

博士論文

コンビナトリアル・ヒスチジン・スキャニングに  
よるタンパク質間相互作用の pH 感受性変換

東京大学大学院新領域創成科学研究科

メディカルゲノム専攻博士課程

塚本雅之

1章	序論	
1-1	緒言	4
1-2	プロテイン A	8
1-3	抗体医薬品	10
1-4	先行研究	12
1-5	本研究の目的	13
2章	ライブラリ設計	
2-1	緒言	14
2-2	変異導入方法	16
2-3	変異部位の選定方法	16
2-4	結果と選定条件	17
2-5	ライブラリ設計	23
3章	コンビナトリアル・スクリーニング	
3-1	緒言	27
3-2	ファージ・ディスプレイ法について	28
3-3	実験方法	29
3-4	結果と考察	32
4章	タンパク質作製	
4-1	タンパク質発現ベクターの作製	40
4-2	タンパク質の発現・精製	44
4-3	結果と考察	45

5章	アフィニティ・クロマトグラフィの評価	
5-1	緒言	46
5-2	実験方法	48
5-3	結果と考察	50
6章	タンパク質間相互作用の速度論的および熱力学的解析	
6-1	緒言	63
6-2	実験方法	64
6-3	結果と考察	69
7章	タンパク質の熱安定性評価	
7-1	緒言	98
7-2	実験方法	98
7-3	結果と考察	102
8章	スクリーニングの収束配列の構造と機能評価	
8-1	緒言	110
8-2	スクリーニングの収束配列の相互作用能評価	110
8-3	スクリーニングの収束配列の熱安定性評価	111
8-4	考察	115
9章	結論	117
	参考文献	122
	謝辞	

# 1 章 序論

## 1-1 緒言

タンパク質は、生命 (生理) 現象 (生体形成、生化学反応、情報伝達、免疫など) において重要な物質である。このタンパク質の構造・機能の理解が、生命 (生理) 現象の理解を深め、工学、農学、医学などの分野での応用が促進されることだろう。

タンパク質工学は、タンパク質の構造と機能の理解を深めるとともに発展してきた。タンパク質工学は、大量生産、機能の解析または改変、新規タンパク質の設計と創製などを可能にしてきた。こられの可能性を大きく前進させた要因は、遺伝子工学の進展であり、その後の様々な構造または機能解析法の進展である。例えば、遺伝子工学によって、タンパク質遺伝子を自由に操作可能となり、配列の情報と構造または機能の関係を理解することができるようになった。そして、構造解析 (X 線結晶構造解析、核磁気共鳴法など) によって、詳細な静的または動的構造を特定することが可能となり、タンパク質の構造と機能の関係を深く理解することができるようになった。

タンパク質の配列や構造や機能に関する研究が進められる中、1990 年代には世界的規模でヒトゲノムプロジェクトが開始され、ヒトゲノム全塩基配列を決定する壮大な計画が、2003 年に完了が宣言された [1]。現在もモデル生物のゲノム配列解析が次々に行われるなど [2]、タンパク質のアミノ酸配列情報のレベルでは、大規模なデータの蓄積が進んでいる。それに伴って、タンパク質の立体構造をそのゲノムレベルで徹底的に調べようという構造ゲノミクスという分野が生まれ、個々のタンパク質の立体構造をひとつひとつ明らかにする実験を積み重ね、それらの構造解析データの蓄積からすべてのタンパク質の機能を推定していこうとする動きがある。また結果的に、タンパク質の基本骨格構造をすべて決定することができ、一次構造 (アミノ酸配列) に基づいた高次構造を予測する問題を、それらの基本骨格構造に帰属するかという帰属推定問題に還元することにあるとされている。そして、タンパク質のアミノ酸配列、構造、および機能の関

係をまとめた様々なデータベースの構築が進められている。

タンパク質工学的研究の究極的目標は、上述の構造ゲノミクスとして進められているタンパク質の高次構造を配列情報から決定していこうとするように、望みの構造や機能を有するタンパク質を合理的にアミノ酸配列設計できることだろう。実際に、近年の研究において、金属結合、触媒反応、特異的な結合の能力などをもつ人工タンパク質設計が様々に行われている [3,4]。更に、例えば、Baker らが天然には存在しない Diels-Alder 反応を触媒する酵素の設計をコンピューターデザインと実験的な構造および機能解析を通じた精密化によって作製できたことを報告している [5]。しかしながら、そうした人工タンパク質の設計・創製の研究が進む中でも、本当の意味で自在にデザインすることはまだまだ困難な課題である。現在もタンパク質工学的手法による有益なタンパク質の設計・創製は、天然に存在するタンパク質をテンプレートとし、既存の様々な情報を利用して合理的にリデザインし、構造および機能解析から精密化していくことで有益なタンパク質を作製していくということが多くの研究で見られる方法だろう。その利点は、既存の構造および機能情報、または改変タンパク質 (変異体) 作製の研究の蓄積が進み、目的に対して、それらの情報や変異体解析実験から効果的な変異を調べて、的確に設計していくことが可能である。欠点としては、1 置換変異体解析の判断条件によって設計していく場合が多いため、複数変異の効果で大きな機能向上または改変が起こるようなもの [6] を合理的設計することが難しいと考えられる。また、既存の情報から設計方針を立てるので、予期せぬ効果をもたらす変異を特定することも難しいと考える。

上記とは別に、タンパク質工学的研究の取り組みの中で、進化工学的手法を用いた設計が新規または改変タンパク質を創製する強力なツールとして生まれてきた。この工学は、1970 年代から 1980 年代にかけてドイツの Eigen が進化の理論的考察から出発し、それを学問として「進化分子工学」を提唱した [7]。そのコンセプトは、ダーウィン進化の変異、淘汰、増幅の基本サイクルを実験系に取り入れて、対象となるタンパク質を

