蛍光が、隣接するジスルフィド結合によってクエンチされているためである(80, 81)。前述の二次構造の酸変性と同様に、pH 2 または pH 3 の範囲で、各ドメインの蛍光極大波長が長波長側にシフトし、酸変性を生じた(図 2-8)。C_L モノマーおよび C_{H1}-C_L ヘテロダイマーでは、蛍光強度の増加が観測された(図 2-8c と d)。これは三次構造の変化により、隣接するジスルフィド結合によるクエンチ効果が弱められたためだと考えられる。また酸変性状態では、NaCl 濃度の違いに応じて蛍光スペクトルが変化した(図 2-9 および図 2-10)。各溶液条件での各ドメインにおける蛍光スペクトルの蛍光極大波長を表 2-2 にまとめた。C_{H3} ホモダイマーおよび C_{H2} モノマーでは、pH 2 および pH 3 において NaCl 濃度の増加に伴って蛍光極大波長が短波長側へシフトした(図 2-9a,b,e,f および図 2-10a,b,e,f)。C_L モノマーおよび C_{H1}-C_L ヘテロダイマーでは、pH 3 において NaCl 濃度が 0 mM から 50 mM への増加に伴って蛍光強度が増加した(図 2-9c,d,g,h)、また pH 2 では NaCl 濃度の増加に伴って、蛍光極大波長が短波長側へシフトした(図 2-10c,d,g,h)。

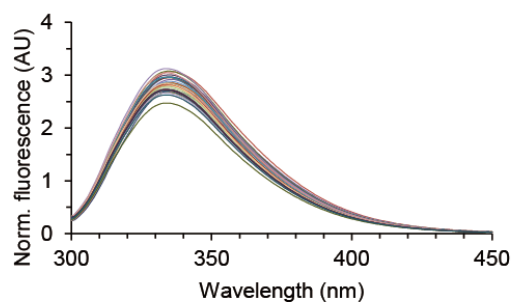
表 2-2：各ドメインの各溶液条件における蛍光スペクトルの蛍光極大波長

domain	pH	NaCl (mM)	maximum (nm)
C _H 3 homo-dimer	7	150	328
	3	0	343
	3	300	336
	2	0	348
	2	300	335
C _H 2 monomer	7	150	334
	3	0	345
	3	300	338
	2	0	347
	2	300	339
C _L monomer	7	150	311
	3	0	347
	3	300	347
	2	0	347
	2	300	347
C _H 1-C _L heter-dimer	7	150	320
	3	0	347
	3	300	343
	2	0	349
	2	300	344

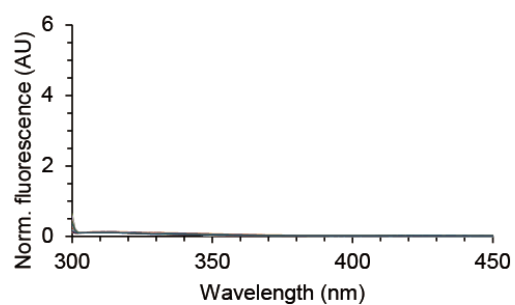
a C_H3 homo-dimer, pH 4 - 8, 0 - 300 mM NaCl



b C_H2 monomer, pH 4 - 8, 0 - 300 mM NaCl



c C_L monomer, pH 4 - 8, 0 - 300 mM NaCl



d C_H1-C_L hetero-dimer, pH 4 - 8, 0 - 300 mM NaCl

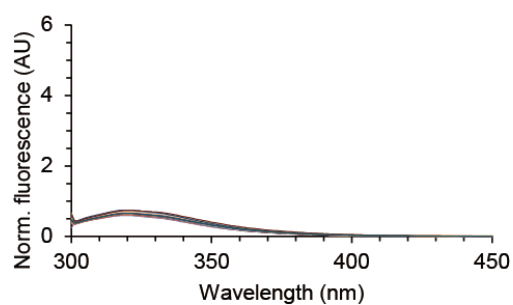
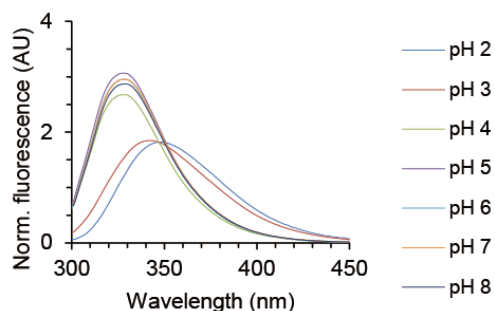
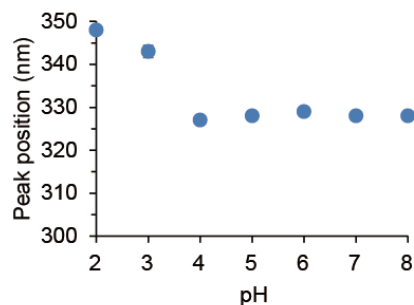


図 2-7 : pH 4 - 8 および 0 - 300 mM NaCl の計 35 条件において測定した C_H3 ホモダイマー(a)および C_H2 モノマー(b)、C_L モノマー(c)、C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の蛍光スペクトルを示した。

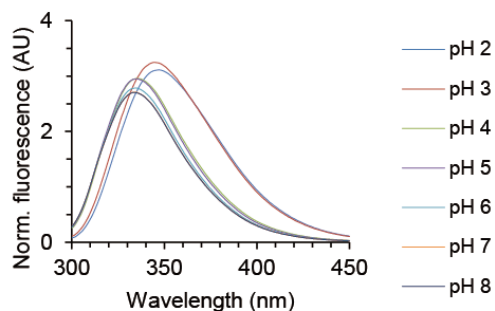
a C_H3 homo-dimer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



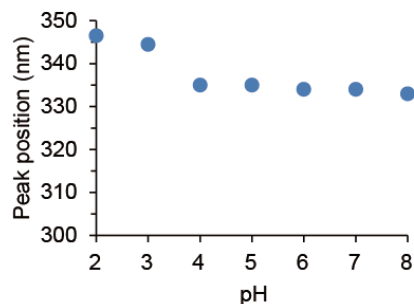
e C_H3 home-dimer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



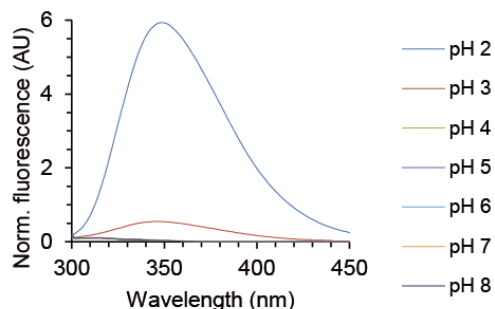
b C_H2 monomer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



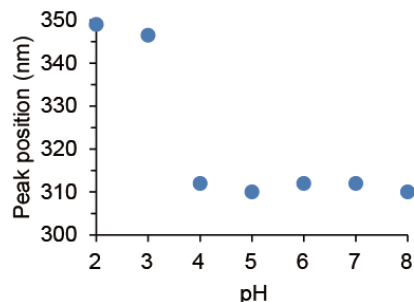
f C_H2 monomer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



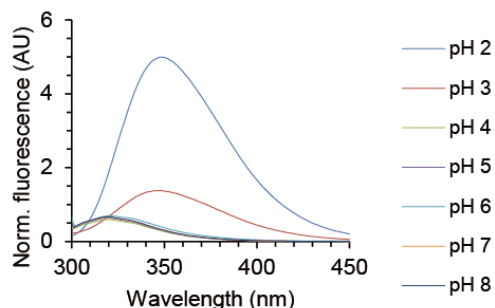
c C_L monomer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



g C_L monomer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



d C_H1-C_L hetero-dimer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl



h C_H1-C_L hetero-dimer, pH 2 - 8, 0 mM NaCl

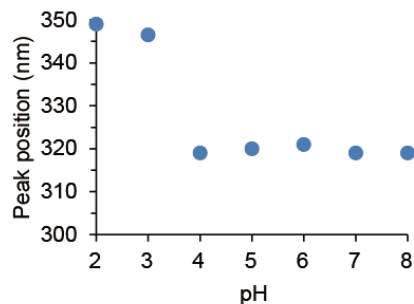
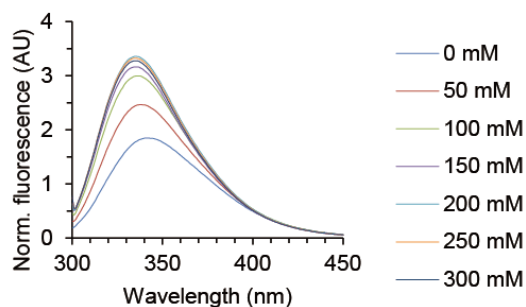
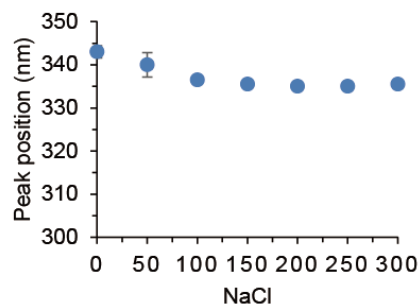


図 2-8 : pH 2 - 8 および 0 mM NaCl の計 7 条件において測定した C_H3 ホモダイマー(a)および C_H2 モノマー(b)、C_L モノマー(c)、C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の蛍光スペクトルを示した。(e) - (h)では各ドメインの蛍光スペクトルの極大波長をプロットした。pH 2 - 3 の条件では独立した測定を二回を行い、その平均強度と誤差を示した。

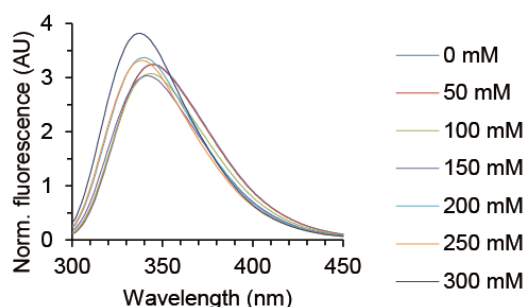
a C_H3 homo-dimer, pH 3, 0 - 300 mM NaCl



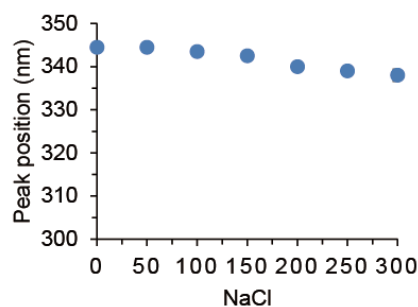
e C_H3 homo-dimer, pH 3, 0 - 300 mM NaCl



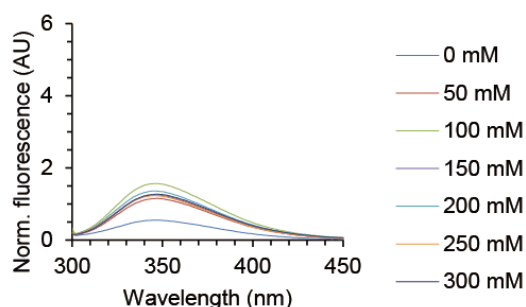
b C_H2 monomer, pH 3, 0 - 300 mM NaCl



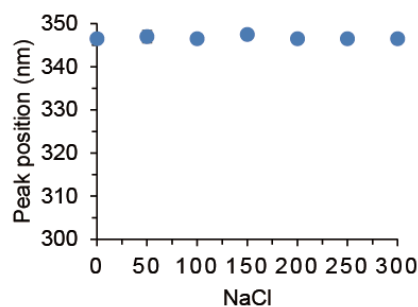
f C_H2 monomer, pH 3, 0 - 300 mM NaCl



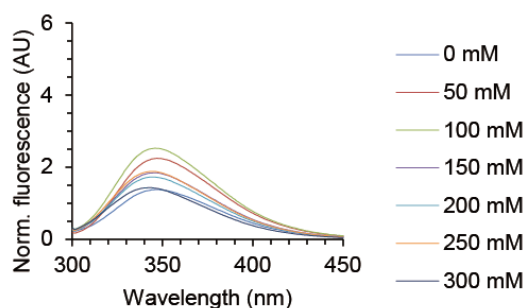
c C_L monomer, pH 3, 0 - 300 mM NaCl



g C_L monomer, pH 3, 0 - 300 mM NaCl



d C_H1-C_L hetero-dimer, pH 3, 0 - 300 mM NaCl



h C_H1-C_L hetero-dimer, pH 3, 0 - 300 mM NaCl

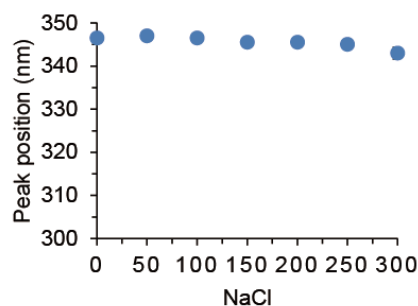
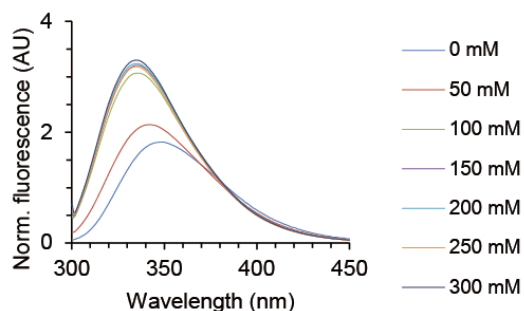
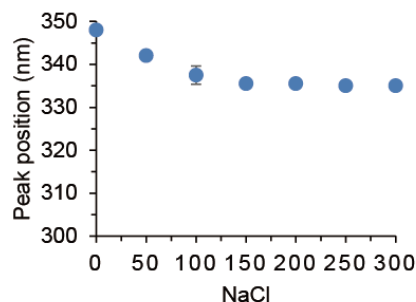


図 2-9 : pH 3 および 0 - 300 mM NaCl の計 7 条件において測定した C_H3 ホモダイマー(a) および C_H2 モノマー(b)、C_L モノマー(c)、C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の蛍光スペクトルを示した。(e) - (h)では各ドメインの蛍光スペクトルの極大波長をプロットした。独立した測定を二回行い、その平均強度と誤差を示した。

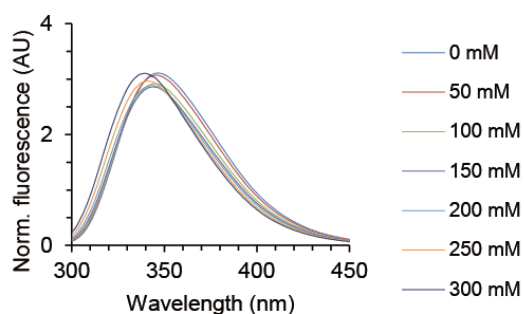
a C_H3 homo-dimer, pH 2, 0 - 300 mM NaCl



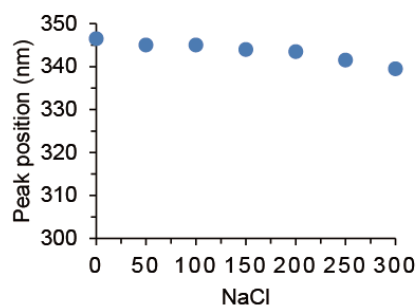
e C_H3 homo-dimer, pH 2, 0 - 300 mM NaCl



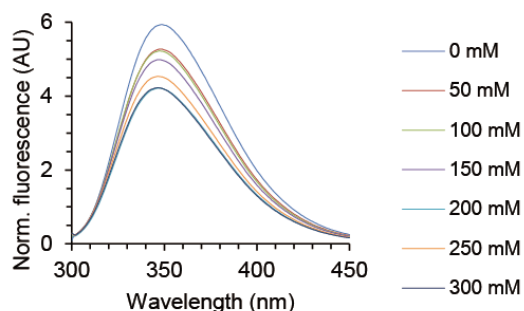
b C_H2 monomer, pH 2, 0 - 300 mM NaCl



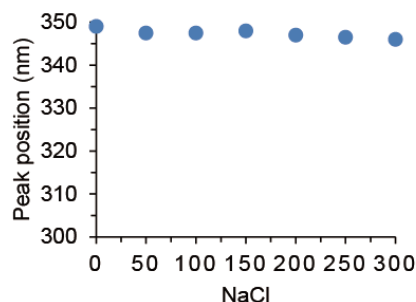
f C_H2 monomer, pH 2, 0 - 300 mM NaCl



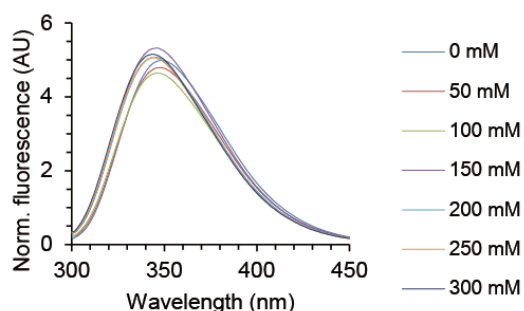
c C_L monomer, pH 2, 0 - 300 mM NaCl



g C_L monomer, pH 2, 0 - 300 mM NaCl



d C_H1-C_L hetero-dimer, pH 2, 0 - 300 mM NaCl



h C_H1-C_L hetero-dimer, pH 2, 0 - 300 mM NaCl

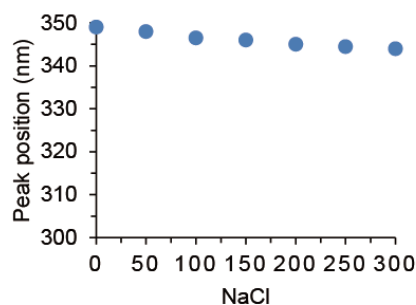


図 2-10: pH 2 および 0 - 300 mM NaCl の計 7 条件において測定した C_H3 ホモダイマー(a) および C_H2 モノマー(b)、C_L モノマー(c)、C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の蛍光スペクトルを示した。(e) - (h)では各ドメインの蛍光スペクトルの極大波長をプロットした。独立した測定を二回行い、その平均強度と誤差を示した。

2.4.3. 特異値分解によるコンホメーション状態の解析

蛋白質は、多くの場合、常温および中性 pH 付近の溶液条件下で一定のコンホメーション状態(天然状態)を有する。しかし、熱や変性剤、酸などにより、溶液条件が変化すると立体構造が変化し、変性状態へと移行する。この時、例えば 2 状態転移の場合、天然状態から変性状態の変化が協同的に生じることから、蛋白質のコンホメーション状態の変化は天然状態と変性状態の 2 状態間の転移反応として記述することができる(32)。CD などの半定量的な測定法により得られたデータに対して特異値分解(SVD)を行うことにより、測定した溶液条件範囲内に存在するコンホメーション状態の数と、それらの各溶液条件での存在比を推定できる(63)。

CD および蛍光スペクトルデータから算出した寄与率を表 2-3 に示した。 C_H3 ホモダイマーおよび C_H2 モノマーでは、 C_L モノマーおよび C_H1-C_L ヘテロダイマーと比較して、第二主成分までの寄与率が相対的に大きな値を示した。図 2-11 に CD および蛍光スペクトルデータの特異値分解により得られた各主成分の特異値、および特異値と特異ベクトルから再構成したスペクトルとデータスペクトルとの誤差の大きさを示す RMSD を示した。CD においては、 C_H3 ホモダイマーと C_H2 モノマーでは第二主成分までを用いた再構成スペクトルにおいて測定スペクトルとの RMSD が収束し、第二主成分までがデータ構成において有意であることを示した。 C_L モノマーおよび C_H1-C_L ヘテロダイマーでは第一主成分のみで RMSD が収束した。蛍光では、 C_H3 ホモダイマーでは第二主成分まで、 C_H2 モノマーでは第三主成分までの再構成により RMSD が収束した。 C_L モノマーおよび C_H1-C_L ヘテロダイマーでは、第一から第四主成分までに RMSD が大きく変動したが、第二主成分までに RMSD の値が 10^{-2} 程度に低下することから、上位 2 つの主成分がデータ再構成に有意であると判断した。これらの結果から、測定した溶液条件範囲には、CD の解析結果では C_H3 ホモダイマーおよび C_H2 モノマーでは 3 つのコンホメーション状態が、 C_L モノマーおよび C_H1-C_L ヘテロダイマーでは 2 つのコンホメーション状態に分類でき、蛍光の解析結果では C_H3 ホモダイマーでは 3 つ、 C_H2 モノマーでは 4 つ、 C_L および C_H1-C_L ヘテロダイマーでは 3 つのコンホメーション状態に分類できることがわかった。

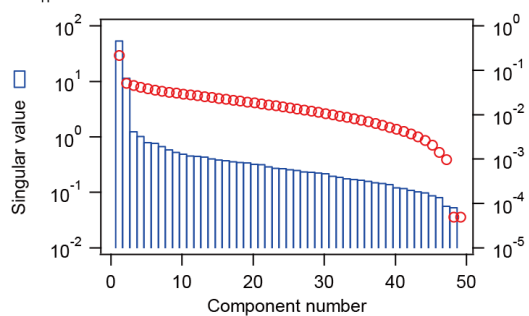
図 2-12 および図 2-14 に、それぞれ CD および蛍光スペクトルデータから抽出した第三主成分までの左特異ベクトルを示した。これら上位三つの左特異ベクトルは自己相関性の高いスペクトル成分を有していることから、それぞれ固有のコンホメーション状態に関する情報を反映しているものと考えられる。図 2-13 および図 2-15 に、それぞれ CD および蛍光スペクトルデータから抽出した第三主成分までの右特異ベクトルを示し、図 2-16 に各 pH の NaCl 濃度変化に応じた自己相関係数を示した。 C_H3 ホモダイマーでは、第一右特異ベクトルが pH 2-3 において NaCl 濃度変化に対応し大きな自己相関係数を示し(図 2-16a と b)、また高 NaCl 濃度で大きな絶対値を示すことから(図 2-13a および図 2-15a)、第一主成分は部分的折りたたみ構造の形成を捉えている成分であることがわか

った。第二右特異ベクトルでは pH 2 – 3 の低 NaCl 濃度において大きな値の変動を示すことから、第二主成分はランダムコイル状態を捉えている成分であることがわかった(図 2-13a および図 2-15a、図 2-16a と b)。第三右特異ベクトルは測定 pH 全体にわたってばらつきが大きく、自己相関係数も小さいことから、第三主成分は何らかのノイズを反映した成分であることがわかった。 C_H2 モノマーおよび C_L モノマーにおいても同様に第一および第二主成分がそれぞれ pH 2 – 3 におけるランダムコイル状態および部分的折りたたみ構造の形成を捉えていることがわかり (図 2-13b と c および図 2-15b と c、図 2-16c – f)、さらに C_H2 モノマー蛍光スペクトルデータにおける第三右特異ベクトルでは各 pH 4 – 8 における値の変動を示したことから、第三主成分は中性付近における何らかのコンホメーション変化を捉えていることがわかった(図 2-15)。 C_H1 - C_L ヘテロダイマーでは、第一主成分はランダムコイル状態を捉えていたが、CD スペクトルにおける第二および第三主成分はばらつきが大きくノイズを捉えていたが(図 2-13d、図 2-16e)、蛍光スペクトルデータにおける第二主成分では部分的折りたたみ構造の形成を捕えた成分であった(図 2-15d、図 2-16f)。

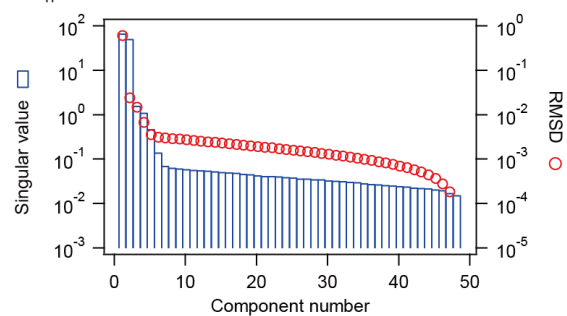
表 2-3：特異値分解から得られた特異値より算出した各主成分の寄与率

		main components (%)		
	domain	first	second	third
CD	C _{H3} homo-dimer	95.31	4.43	0.05
	C _{H2} monomer	97.15	2.07	0.19
	C _L monomer	98.35	0.80	0.25
	C _{H1} -C _L hetero-dimer	99.37	0.25	0.10
fluorescence	C _{H3} homo-dimer	62.98	36.96	0.04
	C _{H2} monomer	84.27	15.56	0.17
	C _L monomer	99.94	0.04	0.01
	C _{H1} -C _L hetero-dimer	99.48	0.51	0.01

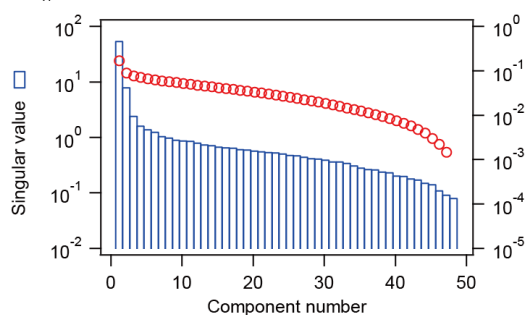
a C_H3 homo-dimer, CD



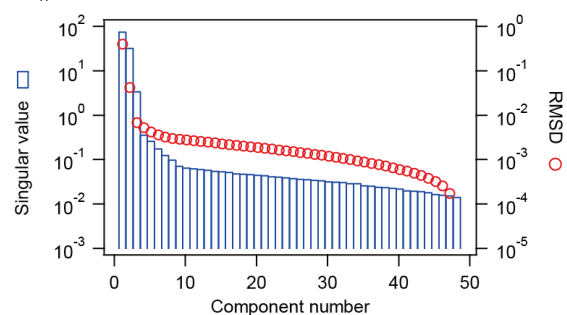
e C_H3 homo-dimer, Fluorescence



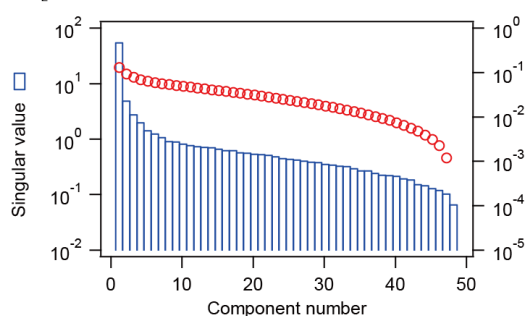
b C_H2 monomer, CD



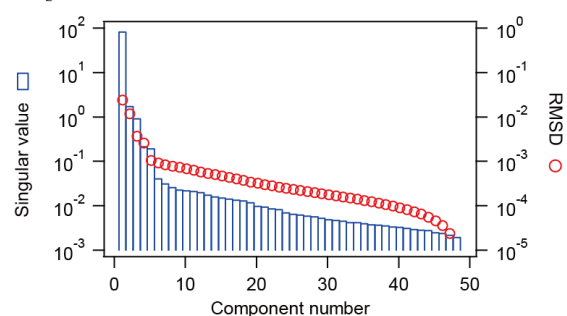
f C_H2 monomer, Fluorescence



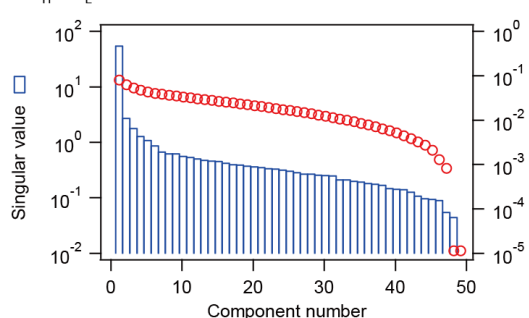
c C_L monomer, CD



g C_L monomer, Fluorescence



d C_H1-C_L hetero-dimer, CD



h C_H1-C_L hetero-dimer, Fluorescence

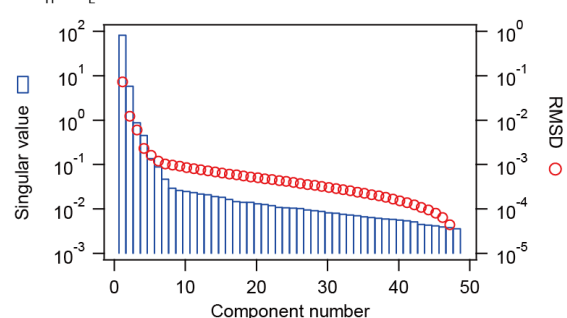
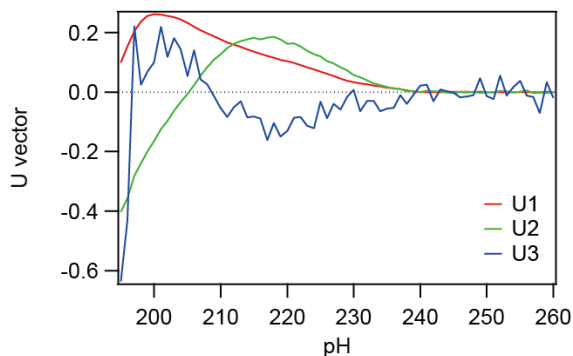
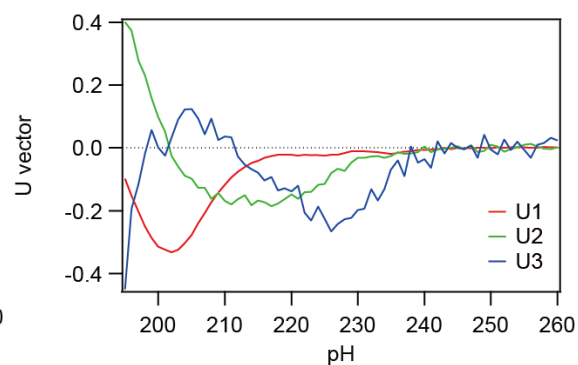


図 2-11 : 各ドメインの CD スペクトルデータ(a-d)および蛍光スペクトルデータ(e-h)の特異値分解により得られた特異値と RMSD を示した。

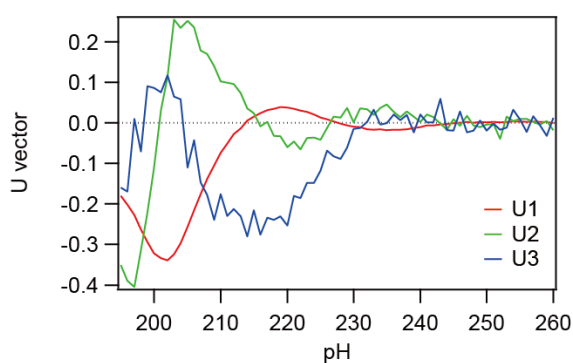
a C_H3 homo-dimer, U vector



b C_H2 monomer, U vector



c C_L monomer, U vector



d C_H1-C_L hetero-dimer, U vector

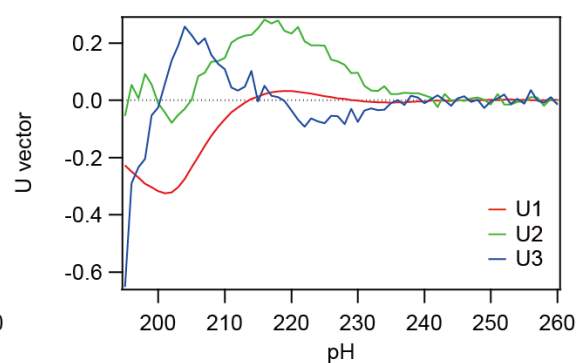
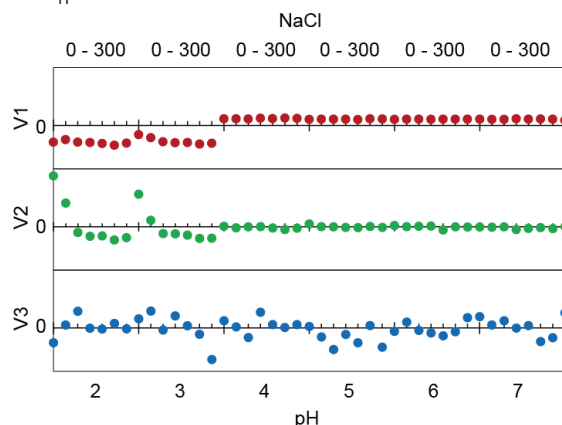
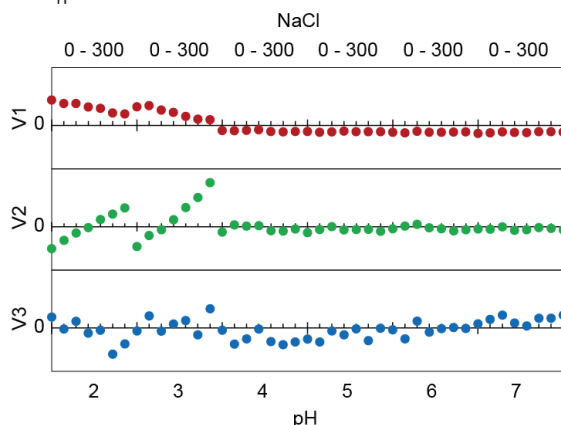


