

## 論文の内容の要旨

論文題目     ホモロジーモデリングと分子動力学法によるROB01 IG5 domainとB5209抗体の複合体構造予測  
氏名         高松 佑一郎

### 論文全体の概要

現在の医薬品開発は Structure-Based Drug Design が主流になりつつある。同様に抗体医薬の開発にとっても、抗原抗体複合体の構造情報は重要である。

本研究の目的は抗体構造が未知である系に対し、ホモロジーモデリング法と分子動力学(MD)計算を用いて、抗原抗体複合体構造を予測する事である。また、得られた複合体構造と結晶構造を比較し、更なる方法論の発展を目指す。ここでは膜タンパク質である ROB01 IG5 domain とそれに高親和性を示す新規抗体である B5209 抗体との複合体構造について研究を行った。この ROB01 IG5 domain は肝細胞癌に特異的に発現するものなので、本研究の成果は将来的な肝細胞癌の抗体治療薬開発に対して重要な知見を与えると考えられる。

研究を始めるにあたり B5209 の抗体構造が未知であったので、B5209 アミノ酸シーケンスから抗体構造をブラインドで予測する必要があった。ここでは、ホモロジーモデリング法を用いて構造の予測を行った。ホモロジーモデリング法で作成した 370 個の候補構造の中から、分子力学エネルギーが最も低いものを予測構造とした(この構造を持つ B5209 Fv 抗体を hoB5209 と呼ぶ)。後に得られた結晶構造と比較すると、主鎖の Root Mean Square Deviation(RMSD)の値が 0.13 nm であり、精度よく結晶構造を再現出来ていた。構造予測が難しいとされる CDR-H3 部位の RMSD 値も 0.2 nm であり、結晶に近い物を予測することが出来ていた。側鎖については、RMSD 値が 0.5 nm 程度まで大きな値を示す残基も存在した。しかし、この事は構造の本質的な違いではなく、水に露出した側鎖の自然な揺らぎを反映したものである可能性がある。この可能性を検証するために MD 計算に基づく新しい揺らぎ解析法を開発した。その解析法を用いて調べたところ、大半の残基に対しては自然な側鎖の熱揺らぎにより RMSD 値が大きくなっていた事が分かった。しかし、少数ではあるが側鎖のパッキングが結晶と本質的に異なる残基が発見された。こうした動力的観点から解析する手法により、構造予測のより詳細な確認が可能になると期待される。

次に ROB01 IG5 domain と hoB5209 の複合体構造を予測するために、MD 計算を用いる。実際に MD シミュレーションで解離状態から会合過程までを再現し、得られた複

合体構造のうち相互作用エネルギーが最も低い構造を予測構造とした。予測構造について結晶構造と比較したところ、結晶構造と比較して結合界面に直行する軸に対して抗体が  $30^\circ$  程度だけずれている事がわかった。従来の剛体ドッキングシミュレーションの結果と比べて、MD シミュレーションが非常に良く結晶構造を再現している。この結果は MD シミュレーションが induced fit や水分子の効果をより正確に考慮しているという事を反映していると考えられる。従って、分子動力学計算による複合体構造予測は計算コストが高いものの、正確な構造予測法として有用である。さらに、予測複合体を作り出した会合過程を詳細に見ると、界面のアミノ酸ペアの再編成が段階的に起こっている事が観察された。こうした解析が抗体の特異的認識過程について重要な知見を与えると期待される。

上記において、分子動力学シミュレーションを用いた複合体構造予測は、従来の剛体ドッキングシミュレーションと比べてより良い成果をあげる事が出来たが、結晶構造と比べてまだ顕著な違いも残っている。例えば、アミノ酸ペアの再現率は 10%程度しかない。このような違いの大きな原因の 1 つとして、ホモロジーモデリング法で作成された抗体構造の誤差が考えられる。この事を検証するために、会合過程の分子動力学シミュレーションを、ホモロジーモデルではなく B5209 の結晶構造を用いて行った。結果、12 本のトラジェクトリのうち、6 本のトラジェクトリが結晶構造と非常に近い複合体構造を形成した。また、hoB5209 の時に見られた  $30^\circ$  程度のずれも見られなかった。この事は、正確な抗体構造を用意する事ができれば分子動力学シミュレーションにより、正確な抗原抗体複合体構造の予測が可能である事を示している。また、精度良く抗体構造を予測することは現在のホモロジーモデリング法のみでは難しく、分子動力学法などとの連携が必要であると考えられた。

本研究では、分子動力学法を用いる新しい構造予測手法および解析手法を開発し、肝細胞癌に特異的に発現する ROB01 の Ig5 domain と B5209 抗体の複合体に応用した。この新しい手法は系に依らない汎用性があるので、今後の抗体医薬開発から抗体の特異的抗原認識機構の研究まで幅広く応用されることが期待される。