高速に目的の方向へ指向進化していく、というものである。この方法は、既存の情報をほとんど必要とせず、目的タンパク質の遺伝子ライブラリを作製し、目的の機能を有するための選択方法を考えて実施することで、目的タンパク質を創製しようというものである。それは、短時間にタンパク質の能力を改善する新たな道を提供し、タンパク質工学を更に発展させてきた。その利点は、ランダムな遺伝子ライブラリを試験管内進化させることで予期せぬ効果を伴って改変タンパク質が作製できる。また、合理的設計では難しい複数変異の効果で大きな機能向上または改変したものを作製できる可能性を含んでいることである。欠点としては、ライブラリの設計と目的のセレクション方法が適切ならば、有益な改変タンパク質を獲得できる可能性が高いけれども、その条件設定の適切さは事前に不明であることが一般的である。依って、最終的に得られた配列が目的とする分子特性を示さないことも少なくない。また、従来のタンパク質工学手法に比べれば、少ない労力で一度に多くの変異体を調べることができるが、探索可能なライブラリ・サイズは有限であり、変異方法や変異部位の数によっては限度がある。

今日では、上記の二つの方法の利点と欠点を補完することで、効果的に目的のタンパク質を作製する方法が取り組まれている。それは、既存情報を用いて変異部位を絞ることや、変異導入方法またはセレクション方法の設定などを合理的に考えることで、効率または効果的に指向進化させて新規タンパク質を創製することである [8]。上述したように、最近の遺伝子またはタンパク質に関するデータベースの充実は、対象となる遺伝子の進化達成の方向、度合いを予測するうえでは心強いものになっている。また、ゲノムプロジェクトとともに配列解析方法が発展したことで、スクリーニングで取得してきた変異体群の大量な配列情報を一度に取得可能となってきた。そして、それらの情報を合理的に考え、有益なタンパク質作製に成功している [9]。

本研究でも、そのようなタンパク質工学研究の流れの中で、合理的設計かつコンビナトリアルなスクリーニングによって、プロテイン A と抗体のタンパク質間相互作用の

pH 感受性変換をモデルケースとして実施し、pH 依存的なタンパク質間相互作用を応用した技術のエンジニアリングを発展させていくために有効な方法のひとつとなることを示すことができると考えている。

## 1-2 プロテイン A

黄色ブドウ球菌由来のタンパク質であるプロテインA (SpA) は、様々な抗体の定常領域 (Fc) に対する強い相互作用とそれらの可変領域 (Fab) に対する弱い相互作用を示す [9-15]。SpAは5つの抗体結合ドメイン (E、D、A、B、C) をもち、約58個のアミノ酸からなり、高い相同性を保持している [11, 12]。そのSpAの構造は、X線結晶構造解析 [16, 17] やNMR [18, 19] で、3ヘリックスバンドル構造であることが明らかにされている。そして、各々のドメイン単独でも、抗体結合活性を保持することがわかっている [15]。一方、Zドメインは、Bドメインの配列をもとに合成された人工タンパク質で [12]、Bドメインとはアミノ酸残基が2箇所 (A1V, G29A) 異なる。この2置換により、抗体結合性を保持したままでより構造が安定化することがわかっている。

SpAの細胞膜外ドメイン (E、D、A、B、C) およびZドメインは、その特異的な抗体結合活性を利用した多くの製品が市販されている。例えば、抗体精製のためのアフィニティ・クロマトグラフィ用担体や抗体を検出するための検査試薬、研究試薬などである。このSpAと抗体の結合力は、中性条件では強く、酸性条件 (pH=3.0以下) で弱いことがわかっている。そのため、抗体精製を目的とした場合、例えば、血清等の抗体を含む試料溶液を中性条件にして、SpAを固定化したビーズ等の固相支持体に接触させ、抗体を選択的に結合させる。その後、中性溶液で洗浄し抗体以外の成分を除去する。最後にpH=3.0の酸性溶液を加えて、SpAに結合した抗体を溶出させる。これにより、高い純度で抗体を単離、回収、精製することができる。

また、人工タンパク質であるZドメインは非常に有効なスキャホールド (改変タンパク質作製する際の骨格構造) タンパク質分子 (名前: Affibody) である。このAffibodyを用いた技術は多岐にわたっており、上記のように市販されているバイオテクノロジー分野、イメージング技術の分野、そして治療薬の分野などである [20]。例えば、治療薬の分野において、特異的結合を有する抗体と同様の結合能を有するものが作製され、抗体



に変わる治療薬となる可能性を秘めていると考えられている。また、標的に対する的確に薬剤を反応させるためのドラッグデリバリーシステムにおいてもその特異的結合能の利用がなされている。加えて、結合能だけでなく、小分子でありながら非常に高い構造安定性を保持しているため、小さな薬剤タンパク質の生体内での半減期延長のためのフュージョンタンパク質として利用されている [21]。

### 1-3 抗体医薬品

抗体は、ヒトの体の中で細菌やウイルスなどの外敵やがん細胞の脅威に立ち向かう重要な役割を担っている分子である。その特徴は、多様性、高い特異性、強い親和力を併せ持っていることである。抗体は、B細胞が分化したプラズマ細胞から産生され、外敵やがん細胞がもつ特定の抗原に特異的に結合すると、生体内の様々な働きによって排除される。この抗体の高い親和性と特異性は、バイオテクノロジーの分野で多く利用されている有効な分子である。