図 2-12 : CD スペクトルデータの特異値分解から得られた C_H3 ホモダイマー(a)および C_H2 モノマー(b)、 C_L モノマー(c)、 C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の左特異ベクトルを示す。赤線は第一特異ベクトル、緑線が第二特異ベクトル、青線が第三特異ベクトルを示す。

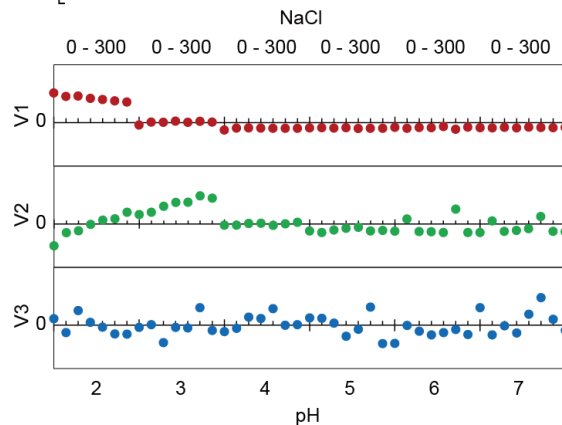
a C_H3 homo-dimer, V vector



b C_H2 monomer, V vector



c C_L monomer, V vector



d C_H1-C_L hetero-dimer, V vector

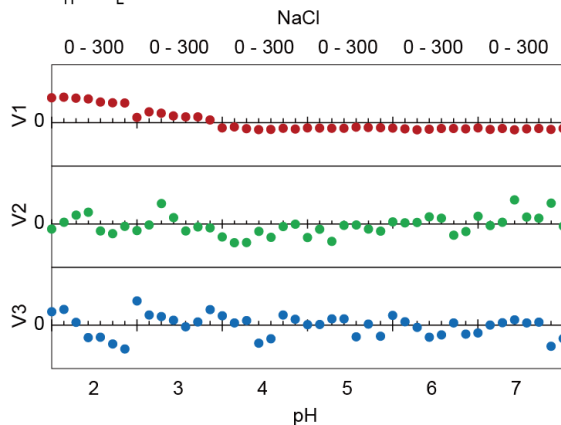
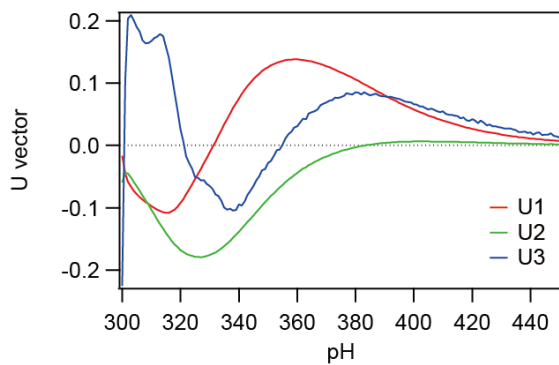
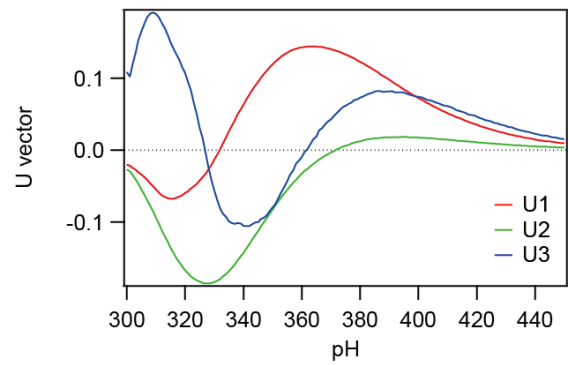


図 2-13 : CD スペクトルデータの特異値分解から得られた C_H3 ホモダイマー(a)および C_H2 モノマー(b)、 C_L モノマー(c)、 C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の右特異ベクトルを示す。赤および緑、青の点は、それぞれ第一および第二、第三右特異ベクトルを示す。各点は各溶液条件のベクトルの値に対応し、左端から pH 2, 0 mM NaCl、および pH 2, 50 mM、…、pH 2, 300 mM NaCl、pH 3, 0 mM NaCl 条件、…における各値を並べている。図の交差した目盛りは pH 条件 (下ラベル) に対応し、上に凸の目盛りは NaCl 条件(上ラベル)に対応する。

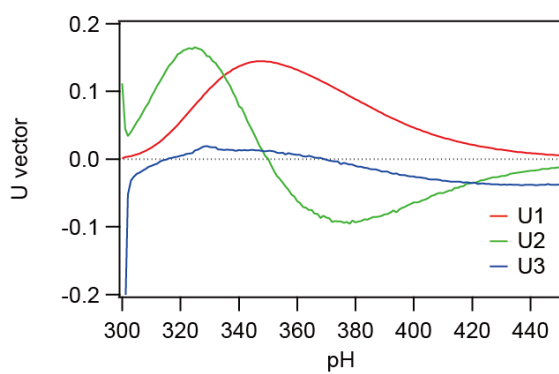
a C_H3 homo-dimer, U vector



b C_H2 monomer, U vector



c C_L monomer, U vector



d C_H1-C_L hetero-dimer, U vector

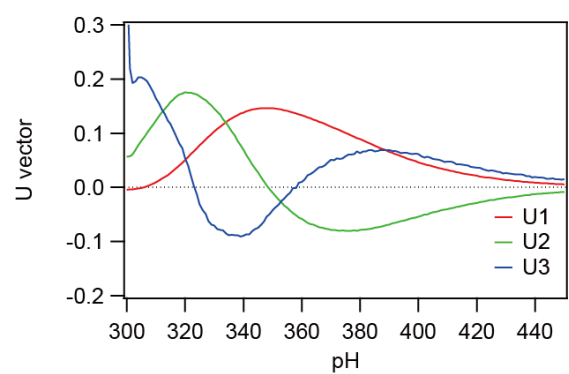
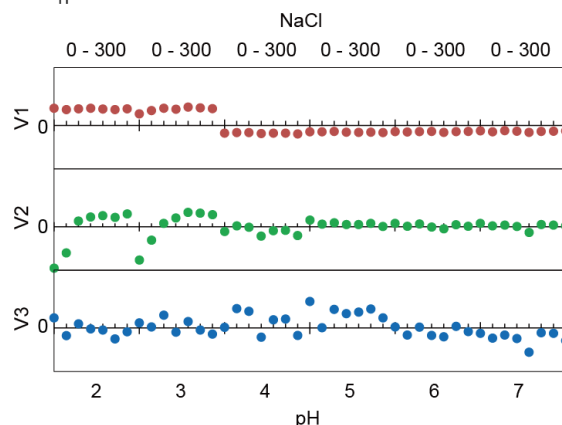
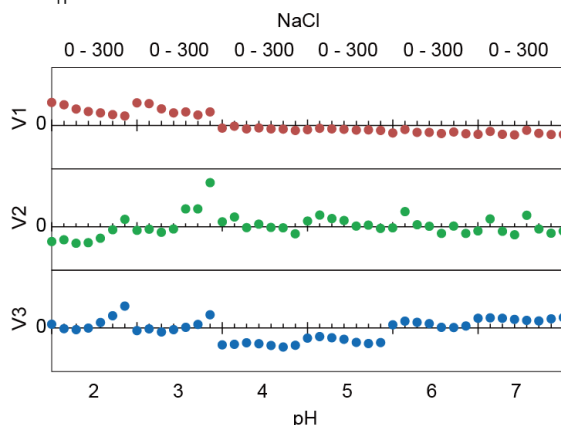


図 2-14 : 蛍光スペクトルデータの特異値分解から得られた C_H3 ホモダイマー(a)および C_H2 モノマー(b)、 C_L モノマー(c)、 C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の左特異ベクトルを示す。赤線は第一左特異ベクトル、緑線が第二特異ベクトル、青線が第三特異ベクトルを示す。

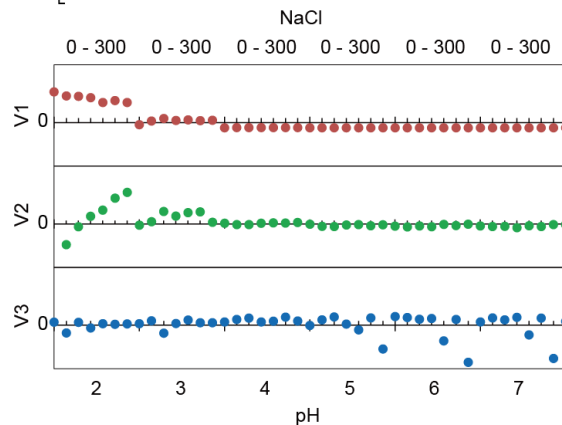
a C_H3 homo-dimer, V vector



b C_H2 monomer, V vector



c C_L monomer, V vector



d C_H1-C_L hetero-dimer, V vector

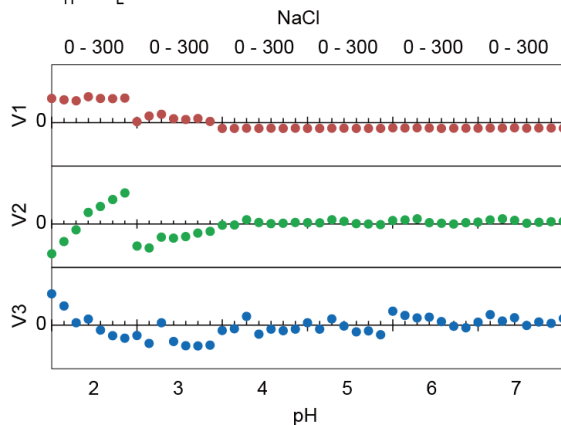


図 2-15：蛍光スペクトルデータの特異値分解から得られた C_H3 ホモダイマー(a)および C_H2 モノマー(b)、 C_L モノマー(c)、 C_H1-C_L ヘテロダイマー(d)の右特異ベクトルを示す。赤点は第一右特異ベクトル、緑点が第二右特異ベクトル、青点が第三右特異ベクトルを示す。各点は各溶液条件のベクトルの値に対応し、左端から pH 2 および 0 mM NaCl 条件、pH 2 および 50 mM 条件、…、pH 2 および 300 mM NaCl 条件、pH 3 および 0 mM NaCl 条件、…における各ベクトルの値を順番に並べている。図の交差した目盛りは pH 条件の違い(下ラベル)に対応し、上に凸の目盛りは NaCl 条件の違い(上ラベル)に対応している。

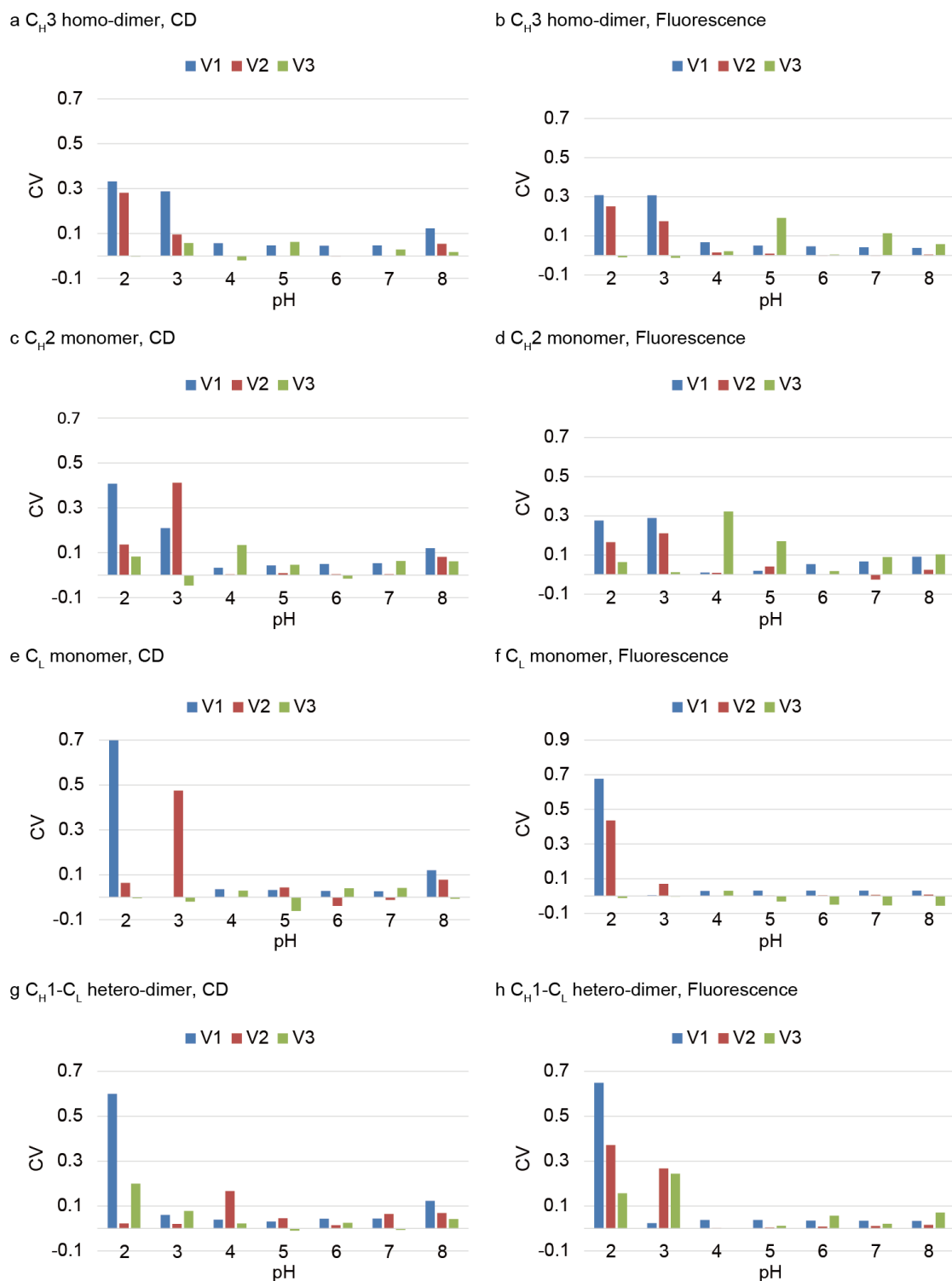


図 2-16: 各 pH の 0 mM から 300 mM NaCl までの各溶液条件における右特異ベクトルより自己相関係数を算出した。(a)および(c)、(e)、(g)は CD スペクトルデータより、(b)および(d)、(f)、(h)は蛍光スペクトルデータより算出した各ドメインの自己相関係数を示している。

2.4.4. Empirical phase diagram による主要コンホメーション状態の可視化と分類

溶液条件ごとの各コンホメーション状態の存在比に関連する右特異ベクトルの情報を基に、Empirical phase diagram (EPD)を作成し、コンホメーション状態の違いを二次元マップ上に表現した。EPD は、各溶液条件に主に存在するコンホメーション状態を、色の違いとして表現する手法である(82, 83)。2.4.3.では、溶液条件と右特異ベクトルの大きさの対応を、横軸に溶液条件(pH、NaCl 濃度)、縦軸にベクトルの大きさの二次元図で表現した(図 2-13 および図 2-15)が、EPD では横軸を pH 変化、縦軸を NaCl 濃度変化に対応させ、ベクトルの大きさを色の濃淡で示すことで、溶液条件と右特異ベクトルの大きさとの対応関係を三次元的に表現することができる。まず標準化した第一および第二、第三右特異ベクトルのそれぞれの値を、赤および緑、青色の濃淡に対応させた単色 EPD (図 2-17 および図 2-18)を作成し、右特異ベクトルとコンホメーション変化との対応関係を確認した。 C_{H3} ホモダイマーの単色 EPD では、第一右特異ベクトルは pH 2–3 および高濃度 NaCl 条件下で、第二右特異ベクトルは pH 2–3 および低濃度 NaCl 条件下において大きな色の変化を示し(図 2-17a と e および図 2-18a と e)、第一主成分は部分的折りたたみ構造を有する状態、第二主成分はランダムコイル状態に対応していることを確認した。 C_{H2} モノマーおよび C_L モノマーの単色 EPD では、第一主成分は pH 2–3 の低濃度 NaCl 条件において存在するランダムコイル状態、また第二主成分は高濃度 NaCl 条件において存在する部分的折りたたみ構造を有する状態に対応していることを確認した(図 2-17b と c, f, g および図 2-18b と c, f, g)。また C_{H2} モノマーにおける蛍光の第三右特異ベクトルを基に作成した EPD では、pH 4–5 において何らかの天然状態とは異なるコンホメーション状態が存在することが確認された(図 2-18j)。 C_{H1} - C_L ヘテロダイマーの単色 EPD では、第一主成分は pH 2 におけるランダムコイル状態、また蛍光の単色 EPD では、第二特異ベクトルが pH 2 における NaCl 濃度に応じたコンホメーション変化を捉えていることが確認された(図 17d と h および図 18d と h)。

次に各ドメインの寄与率および RMSD より算出したコンホメーション状態の成分数を基に有意な情報を含む右特異ベクトルを選出し、色を混合させた EPD を作成した。さらに EPD 作成に使用した右特異ベクトルを用いて階層的クラスタ解析を行うことによって、測定した溶液条件範囲に存在する主要コンホメーション状態の分類を行った。作成した EPD を図 2-19 に示した。 C_{H3} ホモダイマーの EPD では、測定した溶液条件内に三つの主要なコンホメーション状態が存在し、pH 4–8 では天然状態、pH 2–3 では、100 mM NaCl 周辺を境に低濃度 NaCl 条件ではランダムコイル状態、高濃度 NaCl 条件では部分的な折りたたみ構造を有したコンホメーション状態に分類することができた(図 2-19a と b)。 C_{H2} モノマーにおいても、pH 2–3 において、150–250 mM NaCl を境に二つの非天然状態が存在し、 C_{H3} ホモダイマーに比べてより高濃度 NaCl 条件下で部分的折りたたみ構造を有したコンホメーション状態に移行した(図 2-19c と d)。また蛍光の EPD においては、pH 4–5 の溶液条件において、天然状態状態や二つの非天然状態

とは異なるコンホメーション状態(a partially distorted state)が存在することを示した(図 2-19d)。C_Lモノマーおよび C_{H1}-C_Lヘテロダイマーでは、pH 2 または pH 3 において非天然状態状態に移行し、蛍光 EPD では pH 2 における NaCl 濃度増加に応じて二つの非天然状態に分類された(図 2-19e-f)。C_Lモノマーでは、pH 2 と pH 3 を境に酸変性が生じることから、酸ストレスに対して最もコンホメーション安定性に優れたドメインであることがわかった。

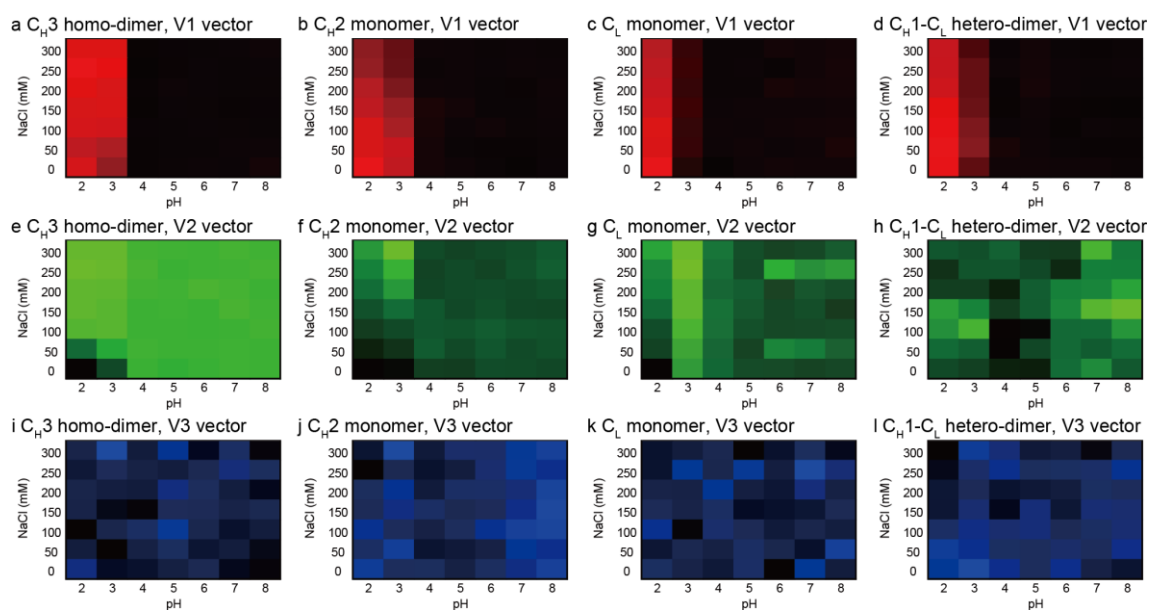


図 2-17: CD スペクトルの右特異ベクトルを基に作成した C_{H3} ホモダイマー(a および e、i) および C_{H2} モノマー(b および f、j)、 C_L モノマー(c および g、k)、 $C_{H1}-C_L$ ヘテロダイマー(d および h、l) の単色 EPD を示す。各溶液条件における各ドメインの標準化した V1、V2、V3 値の大きさに対応させ、赤、緑、青で色付けを行っている。

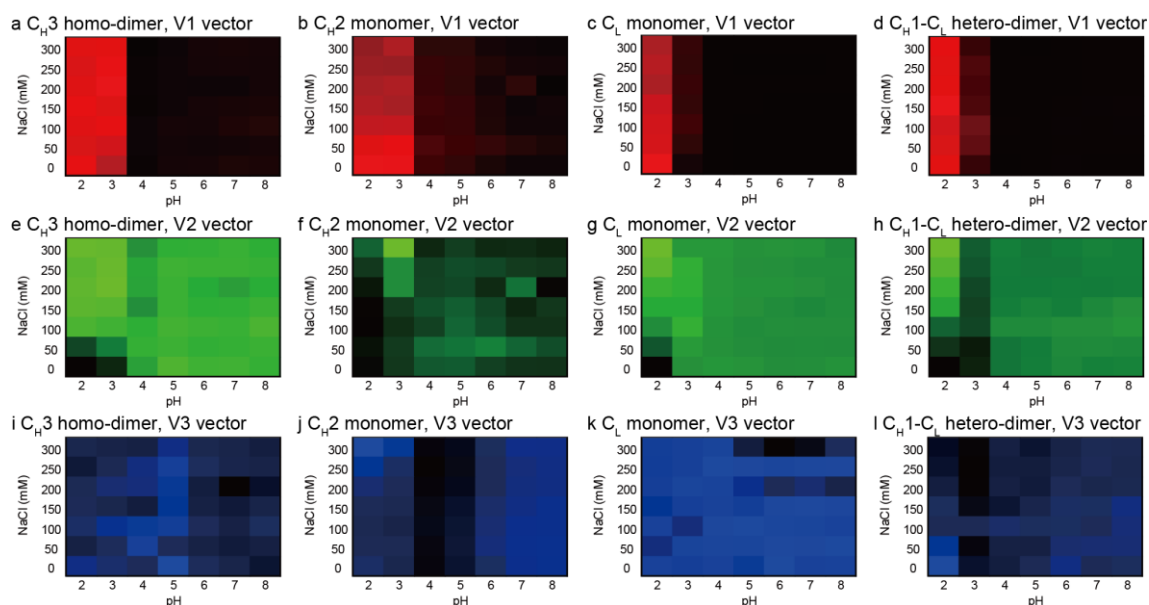


図 2-18: 蛍光スペクトルの右特異ベクトルを基に作成した C_{H3} ホモダイマー(a および e、i) および C_{H2} モノマー(b および f、j)、 C_L モノマー(c および g、k)、 $C_{H1}-C_L$ ヘテロダイマー(d および h、l) の単色 EPD を示す。各溶液条件における各ドメインの標準化した V1、V2、V3 値の大きさに対応させ、赤、緑、青で色付けを行っている。

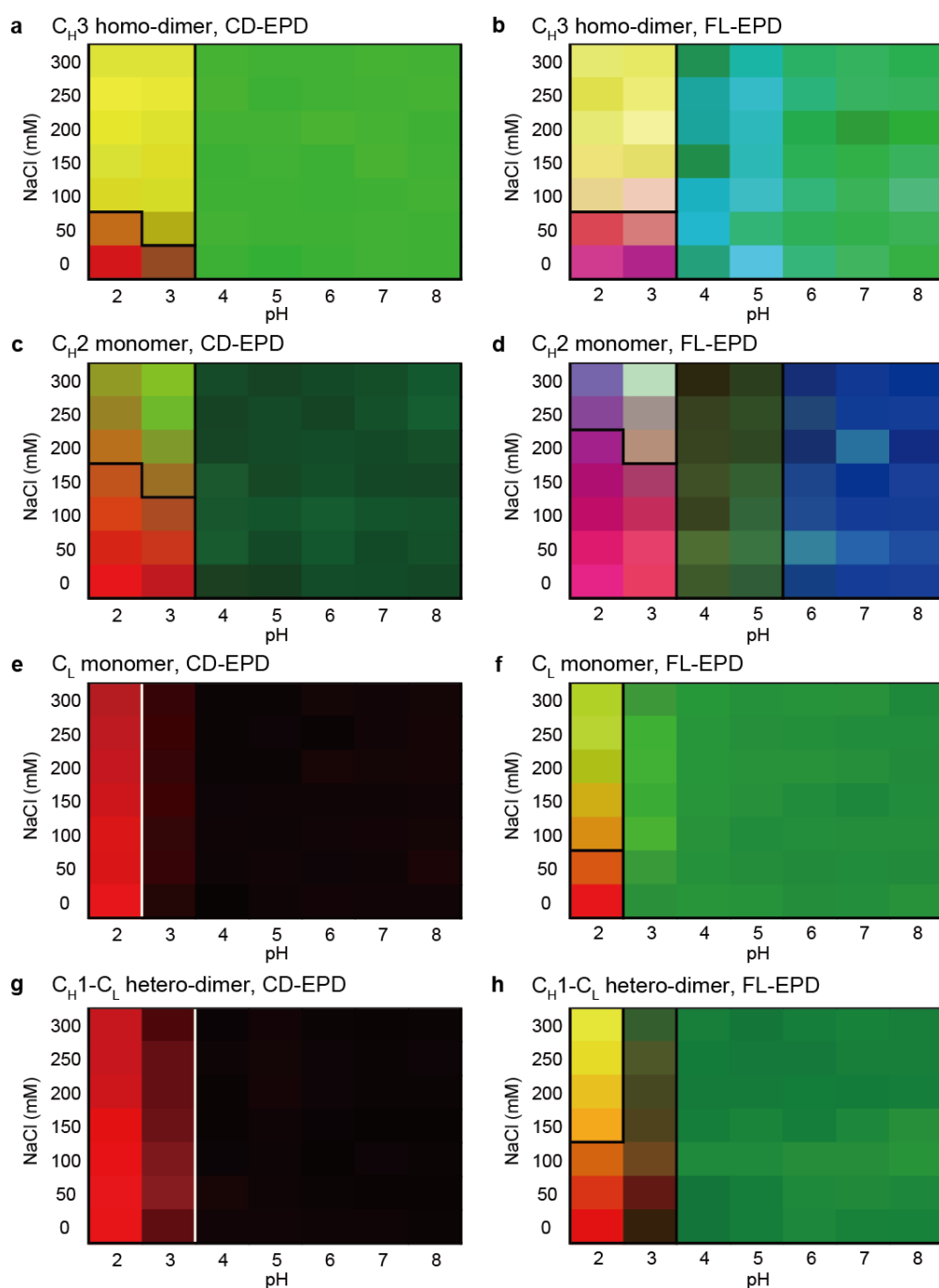


図 2-19：コンホメーション変化に寄与する右特異ベクトルを基に作成した C_H3 ホモダイマー(a および b)および C_H2 モノマー(c および d)、 C_L モノマー(e および f)、 C_H1 - C_L ヘテロダイマー(g および h)の EPD を示す。(a)および(c)、(e)、(g)は CD スペクトルから算出した右特異ベクトルを基に、(b)および(d)、(f)、(h)は蛍光スペクトルを基に作成した EPD である。(b)および(d)は上位三つの、(a)および(c)、(f)、(h)は上位二つの右特異ベクトル、(e)および(g)は上位一つの右特異ベクトルを基に EPD を作成した。EPD 中の黒または白色の太線は、階層的クラスター解析によって分類された主要コンホメーション状態の境界線を示す。

2.4.5. ブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動およびサイズ排除クロマトグラフィーによる凝集体の検出

ブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動(BN-PAGE)を用いた解析では、非還元状態において、 C_H2 モノマーと C_L モノマー、また C_H3 ホモダイマーと C_H1-C_L ヘテロダイマーのそれぞれのバンドの移動度が一致した(図 2-20a)。さらに C_H3 ホモダイマーと C_H1-C_L ヘテロダイマーのバンドの移動度が、 C_H2 モノマーと C_L モノマーよりも小さいことから、BN-PAGE の泳動バッファーの中性 pH 条件 (pH 6.8)において C_H2 モノマーと C_L モノマーは単量体を、 C_H3 ホモダイマーと C_H1-C_L ヘテロダイマーでは二量体を形成していることが示唆された。さらに還元状態では、分子間ジスルフィド結合によりダイマーを形成している C_H1-C_L ヘテロダイマーのバンドが、 C_H2 モノマーと C_L モノマーのバンドと同程度の位置にシフトし、単量体成分に分離した。非共有結合的にダイマーを形成する C_H3 ホモダイマーでは、還元状態においても単量体への分離は観測されず、強い分子間相互作用を有していることが示唆された。

サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いた解析では、pH 7 のバッファー条件下では、各ドメインの溶出時間の序列が C_H1-C_L ヘテロダイマー、 C_H3 ホモダイマー、 C_L モノマー、 C_H2 モノマーであることから、BN-PAGE の結果に対応しており、 C_H2 モノマー- C_L モノマーについてはモノマー、 C_H3 ホモダイマーと C_H1-C_L ヘテロダイマーについてはダイマーを形成していることが確認できた(図 2-20b)。さらに、非天然状態(pH2, 0 mM NaCl および pH 3, 300 mM NaCl)における各ドメインの溶出順を確認した。pH 2 および 0 mM NaCl の条件下では、溶出の順番は C_H1-C_L ヘテロダイマー、 C_L モノマー、 C_H3 ホモダイマー、 C_H2 モノマーとなり、 C_H3 ホモダイマーは酸変性によってモノマー成分に分離することがわかった(図 2-20c)。一方、pH 3 および 300 mM NaCl の条件下では、 C_H3 ホモダイマーおよび C_H2 モノマーの溶出ピークがボイド画分に観測されたことから、凝集体を生じていることがわかった(図 2-20d)。 C_H3 ホモダイマーでは、モノマー成分に由来する溶出ピークが観測されず、全ての分子が凝集体形成に関与していると考えられる。一方、 C_H2 モノマーではモノマー成分の溶出ピークも観測されたことから、溶液中でモノマー成分と凝集体成分が共存していることがわかった。