抗体医薬品は、抗体が持つ高い特異性を利用している。従来の医薬品は、標的以外に作用する割合が高い場合が多く、思わぬ副作用が生じることが多かった。一方で、抗体医薬品は、標的以外に作用することがほとんどないため、副作用が生じにくい効果的な治療薬として注目されている。近年は、ゲノム解析が進み [1]、創薬のターゲットとなる標的分子が特定されていくことで、その可能性が拡大していくことが期待されている。

抗体医薬品は、モノクローナル抗体を主成分としている。そのモノクローナル抗体の作製方法の一つとしては、標的 (抗原) に結合する抗体を産生する B 細胞 (マウスなどに抗原投与して作製) と、無限に増え続ける能力を持ったミエローマ細胞を融合したハイブリドーマ細胞から産生させるものである。近年では、試験管内において、抗体の可変領域 (Fab) の遺伝子ライブラリを用いたファージ・ディスプレイ法 [22-25] を用いて、抗原・抗体の相互作用を利用したスクリーニングから親和性および特異性の高い抗体遺伝子を作製することが可能となり、多様なターゲット (抗原) を認識できる抗体や抗原抗体反応を利用した B 細胞由来の抗体よりも治療効果の高い抗体を作製できる可能性が広がってきている。そして、抗体遺伝子の発現ベクターを作製し、製造用動物細胞 (チャイニーズハムスター卵巣由来の CHO 細胞, マウスミエローマ由来の NS0 細胞および SP2/0 細胞など) に導入して作製することができるようになっている。これらの抗体が産生された培養抽出液は、多くの細胞由来の不純物を含んでおり、その中から

抗体だけを選択的に結合して、大量の抽出液から濃縮して獲得する操作が、医薬品の効果と安全性を担保する上で重要なものになる。この操作として、主にプロテイン A・アフィニティ・クロマトグラフィ精製が用いられている。

抗体医薬品産業において、現在のところまでに 25 種類以上のものが市場にでており、約 4.4 兆円の規模になっている [26]。その治療対象の多くは、ガンの分野 (50.8 %) や自己免疫疾患 (37.8 %) で、医療分野では治療に欠かせない存在となっている製品も少なくないだろう。そして、世界で多くの臨床開発が進んでいるとともに、その物性についての基礎研究も活発に行われている医薬品と言えるだろう。

#### 1-4 先行研究

これまでにヒスチジン変異導入を用いて、タンパク質と化合物の相互作用またはタンパク質間相互作用を pH 変化に対して、その相互作用の感受性を向上させた変異体作製の研究例について以下に示す [45-53]。

アビジン・ビオチンの相互作用システムにおいて、アビジンは4つのサブユニットで形成されたタンパク質である。そのサブユニット間の相互作用の pH 感受性を変換することによって、4量体構造が壊れてビオチンとの相互作用が変化することが報告されている [46]。

医薬品分野において、タンパク質の生体内での薬物導体を延長させるために、目的のタンパク質と細胞のレセプター間または目的タンパク質と抗原間の相互作用の pH 感受性変換を向上させた変異体が作製されている [47-48]。

そして、本研究でも対象としているアフィニティ・クロマトグラフィのリガンドタンパク質の pH 感受性を向上させたものが様々に報告されている [37, 49-51, 53]。それらの研究においては、ヒスチジン変異導入に対して本来の相互作用を維持しながら、pH 変化に伴って相互作用が明確に減少する変異体が作製されている。

上記のように、タンパク質間相互作用の pH 感受性を変換することは、様々な分野において有効な方法であると考えられる。先行研究の多くは、合理的設計に基づいて変異体が作製されている。そして、近年になって、コンビナトリアル・スクリーニングによる研究 [52] が報告されるようになってきている。そこで、本研究では、これまでより効果的かつ効率的にタンパク質間相互作用の pH 感受性変換を実現できないかと考え、合理的設計とコンビナトリアルなスクリーニングの両方を用いて研究することにした。

## 1-5 本研究の目的

本研究では、抗体製品はバイオテクノロジーの分野またはバイオ医薬品産業において有効なものである。その製造工程では、プロテイン A・アフィニティ・クロマトグラフィ精製が一般的に用いられている。その主な欠点の 1 つが、溶出操作時に低い pH で取扱うことが必要のために、抗体が不安定化して変性および凝集することである。この抗体の変性・凝集は、安全面の問題、免疫原性、不都合な副反応の原因となる。

本研究では、構造情報とコンビナトリアル・スクリーニングの統計的な解析を用いて、pH 感受性を変化させた PAB リガンドを作製することを目的とする。pH 感受性の調整は、ヒスチジン残基の pH スイッチの性質を用いる。PAB 変異体のヒスチジン・スキヤニング・ライブラリは、構造情報から選択した変異部位に野生型アミノ酸残基とヒスチジン残基をそれぞれコードするように設計する。そのライブラリをスクリーニングすることによって、pH 感受性の高い PAB 変異体群を得たのち、効果的な変異部位をアミノ酸出現頻度から推定する。そして、効果的な変異部位については、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法測定と構造情報からその効果を評価する。これらのアプローチによって、これまでよりも穏和な pH 条件下で抗体が溶出できるアフィニティ・リガンドを開発する。

## 2章 ライブラリ設計

### 2-1 緒言

遺伝子ライブラリの作製方法は、目的遺伝子にランダムに変異導入する方法、複数の変異部位に野生型のアミノ酸または特定のアミノ酸をコードするように組み合わせる方法または 20 種のアミノ酸をコードするように組み合わせる方法 [27]、アミノ酸の親水性の高いものと疎水性の高いものをコードするように組み合わせる方法 [28]、目的遺伝子とホモロジーの高い複数の遺伝子配列シャッフリングする方法 [29]などがあり、様々な多様性を有するライブラリを作製することが可能になっている。