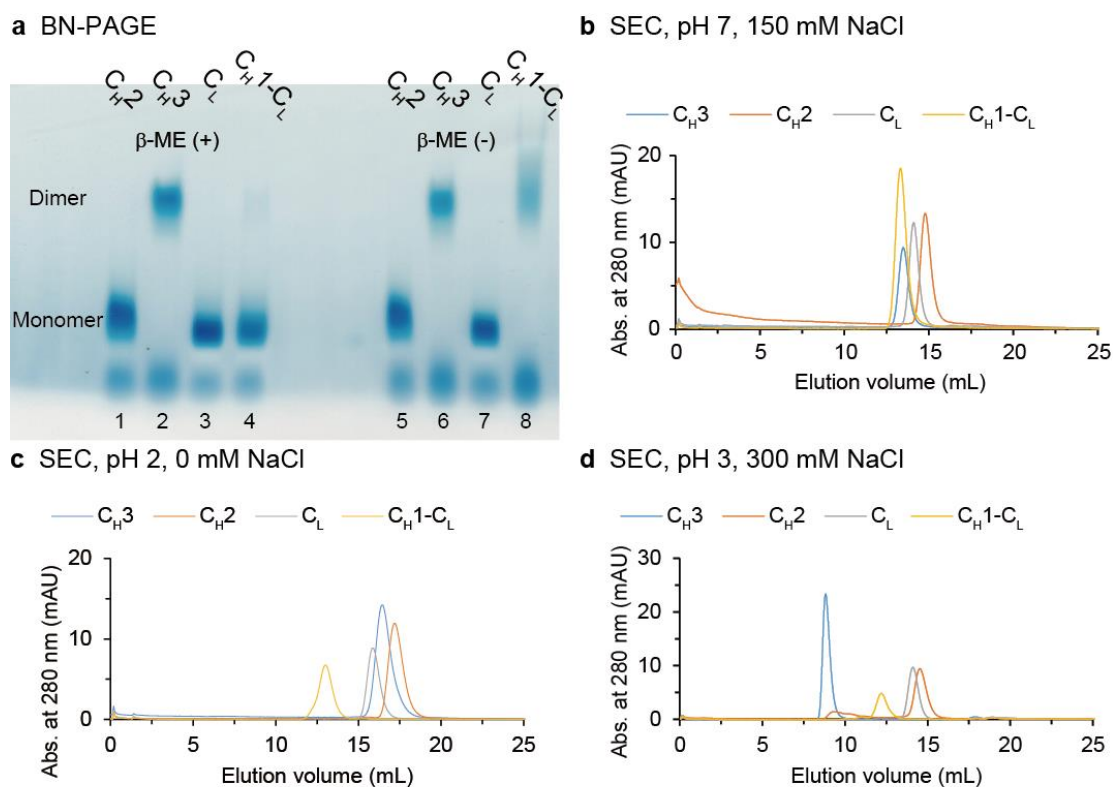


図 2-20 : (a)pH 6.8 におけるブルーネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動 (BN-PAGE)を示す。ゲルは 4–20%のグラジエントゲルを用いた。レーン 1–4 は 5%のβメルカプトエタノールの添加による還元状態での泳動、レーン 5–8 は非還元状態による泳動を示す。(b)平衡化バッファー条件が pH 7 および 150 mM NaCl におけるサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)。(c) pH 2 および 0 mM NaCl における SEC。(d) pH 3 および 300 mM NaCl における SEC。

2.4.6. 動的光散乱測定と Particle size diagram による凝集溶液条件の特定

動的光散乱(DLS)を用いた解析では、CD および蛍光の解析と同様に計 49 種の溶液条件下における粒子サイズを測定した。測定した各溶液条件の粒子サイズから Particle size diagram (PSD)を作成し、各ドメインが凝集体を形成する溶液条件を特定した。天然状態および非天然状態を有する溶液条件において測定した粒子サイズを表 2-4 に示す。NaCl を含まない場合、各ドメインが非天然状態を有する pH 2 または pH 3 の粒子サイズは、天然状態を有する pH 7 の粒子サイズに近い値を示し、C_{H2} モノマーと C_L モノマー、C_{H3} ホモダイマーでは単量体、C_{H1}-C_L ヘテロダイマーでは二量体を維持し、凝集体を形成していないことを確認した(表 2-4 および図 2-21a,c,e,g)。pH 2-3 では、C_{H3} ホモダイマーと C_{H2} モノマーは、溶液の NaCl 濃度の増加に伴って、粒子サイズが増加し、凝集体を形成した(表 2-4 および図 2-21b,d、図 2-22a,b)。Particle size diagram から、C_{H3} ホモダイマーでは、pH 2-3 では 50 または 100 mM 以上の NaCl 濃度条件において粒子サイズが増加し、凝集体の形成が確認された(図 2-22a)。C_{H2} モノマーは、pH 2 では NaCl 濃度が 300 mM 以上において、pH 3-4 では 200 mM 以上で、凝集体を形成した(図 2-22b)。C_{H2} モノマーの EPD(図 2-19c と d)では、pH 4 において明確な非天然状態状態への転移を確認することができていないが、pH 4 においてもわずかに非天然状態の分子が存在し凝集反応を生じているものと考えられる(2-21j)。C_L モノマーおよび C_{H1}-C_L ヘテロダイマーでは、pH 2-3 において、粒子サイズが変化せず、凝集体の形成は観測されなかった(表 2-4 および図 2-21e-h、図 22c,d)。

表 2-4：動的光散乱により測定した各ドメインの粒子サイズ

condition		diameter (nm)			
		C _{H3}	C _{H2}	C _L	C _{H1} -C _L
pH	NaCl	homo-dimer	monomer	monomer	dimer
7	150	7.13 ± 1.83	4.45 ± 0.14	5.18 ± 1.12	7.30 ± 2.05
3	0	5.72 ± 0.47	6.39 ± 0.13	6.06 ± 0.37	6.51 ± 0.97
3	300	41.9 ± 8.89	16.5 ± 2.89	5.15 ± 0.83	6.73 ± 0.43
2	0	5.99 ± 0.13	6.23 ± 0.47	5.40 ± 0.37	8.13 ± 0.97
2	300	39.7 ± 2.81	11.8 ± 2.51	5.76 ± 0.25	7.40 ± 0.61

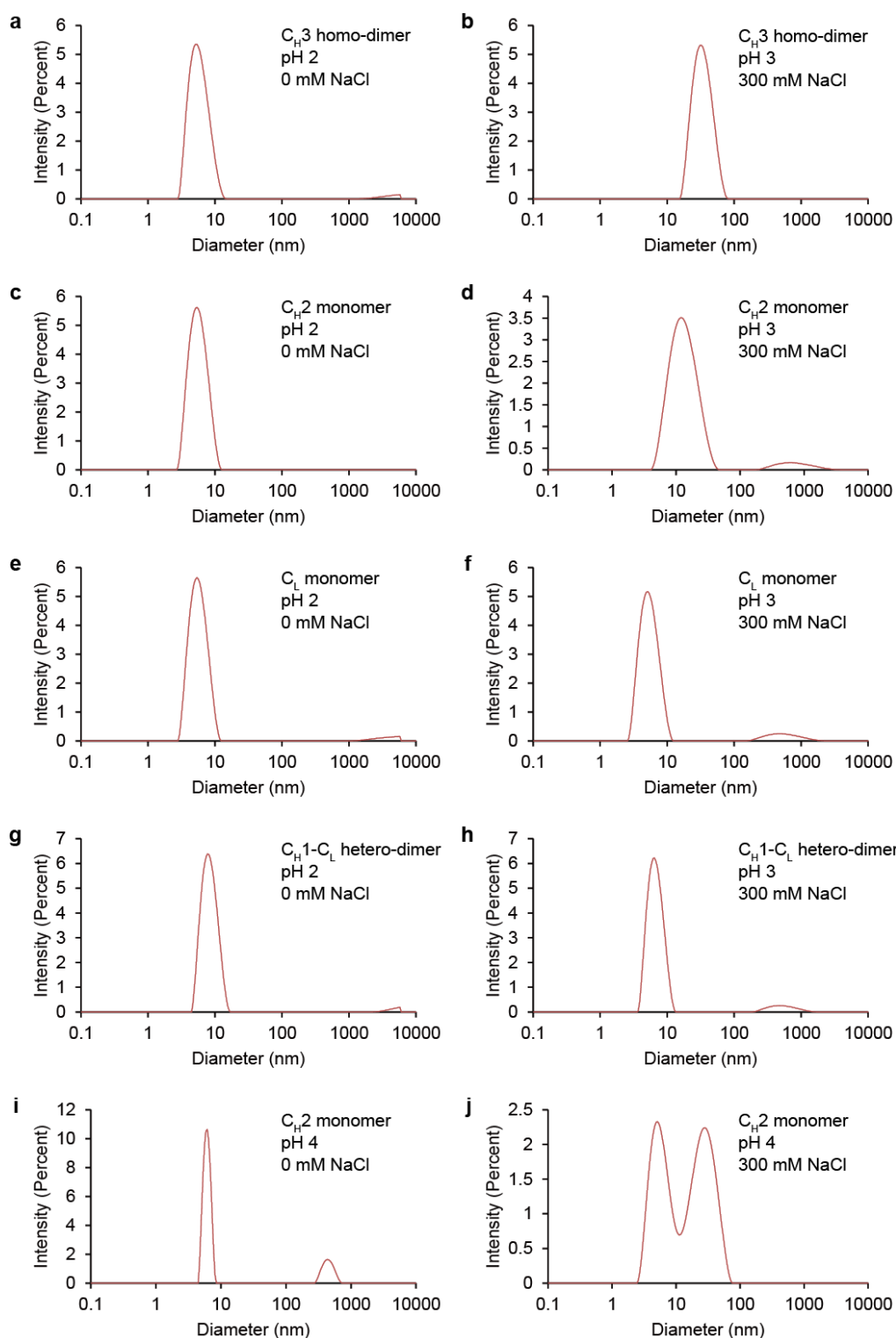


図 2-21: 各ドメインの粒子径分布図を示す。 C_H3 ホモダイマーおよび C_L モノマー、 C_H1 - C_L ヘテロダイマーについては pH 2 および 0 mM NaCl (それぞれ a および e, g)、および pH 3 および 300 mM NaCl (それぞれ b および f, h)における粒子径分布図を示した。 C_H2 モノマーについては、pH 2 および 0 mM NaCl (c)、および pH 3 および 300 mM NaCl (d)、pH 4 および 0 mM または 300 mM NaCl(それぞれ i および j)の粒子径分布図を示した。

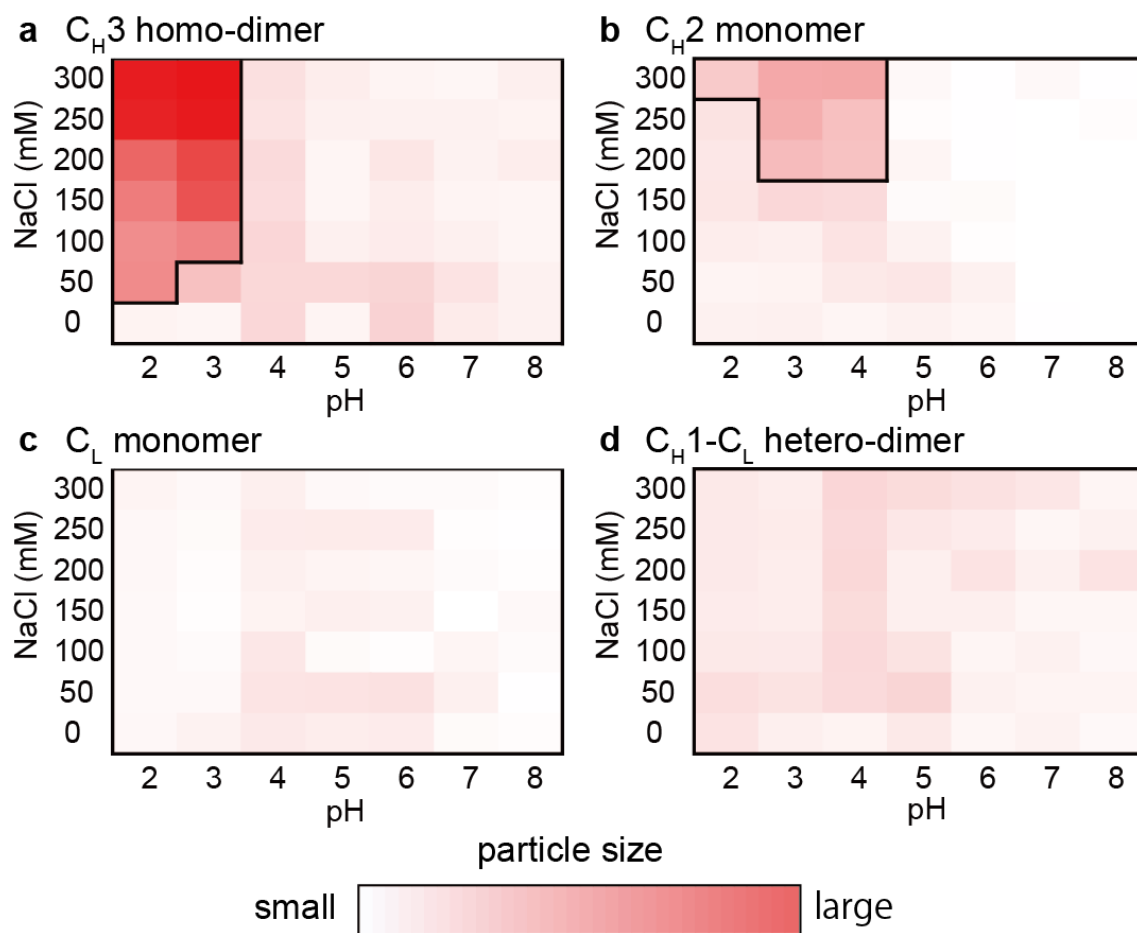


図 2-22 : C_H3 ホモダイマー(a)および C_H2 モノマー(b)、C_Lモノマー(c)、C_H1-C_Lヘテロダイマー(d)の pH 2–8 および 0–300 mM NaCl からなる計 49 種の溶液条件における粒子サイズを基に作成した particle size diagram を示した。赤色が濃いほど粒子サイズが大きいことを示している。黒太線は、階層的クラスター解析により定めた凝集溶液条件の境界線を示す。

2.4.7. 凝集反応に関わる特定コンホメーション状態の検出

各ドメインの EPD による解析から、 C_{H3} ホモダイマーおよび C_{H2} モノマーでは、溶液の NaCl 濃度に応じて二つの主要コンホメーション状態が存在した。この二つの主要コンホメーション状態が存在する溶液条件領域は、 C_{H3} ホモダイマーと C_{H2} モノマーが凝集体を形成する溶液条件領域と、よく相関しているように思われる。したがって、pH 2–3 および高塩濃度条件下に存在するコンホメーション状態、または測定した CD および蛍光スペクトルには、凝集反応による分子間 β シートなどの分子間相互作用に関する情報が含まれている可能性が高い。そこで、pH 3 において溶液の NaCl 濃度を 0 mM から 300 mM にジャンプさせた後、コンホメーションと粒子サイズの経時変化をそれぞれ CD と DLS を用いて測定し、凝集体形成が CD スペクトルの形状の変化に与える影響を解析した。

NaCl 濃度ジャンプ後の CD 強度変化および粒子サイズの経時変化を図 2-23 に示す。各ドメインの CD のシグナル強度は、NaCl 混合後、5 分以内に急激に変化したが、それ以降は緩やかな CD 強度の変化に移行した(図 2-23a)。一方 DLS では、 C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモダイマーにおいて粒子サイズの増加が観測され、粒子サイズは 5 分以内に増加し、それ以降も 300 分まで粒子サイズの増加が続いた(図 2-23b)。各ドメインの CD 強度の経時変化と DLS の粒子サイズの経時変化を比較した場合に、 C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモダイマーに観測される粒子サイズの経時変化に対応する CD 強度変化が観測されていないと考えられる。したがって、測定した CD 強度の変化は、主に分子内で生じているコンホメーション変化を反映していると考えられる。pH 2–3 および高濃度 NaCl の条件下における凝集反応は、部分的な折りたたみ構造を有するコンホメーション状態を介して進行していると考えられる。

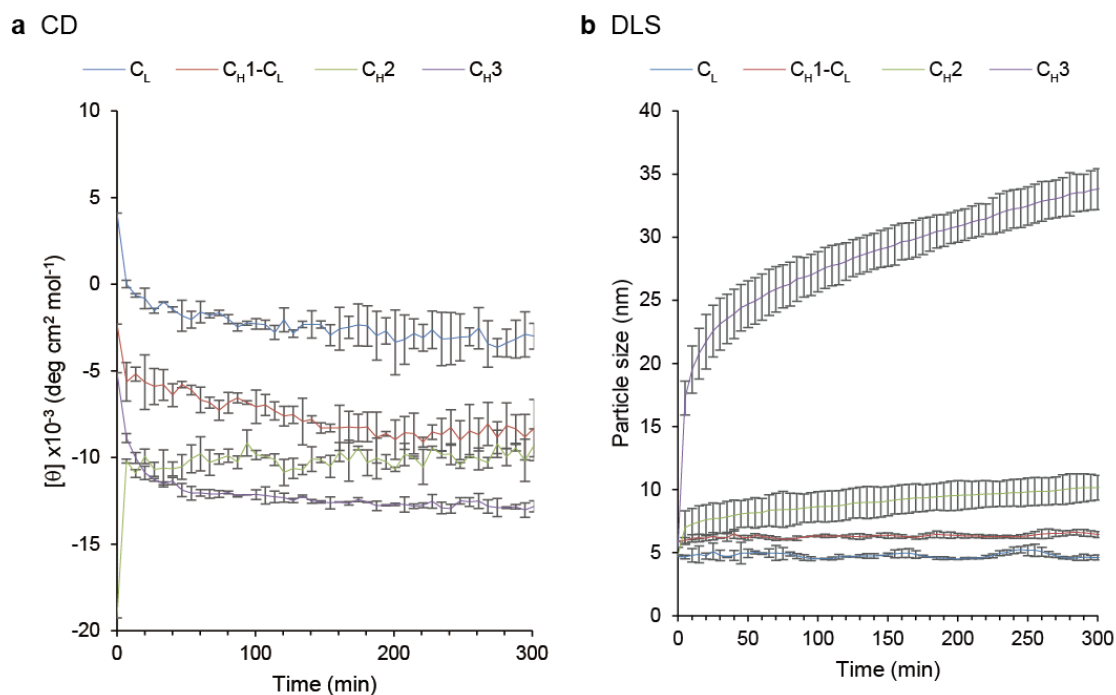


図 2-23 : NaCl 濃度を 0 mM から 300 mM にジャンプさせた後の CD 強度(a)と粒子サイズ(b)の経時変化を示した。(a)では C_{H3} ホモダイマーでは 210 nm、 C_{H2} では 199nm、 C_L モノマーは 200 nm、 C_{H1-C_L} ヘテロダイマーでは 199 nm の CD 強度変化をプロットした。独立した測定を二回行い、その平均値と誤差を示した。

2.5. 考察

2.5.1. Generalized phase diagram によるドメインの特性評価

CD スペクトルおよび内部トリプトファン蛍光スペクトル、動的光散乱測定の結果を基に EPD および PSD を作成することによって、広範な溶液条件(pH 2–8 および 0–300 mM NaCl)における四種類のドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性の違いを示した(図 2-19 および図 2-22)。EPD と PSD から、酸変性状態では溶液中のイオンと蛋白質との相互作用により、分子内反応であるフォールディング反応と分子間反応である凝集反応の双方を誘導されることを示した。さらに NaCl ジャンプ実験による解析から、凝集反応は分子内で部分的折りたたみ構造を形成したコンホメーション状態を介して進行することを示した(図 2-23)。本研究では、これらの解析結果を基に解析した全 49 種の溶液条件における蛋白質溶液状態を、コンホメーション状態と分散状態の双方を考慮した三つの主要な状態に分類した。一つは中性溶液条件下において天然型コンホメーションと単分散を維持するネイティブ状態(the native state (N 状態))、つぎに酸性溶液で低濃度 NaCl 条件下において変性しているが単分散性を維持する単量体単分散性非天然状態(the monomeric monodispersed non-native state (MMNN 状態))、そして高濃度 NaCl 条件下において部分的折りたたみ構造と凝集体の形成が観測される多量体多分散性非天然状態(the polymeric polydispersed non-native state (PPNN 状態))である。各ドメインの各溶液条件におけるそれら三つの状態の分布をまとめた Generalized phase diagram を図 2-24 に示した。 C_{H3} ホモダイマーと C_{H2} モノマーでは、上記の三つの状態の存在し、 C_L モノマーと C_{H1} - C_L ヘテロダイマーでは N 状態と MMNN 状態の二つの状態が存在した(図 2-24)。例外的に C_{H2} モノマーの蛍光スペクトルおよびその EPD からは、pH 4–5 の領域に pH 6–8 のコンホメーション状態とは異なるコンホメーション状態(a partially distorted state)が存在した(図 2-24b)。

先行研究として Buchner の研究グループは、マウス IgG1 のフラグメントおよびドメイン蛋白質の酸性溶液条件下におけるコンホメーション状態と分散状態の解析を行ない、マウス IgG1 ドメインが高濃度 NaCl および酸性条件下において alternatively folded state (AFS)と呼ばれる特定のコンホメーション状態を形成することを報告している(84-87)。CD スペクトルによるマウス C_{H3} ホモダイマーの解析では、NaCl を含まない pH 2 の溶液条件における 200 nm の極小波長が、60 mM NaCl を含む場合では 213 nm にシフトすることを示し、また 300 mM NaCl を含む pH 2 の溶液条件下では、凝集体を形成することを確認している(86)。さらにマウス Fab フラグメントを構成するドメイン(V_H および V_L 、 C_{H1} 、 C_L モノマー)が同様に AFS を形成することが確認されており、 C_L モノマーが 100 mM NaCl を含む pH 2 の溶液条件下ではランダムコイル状態を有するが、175 mM 以上の NaCl 濃度において二次構造形成が生じることが報告されている(87)。これらの溶液条件に応じた極小波長変化や多量体形成の特性は本研究で得られたヒト IgG1 ドメインの解析結果と対応していることから、マウスとヒトの生物種の間で IgG1 の各

ドメインの物性が類似することを示している。本研究ではこれらの知見を踏まえた上で、新たに C_{H2} モノマーが酸性 pH および 300 mM NaCl までの濃度増加により、部分折りたたみ構造および凝集体の形成が誘導されることを特定し、また広範な酸性溶液条件下において C_{H3} ホモダイマーおよび C_{H2} モノマーが凝集体を形成する溶液条件を明確に示すことができた。

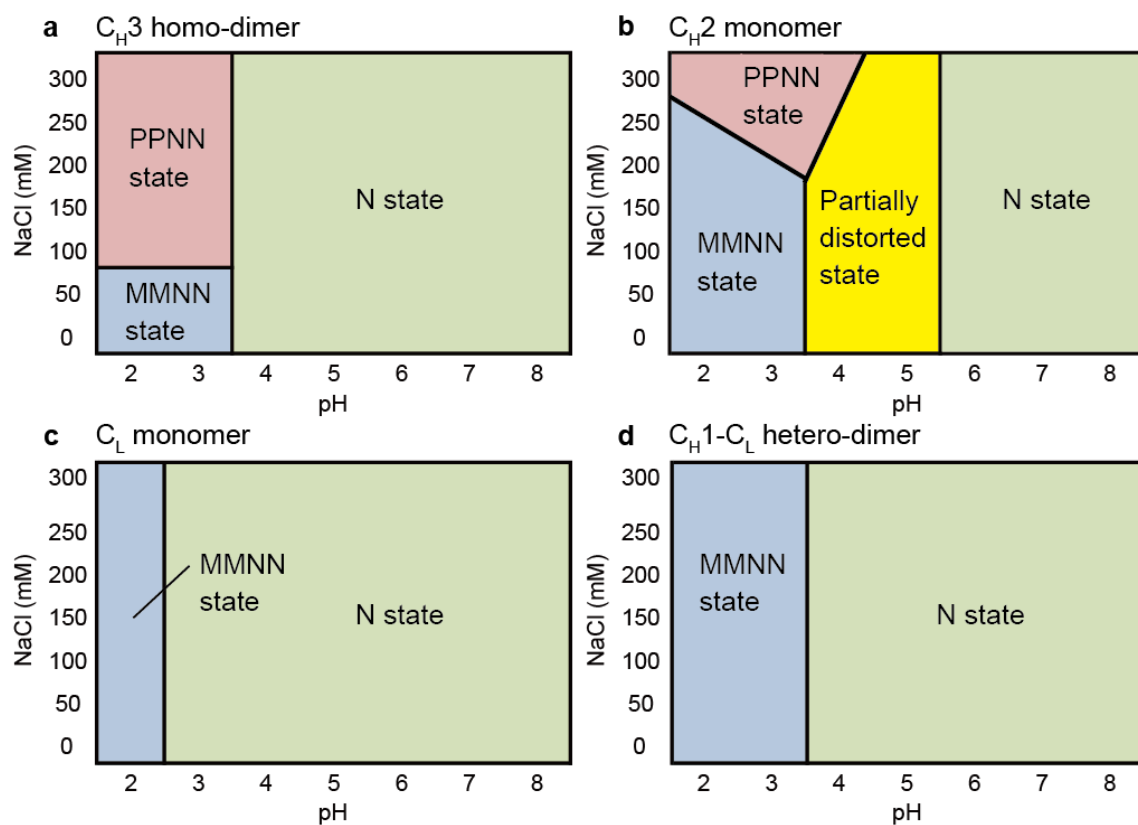


図 2-24 : EPD および PSD から得られた結果を基に作成した generalized phase diagram を示した。pH 2–8 および 0–300 mM NaCl の溶液条件における各ドメインの天然状態(N state)および単分散単量体非天然状態(MMNN state)、多量体多分散非天然状態(PPNN state)の分布を示した。

2.5.2. 抗体定常領域ドメインのコンホメーション安定性の序列

N 状態から非天然状態への変化は、ドメイン毎で異なる pH において生じた。EPD から、 C_H2 モノマーと C_H3 ホモダイマー、 C_{H1} - C_L ヘテロダイマーでは pH 3 – 4 を境に、 C_L モノマーでは pH 2 – 3 を境に生じることを示した(図 2-19)。さらに pH 2 – 3 では C_H2 モノマーと C_H3 ホモダイマーが、それぞれ 200 – 300 mM NaCl および 50 – 100 mM NaCl を境に MMNN 状態と PPNN 状態の二つの状態が存在した(図 2-24)。本研究では、N 状態および MMNN 状態、PPNN 状態の各溶液条件における存在比を求めることにより、各ドメインのコンホメーション安定性の序列を評価した。pH 7 および 150 mM NaCl、pH 2 および 0 mM NaCl、pH 3 および 300 mM NaCl における CD スペクトルを、それぞれ N 状態および MMNN 状態、PPNN 状態のピュアスペクトルであると仮定し、 C_H3 ホモダイマーと C_H2 モノマーでは上記 3 つの状態の、 C_L モノマーと C_{H1} - C_L ヘテロダイマーでは N 状態と MMNN 状態の 2 つの状態の存在比を求めた。各状態の存在比の変化を図 2-25 に示し、pH 3 および 0 mM NaCl における N 状態の存在比を表 2-5 に示した。pH 3 においては、各ドメインで天然状態と非天然状態を有する分子が混在していた。 C_H3 ホモダイマーでは、NaCl 濃度の上昇によって PPNN 状態の量が急激に増加し、100 mM NaCl では 80%以上になった(図 2-25a と b)。一方、 C_H2 モノマーでは、PPNN 状態の存在比は NaCl 濃度の上昇とともに徐々に増加し、 C_H3 ホモダイマーとは異なる応答を示した(図 2-25c と d)。PPNN 状態と MMNN 状態の存在比の合計をコンホメーション不安定性の指標とした場合、抗体ドメインのコンホメーション不安定性は C_H2 モノマー > C_H3 ホモダイマー > C_{H1} - C_L ヘテロダイマー > C_L モノマーとなることがわかった(表 2-5)。

表 2-5 : pH 3 および 0 mM NaCl における N 状態の存在比(%)

C_H3 homo-dimer	C_H2 monomer	C_L monomer	C_{H1} - C_L hetero-dimer
32.30 ± 0.08	21.10 ± 0.02	91.96 ± 0.02	61.43 ± 0.01

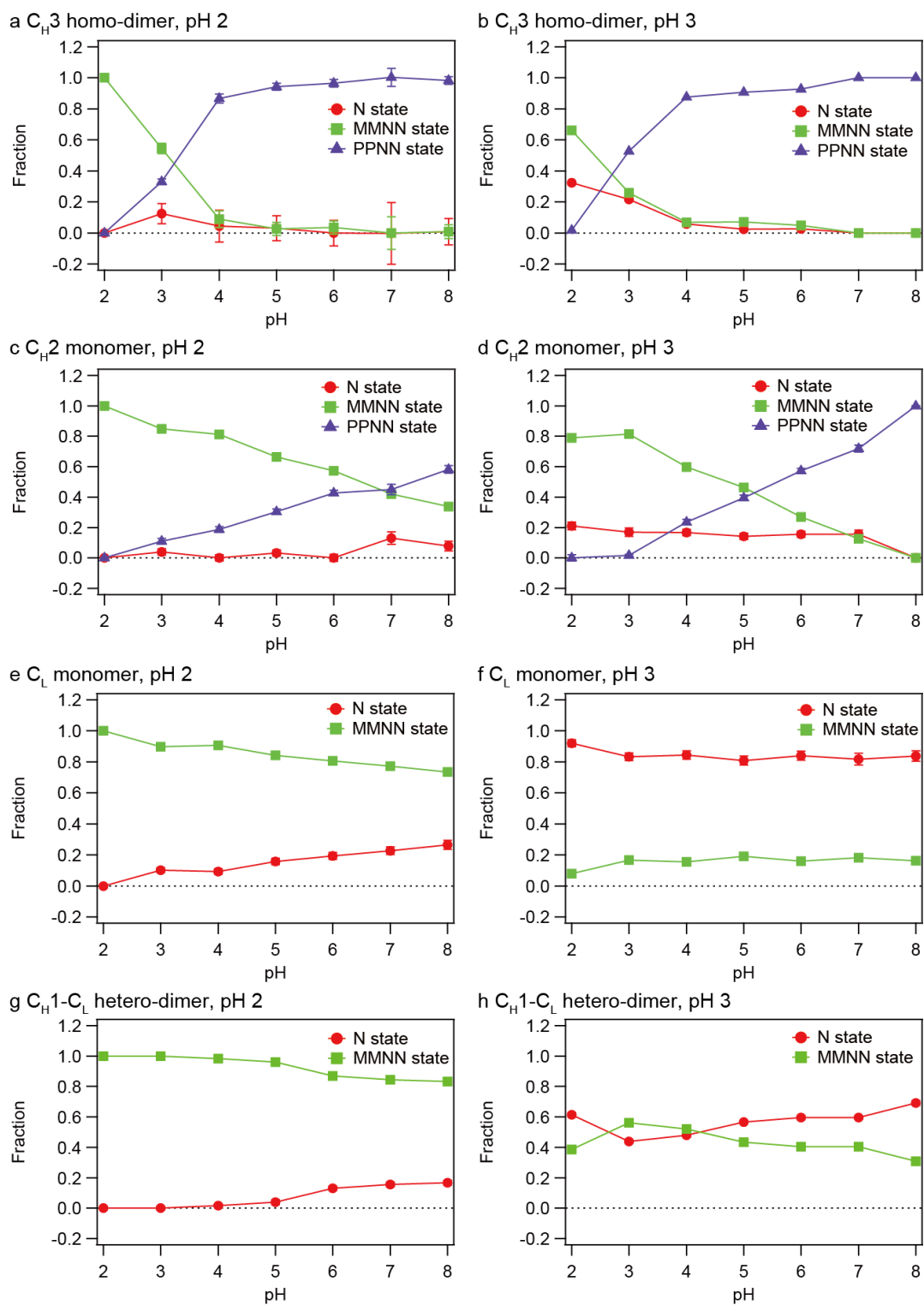


図 2-25 : pH 2 および pH 3 における各ドメインの天然状態(N state)および単分散単量体非天然状態(MMNN state)、多分散多量体非天然状態(PPNN state)の NaCl 濃度変化に応じた存在比を示した。