本研究で用いるプロテイン A (SpA) は、確かに様々な抗体の定常領域 (Fc) と相互作用するけれども、ヒト免疫グロブリン (hIg) G3 の Fc とほとんど相互作用しないことが一般的にわかっている。この SpA と hIgG3 の相互作用が弱いのは、中性条件下で Fc の結合界面上に正電荷を帯びたアルギニン (Arg) 残基が存在することが原因であると考えられた。これは、SpA と抗体の Fc 領域の相互作用界面が電荷をもつアミノ酸の存在に敏感であることを示している。この Arg 残基は、ヒトの IgG1, IgG2, IgG4 では、ヒスチジン (His) 残基である。この His 残基は、マウス、ラビットなどでも保存されていて、Fc 領域の SpA 相互作用面の中心に位置している。更には、この Fc 領域の His 残基と近い位置に SpA の His 残基が位置することも複合体の結晶構造で明らかになっている [16]。これらの His 残基が、SpA と抗体の相互作用の解離に重要であると考えられている。His 残基は、アルカリ性または中性条件では電荷をもたず、低い pH 条件 (pH=6 以下) でのみ正電荷を帯びる。結果として、SpA と IgG の間に静電的反発力の増加と疎水的相互作用の減少が起こる。この His 残基の pH スウィッチの性質は、穏和な条件下で結合した IgG を溶出するための SpA リガンドタンパク質を作製するのに役に立つと考えられる。実際、Gore らの先行研究において、SpA と IgG との相互作用界面が、電荷をもつアミノ酸 (Glu, His, Arg, Lys) の存在に敏感であることを報告している [30]。

その pH 感受性に着目すると、各アミノ酸残基の側鎖構造における特有の荷電の変化に  
相関するものであった。加えて、Brown らの先行研究において、PAB と IgG の複合体  
の構造解析を用いて、ヒスチジン変異導入部位を的確に選択することで、高い pH で抗  
体の溶出を可能とするプロテイン・B ドメイン (PAB) 変異体を作製している [31]。

そこで本研究では、変異導入方法をヒスチジン残基に絞ってライブラリ作製すること  
で、変異導入できる部位の数を多くするとともに Brown らの研究よりも多様なヒスチ  
ジン変異導入した PAB 変異体を作製することにした。その変異部位は、PAB と IgG の  
アミノ酸間距離情報と PAB 上での各アミノ酸の露出表面積比のデータを用いて選定し  
た。選定した各変異部位において、野生型アミノ酸残基とヒスチジン残基をコードする  
ような遺伝子設計を行って、ヒスチジン・スキャンニング・ライブラリを作製した。

## 2-2 変異導入方法

### <ヒスチジン変異導入>

側鎖のイミダゾール基が  $\text{pH} = 6$  で正に帯電することによる静電反発の増加および疎水的相互作用の減少によって相互作用の解離が促進されることを期待している (Fig. 1)。また、ヒスチジン残基は、中性付近では疎水性が高く、SpA と hIgG 間の相互作用に主に寄与している疎水的相互作用は維持することができると考えられるので、本来の相互作用を大きく損なわない変異であると考えている。

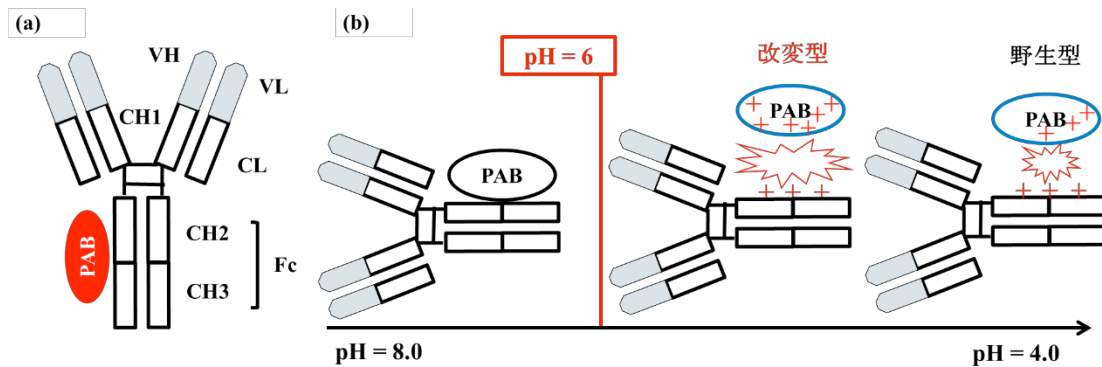


Fig. 1 (a) PAB と IgG の相互作用の模式図

(b) ヒスチジン変異導入による解離促進の模式図

## 2-3 変異部位の選定方法

### <PAB と IgG のアミノ酸間の距離計算>

PABとhIgG1のFcとの複合体の立体構造座標データを、国際的なタンパク質立体構造データベースであるProtein Data Bank (PDB: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) よりダウンロードした (PDB: 1FC2)。ついで、ccp4i 4.0 (Daresbury Laboratory, UK Science and Technology Facilities Council) を用いて、PABのすべてのアミノ酸とFcの正電荷をもつアミノ酸の間の距離を計算した。また、Fc上のアミノ酸から5 Å以内に存在するPABのアミノ酸についても計算を実施した。



### <PAB 上のアミノ酸の露出表面積比計算>

PAB上のアミノ酸の露出表面積比を上記の立体構造座標データから計算した。この数値は、各アミノ酸残基がタンパク質の分子表面または内部に存在しているかを考える指標となる。計算は、Surface Racer 3.0 for Linux (Dr. Oleg Tsodikov, The University of Michigan)、Red Hat Enterprise Linux WS release 3 (Red Hat)、Dell Precision Workstation370 (DELL) を用いて行った。

## 2-4 結果と選定条件

T7 ファージ・ライブラリで選択可能なサイズを考慮して、以下の2つの条件を設定した。

1. Fc の正電荷を帯びているアミノ酸からの距離が 9 Å 以内にある PAB のすべてのアミノ酸
2. Fc の正電荷を帯びているアミノ酸からの距離が 9~11 Å 以内で、PAB 中での露出表面積比がより高いもの。

(1, 2 の条件に含まれるアミノ酸間の距離情報は Table 1、露出表面積比の情報は Table 2 に示す)

上記の条件設定 1 において、アミノ酸間距離の下限について、例えば、4 Å 以上にする事で本来の相互作用に重要または構造安定性に寄与するアミノ酸部位を除くことは十分可能であった。また、これまで実験またはシミュレーションによる変異体解析等で各残基の相互作用や構造安定性への影響に関する理解は進んでいるため [30-36]、変異対象部位として選択する際に優先順位をつけることも可能であった。しかしながら、本研究ではスクリーニングを通して相互作用に重要な部位は保存される、または相互作用に重要な部位がヒスチジン残基に置換されても中性条件での相互作用を維持し、酸性条件で解離を促進させるような効果的な部位が存在するかもしれないと考えた。結果と

して、Fc の正電荷から近い場所にヒスチジン残基を導入すれば効果的な静電反発力の増加が期待されるので、近接のものから PAB 上のアミノ酸を順番に選択した。本研究室の先行研究から 7~8 Å までがヒスチジン置換による pH 感受性変換が期待できることはわかっていたので [37]、少し広めにとって 9 Å まで選択することにした。この条件設定 1 のアミノ酸間の距離情報だけで変異対象部位の数は 10 個である。また、この条件設定においては、露出表面積比は考慮しなかった。実際にその値を考慮すると、変異対象部位の側鎖がタンパク質間相互作用への影響が高い分子表面に存在するものを優先的に選択することや、PAB のタンパク質自身の構造安定性を低下させない部位を選択することができるだろう。しかしながら、本研究では露出面積比の条件を加えなくてもすべてのアミノ酸残基が選択可能であったことと、近接の相互作用改変の多様性を優先するためにここでは考慮しなかった。加えて、もし仮に、構造安定性に影響が大きな変異対象部位が含まれたとしても、スクリーニングを通して構造不安定なものは除かれると考えた。

条件設定 2 においては、スクリーニング可能なライブラリ・サイズまでアミノ酸間距離を広げて変異対象部位を選定していった。そのため、9 Å 以降では、溶液中で IgG と接触する可能性をもし期待するならば、やはり露出表面積比が高い部位（側鎖を分子表面に持っているもの）を選択することがタンパク質間相互作用に影響を与える可能性が高くなると考え、1 Å ずつ広げては露出表面積比が高いものを優先的に選択していくと最大で 11 Å まで対象部位が広がった形になった。その結果、17 個の変異対象部位を決定した。

Table 1 PAB と IgG のアミノ酸間距離情報

Contact residues は、抗体のアミノ酸残基で、その下に距離情報を示している。5 Å まではすべてのアミノ酸、5 Å より長距離では中性付近で正電荷を帯びるアミノ酸だけである。

PA amino acid	Contact residues on Fc (<3.3Å)	Contact residues on Fc (3.3-5.0Å)	Counter residues on Fc (<7.0Å)	Counter residues on Fc (7.0-11.0Å)
Phe124	-	Met252 (SD) 3.39 Å	Arg255 (CG) 5.66 Å His435 (C) 6.18 Å	Lys248 (O) 7.10 Å His310 (NE2) 9.39 Å His433 (C) 8.19 Å His435 (C) 7.04 Å
Asn125	-	Ser254 (OG) 4.25 Å	-	His435 (O) 10.75 Å
Lys126	-	-	Ser254 (OG) 6.49 Å	-
Glu127	-	-	Ile253 (CG2) 6.71 Å	-
Gln128	Ser254 (OG) 3.19 Å	Ile253 (CG2) 3.85 Å	Arg255 (N) 6.42 Å	Arg255 (O) 7.30 Å His310 (NE2) 7.95 Å His435 (ND1) 9.69 Å
Gln129	Leu251 (O) 2.91 Å Met252 (CG) 3.27 Å	Ile253 (N) 3.32 Å Ser254 (OG) 3.59 Å Asn434 (OD1) 3.92 Å His435 (CB) 4.19 Å	Arg255 (N) 6.42 Å His435 (CA) 5.29 Å Lys248 (O) 6.91 Å Arg255 (CG) 6.98 Å	Lys248 (C) 7.53 Å Arg255 (CB) 7.21 Å His310 (CD2) 7.38 Å His433 (O) 7.44 Å His435 (CG) 7.05 Å
Asn130	Asn434 (OD1) 2.90 Å	-	His433 (O) 6.49 Å	His435 (N) 7.94 Å
Ala131	-	-	Asn434 (OD1) 5.11 Å Ile253 (CD1) 6.19 Å	His433 (O) 9.09 Å His435 (ND1) 9.62 Å
Phe132	-	Ile253 (CD1) 3.46 Å His310 (CB) 3.75 Å Leu251 (O) 3.77 Å His435 (ND1) 4.21 Å	His435 (CE1) 5.08 Å His310 (CG) 5.09 Å	Lys248 (O) 8.18 Å Arg255 (O) 8.09 Å His310 (CE1) 7.19 Å His429 (O) 9.85 Å