2.5.3. pH 4–5 の溶液条件における C_{H2} モノマーの a partially distorted state

蛍光スペクトルを基に作成した EPD では、C_{H2} モノマーは pH 4–5 にかけて N 状態とは異なるコンホメーション状態が存在した(図 2-19d)。C_{H2} モノマーは、分子内に二つのトリプトファン残基を含む。そのうちの一つ(Trp377)は分子内部の疎水性コアに存在するが、もう一つ(Trp313)は分子表面に存在する。一方、C_{H1} と C_L モノマーは、それぞれ一つの分子内部に埋没するトリプトファン残基(それぞれ Trp161 と Trp148)をもち、これらのトリプトファン残基のスペクトル変化は pH 2–3 で生じた。このことから、C_{H2} の pH 4–5 における a partially distorted state の形成には、分子表面に存在するトリプトファン残基の側鎖の蛍光変化が関与していると考えられる。近年の Latypov らによる NMR を用いた IgG1 の糖鎖をもたない Fc の解析では、pH 2.5 と pH 4.7 において、ケミカルシフトの変化が 250–255 および 310–315 番目の残基において観測され、C_{H2} ドメインが C_{H3} ドメインに先立って酸変性を生じることを示した(88)。これらの残基には C_{H2} ドメインの構造表面に存在する Trp313 が含まれる(図 2-26)。したがって、観測された a distorted partially state の形成は、Trp313 周りの部分的な構造変化が関与していると推測される。また C_{H2} ドメインでは Trp313 周りにおいて、C_{H3} ドメインより多くの荷電性残基(D312 および K317、E318、K338、K340 等)が存在し、アスパラギン酸やグルタミン酸のプロトン化によって局所的に大きな静電的斥力を発生させている可能性が示唆される。C_{H3} ホモダイマーも C_{H2} モノマーと同様にドメイン一つあたりに二つのトリプトファン残基が存在する(構造表面の Trp381 と疎水性コアの Trp417)。C_{H3} ホモダイマーの蛍光スペクトルを基に作成した EPD においても pH 4–5 にかけて第三右特異ベクトルの特性に由来した薄い青色が観測されることから、同様に a partially diastorted state を形成している可能性が考えられる(図 2-19b)。

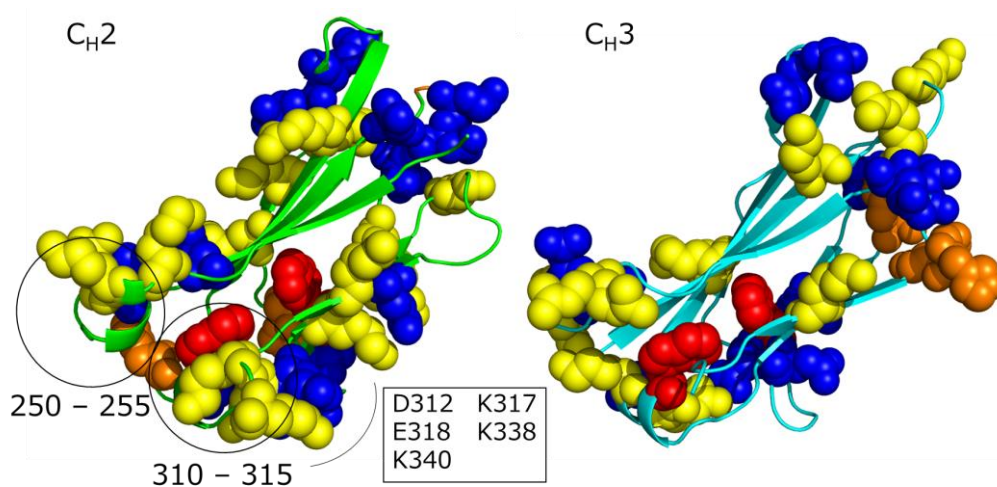


図 2-26 : C_H2 および C_H3 ドメインの立体構造を示した(PDBID : 3D6G(59))。Latypov らの報告によりケミカルシフトの変化を観測されたアミノ酸残基が含まれる領域を黒丸で囲んだ。正電荷を有するリジンおよびアルギニン残基を黄色で、ヒスチジン残基をオレンジ色で示し、負電荷を有するグルタミン酸およびアスパラギン酸残基を青色で示し、トリプトファン残基を赤色で示した。

2.5.4. ドメインのコロイド安定性の序列

C_H3 ホモダイマーでは、pH 2 および pH 3 でそれぞれ 50 mM および 100 mM NaCl 以上の溶液条件下で凝集体を形成した(図 2-22a)。C_H3 ホモダイマーでは、pH 2-3 で 100 mM 以上の NaCl が含まれる溶液条件下で、一定のコンホメーション状態に収束したが、凝集体サイズは NaCl 濃度の増加に伴って増大を続けた(図 2-19a と b および図 2-22a)。一方、C_H2 モノマーでは、pH 2-3 において NaCl 濃度の増加に伴ったコンホメーション変化を生じ、pH 2 および pH 3 でそれぞれ 300 mM および 150 mM 以上の NaCl 濃度で凝集体を形成した(図 2-22b)。C_H2 モノマーでは、C_H3 ホモダイマーと異なり、300 mM までの NaCl 濃度の増加によって特定のコンホメーション状態に収束することはなかった(図 2-19c と d)。しかし、凝集体は形成しないが、分子内コンホメーション変化のみがおこる溶液条件が広範囲に存在した。イオンとの相互作用による分子内のコンホメーション変化は、分子間の凝集反応に比べて、より反応性が高いと考えられる。さらに C_H2 モノマーでは、pH 4 で 200 mM 以上の NaCl を含む溶液条件下で凝集体を形成した(図 2-20b)。pH 4 および 300 mM NaCl 条件下の動的光散乱測定における多峰性の粒子径分布から、微量の非天然状態を有する分子が存在し、それらが局所的に集合し凝集体を形成していると考えられる(図 2-21j)。C_H2 モノマーのコンホメーション不安定性は、弱酸性 pH および高濃度の NaCl を含む溶液条件下において、抗体凝集反応のトリガーになりうると考えられる。C_L モノマーと C_H1-C_L ヘテロダイマーでは、pH 2-3 において凝集しないことから、最も優れたコロイド安定性を有していると考えられる(図 2-22c と d)。

pH 3 および 300 mM NaCl における各ドメインの凝集サイズをコロイド不安定性の指標とした場合、コロイド不安定性は C_H3 ホモダイマー > C_H2 モノマー > C_H1-C_L ヘテロダイマー ≒ C_L モノマーとなると考えられる(表 2-4)。

2.5.5. 各ドメインの抗体凝集への寄与

平衡論的および速度論的解析から、各ドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性における安定性の序列を決定した。熱ストレスに対する抗体ドメインの研究では、コンホメーション不安定性は C_H2 ドメイン > Fab > C_H3 ドメインとなり、C_H2 ドメインの糖鎖の存在はこの序列に影響を与えないと考えられる(48, 50, 51, 56, 89, 90)。したがって、酸ストレスに対するコンホメーション安定性の序列は、熱ストレスに対するコンホメーション安定性の序列に類似していると考えられる(図 2-19)。コロイド安定性については、C_H3 ホモダイマーと C_H2 モノマーのコロイド安定性が C_L モノマーと C_H1-C_L ヘテロダイマーより低いことがわかった(図 2-22)。C_H2 と C_H3 ドメインを含む Fc は、抗体全体の凝集に強く関連していることが報告されており(51, 52, 88, 90)、本章の解析結果と対応している。単独ドメインの物性とドメインが連結された Fc の物性では何らかの異なる特性を有する可能性が考えられるが、抗体全体の凝集性と凝集機構は、ドメイ

ンが固有にもつコンホメーション安定性とコロイド安定性に大きく依存していると考えられる。Kim らは、抗体全体の凝集反応には V_H および V_L、C_H1、C_L ドメインを含む Fab のコンホメーション不安定性に依存していることを報告している(50)。本章では、C_L モノマーと C_H1-C_L ヘテロダイマーは優れたコロイド安定性を示した(図 2-22)。このことから、Fab の凝集性は V_H ドメインと V_L ドメインのコロイド不安定性に依存していると考えられる。Galber と Demarest は異なる CDR をもつ抗体間で異なる凝集性を示すことを報告している(48)。

本章の解析結果および近年の抗体やその部分構造を用いた研究報告より、抗体定常領域を構成するドメインの抗体全体の凝集反応に対する寄与の序列は、C_H3 ドメイン > C_H2 ドメイン > C_H1-C_L ドメイン > C_L ドメインとなると考えられる。

2.5.6. ドメインのアミノ酸組成および配列、構造表面特性にもとづく凝集性の評価

解析した IgG1 の定常領域を構成する 4 つのドメインは、天然状態の立体構造は非常に類似している(RMSD < 2Å)が、アミノ酸配列の同一性は低い値を示す(30%以下)(表 2-6)。そこで、各ドメインのアミノ酸組成やアミノ酸配列、構造表面の性質の違いに基づき、酸ストレスに対して異なるコロイド安定性を示す要因を探索した。

まず初めに各ドメインのアミノ酸組成の違いを解析した。Thomas らや Goh らは、蛋白質の可溶性に影響を与える特定のアミノ酸組成について報告している(66, 67)。本研究では、それらの特定のアミノ酸組成を用いて、各ドメインのコロイド安定性を評価した(図 2-27)。しかし結果として、本研究で得られたコロイド安定性と相関がある特定のアミノ酸組成を見出すことはできなかった。

表 2-6：ドメイン間の立体構造の類似性と配列同一性

domain 1	domain 2	RMSD (Å)	sequence identity (%)
C _H 1 monomer	C _H 2 monomer	0.9	24
C _H 1 monomer	C _H 3 monomer	0.7	29
C _H 1 monomer	C _L monomer	1.5	27
C _H 2 monomer	C _H 3 monomer	0.7	20
C _H 2 monomer	C _L monomer	1.6	25
C _H 3 monomer	C _L monomer	1.3	25

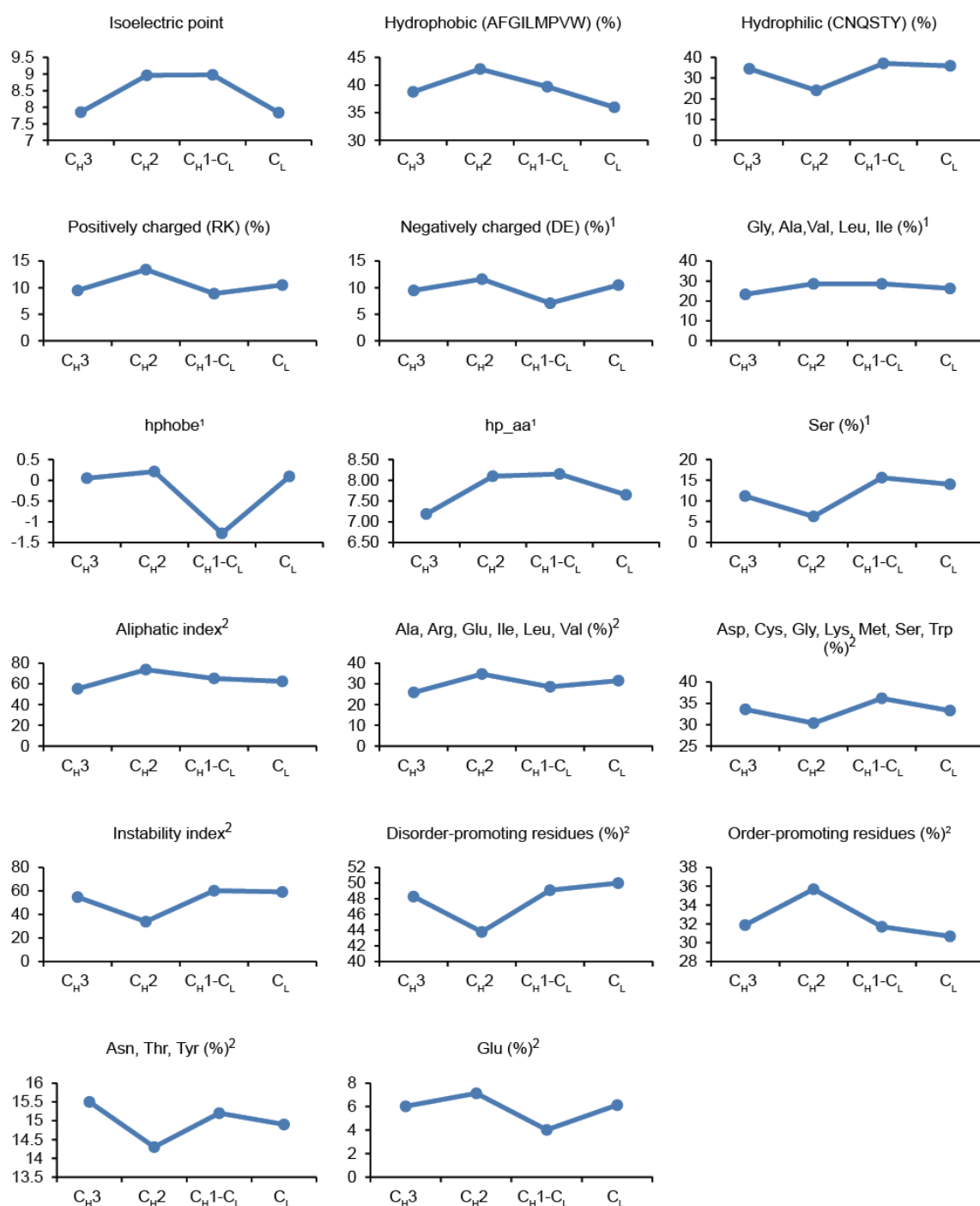


図 2-27：凝集に関与すると報告された各ドメインのアミノ酸組成を示した。各アミノ酸組成の内、上付き数字 1 および 2 がつくものは、それぞれ Goh ら(66)および Thomas ら(67)の報告を参考にした。

次に、アミノ酸配列にもとづいて aggregation prone regions (APRs)を探索するアルゴリズムである Aggrescan (68)および PASTA (69), Zygggregator (70-72), Tango (74)を用いた解析を行った。全てのアルゴリズムが、各ドメイン間で類似したアミノ酸配列領域に APRsが存在し、特に β シート構造を形成する領域において高い凝集性を示した(図 2-28)。各アルゴリズムの蛋白質全体の凝集性に対応するスコアを用いて、各ドメインの凝集性の序列を評価した場合、Zygggregator が本論文の実験結果と類似した序列を示した(図 2-29)。Zygggregator は、アミノ酸配列における複数のパラメーター(疎水性度、 α ヘリックス形成度、 β シート形成度、電荷、疎水性残基パターンおよびゲートキーパー残基)を基に蛋白質の凝集性を評価する。Zygggregator のアルゴリズムより算出された各パラメーターを表 2-7 に示した。上述したアミノ酸組成による評価と同様に、各パラメーターの大きさと実験により得られたコロイド安定性との間に相関が見られなかった。したがって、複数のパラメーターの組み合わせと各パラメーターの適切な重みづけがコロイド安定性を評価するのに重要であることを示していると考えられる。

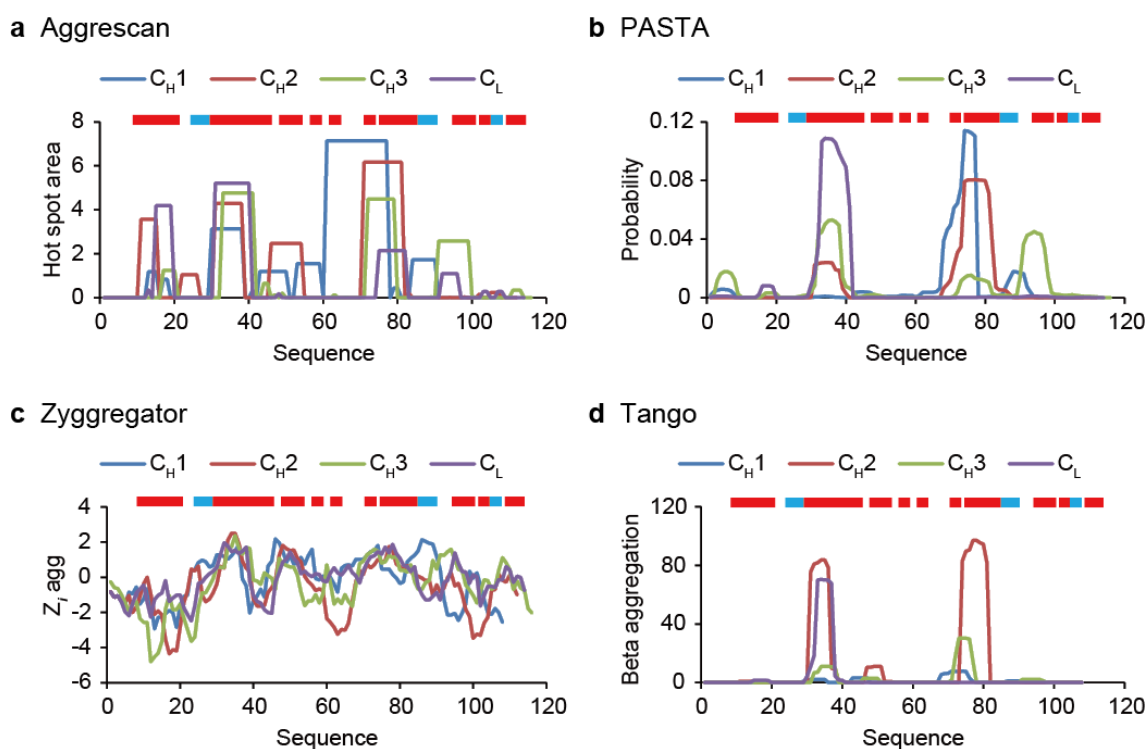


図 2-28 : Aggrescan (a)および PASTA (b)、Zygggregator (c)、Tango (d)による解析した各ドメインのアミノ酸配列における aggregation prone region を示した。各ドメインのモノマーとしてのアミノ酸配列を計算に用いた。各図の上部には C_H3 ドメインの二次構造の分布を示した。赤は β -シートを、青は α -ヘリックスを示している。

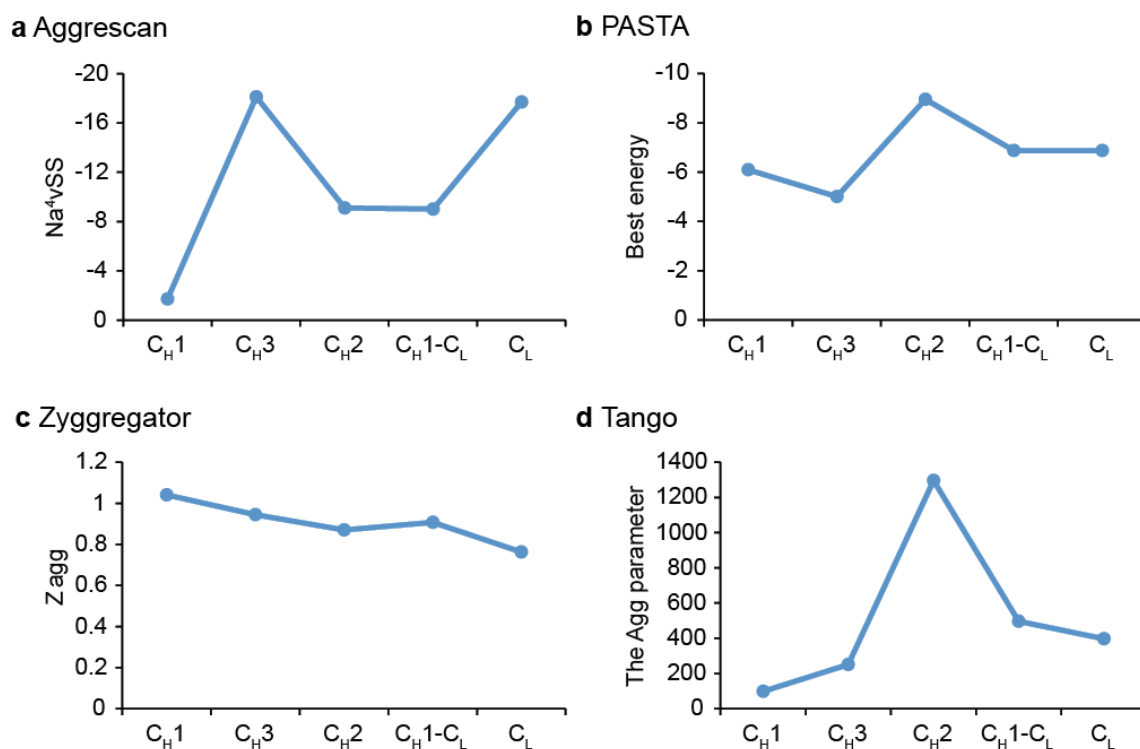


図 2-29： Aggrescan (a)および PASTA (b)、Zyggregator (c)、Tango (d)により解析した各ドメイン蛋白質全体の凝集性を示した。C_{H1} および C_{H3}、C_{H2}、C_L ではモノマーとしてのアミノ酸配列を、C_{H1-C_L} ではヘテロダイマーとしてのアミノ酸組成を計算に用いた。

表 2-7： zyggregator の各パラメーターの算出結果

parameter	C _{H3}	C _{H2}	C _L	C _{H1}
hydrophobicity	53.83	50.89	65.80	38.27
charge	19	24	20	16
beta sheet propensity	412.026	413.565	446.031	377.23
alpha helical propensity	436.723	436.198	458.493	399.961

最後に、蛋白質立体構造の表面特性に基づいて蛋白質の凝集体形成能を推定するアルゴリズムである spatial aggregation propensity (SAP) および developability index (DI) による解析を行った。SAP は蛋白質の天然状態の構造表面に存在する疎水性領域を探索するプログラムで、DI は疎水性の指標である SAP スコアと蛋白質の表面電荷から、蛋白質の凝集性を評価するプログラムである(75-77, 91)。IgG1 の Fab および Fc の結晶構造 (PDBID: 1N8Z (58) および 3D6G (59)) より各ドメインの立体構造を抽出し、計算を行った。計算結果として、SAP による解析では、いくつかの APR 領域が検出された。特に全てのドメインにおいてドメインのダイマー形成面側における疎水性度が高いことがわかった(図 2-30a-d)。DI による解析では、凝集性の序列は、C_{H3} モノマー > C_{H2} モノマー > C_L モノマーであり、本実験結果と大きな相関を示した(図 2-30e)。

天然状態の立体構造から SAP/DI により算出した凝集性が、酸変性状態の凝集体サイズから決定したコロイド安定性と一致したことから、各ドメインの凝集性について以下の事柄を推測できる。C_{H2} モノマーおよび C_{H3} ホモダイマーの凝集反応は、ランダムコイル状態とは異なる PPNN 状態を介して進行した。PPNN 状態は、イオンと荷電残基との相互作用により部分的な折りたたみ構造を形成していると考えられ、その部分的な折りたたみによって、PPNN 状態の構造表面の物性はより天然状態の物性に近いものになっていると予測される。また C_{H2} モノマーと C_{H3} モノマーの SAP スコアは類似した値を示し、最終的な DI 値の差には C_{H2} モノマーが高い電荷を有することに依存していると考えられる。アミノ酸組成においても、C_{H2} モノマーは最も多くの荷電性残基を持つこと示した。したがって、同程度の疎水性度をもつ C_{H2} モノマーと C_{H3} モノマーにおけるコロイド安定性の違いは、2つのドメイン間の電荷の違いに依存している可能性が高い。

C_{H3} モノマーは大きな DI 値を示したが、そのホモダイマーは小さい値を示した。C_{H3} ホモダイマーの疎水的な相互作用面の露出が、C_{H3} モノマーの大きな DI 値に関連していると考えられ、酸変性によるホモダイマーの解離が C_{H3} モノマーの凝集反応のトリガーになりうると考えられる。また、C_{H1} モノマーも大きな DI 値を示し、C_{H1}-C_L ヘテロダイマーの解離に伴って、C_{H1} ドメインを介した凝集反応が生じることが予測される。Feige らは、マウス由来 C_{H1} モノマーが、pH 2 および 100 mM NaCl 条件下で凝集することを報告している(87)。しかし、本研究では C_{H1}-C_L ヘテロダイマーは、酸変性後も凝集体を生じることなかった(図 2-22d)。これは優れたコロイド安定性をもつ C_L ドメインが C 末端のドメイン間ジスルフィド結合を介して C_{H1} ドメインの近傍に存在することによって、可溶化タグやシャペロンに類似した効果により C_{H1}-C_L ヘテロダイマー全体のコロイド安定性を向上させていることが考えられる。

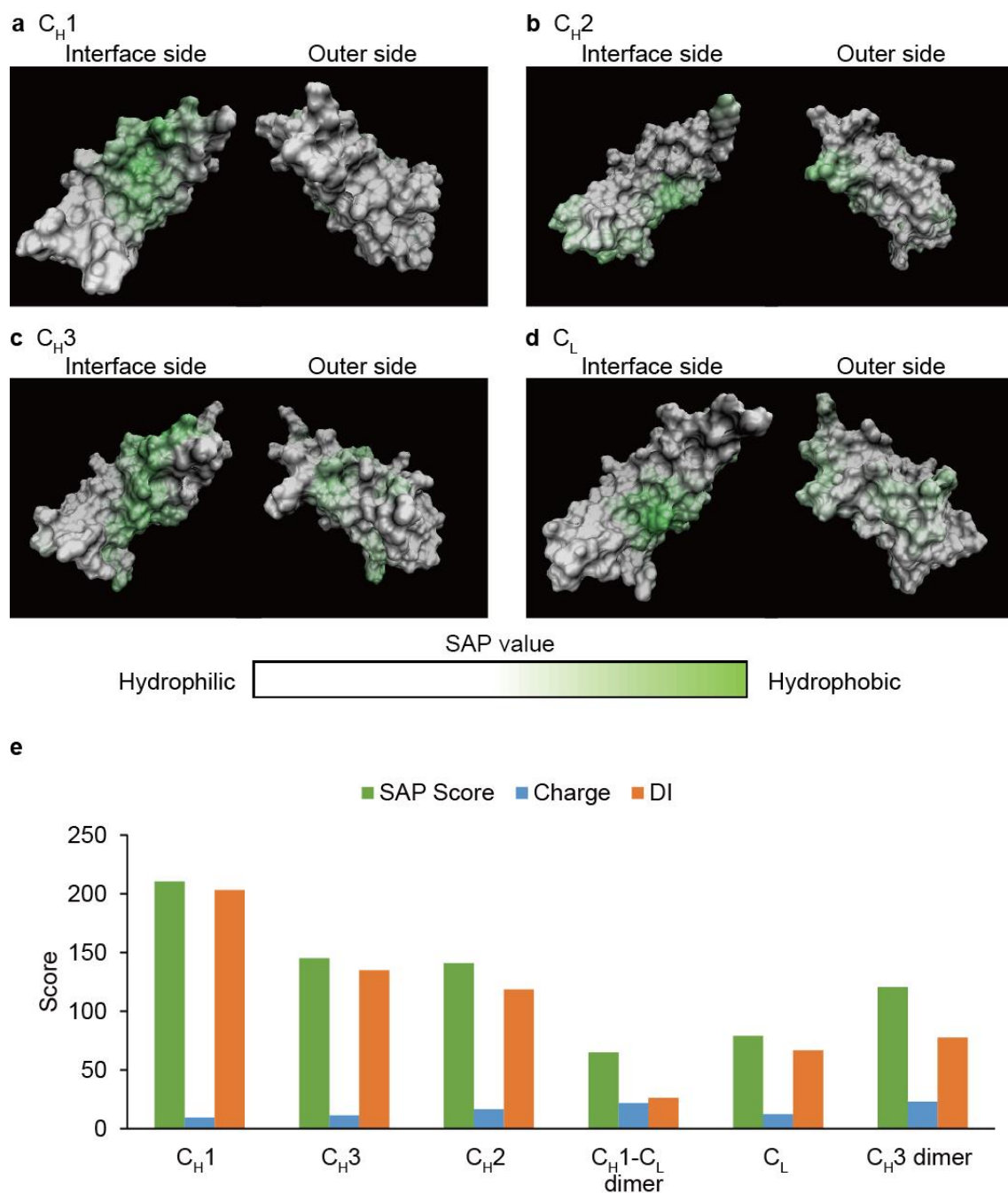


図 2-30 : (a) – (d)は、SAP アルゴリズムにより算出した各ドメインの構造表面における凝集性の解析結果を示す。(a) – (d)における各ドメインの立体構造は、IgG1 の結晶構造 (PDBID: 1N8Z (58)および 3D6G (59))を利用した。Inter face side および Outer side は、それぞれホモダイマー形成面とその反対面を示す。緑色が濃いほど、疎水性高いことを示す。(e)は、SAP スコアおよび電荷、DI 値の計算結果を示す。

2.6. まとめ

本章では、ヒト IgG1 ドメインを構成するドメイン(C_H2 モノマー、 C_H3 ホモダイマー、 C_L モノマー、 C_H1-C_L ヘテロダイマー)の広範な溶液条件(pH 2 – 8 および 0 – 300 mM NaCl)におけるコンホメーション安定性とコロイド安定性を解析することにより、各ドメインの溶液条件に応じた抗体全体の凝集反応への寄与を初めて明確に示すことができた。各ドメインは溶液条件に応じて、N 状態および MMNN 状態、PPNN 状態の三つの状態をとりうる。CD および蛍光スペクトル測定によるコンホメーション解析では、各ドメインのコンホメーション不安定性の序列は、 C_H2 モノマー > C_H3 ホモダイマー > C_H1-C_L ヘテロダイマー > C_L モノマーとなることを明らかにした。また動的光散乱測定による凝集反応の解析では、各ドメインのコロイド安定性の序列は、 C_H3 ホモダイマー > C_H2 モノマー > C_H1-C_L ヘテロダイマー \approx C_L モノマーとなることを明らかにした。さらにこれらのコンホメーション安定性とコロイド安定性の評価から、各ドメインが抗体全体の凝集反応における寄与の大きさの序列は、 C_H3 ホモダイマー > C_H2 モノマー > C_H1-C_L ヘテロダイマー > C_L モノマーとなることを明らかにした。酸変性状態では、300 mM までの NaCl 濃度条件において、 C_H3 ホモダイマーと C_H2 モノマーは凝集体を形成し、さらに凝集反応は天然状態やランダムコイル構造とは異なる部分的折りたたみ構造を有したコンホメーション状態を介して進行することが確認された。 C_H3 ホモダイマーのコロイド安定性が最も低いことから、抗体中の C_H3 ドメインの変性は急速かつ巨大な凝集体の形成を誘導するものと考えられる。一方、 C_H2 モノマーのコンホメーション安定性が最も低いことから、弱酸性(~pH 4)および高濃度 NaCl (> 200 mM)の溶液条件における凝集反応を主要に誘導するものと考えられる。SAP/DI を用いた凝集性の評価と本章の実験結果が対応したことから、PPNN 状態における部分的折りたたみ構造を有したコンホメーション状態は、ランダムコイル構造とは異なり、天然型構造の構造表面と類似した特性を有している可能性が高いことが示唆された。本章で明らかにした各ドメインが固有にもつ物性が、抗体またはその部分構造の凝集反応の解析により得られている知見と対応することから、ドメインレベルの物性を基礎とすることにより抗体全体の凝集反応機構を理解することが可能であることを明確に示すことができた。

第三章

F_c の解析

3.1. 序論

本章では、第二章に示した抗体ドメインが固有にもつ物性が、抗体が本来もつマルチドメイン構造中においてどのように反映されるのか、また抗体全体の凝集反応に対してどのように関与し得るのかを解析した。解析対象には、特に IgG1 の凝集反応に寄与していると考えられる C_H2 と C_H3 ドメインを含む Fc を用いた。pH 2 – 8 の溶液条件における Fc のコンホメーション変化を分析し、酸変性における Fc 中の C_H2 と C_H3 ドメインのそれぞれのコンホメーション変化を特定した。また 300 mM の NaCl を含む溶液条件における Fc の凝集反応を分析し、酸変性した C_H2 と C_H3 ドメインの Fc 全体の凝集反応への関与を明らかにした。

3.2. 実験手法

3.2.1. Fc の遺伝子配列を含むベクターの構築

ヒト由来 IgG1 の Fc (wtFc) の遺伝子配列を設計した。wtFc の遺伝子配列は、pFUSE-hIgG1-Fc1 プラスミド (InvivoGen) にコードされている DNA 配列を用いた。wtFc の遺伝子配列の N 末端側には、2 つのシステイン残基を有するヒンジ領域を含んでおり、合成された 2 本の wtFc ポリペプチドはヒンジ領域でジスルフィド結合により連結されることが予測される。N 末端にはヒスチジンタグを含まず、また N および C 末端には制限酵素切断部位を挿入している。wtFc の遺伝子 DNA 断片は、pFUSE-hIgG1-Fc1 プラスミドをテンプレートとして PCR 法により増幅した。wtFc 遺伝子 DNA 断片の増幅産物に対して、NdeI および EcoRI を用いて制限酵素切断処理を行った。作製した各遺伝子配列を pET22b (+) (Novagen) にライゲーションした。

以下に wtFc の分子量およびモル吸光係数、遺伝子配列、アミノ酸配列を示す。

wtFc

分子量

51,564 (二量体)

モル吸光係数

71,570 dm³mol⁻¹cm⁻¹ (二量体)

遺伝子配列

```
ATGGCAGACAAAACCTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
ACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC
CCCTGAGGTCACATGCGTGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
```

GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTCCGGGTAAATAA

アミノ酸配列

MADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

3.2.2. wtFc 蛋白質の発現および精製

wtFc 蛋白質の発現には大腸菌組換え発現系を用い、ドメイン蛋白質と同様の方法で行った(2.2.3.参照)。菌体破砕液の上清画分に対して、Hitrap protein G HP (GE healthcare) を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行った。平衡化バッファーには 20 mM リン酸バッファー pH 7.0 を用い、溶出バッファーには 20 mM グリシンバッファー pH 2.0 を用いた。精製蛋白質に対して、Resource S カラムを用いて陽イオン交換クロマトグラフィー、superdex 75 カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行った(2.2.3 参照)。精製した蛋白質の分子量と純度は、SDS-PAGE と TOF-MS を用いて確認した(図 3-1)。

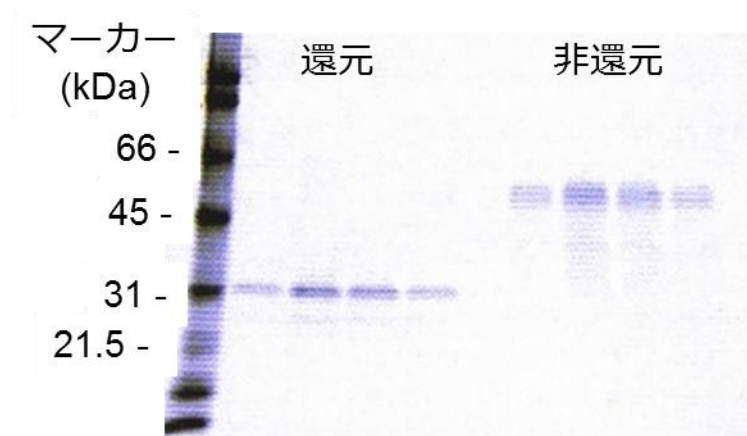


図 3-1 : サイズ排除クロマトグラフィー後の wtFc の精製画分の SDS-PAGE による解析結果を示した。左の 4 サンプルは 1% β -メルカプトエタノールの添加により還元処理を行い、右 4 サンプルは非還元処理のサンプルである。wtFc の分子量の理論値は非還元状態では 51,564.6、還元状態では 25,782.3 である。この結果から wtFc は中性 pH において N 末端で分子間ジスルフィド結合を形成していると考えられる。

3.2.3. 溶液調整

精製した wtFc および C_{H2} モノマー、C_{H3} ホモダイマーを、20 mM クエン酸-リン酸緩衝液 pH 7 に透析した後、限外濾過を用いて蛋白質濃度を wtFc では 150 μM、C_{H2} モノマーおよび C_{H3} ホモダイマーでは 500 μM まで濃縮した。20 mM リン酸溶液と 20 mM クエン酸溶液を、任意の割合で混合し 10 種類の pH の異なる溶液を作製した。また、20 mM グリシンバッファー pH 2 と 400 mM NaCl を含む同様の緩衝液を混合することによって、0 – 300 mM NaCl の条件範囲における計 31 種類の溶液を作製した。各溶液は、96 ウェルハーフプレート(Corning)のウェル上で調整した。動的光散乱測定直前に、濃縮した各蛋白質溶液を、Fc 蛋白質の終濃度が 15 μM、C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモダイマーは 50 μM となるように各溶液に添加した後、動的光散乱測定を開始した。測定終了後、pH メーターを用いて各測定溶液の pH を測定した。次に各溶液の円偏光二色性スペクトルを測定した。測定後、280 nm の吸光度を測定することによって蛋白質濃度を算出した。

3.2.4. 円偏光二色性スペクトル測定

分析装置は、J-1500 Spectropolarimeter (Jasco)を用いた。蛋白質濃度は、wtFc では 15 μM、C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモダイマーでは 50 μM とした。測定温度は 20°C、バンド幅は 1 nm、レスポンスは 8 sec、測定範囲は 195 – 260 nm、データ取込間隔は 0.1 nm、走査速度は 10 nm / min とした。セル長 0.02 cm の円筒型石英セルを使用した。測定スペクトルからバッファー溶液の CD スペクトルを差し引き、ベースライン補正を行った。

3.2.5. 動的光散乱測定

分析装置は、DynaPro PlateReader II (Wyatt)を用いた。蛋白質濃度は、wtFc は 15 μM、C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモダイマーは 50 μM とした。ウェルプレートは、96 Well Half Area UV Plate (Corning)を用いた。試料量は 100 μl とし、測定前に 0.22 μm の遠心フィルター (Millipore)に試料を通した。測定温度は 20.5°Cとした。Dynamic ソフトウェア(Wyatt)を用いて、測定した自己相関関数から拡散係数および平均粒子径を算出した。

3.3. 解析手法

3.3.1. 三状態転移解析

wtFc は酸変性において、以下の可逆連続的三状態転移を生じていると仮定した。



F はフォールド状態、I は中間状態、U はアンフォールド状態を示す。各コンホメーション状態の転移反応における平衡定数(K)の算出には、以下の式を用いた(92, 93)。

$$K_{F-I}(\text{pH}) = K_{F-I,\text{ref}}(1+10^{\text{p}K_{a,F-I}-\text{pH}})^{n_1}$$

$$K_{I-U}(\text{pH}) = K_{I-U,\text{ref}}(1+10^{\text{p}K_{a,I-U}-\text{pH}})^{n_2}$$

$K_{F-I,\text{ref}}$ および $K_{I-U,\text{ref}}$ は、標準平衡定数(a reference equilibrium constant)であり、溶液中のプロトン濃度が十分に低い条件下におけるコンホメーション状態間の平衡定数である。 $K_{a,F-I}$ および $K_{a,I-U}$ は、各状態転移反応における微視的酸解離定数(a microscopic dissociation constant)、 n_1 および n_2 は転移反応に関与するプロトン数に対応している。特異値分解から算出した第 1 および第 2 右特異ベクトル(2.3.1.参照)に対して、以下のフィッティング式を最小二乗法によりフィットさせることで各コンホメーション状態転移間の平衡定数を求めた。

$$Vn = \frac{Vn_F + Vn_I K_{F-I} + Vn_U K_{F-I} K_{I-U}}{1 + K_{F-I} + K_{F-I} K_{I-U}} \quad (n = 1, 2)$$

Vn ($n = 1, 2$) は第 n 右特異ベクトルを示す。 Vn_F および Vn_I, Vn_U は、それぞれフォールド状態、中間状態、アンフォールド状態の第 n 右特異ベクトルにおけるベースラインである。各コンホメーション状態の各 pH での存在比率(f_F, f_I, f_U)は、以下の式により算出した。

$$f_F = \frac{[F]}{[F]+[I]+[U]} = \frac{1}{1 + K_{F-I} + K_{F-I} K_{I-U}}$$

$$f_I = \frac{[I]}{[F]+[I]+[U]} = \frac{K_{F-I}}{1 + K_{F-I} + K_{F-I} K_{I-U}}$$

$$f_U = \frac{[U]}{[F]+[I]+[U]} = 1 - f_F - f_I$$

CH_2 モノマーの酸変性に関しては、以下に示すフォールド状態とアンフォールド状態間の 2 状態転移を仮定した。



CH_2 モノマーの 2 つのコンホメーション状態間の平衡定数の算出には、以下の式を用いた。

$$K_{F-U}(\text{pH}) = K_{F-U,\text{ref}}(1+10^{\text{p}K_{a,F-U}-\text{pH}})^{n_3}$$

$K_{F-U,ref}$ の値は、文献値の $\Delta G_{N \rightarrow U} = 15.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ を用いた(94)。C_H2 モノマーの CD スペクトルデータに対する特異値分解により得られた第 1 右特異ベクトルに対して、以下のフィッティング式をフィットすることにより平衡定数を求めた。

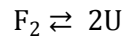
$$V1 = \frac{V1_F + V1_U K_{F-U}}{1 + K_{F-U}}$$

フォールド状態とアンフォールド状態の各 pH における存在比率は、以下の式に従い算出した。

$$f_F = \frac{[F]}{[F]+[U]} = \frac{1}{1 + K_{F-U}}$$

$$f_U = \frac{[U]}{[F]+[U]} = 1 - f_F$$

C_H3 ホモダイマーの酸変性に関しては、以下に示すダイマーのフォールド状態とモノマーのアンフォールド状態間の 2 状態転移を仮定した(54, 95)。



C_H3 モノマーの 2 つのコンホメーション状態間の平衡定数の算出には、以下の式を用いた。

$$K_{F_2-2U}(pH) = K_{F_2-2U,ref}(1+10^{pK_{a,F_2-2U} - pH})^{n_4}$$

$K_{F_2-2U,ref}$ の値は、文献値の $\Delta G_{U \rightarrow N} = -66.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ を用いた(54)。C_H3 モノマーの CD スペクトルデータに対する特異値分解により得られた第 1 右特異ベクトルに対して、以下のフィッティング式をフィットすることにより平衡定数を求めた。

$$V1 = \frac{V1_F + V1_U K_{F_2-2U}}{1 + K_{F_2-2U}}$$

フォールド状態とアンフォールド状態の各 pH における存在比率は、以下の式に従い算出した。

$$f_U = \frac{[U]}{P_t} = \frac{-A + \sqrt{A^2 + 4A}}{2}, \text{ ここで } A = \frac{K_{F_2-2U}}{2P_t}$$

$$f_N = \frac{2[F]}{P_t} = 1 - f_U$$

P_t は、モノマー換算の蛋白質濃度を示す。解析には、Igor (Wavemetrics)を用いた。

3.4. 実験結果

3.4.1. 円偏光二色性スペクトル測定による wtFc の二次構造解析

0 mM または 300 mM NaCl を含む pH 2 – 8 の条件範囲における wtFc および C_H3 ホモダイマー、C_H2 モノマーの CD スペクトルを測定し、各溶液条件における二次構造を解析した(図 3-2 および図 3-3)。中性および酸性溶液条件における CD スペクトルの吸収極大波長と極小波長を表 3-1 に示した。中性 pH 条件では、NaCl 濃度が 0 mM および 300 mM のどちらの溶液条件においても、wtFc は 200 nm 付近に吸収極大と 215 nm 付近に吸収極小をもつ CD スペクトルを示した(表 3-1 および図 3-2)。酸性 pH では、wtFc の 200 nm 付近の CD 強度が低下し、酸変性を生じた(図 3-2a および 3-3a)。NaCl を含まない場合は pH 2.58 で 200 nm 付近に吸収極小をもつランダムコイル型の CD スペクトルを示した(図 3-2a)。300 mM の NaCl が含まれる場合は、二段階のスペクトル変化が観測され、pH 3.60 – 4.20 では 210 nm 付近の極小値の強度変化が観測され、また pH 3.19 以下では 209 nm に極小をもつ CD スペクトルへと収束した(図 3-2b および図 3-3a)。

表 3-1 : wtFc の各溶液条件における CD スペクトルの吸収極大波長と吸収極小波長

Domain	Condition		Maximum (nm)	Minimum (nm)
	pH	NaCl		
wtFc	7.15	0	200	216
	6.83	300	202	214
	2.58	0	-	200
	2.51	300	-	209

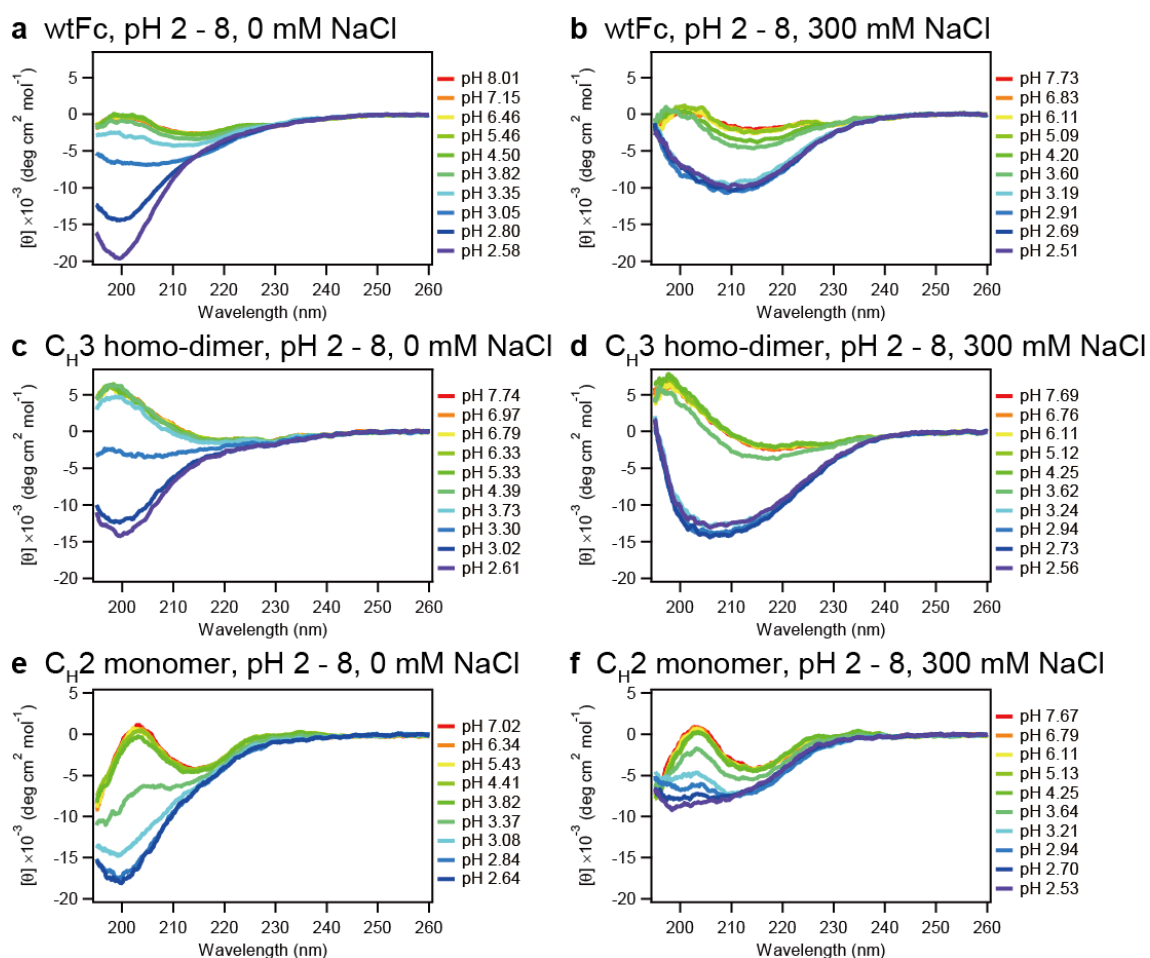
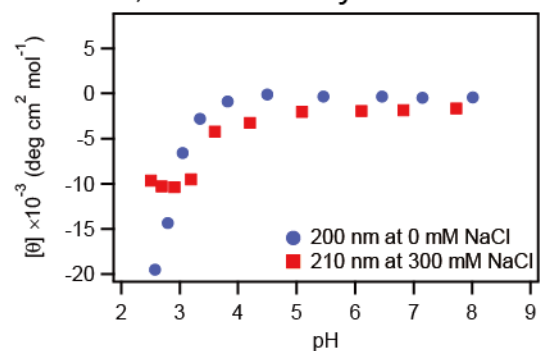
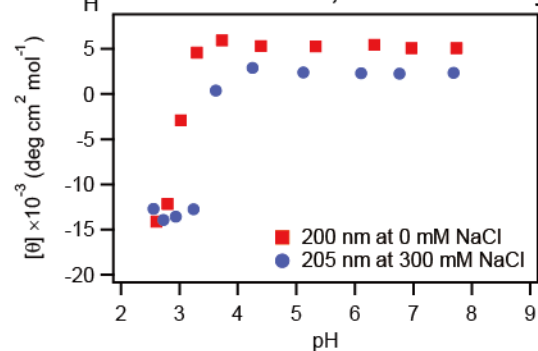


図 3-2 : NaCl を含まない条件での wtFc (a)と C_{H3} ホモダイマー (c)、C_{H2} モノマー (e)、および 300 mM NaCl を含む条件での wtFc (b)と C_{H3} ホモダイマー (d)、C_{H2} モノマー (f) の pH 2 - 8 の計 10 種の溶液条件における CD スペクトルを示した。

a wtFc, CD intensity



b C_H3 homo-dimer, CD intensity



c C_H2 monomer, CD intensity

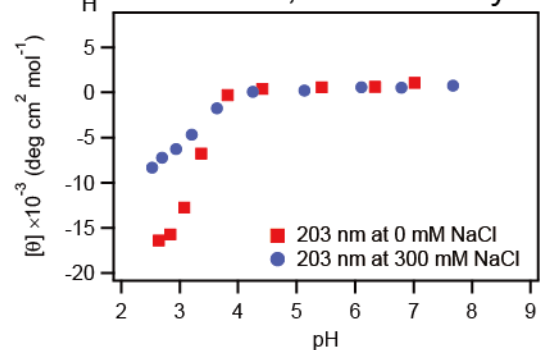


図 3-3 : 図 3-2 で示した各 pH 条件で測定した CD スペクトルの pH に応じた任意の波長における CD 強度変化を示した。波長は、pH に応じたスペクトル変化をよく反映する波長を任意に選択した。

3.4.2 特異値分解および三状態転移解析

wtFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインのそれぞれのコンホメーション変化に関する情報を抽出するため、測定した 0 mM NaCl での pH 2–8 における wtFc および C_{H3} ホモダイマー C_{H2} モノマーの CD スペクトルデータに対して特異値分解を行った。特異値および右特異ベクトルから算出した第一から第三主成分における寄与率および自己相関係数をそれぞれ表 3-2 および表 3-3 に、RMSD を図 3-4 に示した。wtFc の第二主成分の寄与率は、C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモダイマーに比べて、相対的に高い値を示した。また RMSD も wtFc では、C_{H3} ホモダイマーと C_{H2} モノマーと比較して第二主成分の寄与が大きいことがわかった (図 3-4)。第一および第二左特異ベクトルでは、ノイズの小さいスペクトルの形状を有していたが、第三左特異ベクトルは短波長側でノイズが大きかった (図 3-5a)。第一および第二右特異ベクトルでは、pH 5–8 にかけてベースラインが直線的であり、また pH 2–4 にかけての変化が協同的であることから、蛋白質の酸変性反応を示しているものと考えられる (図 3-5b)。さらに第一右特異ベクトルの値が pH 8 から pH 2 にかけて連続的な減少を示す一方で、第二右特異ベクトルでは pH 3.05 で極大値を持つ上に凸の分布を示した。このことから、pH 3.05 付近には第二左特異ベクトルで示される中間状態の蓄積が生じていると考えられる。これらの結果から、wtFc の酸変性反応には、pH 8 から pH 2 にかけて三状態転移が生じており、2 つのコンホメーション状態転移および 3 つのコンホメーション状態、すなわちフォールド状態および中間状態、アンフォールド状態が存在することが示された。

C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモダイマーの CD スペクトルデータにおける特異値分解では、第一左特異ベクトルのみがノイズの小さなスペクトル形状を示し、また第一右特異ベクトルが pH 2–8 にかけて協同的な変化を示すことから、コンホメーション状態転移に対応していると考えられる (図 3-5c-f)。第二および第三右特異ベクトルは、pH 変化に応じた協同的な変化を示さず、コンホメーション状態転移には対応していないと考えられる。したがって、C_{H2} モノマーおよび C_{H3} ホモダイマーでは、pH 2–8 にかけて二状態転移を生じていることが示された。

表 3-2：特異値から算出した寄与率

protein	contribution ratio (%)		
	first	second	third
wtFc	98.69	1.27	0.02
C _H 2 monomer	99.71	0.12	0.08
C _H 3 homo-dimer	99.84	0.08	0.03

表 3-3：右特異ベクトルから算出した自己相関係数

Protein	auto correlation co-efficient		
	first	second	third
wtFc	0.622	0.404	0.284
C _H 2 monomer	0.716	0.490	−0.030
C _H 3 homo-dimer	0.646	0.694	−0.027

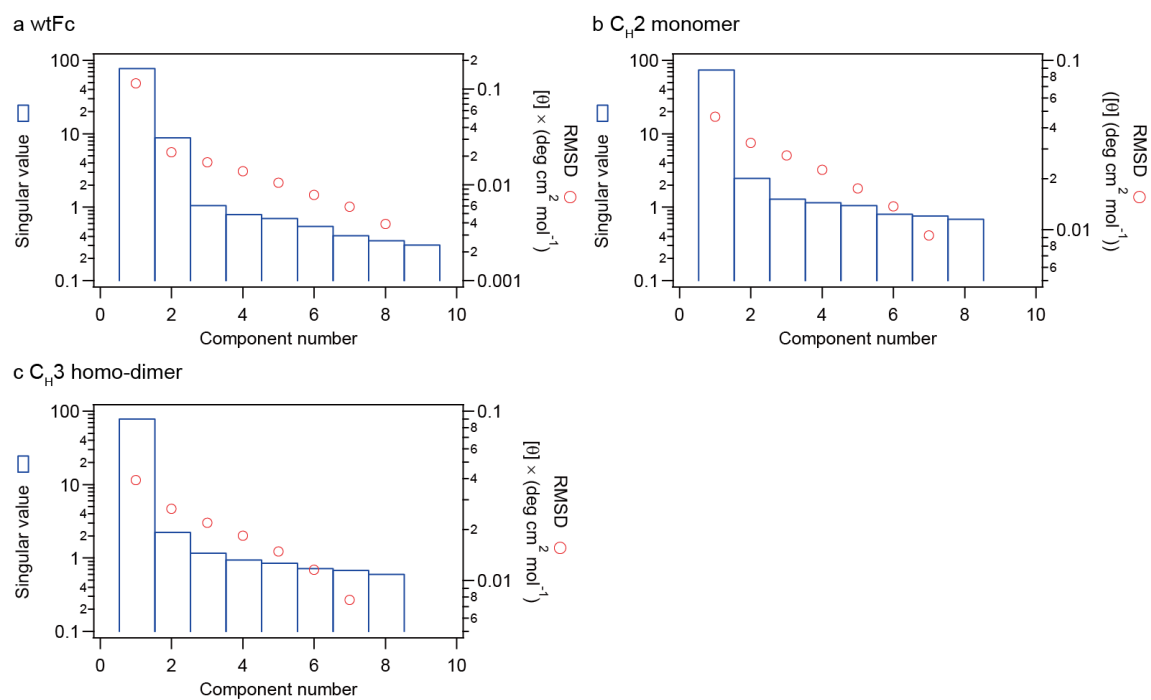


図 3-4 : wtFc (a)および C_{H2} モノマー (b)、C_{H3} ホモダイマー (c)の NaCl を含まない条件での CD スペクトルデータに対する特異値分解により算出した特異値および RMSD を示した。

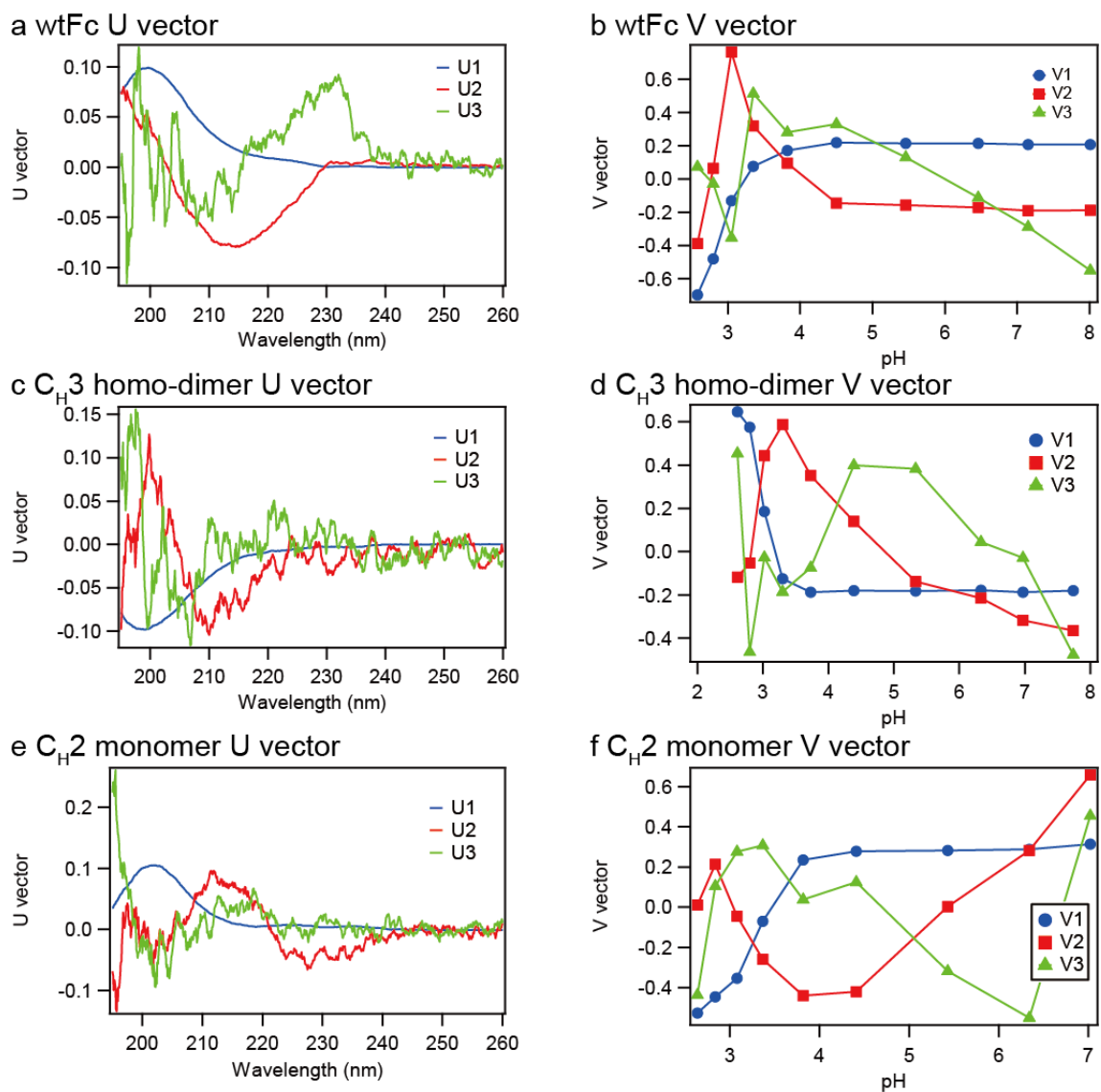


図 3-5 : (a)および(c)、(e)ではそれぞれ wtFc および C_{H3} ホモダイマー、C_{H2} モノマーの第三主成分までの左特異ベクトルを示した。(b)および(d)、(f)ではそれぞれ wtFc および C_{H3} ホモダイマー、C_{H2} モノマーの第三主成分までの右特異ベクトルを示した。

pH 変化に対して上位の右特異ベクトルが描く曲線は pH 変化に応じたコンホメーションの状態転移に対応していると考えられることから、コンホメーション状態転移の理論式を用いて、右特異ベクトルに対してフィッティングを行うことで、各コンホメーション状態転移の平衡定数と各コンホメーション状態の pH 変化に応じた存在比率の変化を算出した。wtFc の酸変性には、3 つのコンホメーション状態が存在すると考えられることから、算出した第 1 および第 2 右特異ベクトルに対して三状態転移の理論式を用いてフィッティングを行い、フォールド状態から中間状態、または中間状態からアンフォールド状態へのそれぞれの転移反応の平衡定数と、各コンホメーション状態の存在比の変化を算出した(図 3-6a と d)。同様に、単独状態の C_{H2} モノマーおよび C_{H3} ホモダイマーの第 1 右特異ベクトルに対しては、二状態転移解析を行い、フォールド状態とアンフォールド状態の状態転移の平衡定数および存在比率を算出した(図 3-6b – d)。算出した wtFc および C_{H2} モノマー、C_{H3} ホモダイマーの各パラメーターと変性 pH 中点の計算結果をそれぞれ表 3-4 および表 3-5 に示した。wtFc の 2 つの変性曲線が、それぞれ C_{H2} モノマーおよび C_{H3} ホモダイマーの変性曲線との対応を示すことから、wtFc で観測された 2 つのコンホメーション状態転移は、wtFc 内の C_{H2} ドメインと C_{H3} ドメインの状態転移に対応していると考えられる(図 3-7)。wtFc 中の 2 つのドメインはそれぞれ独立的に酸変性を生じており、そのコンホメーション安定性は、各々のドメインがもつ固有のコンホメーション安定性に依存していると考えられる。したがって、wtFc においては、マルチドメイン構造形成が wtFc 中の各ドメインのコンホメーション安定性に与える影響は少ないことが示唆される。

表 3-4 : 3 状態転移解析により得られた各パラメーター

parameter	protein		
	wtFc	C _{H2} monomer	C _{H3} homo-dimer
pK _{a1}	5.11 ± 0.26	4.46 ± 0.16	5.05 ± 0.05
n ₁	1.50 ± 0.26	2.36 ± 0.30	6.57 ± 0.17
pK _{a2}	4.50 ± 0.87	-	-
n ₂	7.14 ± 3.54	-	-
V _{1,F}	0.21 (fixed)	0.296 ± 0.01	0.65 ± 0.00
V _{1,I}	-0.13 (fixed)	-	-
V _{1,U}	-0.70 (fixed)	-0.533 ± 0.02	-0.18 ± 0.00
V _{2,F}	-0.18 (fixed)	-	-
V _{2,I}	1.20 ± 0.29	-	-
V _{2,U}	-0.39 (fixed)	-	-

wtFc における pK_{a1} および pK_{a2} は、それぞれ pK_{aF-I} および pK_{aI-U} に対応している。

表 3-5 : wtFc および C_{H2} モノマー、C_{H3} ホモダイマーの変性 pH 中点

protein	midpoint pH ₁	midpoint pH ₂
wtFc	3.27	2.84
C _{H2} monomer	3.32	-
C _{H3} homo-dimer	3.00	-