Phe132		Gln311 (CG) 4.87 Å Thr250 (O) 4.95 Å		His433 (O) 8.86 Å His435 (ND1) 7.09 Å
Tyr133	Leu432 (O) 3.09 Å His433 (O) 3.23 Å -	His435 (CD2) 3.45 Å Asn434 (CA) 3.58 Å Glu430 (O) 4.14 Å -	His435 (NE2) 5.06 Å His433 (O) 5.12 Å His429 (O) 6.35 Å -	His310 (CB) 9.09 Å His429 (O) 7.02 Å His433 (CB) 7.14 Å His435 (C) 7.05 Å
Glu134	-	-	His433 (O) 6.12 Å -	His433 (O) 7.03 Å His435 (CE1) 7.91 Å
Ile135	-	-	-	His435 (CE1) 9.41 Å
Leu136	-	Leu314 (CD1) 3.56 Å	-	His310 (CG) 7.06 Å
Leu136	-	Gln311 (CA) 3.91 Å His435 (CE1) 4.00 Å Gln311 (O) 4.71 Å Asp315 (OD2) 4.77 Å	-	Lys338 (NZ) 8.44 Å His435 (CD2) 7.07 Å -
His137	-	His435 (NE2) 4.29 Å -	His435 (CE1) 5.05 Å His433 (O) 6.48 Å -	His310 (O) 9.66 Å Lys338 (NZ) 8.48 Å His429 (O) 8.20 Å His433 (C) 7.31 Å
His137				His435 (CE1) 7.12 Å
Leu138	-	-	-	Asp315 (OD2) 8.26 Å
Leu141	-	-	-	Gln311 (NE2) 9.42 Å Asp315 (OD2) 8.35 Å
Glu143	-	-		Lys317 (CE) 8.41 Å
Glu144	-	-	-	Lys317 (CE) 9.64 Å
Gln145	-	-	-	Gln311 (NE2) 8.68 Å
Arg146	-	Asp315 (OD2) 4.96 Å		His310 (C) 8.60 Å
Asn147	Gln311 (NE2) 2.75 Å	Leu309 (CD1) 3.74 Å	Lys317 (CE) 6.93 Å	His310 (N) 7.88 Å

Asn147	-	Asn312 (OD1) 4.24 Å	-	Lys317 (CE) 7.21 Å
Gly148	-	-	Gln311 (OE1) 6.42 Å	-
Phe149	-	-	Ile253 (CD1) 6.67 Å	-
Ile150	-	Gln311 (OE1) 3.54 Å Ile253 (CD1) 4.18 Å -	His310 (ND1) 5.84 Å -	Arg255 (O) 9.19 Å His310 (CB) 7.15 Å His435 (CE1) 8.64 Å
Gln151	-	Leu309 (CD2) 4.17 Å	-	His310 (ND1) 8.10 Å
Ser152	-	-	-	Ile253 (CD1) 7.16 Å
Leu153	-	Ile253 (CD1) 3.58 Å -	-	Arg255 (N) 9.52 Å His310 (CE1) 9.07 Å
Lys154	-	Leu309 (CD2) 3.49 Å Ile253 (CG1) 4.28 Å His310 (ND1) 4.53 Å Gln311 (OE1) 4.72 Å	His310 (CE1) 5.07 Å Arg255 (O) 6.38 Å -	His310 (CD2) 7.08 Å -
Asp155	-	-	Ile253 (CD1) 6.89 Å	His310 (CE1) 9.78 Å

\*各アミノ酸の表記について

グリシン (Gly, G)、アラニン (Ala, A)、バリン (Val, V)、ロイシン (Leu, L)、イソロイシン (Ile, I)、メチオニン (Met, M)、フェニルアラニン (Phe, F)、トリプトファン (Trp, W)、プロリン (Pro, P)、セリン (Ser, S)、トレオニン (Thr, T)、チロシン (Tyr, Y)、システイン (Cys, C)、アスパラギン (Asn, N)、グルタミン (Gln, Q)、アスパラギン酸 (Asp, D)、グルタミン酸 (Glu, E)、アルギニン (Arg, R)、リジン (Lys, K)、ヒスチジン (His, H)以下でも、上記のアミノ酸の3文字または1文字表記を用いることがある。

Table 2 露出表面積比の情報

Number	アミノ酸残基	NMR	X-ray	Number	アミノ酸残基	NMR	X-ray
1	ALA	0.90	-	31	ILE	0.00	0.17
2	ASP	0.98	-	32	GLN	0.72	0.60
3	ASN	0.39	-	33	SER	0.37	0.53
4	LYS	0.72	-	34	LEU	0.07	0.01
5	PHE	0.19	0.78	35	LYS	0.36	0.64
6	ASN	0.48	0.94	36	ASP	0.59	0.68
7	LYS	0.56	0.52	37	ASP	0.65	0.43
8	GLU	0.92	0.76	38	PRO	0.64	0.28
9	GLN	0.09	0.36	39	SER	0.56	0.61
10	GLN	0.34	0.47	40	GLN	0.84	0.59
11	ASN	0.52	0.64	41	SER	0.00	0.03
12	ALA	0.16	0.01	42	ALA	0.30	0.66
13	PHE	0.21	0.40	43	ASN	0.54	0.27
14	TYR	0.72	0.63	44	LEU	0.12	0.26
15	GLU	0.73	0.50	45	LEU	0.07	0.53
16	ILE	0.00	0.00	46	ALA	0.71	0.41
17	LEU	0.21	0.46	47	GLU	0.65	0.60
18	HIS	0.79	0.60	48	ALA	0.00	1.04
19	LEU	0.14	0.15	49	LYS	0.41	-
20	PRO	0.84	0.66	50	LYS	0.93	-
21	ASN	0.13	0.61	51	LEU	0.27	-
22	LEU	0.01	0.00	52	ASN	0.23	-
23	ASN	0.66	0.72	53	ASP	0.82	-
24	GLU	0.53	0.78	54	ALA	0.59	-
25	GLU	0.85	0.96	55	GLN	0.79	-
26	GLN	0.73	0.47	56	ALA	0.24	-
27	ARG	0.11	0.23	57	PRO	0.88	-
28	ASN	0.41	0.71	58	LYS	0.87	-
29	GLY	0.38	0.42	59	ALA	1.00	-
30	PHE	0.09	0.27				