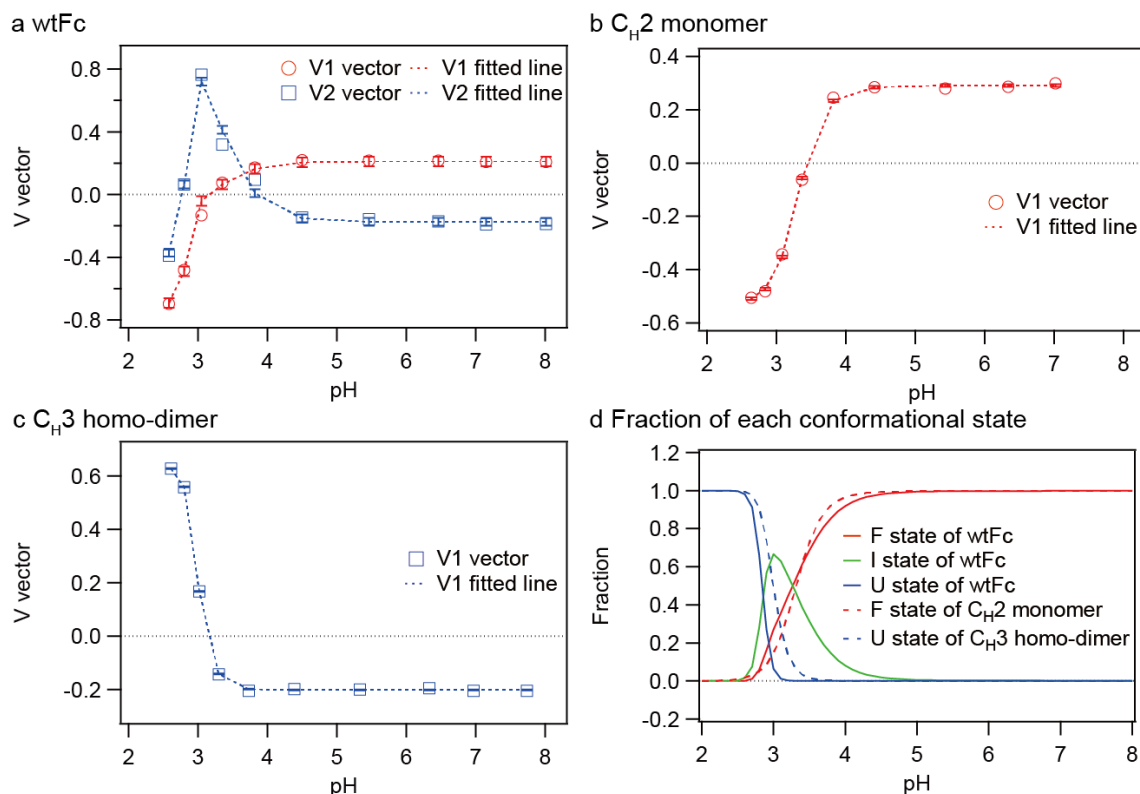


図 3-6: (a)は wtFc の上位二つの右特異ベクトルに対するフィッティング結果を示した。点は右特異ベクトルの値、点線はフィッティング結果を示す。(b)と(c)はそれぞれ C_H2 モノマーと C_H3 ホモダイマーの第一右特異ベクトルに対するフィッティング結果を示した。フィッティングラインには、各測定点でのフィッティング誤差の平均値を示した。(d)はフィッティングにより得られた wtFc および C_H2 モノマー、C_H3 ホモダイマーの各コンホメーション状態の存在比の変化を示した。実線は wtFc、点線は C_H2 モノマーおよび C_H3 ホモダイマーの存在比の変化を示した。F state および I state、U state はそれぞれフォールド状態および中間状態、アンフォールド状態を示す。

wtFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインが独立して変性する場合、図 3-7 に示すような酸変性経路を想定できる。この酸変性経路には、4 つの分子種(C_{H2}(F)-C_{H3}(F), C_{H2}(U)-C_{H3}(F), C_{H2}(F)-C_{H3}(U), C_{H2}(U)-C_{H3}(U))が存在する。F と U は、wtFc 中の C_{H3} または C_{H2} ドメインが、それぞれフォールド状態またアンフォールド状態を有していることを示している。しかし、実験ではこのうち 3 つのコンホメーション状態のみが観測された。C_{H2} ドメインが C_{H3} ドメインよりも先に変性することから、実験では図 3-5 において点線で囲んだ酸変性経路が主に生じていると考えられる。C_{H2}(F)-C_{H3}(U)は、分子の存在量が少ないために特異値分解で抽出できなかったのだと考えられる。

3.4.1.では、300 mM の NaCl が含まれる場合において、pH 3.60 – 4.20 と pH 2.51 – 3.19 のそれぞれの pH 領域において二段階のスペクトル変化が観測されたことを示した(図 3-2b と図 3-3a)。これらは、上述した NaCl を含まない場合の解析と同様にそれぞれ wtFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインの独立した酸変性反応に対応していると考えられる。ただし、300 mM NaCl を含む場合は、NaCl を含まない場合に比べて、wtFc 中の二つのドメインの酸変性開始 pH がより高 pH 側で生じた。これは、後述するように 300 mM NaCl を含む溶液では、wtFc および C_{H2} モノマー、C_{H3} ホモダイマーが変性を伴った凝集体を形成しているためと考えられ、アンフォールド状態の分子が不可逆的な凝集反応にトラップされることで、フォールド状態の見かけの減少が速くなり、見かけの変性 pH が上昇したのだと考えられる。

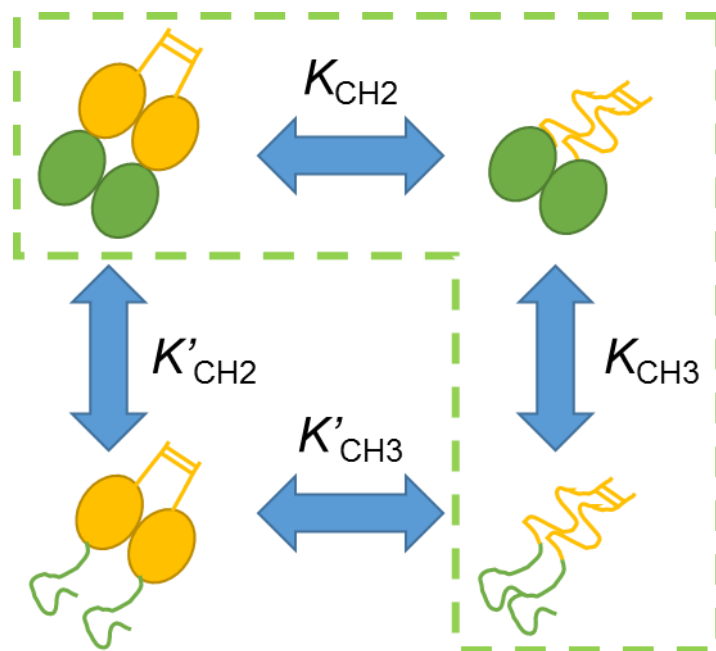


図 3-7 : wtFc の酸変性経路

3.4.3. 動的光散乱測定による wtFc の凝集解析

pH 2 – 8 の溶液条件範囲において wtFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインの独立した酸変性に伴う wtFc の凝集反応を解析した。NaCl を溶液中に含まない場合には wtFc の凝集反応は観測されなかった。300 mM NaCl を含む溶液条件では、二段階の粒子サイズの増加が観測され、pH 3.60 – 4.20 でわずかな粒子サイズの増加が、pH 2.51 – 3.19 ではより大きな粒子サイズの増加を示した(図 3-8a と e)。pH 3.19 から pH 2.51 にかけて、pH の低下に伴った粒子サイズの減少がみられた。C_{H2} モノマーおよび C_{H3} ホモダイマーについても、同様に pH 2 – 8 の粒子サイズを測定した(図 3-8b–g)。C_{H2} モノマーでは pH 3.64 以下、C_{H3} ホモダイマーでは pH 3.61 以下で粒子サイズの増加が観測された。C_{H3} ホモダイマーは C_{H2} モノマーに比べて、より大きな凝集体を形成した。wtFc の凝集開始 pH および凝集体サイズと、C_{H3} ホモダイマーと C_{H2} モノマーのそれぞれの pH および凝集体サイズの間に相関がみられることから、wtFc の凝集反応は、独立に変性したドメイン(pH 3.60 – 4.20 では C_{H2} ドメイン、pH 2.51 – 3.19 では C_{H3} ドメイン)が凝集反応を主導し、さらに形成される凝集体のサイズは変性したドメインが固有にもつコロイド安定性に相対的に依存することがわかった(図 3-10a)。また各試料の凝集体サイズの経時変化の様子は、pH に応じて異なる特徴を示した(図 3-8a–c)。例えば、C_{H3} ホモダイマーでは、pH 2.91 以下では反応開始直後、急激に粒子サイズが増加し、その後穏やかな粒子サイズの増加が起こった(図 3-8c)。pH 3.20 では、開始直後の粒子サイズは pH 2.91 よりも遅かったが、その後の反応では最も大きな粒子サイズをもつ凝集体を形成した。pH 3.61 では反応開始直後は粒子サイズの増加が観測されなかったが、反応 4 時間後において粒子サイズが増加し始め、凝集開始までにラグタイムが存在した。

wtFc の凝集反応に対する NaCl 濃度変化の影響を調べるため、wtFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインが共に変性している pH 2 において、0 – 300 mM NaCl の範囲における wtFc および C_{H2} モノマー、C_{H3} ホモダイマーの凝集反応を解析した(図 3-9)。wtFc では、50 mM 以上の NaCl 濃度条件下において凝集体を生じた(図 3-9a)。C_{H3} ホモダイマーでは 50 mM 付近以上の NaCl 濃度条件下で凝集体を生じたが、C_{H2} モノマーの凝集反応は 200 mM 付近の NaCl 濃度条件下まで生じなかった(図 3-9b と c)。wtFc と C_{H3} ドメインの凝集開始 NaCl 濃度が近いことから、50 mM NaCl 付近で生じる wtFc の凝集反応には、C_{H3} ドメイン間の相互作用が wtFc の凝集反応に関与していることが示唆される(図 3-10b)。また粒子サイズの蛋白質濃度依存性を確認するため、7.5 – 50 μ M の蛋白質濃度における粒子サイズを表 3-6 に示した。wtFc の粒子サイズは、7.5 – 50 μ M の C_{H3} ホモダイマーが形成した凝集体よりも小さく、wtFc は C_{H3} ホモダイマーに比べて優れたコロイド安定性を有することがわかった。C_{H2} モノマーおよび wtFc 中で変性した C_{H2} ドメインがコロイド安定性に優れていることから、wtFc 中では C_{H2} ドメインが C_{H3} ホモダイマーと連結することによって、C_{H3} ホモダイマーの低いコロイド安定性を補い、wtFc 全体のコロイド安定性を向上させていると考えられる。

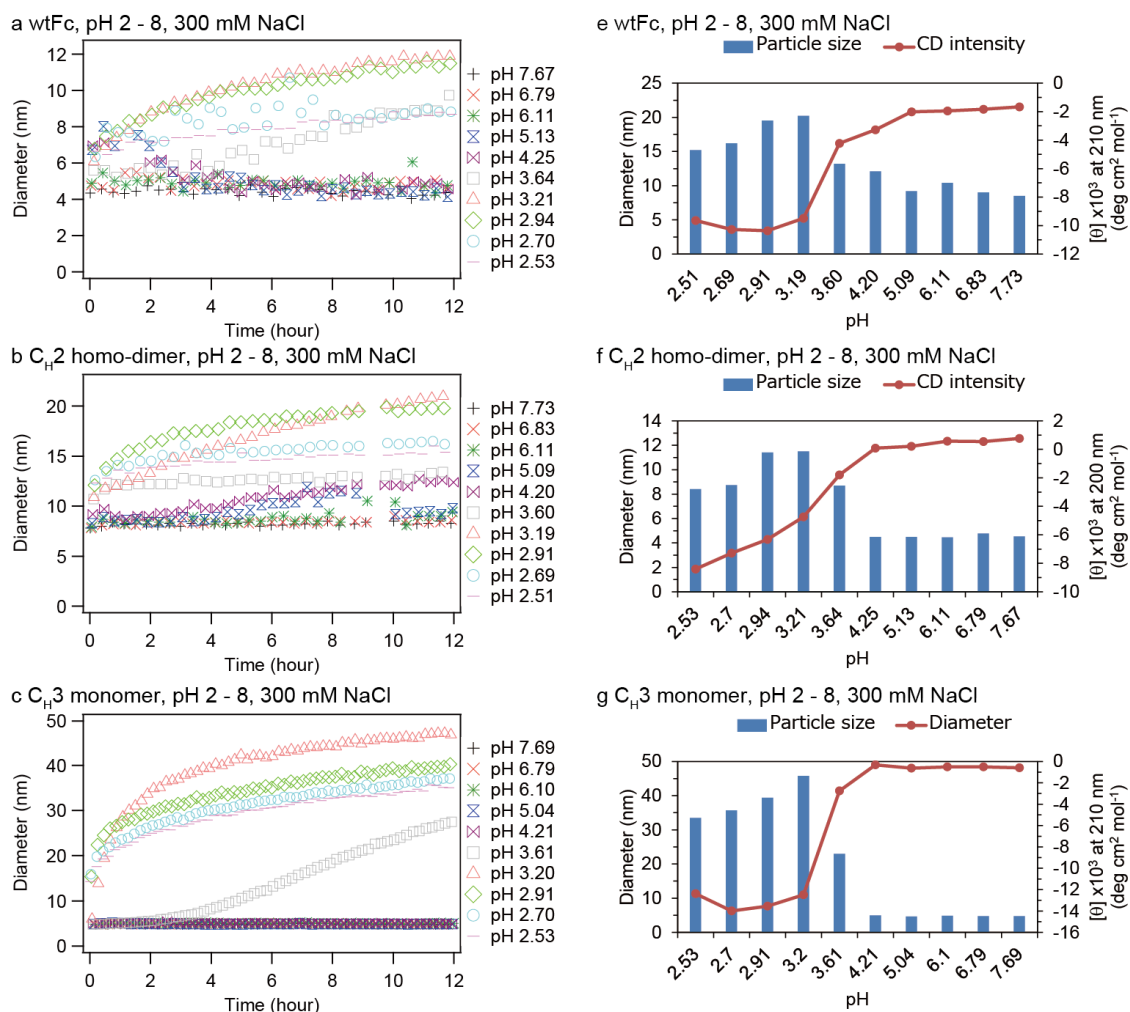


図3-8: (a - c) wtFcおよびC_H2モノマー、C_H3ホモダイマーのpH 2 - 8および300 mM NaCl条件における凝集反応の経時変化を示した。(e - g) 反応開始10時間後の各pHの粒子サイズとCD強度変化を示した。青棒は粒子サイズを、赤線はCD強度を示している。蛋白質濃度は、wtFcは15 μM、C_H2モノマーとC_H3ホモダイマーは50 μMを用いた。

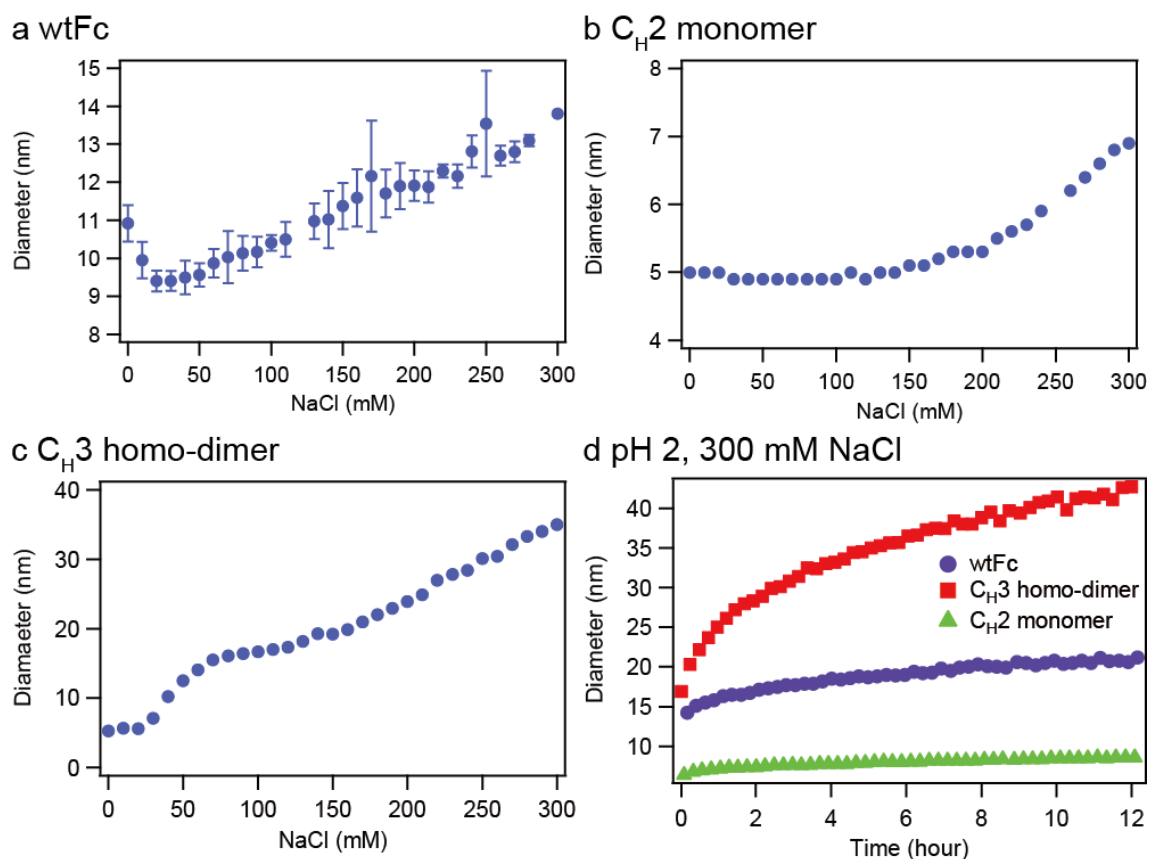


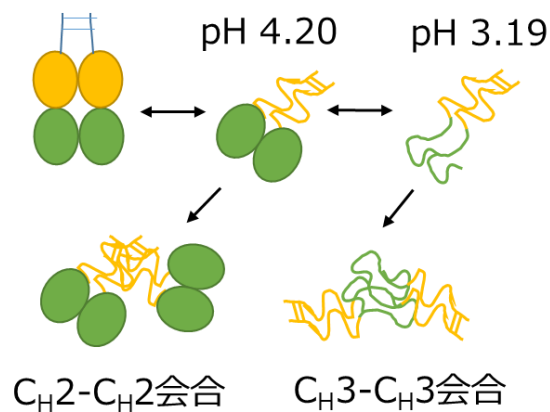
図 3-9 : (a) – (c) wtFc および C_{H2} モノマー、C_{H3} ホモダイマーの 0 – 300 mM NaCl における各 NaCl 濃度の凝集反応開始 10 時間後における粒子サイズをプロットした。蛋白質濃度は、wtFc は 15 μM、C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモダイマーは 50 μM を用いた。試料溶液は、任意の濃度の NaCl を含む 20 mM グリシンバッファー pH 2.0 と蛋白質試料溶液を 9 : 1 で混合しており、混合後の溶液の pH は pH 2.23 ± 0.01 である。wtFc の測定は独立した 3 回のデータ測定を行い、その平均値と標準偏差をプロットした。(d) 凝集反応開始後の粒子サイズの経時変化をプロットした。全試料の蛋白質濃度は 50 μM とした。

表 3-6 : wtFc および C_{H2} モノマー、C_{H3} ホモダイマーの粒子サイズの蛋白質濃度依存性

protein	concentration (μM)		
	7.5	15	50
diameter (nm)			
wtFc	-	14	20.5
C _{H2} monomer	-	-	6.9
C _{H3} homo-dimer	24	27.8	35.9

7.5 μM および 15 μM における C_{H2} モノマーの粒子サイズは、散乱光が弱いために測定できなかった。7.5 μM における wtFc の粒子サイズは測定を行っていない。

a pH 2 – 8, 300 mM NaCl条件における凝集反応経路



b pH 2, 0 – 300 mM NaCl条件における凝集反応経路

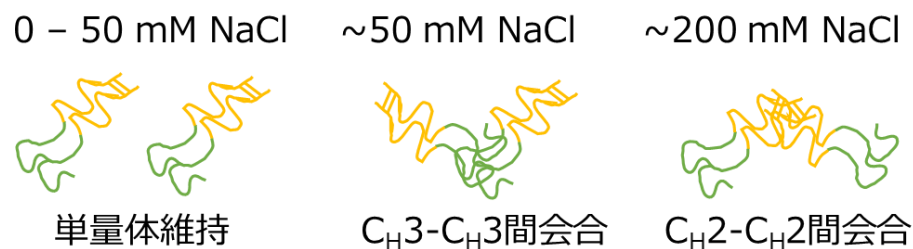


図 3-10 : 実験結果より推測される 300 mM NaCl を含む pH 2 – 8 (a)および pH 2 における 0 – 300 mM NaCl 条件範囲(b)における wtFc の凝集反応経路を示した。

3.5. 考察

3.5.1. wtFc を構成するドメインのコンホメーション安定性の独立的な振る舞い

wtFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインは、独立的な酸変性を生じ、それぞれのドメインのコンホメーション安定性は、単独ドメインがもつ安定性と同程度のものであった(図 3-6)。wtFc においてはマルチドメイン構造の形成が C_{H2} と C_{H3} ドメインのコンホメーション安定性に与える影響は少ないことが示唆される。既報の Fc の結晶構造(PDBID: 3D6G(59))を参照した場合に、C_{H2}-C_{H3} ドメイン間に存在する相互作用数は、C_{H3}-C_{H3} ドメイン間に比べて少ないため、C_{H2}-C_{H3} ドメイン間のイオン結合や疎水性相互作用等を介した直接的な相互作用による安定化効果は少ないと考えられる(表 3-7)。各ドメインの空間的な独立性が高いことは、各々のドメインのフォールディング効率を向上させ、速度論的に競合する凝集反応を回避することに貢献していると考えられる(96)。Budyak らは、intracellular lipid-binding proteins (iLBPs)の凝集性が低い要因に、Φ 値解析よりフォールディング反応における速やかなβ-バレル構造の形成が関与することを報告している(97)。またこの空間的な独立性は、各ドメインに動的な柔軟性を与えることが予測される(57, 98)。Fc のドメイン間の動きは FcγRI との強固な結合を形成するのに重要であることが報告されており、生物学的な機能と密接に関連している可能性が高い(99)。

Fab を用いた解析では、V_H と V_L ドメインが C_{H1}-C_L ドメインと連結した Fab を形成した場合、変性剤に対する平衡論的なコンホメーション安定性が単独ドメインの場合に比べて向上することが報告されている(57)。しかし、この安定化効果は、V_H または V_L ドメインが不安定な場合に明確に観測され、V_H と V_L ドメインがともに安定性が高い場合には、Fab 形成による安定化効果は観測されない。本章で解析した wtFc の C_{H2} と C_{H3} ドメインの酸変性 pH 中点も互いに近い位置に存在することから、wtFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインの連結によるコンホメーション安定性に対する効果も少ないのではないかと考えられる。

C_{H2} ドメインは、C_{H3} ドメインより高い pH で酸変性を生じた。酸性 pH 条件下でプロトン化するアミノ酸(アスパラギン酸およびグルタミン酸)および分子間の斥力に関与する正電荷をもつアミノ酸残基(リジンおよびアルギニン)の数を表 3-8 に示した。C_{H2} ドメインにおける荷電残基の数が、特にリジン残基の数が、C_{H3} ドメインよりも多く、中性 pH 条件では全体として C_{H2} ドメインは C_{H3} ドメインより+2 の正電荷を有していると考えられる。C_{H3} ドメインは非共有結合的な二量体形成を介してコンホメーション安定性を向上させていることを考慮する必要があるが、C_{H2} ドメインは C_{H3} ドメインに比べて、酸性 pH 条件下において正電荷を介したより大きな分子内斥力を発生させていると予測され、より高い pH での酸変性を引き起こす要因となっていると考えられる。このことは表 3-4 における C_{H2} と C_{H3} ドメインの酸変性反応におけるパラメーター n の値に反映されており、C_{H2} はより少ない数の負電荷アミノ酸残基におけるプロトン化により酸変性反応が引き起こされることを示唆している。

表 3-7 : wtFc におけるドメイン間の相互作用数

interaction	numer of counts
C _H 2-C _H 3 inter-domain interaction	99
C _H 3-C _H 3 inter-domain interaction	249
C _H 2 intra-molecular interaction	2295
C _H 3 intra-molecular interaction	2235

ある残基から 8Å 以内に存在するアミノ酸残基の数を示す。計算には、COCOMAPS を用いた(100)。計算には Fc の結晶構造(PDBID : 3D6G (59))を使用した。C_H2-C_H2 ドメイン間の分子間相互作用(糖鎖を介した相互作用は除く)は検出されなかったため記載していない。

表 3-8 : C_H2 と C_H3 ドメインに含まれる荷電残基数

domain	aspartic acid	glutamic acid	lysine	arginine
C _H 2	5	8	12	3
C _H 3	4	7	8	3

3.5.2. wtFc を構成するドメインのコロイド安定性の相補的な振る舞い

wtFc の凝集反応では、C_H2 と C_H3 ドメインのコロイド安定性が相互に影響を及ぼし合い、wtFc 全体の凝集反応が C_H3 ダイマーに比べて抑制されることがわかった(図 3-8)。Wright らは、マルチドメイン蛋白質において並列するドメイン間の配列同一性が低い場合に、マルチドメイン蛋白質全体の凝集性が抑制されることを報告している(101)。抗体中の定常領域を構成するドメインの配列相同性も 30% 以下で低い値を示した(表 2-6)。抗体中の C_H3 ドメインはホモダイマーを形成し抗体全体の構造維持において重要だが、ホモダイマー形成に関与する相互作用部位の大きな疎水性領域がコロイド安定性の低下を招いていると考えられる(図 2-30c)。このことから、C_H2 ドメインの優れたコロイド安定性は、wtFc 全体のコロイド安定性を向上させるために進化上獲得された形質と推定することができる。マルチドメイン構造を形成する蛋白質の変性状態において、コロイド安定性の相互作用により蛋白質全体の凝集反応を抑制させているという報告はこれまでにない。一般的に Glutathione-S-transferase (GST) や maltose-binding protein (MBP) などの可溶性の高い蛋白質を可溶性の低い目的蛋白質に付加した場合に、目的蛋白質の発現効率や可溶性の向上につながることが経験的に知られているが、この場合にもフォールディング途上におけるコロイド安定性の向上が凝集抑制に効いているのだと推測される(102, 103)。さらに C_H1-C_L ヘテロダイマーにおいても、C_H1 モノマーではコロイド安定性が低い(87)、C_L モノマーと共発現することによりコロイド安定性が向上することを示した(図 2-22d)。抗体全体ではコロイド安定性に劣るドメイン(C_H1 と C_H3 ドメイン)を、コロイド安定性に優れるドメイン(C_H2 と C_L ドメイン)と組み合わせることによって、抗体全体としてのコロイド安定性を最適化している可能性が考えられる。

3.5.3. 凝集体構造に関する考察

蛋白質の凝集反応には、フラクタル的な性質を見出せることが知られている(104)。凝集体構造がもつフラクタル次元は、その凝集体の単位サイズあたりの粒子密度に対応し、フラクタル次元が大きいほどより密に詰まった凝集体、小さいほどより粗な凝集体となり、また同じ数の粒子が凝集体を形成する場合、密に詰まった凝集体の流体力学的な粒子サイズが小さくなる(105)。例えば、分子間斥力が小さいために拡散が凝集反応の律速となった場合に形成される凝集体のフラクタル次元はおよそ 1.8 であり、分子間の斥力が増加し凝集速度において会合反応速度が律速となったより緩慢な凝集反応の場合の凝集体のフラクタル次元は目安として 2.5 程度になる。拡散律速凝集に比べて、緩慢凝集の方がより密に詰まった凝集体が形成される。

本章では wtFc および C_H2 モノマー、C_H3 ホモダイマーにおいて pH 変化に応じた凝集体サイズの経時的な増加曲線が変化することを示した(図 3-8)。この増加曲線の変化について、上記に示した凝集体のフラクタル次元の考え方を適応することができると考えられる。ここでは最もその変化を認識しやすい C_H3 ホモダイマーを例として考察する。

図 3-8c について両対数グラフをとった場合(図 3-11)、その直線の傾きは毎時の凝集体サイズ(直径)の増加率を示し、この傾きはフラクタル次元の逆数に比例するとされている(106)。pH 3.61 から pH 2.53 にかけて傾きが小さくなることから、pH が低下するにつれてフラクタル次元が増加していることがわかる。pH 2.91 以下の両対数プロットの傾きは相互に一致することから、フラクタル次元がほぼ一定であることを示している。pH が低下した場合、酸性アミノ酸残基がプロトン化されるために、塩基性アミノ酸残基の正電荷による分子間斥力が大きくなることにより凝集反応が緩慢になり、生じる凝集体の密度が増加しているのだと考えられる。

また図 3-7c の pH 3.61 では凝集体サイズの増加曲線がシグモイド型を示し、凝集体形成におけるラグタイムが存在した。この pH 領域は C_{H3} ホモダイマーの変性 pH 中点に近く、平衡論的にわずかな量のアンフォールディング状態の分子が溶液中に含まれている。理論的なシミュレーションによって、変性中点に近い溶液条件下において、このようなシグモイド型の凝集反応曲線を形成することが示唆されている(105)。経時的に供給される少量の変性分子が、毎時、極微量であるが凝集体の形成を進行させていると考えられる。ある反応時間で粒子サイズが急激に立ち上がるのは、ラグタイムの間に形成された凝集体-凝集体間での凝集反応が生じ始めるために、粒子サイズが指数関数的に増加しているのではないかと考えられる。

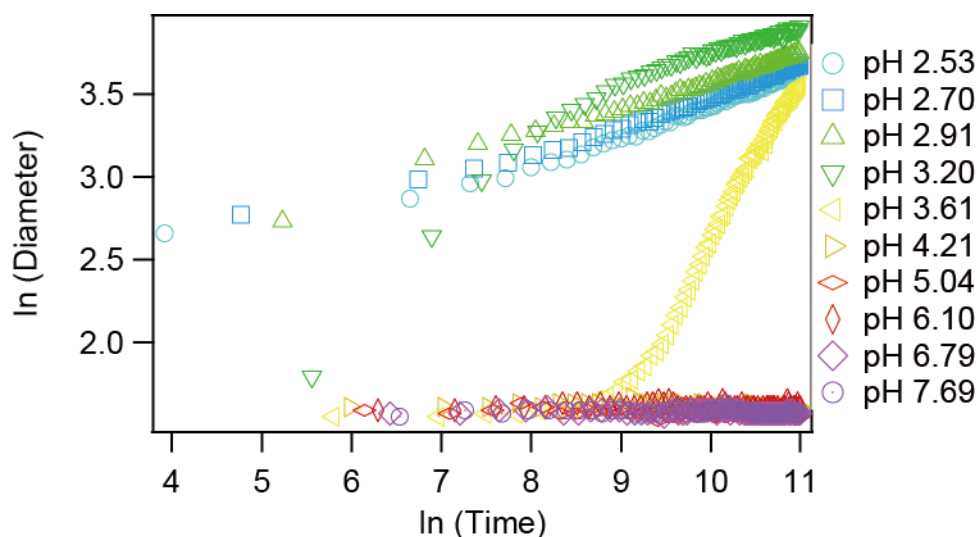


図 3-11: 図 3-6c のデータを両対数グラフとしてプロットした。

3.6. まとめ

本章では、wtFc を解析し、マルチドメイン構造をもつ wtFc 中における C_{H2} と C_{H3} ドメインのコンホメーション変化と変性に伴う凝集反応を解析した。

C_{H2} と C_{H3} ドメインは、それぞれがもつ固有のコンホメーション安定性に従い、独立的に酸変性を生じた。それぞれのコンホメーション安定性は、C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモ

ダイマーと同程度の安定性を示したことから、マルチドメイン構造の形成は wtFc 中の C_H2 と C_H3 ドメインのコンホメーション安定性に大きな影響は与えていないことが示唆される。変性したドメインは、wtFc の凝集反応を誘導し、凝集体サイズは変性したドメインのコロイド安定性に相関していた。しかし、C_H2 と C_H3 ドメインのコロイド安定性は、相互に影響を及ぼし合っており、wtFc 全体のコロイド安定性は、C_H2 ドメインの優れたコロイド安定性により、C_H3 ホモダイマーに比べて安定化されていることがわかった。抗体のマルチドメイン構造の形成は凝集回避に作用していると考えられ、各ドメインのコンホメーション安定性の独立的な振る舞いとコロイド安定性の相補的な振る舞いは、抗体の全体的な安定性を最適化する過程において有利に働いたものと考えられる。

第四章

ドメイン間ジスルフィド結合を導入した環状化 Fc の解析

4.1. 序論

本章では、Fc の C 末端にドメイン間ジスルフィド結合を導入した環状化 Fc (cycFc) を合成し、その物性解析を行った。pH 2–8 における cycFc のコンホメーション変化および 300 mM NaCl を含む溶液条件での凝集反応を分析し、wtFc の解析により得られた結果と比較することで、ドメイン間ジスルフィド結合の導入が、cycFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインのコンホメーション安定性およびコロイド安定性に与える影響、およびコンホメーション安定性の変化が凝集反応に与える影響を解析した。

4.2. 実験手法

4.2.1. Fc の C 末端にシステイン残基の導入した Fc (cycFc) の遺伝子配列の設計および遺伝子クローニング、発現、精製

Wozniak らの報告を参考に Fc の C_{H3} ドメインの C 末端 3 残基 (445-Pro-Gly-Lys-447) を、C_L ドメインの末端 3 残基 (Gly-Glu-Cys) に置換した遺伝子配列を合成した(107)。変異を含むプライマーを用いて、wtFc 遺伝子を含むプラスミドをテンプレートとして PCR 法により cycFc 遺伝子の DNA 断片を増幅した。その後の遺伝子クローニングおよび発現、精製は、wtFc と同様の方法で実施した(3.2.1.および 3.2.2.参照)。図 4-1 にサイズ排除クロマトグラフィーによる最終精製後における cycFc の SDS-PAGE 解析結果を示した。

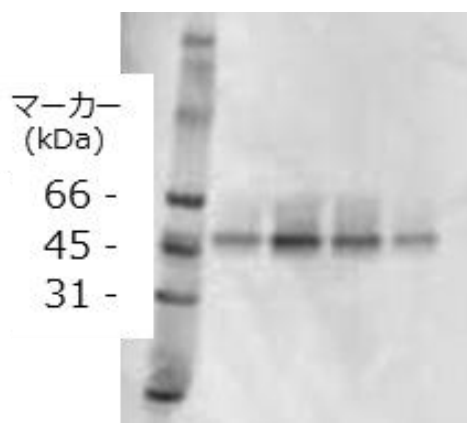


図 4-1 : サイズ排除クロマトグラフィー後の cycFc の精製画分の SDS-PAGE による精製結果を示した。サンプルは非還元処理のものである。cycFc の分子量の理論値は 51,578 である。

以下に、cycFc の分子量およびモル吸光係数、遺伝子配列、アミノ酸配列を示す。

分子量

51,578 (二量体)

モル吸光係数

71,570 dm³mol⁻¹cm⁻¹ (二量体)

遺伝子配列

ATGGCAGACAAAACCTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG
ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGAC
CCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT
TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG
GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCC
CCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC
CGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC
ATGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT
GTCTGGCGAATGTAA

アミノ酸配列

MADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSEGC

4.2.2. 溶液調整および、円偏光二色性スペクトル測定、動的光散乱測定

溶液調製および円偏光二色性スペクトル、動的光散乱測定は、wtFc と同様の方法により実施した(3.2.3.および 3.2.4、3.2.5.参照)。

4.3. 解析手法

4.3.1. ピュアスペクトルの算出と三状態転移解析

標準化 CD スペクトルデータを含むデータ行列 **A** (2.3.1.参照)は、フォールド状態および中間状態、アンフォールド状態のピュアスペクトルを含む行列(**D**)と、それら各ピュアスペクトルの各溶液条件における存在比を含む行列(**F**)を用いて、以下のように表すことができる。

$$\mathbf{A} = \mathbf{D}\mathbf{F}^T$$

\mathbf{F} は、三状態転移解析(3.3.1.参照)により求められる。上式を以下のように変形し、各コンホメーション状態のピュアスペクトルを求めた。

$$\mathbf{D} = (\mathbf{A}\mathbf{F})(\mathbf{F}^T\mathbf{F})^{-1}$$

\mathbf{D} に含まれるピュアスペクトルにおける各波長の標準化されている CD 強度を、以下の式により測定 CD スペクトルに対応する CD 強度へ変換した。

$$[\theta]_{i,j} = [\tilde{\theta}]_{i,j}s + [\bar{\theta}]_i \quad (j = F, I, U)$$

$[\theta]_{i,j}$ ($j = F, I, U$)は、測定 CD スペクトルに対応するフォールド状態($j = F$)、中間状態($j = I$)、アンフォールド状態($j = U$)の波長 i の CD 強度である。 $[\tilde{\theta}]_{i,j}$ ($j = F, I, U$)は、ピュアスペクトルの波長 i の標準化 CD 強度である。 s および $[\bar{\theta}]_i$ はそれぞれ wtFc の測定 CD スペクトルデータセットにおける標準偏差、および波長 i の平均 CD 強度を示す。

cycFc の三状態転移における平衡定数および存在比の算出には、上式より算出した wtFc の各コンホメーション状態のピュアスペクトルを用いることとし、cycFc の測定 CD スペクトルデータに対して、以下のフィッティング式を最小二乗法によりフィットすることにより算出した。

$$[\theta]_i = \frac{[\theta]_{i,F} + [\theta]_{i,I}K_{F-I} + [\theta]_{i,U}K_{F-I}K_{I-U}}{1 + K_{F-I} + K_{F-I}K_{I-U}}$$

$[\theta]_i$ は cycFc の波長 i の CD 強度、 $[\theta]_{i,F}$, $[\theta]_{i,I}$, $[\theta]_{i,U}$ はそれぞれ wtFc のフォールド状態、中間状態、アンフォールド状態のピュアスペクトルの波長 i の CD 強度である。解析には、Igor (Wavemetrics)を用いた。

4.4. 実験結果

4.4.1. 円偏光二色性スペクトル測定による二次構造解析

0 mM および 300 mM NaCl を含む pH 2–8 の条件範囲における CD スペクトルを測定し、二次構造解析を行った(図 4-2a と b)。各溶液条件における CD スペクトルの吸収極大波長および極小波長を表 4-1 に示した。中性 pH における CD スペクトルは wtFc の CD スペクトルと一致し、フォールド状態における二次構造に変化がないことを確認した(図 4-2c と d)。NaCl を溶液に含まない場合、pH 2.62 では 199 nm に極小値をもつ CD スペクトルを示した(図 4-2a,c,e)。その CD 強度は、wtFc の pH 2.58 における CD 強度に比べて小さく、cycFc は完全に酸変性していないことが示唆された(図 4-2c と e)。300 mM NaCl を含む溶液条件においては、二段階の CD スペクトル変化が観測され(図 4-2b)、wtFc で得られた結果と同様に、pH 3.57–4.15 の変化は C_{H2} ドメインの酸変性に、pH 3.16 以下の変化は C_{H3} ドメインの酸変性に対応していると考えられる。また各ドメインの変性 pH は、不可逆的な凝集反応によって NaCl を含まない条件よりも高い pH で酸変性した(図 4-2b)。pH 2.90 以下では一定の CD スペクトルに収束し、208 nm に極小値をもつ CD スペクトルを示した(図 4-2b と d, f)。そのスペクトルは、wtFc の pH 2.51 でのスペクトルとほぼ一致することから、300 mM NaCl を含む場合、cycFc のアンフォールド状態は、wtFc と類似した二次構造特性を有していると考えられる(図 4-2b と d)。

表 4-1 : cycFc の各溶液条件における CD スペクトルの吸収極大波長と吸収極小波長

protein	condition		maximum (nm)	minimum (nm)
	pH	NaCl		
cycFc	6.94	0	199	215
	6.81	300	200	214
	2.62	0	-	199
	2.53	300	-	208

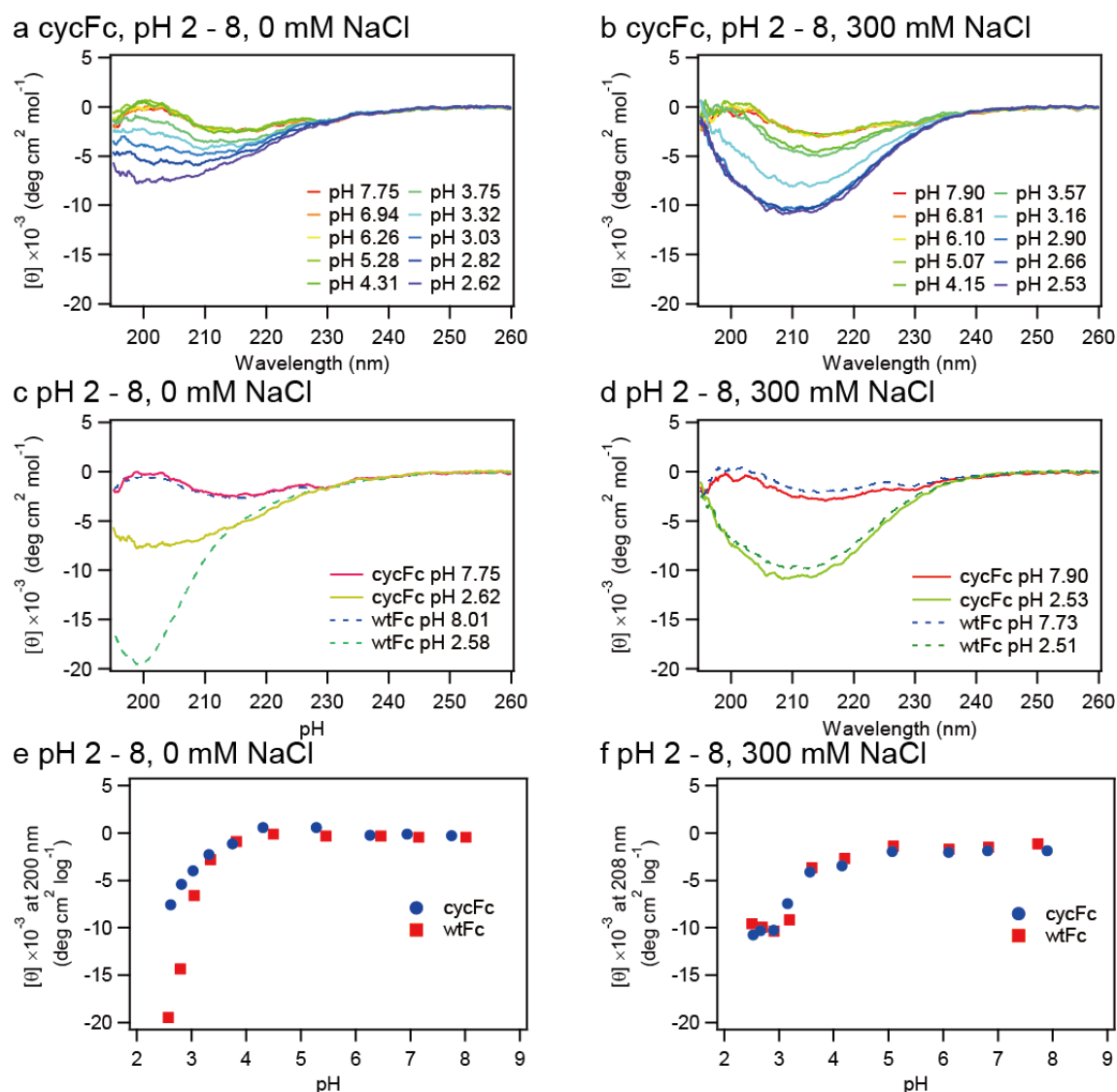


図 4-2 : (a)および(b)では、0 mM (a)または 300 mM NaCl (b)を含む pH 2–8 の各溶液条件における cycFc の CD スペクトルを示した。(c)および(d)では、0 mM (c)または 300 mM NaCl (d)を含む条件での cycFc と wtFc の中性および酸性 pH における CD スペクトルを比較した。(c)と(d)では、実線および点線は、それぞれ cycFc および wtFc の CD スペクトルを示している。(e)および(f)では、0 mM (e)または 300 mM NaCl (f)を含む条件における cycFc と wtFc の CD 強度変化を比較した。

4.4.2. 特異値分解と三状態転移解析

第3章において、wtFcを構成するC_{H2}とC_{H3}ドメインがそれぞれ独立した酸変性を生じることを示した。また本研究と同様にFcのC_{H3}ドメインのC末端にドメイン間ジスルフィド結合を導入したWozniakらの研究では、DSCを用いた解析でジスルフィド結合を導入したFcのC_{H2}とC_{H3}ドメインがそれぞれ独立した熱変性を生じることを報告している(107)。酸変性においても、cycFc中のC_{H2}とC_{H3}ドメインは独立的なコンホメーション変化を生じることが予測された。そこでまずcycFcのpH 2–8におけるC_{H2}とC_{H3}ドメインの独立したコンホメーション変化に関する情報を抽出するため、NaClを含まない条件におけるCDスペクトルデータに対して特異値分解を行った(図4-3a–c)。特異値から算出した寄与率、および右特異ベクトルから算出した自己相関係数を表4-2および表4-3に示した。RMSDは第二主成分までの寄与が大きいことを示した(図4-3a)が、cycFcの第二主成分の寄与率はwtFcより低い値を示した(表4-2)。また第一右特異ベクトルはpHの減少に伴った協同的な変化を示したが、第二右特異ベクトルでは協同的な変化を示さなかった(図4-3bとc)。第二右特異ベクトルは、コンホメーション転移反応に関連する情報を有していないことが示唆されることから、特異値分解ではC_{H2}およびC_{H3}ドメインの2つの独立したコンホメーション変化に関する情報を抽出できていないと考えられる。cycFcは、pH 2.62では完全に変性していないことから、独立したアンフォールド状態に関する情報が抽出できていないのだと考えられる。

そこで本研究では、wtFcのCDスペクトルデータからフォールド状態、中間状態、アンフォールド状態に関するピュアスペクトルを算出し(図4-3d)、それらを用いてcycFcのCDスペクトルデータに対して三状態転移解析を行うことで、各pHにおける各コンホメーション状態の平衡定数と存在比率を算出した。フィッティングにより得られた各パラメーターとpHごとの各コンホメーション状態の存在比をそれぞれ表4-4および図4-3eとfに示した。cycFcのC_{H2}とC_{H3}ドメインの双方の変性pH中点が、wtFcのpH中点から酸性pH側へシフトした(図4-3f)。このことから、ドメイン間ジスルフィド結合の導入によって、C_{H3}ドメインだけではなく、C_{H2}ドメインも安定化されていることが示唆された。

表 4-2 : cycFc の CD スペクトルデータより算出した寄与率

protein	contribution ratio (%)		
	first	second	third
cycFc	98.7	0.82	0.13
wtFc	98.69	1.27	0.02

表 4-3 : cycFc の右特異ベクトルにおける自己相関係数

protein	auto correlation coefficient		
	first	second	third
cycFc	0.676	0.493	-0.078
wtFc	0.622	0.404	0.284

表 4-4 : cycFc の三状態転移解析により得られた各パラメーター

parameter	cycFc	wtFc
$pK_{a_{F-I}}$	5.46 ± 0.02	5.11 ± 0.26
n_1	1.11 ± 0.01	1.50 ± 0.27
$pK_{a_{I-U}}$	5.20 ± 0.21	4.50 ± 0.88
n_2	4.40 ± 0.37	7.15 ± 3.54

表 4-5 : cycFc の変性 pH 中点

Protein	midpoint pH ₁	midpoint pH ₂
cycFc	2.98	2.49
wtFc	3.27	2.84

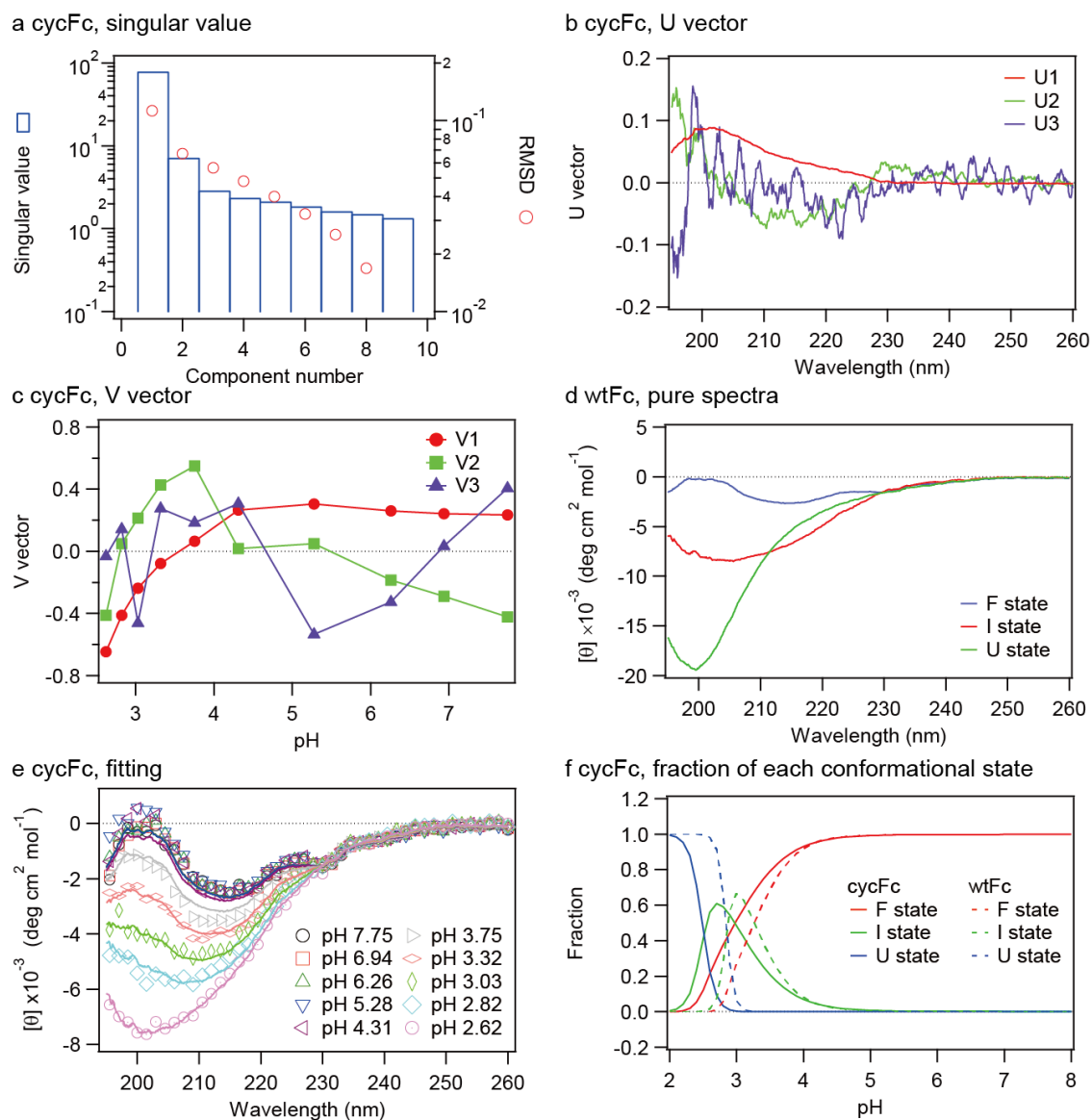
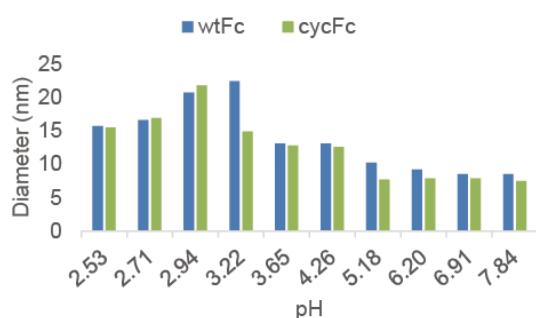


図 4-3 : cycFc の CD スペクトルより算出した特異値と RMSD (a)、左特異ベクトル(b)および右特異ベクトル(c)。(d) wtFc のスペクトルデータより算出した各コンホメーション状態のピュアスペクトル。(e) cycFc の CD スペクトルデータに対するフィッティング結果。各マーカーは測定 CD スペクトルを、実線はフィッティングにより得られたスペクトルを示した。(f)cycFc の各コンホメーション状態の存在比変化。実線と点線はそれぞれ cycFc と wtFc の存在比変化を示している。

4.4.3. 動的光散乱による cycFc の凝集反応の解析

300 mM NaCl を含む pH 2 – 8 の条件範囲において、動的光散乱を測定し、cycFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインの酸変性に伴う凝集反応を解析した(図 4-4)。wtFc と同様に pH の低下に伴い 2 段階の凝集体サイズの増加が観測され、それぞれ pH 3.22 – 4.26 では C_{H2} ドメインの酸変性に伴う凝集反応が、pH 2.53 – 2.94 では C_{H3} ドメインの酸変性に伴う凝集反応が観測された(図 4-4a)。pH 3.22 では、wtFc において C_{H3} ドメインの酸変性に伴う凝集反応が観測されたが、cycFc では観測されなかった。ドメイン間ジスルフィド結合の導入により C_{H3} ドメインのコンホメーション安定性が増加したことで、C_{H3} ドメインの酸変性に依存した凝集反応が抑制されたと考えられる。一方で、pH 2.94 および pH 4.26 の粒子サイズは、wtFc の粒子サイズに近い値を示した(図 4-4a)。さらに pH 2 において 300 mM までの NaCl 濃度の増加に伴う cycFc の凝集サイズの変化を解析した(図 4-4b)。cycFc は、wtFc と同様に、50 mM NaCl 付近で凝集体を形成し始め、また各 NaCl 濃度の粒子サイズも cycFc と wtFc の間で大きな差がなかった。このことは、ドメイン間ジスルフィド結合の導入は、アンフォールド状態における cycFc のコロイド安定性に大きな影響を与えないことを示唆している。

a pH 2 - 8, 300 mM NaCl



b pH 2, 0 - 300 mM NaCl

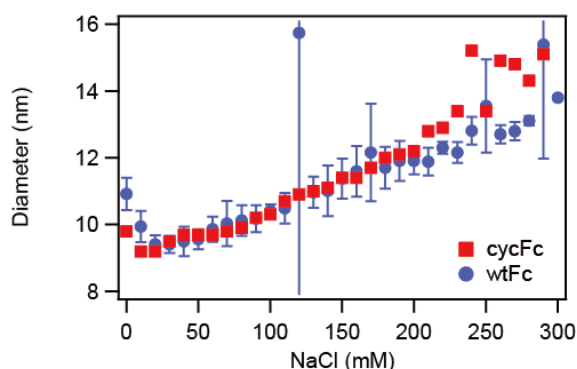


図 4-4 : (a)は 300 mM NaCl を含む pH 2 – 8 における各溶液条件の凝集反応開始 10 時間後の粒子サイズを示した。緑棒は cycFc、青棒は wtFc の粒子径サイズを示す。(b)は pH 2 での 0 – 300 mM NaCl における各溶液条件の凝集反応開始 10 時間後の粒子サイズを示した。赤点(棒)は cycFc、青点(棒)は wtFc の粒子サイズを示す。

4.5. 考察

Fc の C 末端へのドメイン間ジスルフィド結合の導入によって、cycFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインのコンホメーション安定性が増加することを示した。蛋白質立体構造上の適切な位置にジスルフィド結合を導入することにより、蛋白質のコンホメーション安定性を向上させた研究例は多数存在する(108-110)。ジスルフィド結合の導入は、蛋白質のアンフォールド状態の分子ダイナミクスを制限し、鎖エントロピーを低下させる。そのためアンフォールド状態の自由エネルギーが増加するために、タンパク質はより天然状態を形成しやすくなると考えられている。本章においても、ドメイン間ジスルフィド結合により C_{H3} ドメインの C 末端が固定化され、アンフォールド状態における鎖ダイナミクスが抑制されたこと、またコンホメーション安定性に重要なホモダイマーの形成が誘導されたことが、コンホメーション安定性の向上につながったものと考えられる(図 4-5)(54)。Wozniak らは、分子間または分子内にジスルフィド結合を導入することによって、Fc の熱ストレスに対するコンホメーション安定性が増加することを報告している(107, 111)。本研究においては、酸ストレスに対するコンホメーション安定性も増加することを確認できた。さらに、本章では C_{H2} ドメインのコンホメーション安定性の増加も確認され、C_{H3} ドメインのドメイン間ジスルフィド結合導入による安定化効果が直接関与しないと考えられる C_{H2} ドメインの安定化にも寄与していることが示唆された。Röthlisberger らによる Fab の解析では、V_H と V_L ドメインのコンホメーション安定性が C_{H1}-C_L ヘテロドメインと比べて著しく低い場合に、V_H と V_L ドメインが C_{H1}-C_L ヘテロドメインと連結によって安定化することが報告されている(57)。第三章の wtFc の解析では、wtFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインのコンホメーション安定性が、C_{H2} モノマーと C_{H3} ホモダイマーと同程度であることから、ほぼ独立的に酸変性を生じていることが示唆された。本章では Fc の C 末端に人為的にジスルフィド結合を導入し Fc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインのコンホメーション安定性の差を広げることによって、Fc のマルチドメイン構造形成によるコンホメーション安定性の伝播効果が顕在化されたのではないかと考えられる。ジスルフィド結合の導入による Fc のコンホメーション安定性の伝播効果に関する報告はこれまでにないが、Fc 以外のマルチドメイン蛋白質では非共有結合的な多量体形成がマルチドメイン蛋白質全体の平衡論的なコンホメーション安定性の向上やアンフォールディング速度の低下をもたらす効果があることが報告されている(112)。また単量体蛋白質を人為的に環状化させる場合に、N 末端と C 末端をつなぐ適切な長さのリンカーを設計し、蛋白質の不安定化を防ぐ必要がある(113)。CD による解析では cycFc と wtFc が同一の二次構造特性を有していることは確認しているものの、ドメイン間ジスルフィド結合の導入が三次構造その他のコンホメーション特性に影響を与えている可能性があり、適切なジスルフィド結合が形成されていないことも考慮する必要があるだろう。本研究ではさらに鎖エントロピーの低下が Fc のコロイド安定性に与える影響を解析した。しかし、ジスルフィド結合の導入によって、アンフォールド状態にお

けるコロイド安定性が変化しないことが確認された。蛋白質の構造中には、特に凝集に関与する領域(aggregation prone region)が存在することが示唆されている(75)。研究当初の段階ではドメイン間ジスルフィド結合導入による鎖エントロピーの低下は、アンフォールド状態におけるコンホメーション数を制限し、この aggregation prone region の露出を阻害する効果があるのかもしれないと予測した。しかし cycFc の解析結果から、cycFc のアンフォールド状態では、aggregation prone region は wtFc と同程度に露出されており、凝集体の形成に関与しているのではないかと推測される。

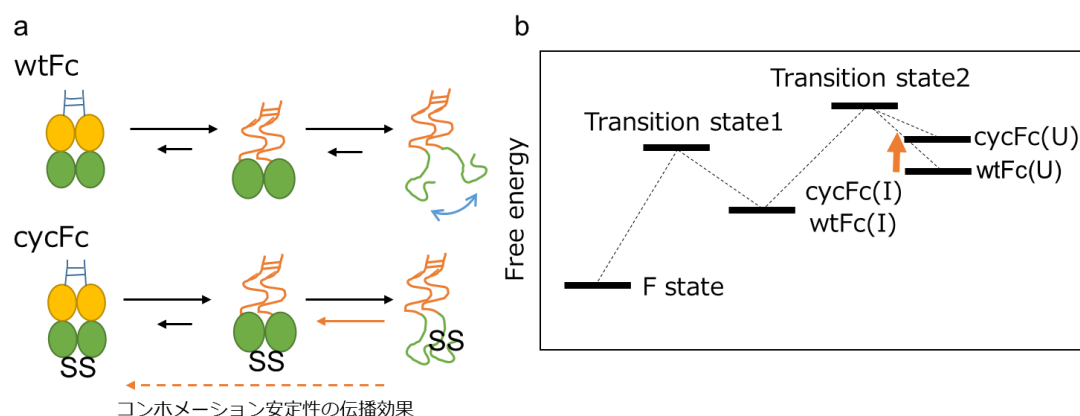


図 4-5 : (a)ドメイン間ジスルフィド結合導入による分子鎖ダイナミクス低下効果のイメージを示した。(b)分子鎖ダイナミクスの低下がコンホメーション状態の自由エネルギーに与える効果を示した。

4.6. まとめ

ドメイン間ジスルフィド結合を導入した cycFc を解析し、 C_H3 ドメインだけではなく C_H2 ドメインのコンホメーション安定性も増加することを明らかにした。また C_H3 ドメインのコンホメーション安定性の増加によって、 C_H3 ドメインの酸変性反応に依存する凝集反応を抑制できることを示した。しかし、酸変性後の凝集体サイズは wtFc と大きな差がみられず、環状化による鎖ダイナミクスの制限は、コロイド安定性には影響を与えないことが示唆された。抗体医薬品を含めた有用蛋白質の安定化戦略においては、ジスルフィド結合の導入によってコロイド安定性を少なくとも低下させることがないのであれば、適切なジスルフィド結合の導入によりコンホメーション安定性を増加させ、変性反応に依存した凝集反応を抑制することは、凝集抑制のための有効な蛋白質工学的戦略となりうると思われる。

第五章

総括

本論文では、抗体凝集機構をドメインレベルの物性変化と凝集反応から理解し、また抗体がもつマルチドメイン構造の形成がドメインの物性や抗体全体の凝集反応に与える影響を明らかにするために、IgG1 を構成するドメインおよび Fc の酸および塩ストレスに対するコンホメーション変化と凝集反応の解析を行った。

第二章では、ドメインを対象とした解析を行い、各ドメインのコンホメーション安定性とコロイド安定性が相互に異なることを示した。コンホメーション不安定性の序列は C_{H2} モノマー $> C_{H3}$ ホモダイマー $> C_{H1}-C_L$ ヘテロダイマー $> C_L$ モノマーとなり、コロイド不安定性の序列は C_{H3} ホモダイマー $> C_{H2}$ モノマー $> C_{H1}-C_L$ ヘテロダイマー $\approx C_L$ モノマーとなることを明らかにした。各ドメインは溶液条件に応じて、N 状態および MMNN 状態、PPNN 状態の三つの状態をとることを示した。PPNN 状態においては、部分的折りたたみ構造を有したコンホメーション状態を介して凝集反応を生じていることを示した。コンホメーション安定性とコロイド安定性の評価から、抗体全体の凝集反応における各ドメインの寄与の大きさは、 C_{H3} ホモダイマー $> C_{H2}$ モノマー $> C_{H1}-C_L$ ヘテロダイマー $> C_L$ モノマーとなることを示した。 C_{H3} ホモダイマーのコロイド安定性が最も低いことから、抗体中の C_{H3} ドメインの酸変性は急速かつ巨大な凝集体の形成を誘導し、一方で C_{H2} モノマーではコンホメーション安定性が最も低いことから、弱酸性(\sim pH 4)および高濃度 NaCl (> 200 mM)の溶液条件における抗体の凝集反応を主導するものと考えられる。