\*PAB は NMR では単独の構造、X-ray では複合体の構造である。PAB のヘリックス構造が少し変化することが指摘されている。そこで、熱安定では NMR のデータを、変異部位特定では X-ray のデータをもとに考える。

## 2-5 ライブラリ設計

上記から導いた5位、6位、9位、10位、11位、13位、14位、15位、17位、24位、25位、27位、28位、31位、32位、35位および36位の17個の変異対象部位を決定した。17個の変異対象部位のいずれか一つ以上がヒスチジン残基に置換した変異体の総数は、各部位が野生型のアミノ酸残基かヒスチジン残基のどちらか一方であるとする、理論的には131072 (2の17乗より1引いた数) 種類存在する。変異型PABライブラリを構築するために必要となる遺伝子ライブラリは、[PAB Library Primer1~4] で示される核酸配列を有するポリヌクレオチドをRikaken (Nagoya, Japan) から購入し、ついでこれらを組み合わせてオーバーラップ伸長PCR (Polymerase chain reaction) 法 (Fig. 2) で作製した。

### <PAB ライブラリ作製プライマー配列>

>PAB Library Primer1

CCGAATTCCGGCGGTGGAGGCTCCATGGCTGATAACAAA

>PAB Library Primer2

GTTTAAGTTCGGCAAATGMWGGATWTSATRRWRAGCRTKWTGWTGTTCTTTR  
TKAWRTTGTATCAGCCATGGAGCCTC C

>PAB Library Primer3

CATTTGCCGAACHTAAACSAWSAWCAACRYMAYGGCTTCMWTCAWAGCCTGM  
AWSATGACCCAAGCCAAA GCGCTAAC

>PAB Library Primer4

CGCAAGCTTGTCTTATTTTGGTGCTTGTGCATCATTAGCTTTTTAGCTTCTGCT  
AAAAGGTTAGCGCTT TGGCTTGGGTC

\*R = (A または G)、Y = (C または T)、M = (A または C)、K = (G または T)、S = (G または C)、W = (A または T) の塩基コードすることを表記するもの

[PAB Library Primer1~4] で示される核酸配列を有するポリヌクレオチドは、PAB タンパク質をコードする核酸配列の一部に対応し、オーバーラップに必要な 20 塩基長程度の相補領域をそれぞれの末端に有している。また、PAB Library Primer1 で示される配列の 5'末端側には、塩基配列が GAATTC の EcoRI の制限酵素サイト、塩基配列が GGCGGTGGAGGC のグリシンリンカー (GlyGlyGlyGly)、および塩基配列が CCATGG の NcoI の制限酵素サイトを付与し、PAB Library Primer4 で示される配列の 3'末端側には、塩基配列が AAGCTT の HindIII の制限酵素サイトを付与している。さらに、上述の 17 個の変異対象部位に相当する位置には、野生型のアミノ酸とヒスチジンを共にコードすることができる混合塩基を導入した (Table 3)。

Table 3 野生型アミノ酸と変異型アミノ酸のコドンの組合せ

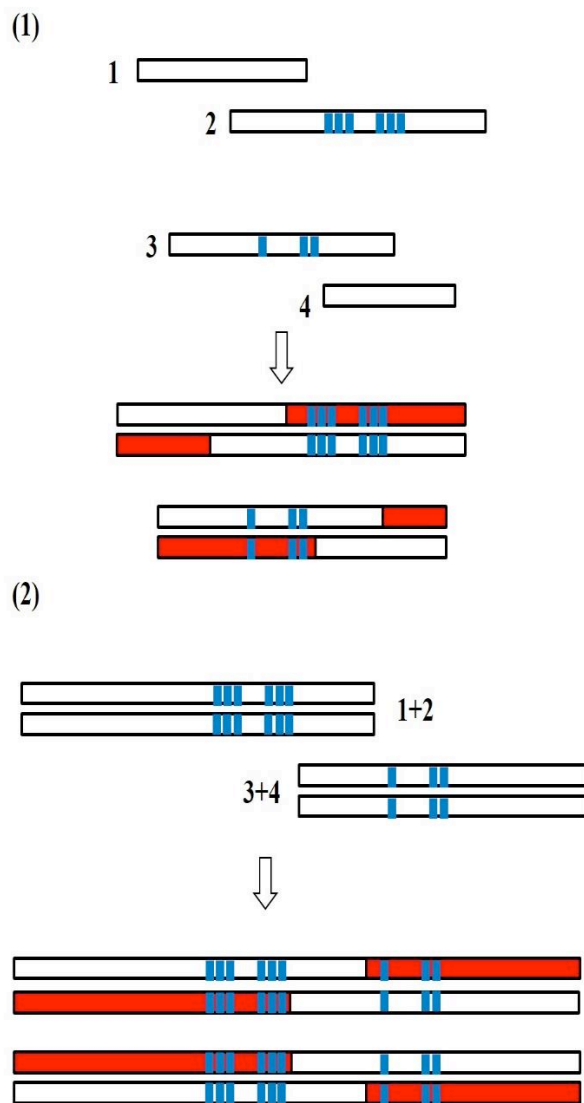
変異部位	変異	コドン設計	オリゴマーにコードされる配列			
Phe	His	YWT	Phe(TTT)	His(CAT)	Tyr(TAT)	Leu(CTT)
Asn	His	MAY	Asn(AAT, AAC)		His(CAT, CAC)	
Gln	His	CAW	Gln(CAA)		His(CAT)	
Tyr	His	YAT	Tyr(TAT)		His(CAT)	
Glu	His	SAW	Glu(GAA)	His(CAT)	Asp(GAT)	Gln(CAA)
Leu	His	CWK	Leu(CTT, CTG)		His(CAT)	Gln(CAG)
Arg	His	CRY	Arg(CGT, CGC)		His(CAT, CAC)	
Ile	His	MWT	Ile(ATT)	His(CAT)	Asn(AAT)	Leu(CTT)
Lys	His	MAW	Lys(AAA)	His(CAT)	Asn(AAT)	Gln(CAA)
Asp	His	SAT	Asp(GAT)		His(CAT)	