第三章では、wtFc を対象とした解析を行い、wtFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインは、それぞれがもつ固有のコンホメーション安定性に依存してほぼ独立的に酸変性を生じることを示した。それぞれのコンホメーション安定性は、 C_{H2} モノマーおよび C_{H3} ホモダイマーと同程度の安定性を示したことから、マルチドメイン構造の形成は wtFc 中の C_{H2} と C_{H3} ドメインのコンホメーション安定性に大きな影響は与えていないことを明らかにした。酸変性したドメインは wtFc の凝集反応を誘導し、その凝集体サイズは酸変性したドメインのコロイド安定性に相関していた。しかし、 C_{H2} と C_{H3} ドメインのコロイド安定性は wtFc 中で相互に影響を及ぼしあっており、wtFc 全体のコロイド安定性は C_{H2} ドメインの優れたコロイド安定性により、 C_{H3} ホモダイマーのコロイド安定性に比べて安定化されていることを明らかにした。

第四章では、cycFc を対象とした解析を行い、 C_{H3} ドメインの C 末端に導入したドメイン間ジスルフィド結合による鎖ダイナミクスの制限効果により、 C_{H3} ドメインの酸ストレスに対するコンホメーション安定性が増加することを示した。また C_{H3} ドメインのコンホメーション安定性の向上によって、 C_{H2} ドメインの安定化も誘導されることを明らかにした。一方で、各ドメインの酸変性後に生じる凝集体のサイズは、wtFc のサイズと同程度であり、ドメイン間ジスルフィド結合の導入は、コロイド安定性に大きな影響を与えていないことを明らかにした。

生命を定義することは困難であるが、蛋白質は生命を担う最も重要な物質の一つであ

る。蛋白質の機能発現にはフォールディング反応によって固有の立体構造を形成する必要がある。そのフォールディング反応は、高速かつ協同的に生じる特性をもつ。近年の研究から、このフォールディングの協同性は、競合する凝集反応を回避するために蛋白質が分子進化の途上で獲得した特性であると考えられている(96)。蛋白質が生命を体現するにあたり、非組織的かつ非機能的な結果を招く凝集反応は回避せざるを得ない重要な反応であったと考えられる。抗体は、生体内で免疫反応に関与する蛋白質である。免疫反応とは、自己と非自己を区別するという意味で生命にとって重要な反応の一つである。そのような重要な反応に関与する蛋白質として、抗体の物性と機能は分子進化の途上で高度に最適化されていると考えられる。本論文の物性解析結果および近年における他の研究成果を通じて、その物性の最適化の一部である凝集回避の観点において、抗体は次にあげる凝集回避機構を備えていることが示唆された。(a) 各ドメインは独立的かつ協同的なアンフォールディング反応を生じることから、ドメインごとのフォールディング反応は最適化されており、速度論的に競合する凝集反応を回避している。(b) マルチドメイン構造の形成は、コンホメーション安定性の増加およびアンフォールディング速度の低下を誘導し、変性反応依存的な凝集反応を抑制する効果がある。(c) 抗体中には、コロイド安定性に優れたドメインと劣るドメインが共存しており、コロイド安定性に優れたドメインが抗体全体のコロイド安定性を向上させ、変性後の凝集反応を抑制している。

生命が最適化した抗体というものを医薬品として応用することは優れた手段である。しかし、その抗体物性の最適性は生体内に限定されている。抗体医薬品では、抗体を生体外で製造・輸送・保管しなければならず、生体内環境を外れ、大きなストレスに曝される場合には、抗体の蛋白質として物性に由来して変性・凝集するという事は、本論文や他の多くの研究がよく示すところである。抗体が生体内で経験する以上の物理的ストレスを想定し、その条件に対する最適化を行い、医薬品としての品質と安全性を確保しなければならない(19, 36)。また抗体ほど詳細に解析された蛋白質は他になく、今後はエンジニアリングの時代に突入すると言われている。抗体の安定性向上を図る種々の蛋白質工学的な抗体改良研究も今後盛んに行われていくものと予測される(114, 115)。本論文の解析では、抗体凝集反応を、抗体ドメインのコンホメーション変化と会合反応を基礎として理解することができること、またマルチドメイン構造の形成が抗体全体の安定化に大きく寄与していることを明らかにした。本研究により得られた抗体の物性に関する知見が、将来の抗体医薬品の開発および抗体を利用したバイオテクノロジー分野の発展に役立つことを願う。

参考文献

1. Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol*. 2013;4:76. PubMed PMID: 23543707. PMCID: PMC3608903. eng.
2. Reichert JM, Valge-Archer VE. Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2007 May;6(5):349-56. PubMed PMID: 17431406. eng.
3. Kempeni J. Preliminary results of early clinical trials with the fully human anti-TNFalpha monoclonal antibody D2E7. *Ann Rheum Dis*. 1999 Nov;58 Suppl 1:I70-2. PubMed PMID: 10577977. PMCID: PMC1766582. eng.
4. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med*. 2007 Jul;357(1):39-51. PubMed PMID: 17611206. eng.
5. Dall'Acqua WF, Kiener PA, Wu H. Properties of human IgG1s engineered for enhanced binding to the neonatal Fc receptor (FcRn). *J Biol Chem*. 2006 Aug;281(33):23514-24. PubMed PMID: 16793771. eng.
6. Ghetie V, Ward ES. Multiple roles for the major histocompatibility complex class I- related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:739-66. PubMed PMID: 10837074. eng.
7. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*. 2015;7(1):9-14. PubMed PMID: 25529996. PMCID: PMC4622599. eng.
8. Qiu X, Wong G, Audet J, Bello A, Fernando L, Alimonti JB, et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature*. 2014 Oct;514(7520):47-53. PubMed PMID: 25171469. PMCID: PMC4214273. eng.
9. Barouch DH, Whitney JB, Moldt B, Klein F, Oliveira TY, Liu J, et al. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature*. 2013 Nov;503(7475):224-8. PubMed PMID: 24172905. PMCID: PMC4017780. eng.
10. Giudice EL, Campbell JD. Needle-free vaccine delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006 Apr;58(1):68-89. PubMed PMID: 16564111. eng.
11. Nochi T, Takagi H, Yuki Y, Yang L, Masumura T, Mejima M, et al. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun;104(26):10986-91. PubMed PMID: 17573530. PMCID: PMC1904174. eng.
12. Borrás-Blasco J, Gracia-Pérez A, Rosique-Robles JD, Casterá MD, Abad FJ. Acceptability of switching adalimumab from a prefilled syringe to an autoinjection pen. *Expert Opin Biol Ther*. 2010 Mar;10(3):301-7. PubMed PMID: 20059372. eng.
13. Robinson MP, Ke N, Lobstein J, Peterson C, Szkodny A, Mansell TJ, et al. Efficient

- expression of full-length antibodies in the cytoplasm of engineered bacteria. *Nat Commun.* 2015;6:8072. PubMed PMID: 26311203. PMCID: PMC4560801. eng.
14. Iizuka M, Ogawa S, Takeuchi A, Nakakita S, Kubo Y, Miyawaki Y, et al. Production of a recombinant mouse monoclonal antibody in transgenic silkworm cocoons. *FEBS J.* 2009 Oct;276(20):5806-20. PubMed PMID: 19740109. eng.
 15. Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish K. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature.* 1989 Nov;342(6245):76-8. PubMed PMID: 2509938. eng.
 16. Reilly RM, Domingo R, Sandhu J. Oral delivery of antibodies. Future pharmacokinetic trends. *Clin Pharmacokinet.* 1997 Apr;32(4):313-23. PubMed PMID: 9113439. eng.
 17. Hussack G, Hirama T, Ding W, Mackenzie R, Tanha J. Engineered single-domain antibodies with high protease resistance and thermal stability. *PLoS One.* 2011;6(11):e28218. PubMed PMID: 22140551. PMCID: PMC3227653. eng.
 18. Jasion VS, Burnett BP. Survival and digestibility of orally-administered immunoglobulin preparations containing IgG through the gastrointestinal tract in humans. *Nutr J.* 2015;14:22. PubMed PMID: 25880525. PMCID: PMC4355420. eng.
 19. Feng YW, Ooishi A, Honda S. Aggregation factor analysis for protein formulation by a systematic approach using FTIR, SEC and design of experiments techniques. *J Pharm Biomed Anal.* 2012 Jan;57:143-52. PubMed PMID: 21920692. eng.
 20. Wang W, Singh S, Zeng DL, King K, Nema S. Antibody structure, instability, and formulation. *J Pharm Sci.* 2007 Jan;96(1):1-26. PubMed PMID: 16998873. eng.
 21. Wang W, Singh SK, Li N, Toler MR, King KR, Nema S. Immunogenicity of protein aggregates--concerns and realities. *Int J Pharm.* 2012 Jul;431(1-2):1-11. PubMed PMID: 22546296. eng.
 22. Vázquez-Rey M, Lang DA. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol Bioeng.* 2011 Jul;108(7):1494-508. PubMed PMID: 21480193. eng.
 23. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J.* 2006;8(3):E501-7. PubMed PMID: 17025268. PMCID: PMC2761057. eng.
 24. Ratanji KD, Derrick JP, Dearman RJ, Kimber I. Immunogenicity of therapeutic proteins: Influence of aggregation. *J Immunotoxicol.* 2013 Aug. PubMed PMID: 23919460. ENG.
 25. Fahrner RL, Knudsen HL, Basey CD, Galan W, Feuerhelm D, Vanderlaan M, et al. Industrial purification of pharmaceutical antibodies: development, operation, and validation of chromatography processes. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2001;18:301-27. PubMed PMID: 11530694. eng.
 26. Shukla AA, Hubbard B, Tressel T, Guhan S, Low D. Downstream processing of monoclonal antibodies--application of platform approaches. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007 Mar;848(1):28-39. PubMed PMID: 17046339. eng.

27. Ayyar BV, Arora S, Murphy C, O'Kennedy R. Affinity chromatography as a tool for antibody purification. *Methods*. 2012 Feb;56(2):116-29. PubMed PMID: 22033471. eng.
28. Dobson C. Protein folding and misfolding. *Nature*. 2003 DEC 18 2003;426(6968):884-90. PubMed PMID: WOS:000187342000070. English.
29. 後藤祐児, 桑島邦博, 谷澤克行. タンパク質科学 構造・物性・機能. 日本: 化学同人; 2005.
30. 笹井理生. 非線形科学シリーズ 3 蛋白質の柔らかなダイナミクス. 日本: 培風館; 2008.
31. Nolting B. Protein Folding Kinetics. Berlin: Springer-Verlag; 1999.
32. Fersht A. Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. New York: Freeman and Company; 1999.
33. Pain RH. Mechanism of Protein Folding: Oxford University Press; 2000.
34. Taverna D, Goldstein R. Why are proteins so robust to site mutations? *Journal of Molecular Biology*. 2002 JAN 18 2002;315(3):479-84. PubMed PMID: WOS:000173577400018. English.
35. Rubin J, Linden L, Coco W, Bommarius A, Behrens S. Salt-induced aggregation of a monoclonal human immunoglobulin G1. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013 FEB 2013;102(2):377-86. PubMed PMID: WOS:000313790100012. English.
36. Mueller M, Loh MQ, Tee DH, Yang Y, Jungbauer A. Liquid formulations for long-term storage of monoclonal IgGs. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013 Feb;169(4):1431-48. PubMed PMID: 23315232. eng.
37. Blumlein A, McManus J. Reversible and non-reversible thermal denaturation of lysozyme with varying pH at low ionic strength. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*. 2013 OCT 2013;1834(10):2064-70. PubMed PMID: WOS:000325236700012. English.
38. Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF. Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharm Res*. 2003 Sep;20(9):1325-36. PubMed PMID: 14567625. eng.
39. Chi E, Krishnan S, Kendrick B, Chang B, Carpenter J, Randolph T. Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Protein Science*. 2003 MAY 2003;12(5):903-13. PubMed PMID: WOS:000182486800002. English.
40. Saito S, Hasegawa J, Kobayashi N, Tomitsuka T, Uchiyama S, Fukui K. Effects of ionic strength and sugars on the aggregation propensity of monoclonal antibodies: influence of colloidal and conformational stabilities. *Pharm Res*. 2013 May;30(5):1263-80. PubMed PMID: 23319172. eng.
41. Saito S, Hasegawa J, Kobayashi N, Kishi N, Uchiyama S, Fukui K. Behavior of monoclonal antibodies: relation between the second virial coefficient ($B(2)$) at low

- concentrations and aggregation propensity and viscosity at high concentrations. *Pharm Res.* 2012 Feb;29(2):397-410. PubMed PMID: 21853361. eng.
42. VERWEY EJ. Theory of the stability of lyophobic colloids. *J Phys Colloid Chem.* 1947 May;51(3):631-6. PubMed PMID: 20238663. eng.
 43. Narayanan J, Liu X. Protein interactions in undersaturated and supersaturated solutions: A study using light and x-ray scattering. *Biophysical Journal.* 2003 JAN 2003;84(1):523-32. PubMed PMID: WOS:000183067300045. English.
 44. Sumi T, Imamura H, Morita T, Isogai Y, Nishikawa K. Model-potential-free analysis of small angle scattering of proteins in solution: insights into solvent effects on protein-protein interaction. *Phys Chem Chem Phys.* 2014 Dec;16(46):25492-7. PubMed PMID: 25343423. eng.
 45. Nicoud L, Arosio P, Sozo M, Yates A, Norrant E, Morbidelli M. Kinetic Analysis of the Multistep Aggregation Mechanism of Monoclonal Antibodies. *Journal of Physical Chemistry B.* 2014 SEP 11 2014;118(36):10595-606. PubMed PMID: WOS:000341619600005. English.
 46. Elvin J, Couston R, van der Walle C. Therapeutic antibodies: Market considerations, disease targets and bioprocessing. *International Journal of Pharmaceutics.* 2013 JAN 2 2013;440(1):83-98. PubMed PMID: WOS:000313655300010. English.
 47. Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol.* 1998 Feb;275(5):861-72. PubMed PMID: 9480774. eng.
 48. Garber E, Demarest SJ. A broad range of Fab stabilities within a host of therapeutic IgGs. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Apr;355(3):751-7. PubMed PMID: 17321501. eng.
 49. Ionescu RM, Vlasak J, Price C, Kirchmeier M. Contribution of variable domains to the stability of humanized IgG1 monoclonal antibodies. *J Pharm Sci.* 2008 Apr;97(4):1414-26. PubMed PMID: 17721938. eng.
 50. Kim N, Remmele RL, Liu D, Razinkov VI, Fernandez EJ, Roberts CJ. Aggregation of anti-streptavidin immunoglobulin gamma-1 involves Fab unfolding and competing growth pathways mediated by pH and salt concentration. *Biophys Chem.* 2013 Feb;172:26-36. PubMed PMID: 23334430. eng.
 51. Zhang-van Enk J, Mason BD, Yu L, Zhang L, Hamouda W, Huang G, et al. Perturbation of thermal unfolding and aggregation of human IgG1 Fc fragment by Hofmeister anions. *Mol Pharm.* 2013 Feb;10(2):619-30. PubMed PMID: 23256580. eng.
 52. Mehta SB, Bee JS, Randolph TW, Carpenter JF. Partial unfolding of a monoclonal antibody: role of a single domain in driving protein aggregation. *Biochemistry.* 2014 May;53(20):3367-77. PubMed PMID: 24804773. eng.

53. Wu H, Kroe-Barrett R, Singh S, Robinson A, Roberts C. Competing aggregation pathways for monoclonal antibodies. *Febs Letters*. 2014 MAR 18 2014;588(6):936-41. PubMed PMID: WOS:000333088800014. English.
54. Thies MJ, Mayer J, Augustine JG, Frederick CA, Lilie H, Buchner J. Folding and association of the antibody domain CH3: prolyl isomerization preceeds dimerization. *J Mol Biol*. 1999 Oct;293(1):67-79. PubMed PMID: 10512716. eng.
55. Feige MJ, Groscurth S, Marcinowski M, Shimizu Y, Kessler H, Hendershot LM, et al. An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Mol Cell*. 2009 Jun;34(5):569-79. PubMed PMID: 19524537. PMCID: PMC2908990. eng.
56. Zheng K, Bantog C, Bayer R. The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. *MAbs*. 2011 2011 Nov-Dec;3(6):568-76. PubMed PMID: 22123061. PMCID: PMC3242843. eng.
57. Röthlisberger D, Honegger A, Plückthun 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*. 2005 Apr;347(4):773-89. PubMed PMID: 15769469. eng.
58. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, et al. Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature*. 2003 Feb;421(6924):756-60. PubMed PMID: 12610629. eng.
59. Moiani D, Salvalaglio M, Cavallotti C, Bujacz A, Redzynia I, Bujacz G, et al. Structural characterization of a Protein A mimetic peptide dendrimer bound to human IgG. *J Phys Chem B*. 2009 Dec;113(50):16268-75. PubMed PMID: 19924842. eng.
60. Corisdeo S, Wang B. Functional expression and display of an antibody Fab fragment in *Escherichia coli*: study of vector designs and culture conditions. *Protein Expr Purif*. 2004 Apr;34(2):270-9. PubMed PMID: 15003261. eng.
61. More AS, Torani VM, Okbazghi SZ, Kim JH, Joshi SB, Middaugh CR, et al. Correlating the impact of Well-Defined Oligosaccharide Structures on Physical Stability Profiles of IgG1-Fc Glycoforms. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2015.
62. Raju T, Briggs J, Borge S, Jones A. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*. 2000 MAY 2000;10(5):477-86. PubMed PMID: WOS:000086491400005. English.
63. Hendler RW, Shrager RI. Deconvolutions based on singular value decomposition and the pseudoinverse: a guide for beginners. *J Biochem Biophys Methods*. 1994 Jan;28(1):1-33. PubMed PMID: 8151067. eng.
64. Arai M, Ferreón JC, Wright PE. Quantitative analysis of multisite protein-ligand

- interactions by NMR: binding of intrinsically disordered p53 transactivation subdomains with the TAZ2 domain of CBP. *J Am Chem Soc.* 2012 Feb;134(8):3792-803. PubMed PMID: 22280219. PMCID: PMC3290704. eng.
65. Shrager R, Hendler R. Titration of Individual Components in a Mixture with Resolution of Difference Spectra, pKs, and Redox Transitions. *Analytical Chemistry.* 1982 1982;54(7):1147-52. PubMed PMID: WOS:A1982NR19100038. English.
 66. Goh CS, Lan N, Douglas SM, Wu B, Echols N, Smith A, et al. Mining the structural genomics pipeline: identification of protein properties that affect high-throughput experimental analysis. *J Mol Biol.* 2004 Feb;336(1):115-30. PubMed PMID: 14741208. eng.
 67. Idicula-Thomas S, Balaji PV. Understanding the relationship between the primary structure of proteins and its propensity to be soluble on overexpression in *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 2005 Mar;14(3):582-92. PubMed PMID: 15689506. PMCID: PMC2279285. eng.
 68. Conchillo-Solé O, de Groot NS, Avilés FX, Vendrell J, Daura X, Ventura S. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics.* 2007;8:65. PubMed PMID: 17324296. PMCID: PMC1828741. eng.
 69. Trovato A, Chiti F, Maritan A, Seno F. Insight into the structure of amyloid fibrils from the analysis of globular proteins. *Plos Computational Biology.* 2006 DEC 2006;2(12):1608-18. PubMed PMID: WOS:000243482000012. English.
 70. DuBay KF, Pawar AP, Chiti F, Zurdo J, Dobson CM, Vendruscolo M. Prediction of the absolute aggregation rates of amyloidogenic polypeptide chains. *J Mol Biol.* 2004 Aug;341(5):1317-26. PubMed PMID: 15302561. eng.
 71. Pawar AP, Dubay KF, Zurdo J, Chiti F, Vendruscolo M, Dobson CM. Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. *J Mol Biol.* 2005 Jul;350(2):379-92. PubMed PMID: 15925383. eng.
 72. Tartaglia GG, Pawar AP, Campioni S, Dobson CM, Chiti F, Vendruscolo M. Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins. *J Mol Biol.* 2008 Jul;380(2):425-36. PubMed PMID: 18514226. eng.
 73. Tartaglia GG, Vendruscolo M. The Zyggregator method for predicting protein aggregation propensities. *Chem Soc Rev.* 2008 Jul;37(7):1395-401. PubMed PMID: 18568165. eng.
 74. Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins.

- Nat Biotechnol. 2004 Oct;22(10):1302-6. PubMed PMID: 15361882. eng.
75. Chennamsetty N, Helk B, Voynov V, Kayser V, Trout B. Aggregation-Prone Motifs in Human Immunoglobulin G. *Journal of Molecular Biology*. 2009 AUG 14 2009;391(2):404-13. PubMed PMID: WOS:000269227300012. English.
 76. Chennamsetty N, Voynov V, Kayser V, Helk B, Trout B. Prediction of Aggregation Prone Regions of Therapeutic Proteins. *Journal of Physical Chemistry B*. 2010 MAY 20 2010;114(19):6614-24. PubMed PMID: WOS:000277499700044. English.
 77. Lauer TM, Agrawal NJ, Chennamsetty N, Egodage K, Helk B, Trout BL. Developability index: a rapid in silico tool for the screening of antibody aggregation propensity. *J Pharm Sci*. 2012 Jan;101(1):102-15. PubMed PMID: 21935950. eng.
 78. Olsson M, Sondergaard C, Rostkowski M, Jensen J. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pK(a) Predictions. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2011 FEB 2011;7(2):525-37. PubMed PMID: WOS:000287049200025. English.
 79. Goto Y, Calciano LJ, Fink AL. Acid-induced folding of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jan;87(2):573-7. PubMed PMID: 2153957. PMCID: PMC53307. eng.
 80. Cowgill RW. Fluorescence and protein structure. XVII. On the mechanism of peptide quenching. *Biochim Biophys Acta*. 1970 Jan;200(1):18-25. PubMed PMID: 5410718. eng.
 81. Tsunenaga M, Goto Y, Kawata Y, Hamaguchi K. Unfolding and refolding of a type kappa immunoglobulin light chain and its variable and constant fragments. *Biochemistry*. 1987 Sep;26(19):6044-51. PubMed PMID: 3120770. eng.
 82. Ramsey JD, Gill ML, Kamerzell TJ, Price ES, Joshi SB, Bishop SM, et al. Using empirical phase diagrams to understand the role of intramolecular dynamics in immunoglobulin G stability. *J Pharm Sci*. 2009 Jul;98(7):2432-47. PubMed PMID: 19072858. eng.
 83. Kim JH, Iyer V, Joshi SB, Volkin DB, Middaugh CR. Improved data visualization techniques for analyzing macromolecule structural changes. *Protein Sci*. 2012 Oct;21(10):1540-53. PubMed PMID: 22898970. PMCID: PMC3526995. eng.
 84. Buchner J, Renner M, Lilie H, Hinz HJ, Jaenicke R, Kiefhabel T, et al. Alternatively folded states of an immunoglobulin. *Biochemistry*. 1991 Jul;30(28):6922-9. PubMed PMID: 1906346. eng.
 85. Lilie H, Buchner J. Domain interactions stabilize the alternatively folded state of an antibody Fab fragment. *FEBS Lett*. 1995 Mar;362(1):43-6. PubMed PMID: 7698350. eng.
 86. Thies MJ, Kammermeier R, Richter K, Buchner J. The alternatively folded state of the antibody C(H)3 domain. *J Mol Biol*. 2001 Jun;309(5):1077-85. PubMed PMID: 11399080. eng.

87. Feige MJ, Simpson ER, Herold EM, Bepperling A, Heger K, Buchner J. Dissecting the alternatively folded state of the antibody Fab fragment. *J Mol Biol.* 2010 Jun;399(5):719-30. PubMed PMID: 20434459. eng.
88. Latypov RF, Hogan S, Lau H, Gadgil H, Liu D. Elucidation of acid-induced unfolding and aggregation of human immunoglobulin IgG1 and IgG2 Fc. *J Biol Chem.* 2012 Jan;287(2):1381-96. PubMed PMID: 22084250. PMCID: PMC3256859. eng.
89. Fesinmeyer RM, Hogan S, Saluja A, Brych SR, Kras E, Narhi LO, et al. Effect of ions on agitation- and temperature-induced aggregation reactions of antibodies. *Pharm Res.* 2009 Apr;26(4):903-13. PubMed PMID: 19104916. eng.
90. Hari SB, Lau H, Razinkov VI, Chen S, Latypov RF. Acid-induced aggregation of human monoclonal IgG1 and IgG2: molecular mechanism and the effect of solution composition. *Biochemistry.* 2010 Nov;49(43):9328-38. PubMed PMID: 20843079. eng.
91. Chennamsetty N, Voynov V, Kayser V, Helk B, Trout B. Design of therapeutic proteins with enhanced stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009 JUL 21 2009;106(29):11937-42. PubMed PMID: WOS:000268178400024. English.
92. Barrick D, Baldwin R. 3-State Analysis of Sperm Whale Apomyoblobin Folding. *Biochemistry.* 1993 APR 13 1993;32(14):3790-6. PubMed PMID: WOS:A1993KX17900035. English.
93. Sakurai K, Goto Y. Principal component analysis of the pH-dependent conformational transitions of bovine beta-lactoglobulin monitored by heteronuclear NMR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Sep;104(39):15346-51. PubMed PMID: 17878316. PMCID: PMC2000507. eng.
94. Feige MJ, Walter S, Buchner J. Folding mechanism of the CH2 antibody domain. *J Mol Biol.* 2004 Nov;344(1):107-18. PubMed PMID: 15504405. eng.
95. Neet KE, Timm DE. Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. *Protein Sci.* 1994 Dec;3(12):2167-74. PubMed PMID: 7756976. PMCID: PMC2142765. eng.
96. Monsellier E, Chiti F. Prevention of amyloid-like aggregation as a driving force of protein evolution. *Embo Reports.* 2007 AUG 2007;8(8):737-42. PubMed PMID: WOS:000248447300009. English.
97. Budyak IL, Krishnan B, Marcelino-Cruz AM, Ferrolino MC, Zhuravleva A, Gierasch LM. Early folding events protect aggregation-prone regions of a β -rich protein. *Structure.* 2013 Mar;21(3):476-85. PubMed PMID: 23454187. PMCID: PMC3630246. eng.
98. Frank M, Walker RC, Lanzilotta WN, Prestegard JH, Barb AW. Immunoglobulin G1 Fc domain motions: implications for Fc engineering. *J Mol Biol.* 2014 Apr;426(8):1799-811.

- PubMed PMID: 24522230. PMCID: PMC4041121. eng.
99. Kiyoshi M, Caaveiro JM, Kawai T, Tashiro S, Ide T, Asaoka Y, et al. Structural basis for binding of human IgG1 to its high-affinity human receptor FcγRI. *Nat Commun.* 2015;6:6866. PubMed PMID: 25925696. PMCID: PMC4423232. eng.
 100. Vangone A, Spinelli R, Scarano V, Cavallo L, Oliva R. COCOMAPS: a web application to analyze and visualize contacts at the interface of biomolecular complexes. *Bioinformatics.* 2011 Oct;27(20):2915-6. PubMed PMID: 21873642. eng.
 101. Wright CF, Teichmann SA, Clarke J, Dobson CM. The importance of sequence diversity in the aggregation and evolution of proteins. *Nature.* 2005 Dec;438(7069):878-81. PubMed PMID: 16341018. eng.
 102. Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene.* 1988 Jul;67(1):31-40. PubMed PMID: 3047011. eng.
 103. Pryor KD, Leiting B. High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. *Protein Expr Purif.* 1997 Aug;10(3):309-19. PubMed PMID: 9268677. eng.
 104. Deyoung L, Fink A, Dill K. Aggregation of Globular-Proteins. *Accounts of Chemical Research.* 1993 DEC 1993;26(12):614-20. PubMed PMID: WOS:A1993MM45700002. English.
 105. Feder J, Jossang T. Aggregation Kinetics of Immunoglobulins. *Physica Scripta.* 1986 1986;T13:33-42. PubMed PMID: WOS:A1986G635600006. English.
 106. McClements DJ. *Understanding and Controlling the Microstructure of Complex Foods*: Elsevier; 2007.
 107. Wozniak-Knopp G, Rüker F. A C-terminal interdomain disulfide bond significantly stabilizes the Fc fragment of IgG. *Arch Biochem Biophys.* 2012 Oct;526(2):181-7. PubMed PMID: 22483683. eng.
 108. Betz SF. Disulfide bonds and the stability of globular proteins. *Protein Sci.* 1993 Oct;2(10):1551-8. PubMed PMID: 8251931. PMCID: PMC2142256. eng.
 109. Zhou NE, Kay CM, Hodges RS. Disulfide bond contribution to protein stability: positional effects of substitution in the hydrophobic core of the two-stranded alpha-helical coiled-coil. *Biochemistry.* 1993 Mar;32(12):3178-87. PubMed PMID: 8457578. eng.
 110. Zavodszky M, Chen CW, Huang JK, Zolkiewski M, Wen L, Krishnamoorthi R. Disulfide bond effects on protein stability: designed variants of *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor-V. *Protein Sci.* 2001 Jan;10(1):149-60. PubMed PMID: 11266603. PMCID: PMC2249841. eng.

111. Wozniak-Knopp G, Stadlmann J, Rüker F. Stabilisation of the Fc fragment of human IgG1 by engineered intradomain disulfide bonds. *PLoS One*. 2012;7(1):e30083. PubMed PMID: 22272277. PMCID: PMC3260182. eng.
112. Han JH, Batey S, Nickson AA, Teichmann SA, Clarke J. The folding and evolution of multidomain proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Apr;8(4):319-30. PubMed PMID: 17356578. eng.
113. Takahashi H, Arai M, Takenawa T, Sota H, Xie QH, Iwakura M. Stabilization of hyperactive dihydrofolate reductase by cyanocysteine-mediated backbone cyclization. *J Biol Chem*. 2007 Mar;282(13):9420-9. PubMed PMID: 17264073. eng.
114. Perchiacca JM, Tessier PM. Engineering aggregation-resistant antibodies. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2012;3:263-86. PubMed PMID: 22468604. eng.
115. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013;82:775-97. PubMed PMID: 23495938. eng.

発表論文

Yageta S, Lauer MT, Trout BL, Honda S. Conformational and Colloidal Stabilities of Isolated Constant Domains of Human Immunoglobulin G and Their Impact Antibody Aggregation under Acidic Conditions. *Molecular Pharmaceutics*. 2015;12(5):1443-1455
 DOI: 10.1021/mp500759p
 Copyright © 2015 American Chemical Society

謝辞

本研究は、東京大学大学院新領域創成科学研究科博士課程在学中、産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門本田真也副部門長のご指導のもと行われました。

研究計画および遂行方法、論文作成に関する考え方まで真摯にかつ論理的にご教授くださいました本田真也副部門長に深く感謝いたします。本田先生とディスカッションを交わした日々は、私にとって学び多きかけがいのない時間でした。

本論文の副査としてご指導をいただきました東京大学大学院新領域創成科学研究科の上田卓也教授、伊藤耕一教授、深井周也准教授、東京大学大学院総合文化研究科の新井宗仁准教授に深く御礼を申し上げます。

抗体ドメイン蛋白質の **Spatial aggregation propensity** および **Developability index** の計算を快くお引き受けくださいましたマサチューセッツ工科大学 **molecular engineering laboratory** の **Bernhardt L. Trout** 教授、**Timothy M. Lauer** 氏に心より感謝いたします。

実験技術をご教授くださり、また研究計画と学生生活に関するアドバイスをいただきました産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門渡邊秀樹主任研究員に深く感謝いたします。

物理化学の概念や理論の導出、データ解析の方法についてご教授くださいました産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門今村比呂志博士研究員に深く感謝いたします。

産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門分子細胞育種研究グループおよび次世代バイオ医薬品製造技術研究組合の研究員の皆様には、日々の研究のサポートとアドバイスを賜り、本論文の完成につながりました。ここに深く感謝いたします。

東京大学には学生生活におけるサポートを賜り、5年間に及ぶ産総研での研究を集中して遂行することができました。ここに感謝いたします。

産業技術総合研究所には本田研での研究遂行におけるサポートを賜り、またイノベーションスクールを通して博士研究員や学生と交流する機会を与えていただきました。ここに感謝いたします。

最後に、温かく見守って下さいました友人、家族に心より感謝いたします。

2016 年 3 月

八桁 清樹