なお、混合塩基の組み合わせによっては、野生型のアミノ酸とヒスチジンのみならず第3のアミノ酸がコードされる場合もある。例えば、5位において用いたYWTは、TTT、TAT、CTT、CATの4種の配列を実現するが、それぞれPhe、Tyr、Leu、Hisをコードするので、第3のアミノ酸としてTyrとLeuが5位に導入される可能性が生じる。これらの第3のアミノ酸の存在を含めて当該ライブラリの配列多様性を算出すると、核酸配列として $3.4 \times 10^7$ 個の、アミノ酸配列として $2.5 \times 10^7$ 個の、分子が理論的に作製されることになる。つまり、この目的と異なるアミノ酸残基が含まれることを考慮し、スクリーニングの系のライブラリ・サイズに合わせて遺伝子設計をする必要がある。

オーバーラップ伸長法は、PCR反応液条件および反応条件でFig. 2のようにして実施した。まず、Fig. 2の (1) のように、1本鎖のPAB Library Primer1と2、PAB Library Primer3と4をそれぞれ濃度100  $\mu$ Mの溶液を用いて、PCRの反応液条件および反応条件 (Table4) で2本鎖DNAをそれぞれ作製する。つづいて、Fig. 2の (2) のように、(1+2) と (3+4) の2本鎖DNAを作製したPCR反応後の50  $\mu$ lの溶液からDNA primerとして1  $\mu$ lずつ用いて、同様の反応条件で目的遺伝子の全長2本鎖DNAを作製した。

Fig. 2 オーバーラップ伸長 PCR 法



\*青色部分が変異部位、赤色部分が PCR 反応によって伸張する部分である。

Table 4 PCR 反応条件

PCR 反応液条件		
DNA	Primer1	1 $\mu$ l
DNA	Primer2	1 $\mu$ l
KOD-plus-DNA	polymerase	1 $\mu$ l
10 $\times$ Buffer		5 $\mu$ l
2mM dNTPs		5 $\mu$ l
25mM	MgSO <sub>4</sub>	2 $\mu$ l
DW		35 $\mu$ l
Total		50 $\mu$ l
PCR 反応時間と温度設定		
94 $^{\circ}$ C		2 min
25~30 cycle		
98 $^{\circ}$ C		10 sec
7m-5 $^{\circ}$ C		30 sec
68 $^{\circ}$ C		1 min
4 $^{\circ}$ C		$\infty$

## 3章 コンビナトリアル・スクリーニング

### 3-1 緒言

現在、新規タンパク質設計において、コンビナトリアル・スクリーニングを用いたエンジニアリングは、目的の分子を獲得するのに強力な方法である。その中でも本研究のようなアフィニティ (タンパク質間相互作用) の分野は進んでいる。まず、スクリーニング方法として、細胞系 (T7 フェージ, 大腸菌、etc) または無細胞系 (mRNA、etc) を用いたディスプレイ法が 11 個、それ以外にも酵母ツーハイブリッド法などがある [38]。そして、提示する分子として、抗体の可変領域遺伝子や 8 つのスキヤホールド (改変タンパク質作製する際の骨格構造) タンパク質遺伝子を用いて、様々なアフィニティ分子の作製に成功が報告されているので、ターゲット分子に相互作用するものを獲得するという目的においては、様々なスクリーニング方法と組み合わせることで多様なターゲットに結合する分子の作製が可能となっている。

本研究では、中性付近では IgG に対して相互作用し、弱酸性付近では相互作用しないような PAB 変異体群を獲得するために、1 つのスクリーニングの中で 2 つのセレクションを行った。そして、得られた変異体群の配列情報を統計的に解析し、目的の分子特性を有するであろう PAB 変異体の設計を行うことにする。

### 3-2 ファージ・ディスプレイ法について

本研究では T7 ファージを用いて行うことにした。T7 ファージは、60 程度の遺伝子からなる約 40 kbp の 2 本鎖直鎖状ゲノム DNA をもつ溶菌性のファージであり、大腸菌表面のリポ多糖を介して結合し、その内部に DNA を注入して感染する。Fig. 3 に T7 ファージの模式図を示す。ゲノム DNA を含むファージの頭部は、415 個の G10 タンパク質の会合で形成される。T7 ファージ・ディスプレイ法では、外来タンパク質遺伝子をこの G10 タンパク質遺伝子の C 末端に付加して、融合タンパク質を発現させることでファージ表面に提示される (Fig. 3)。

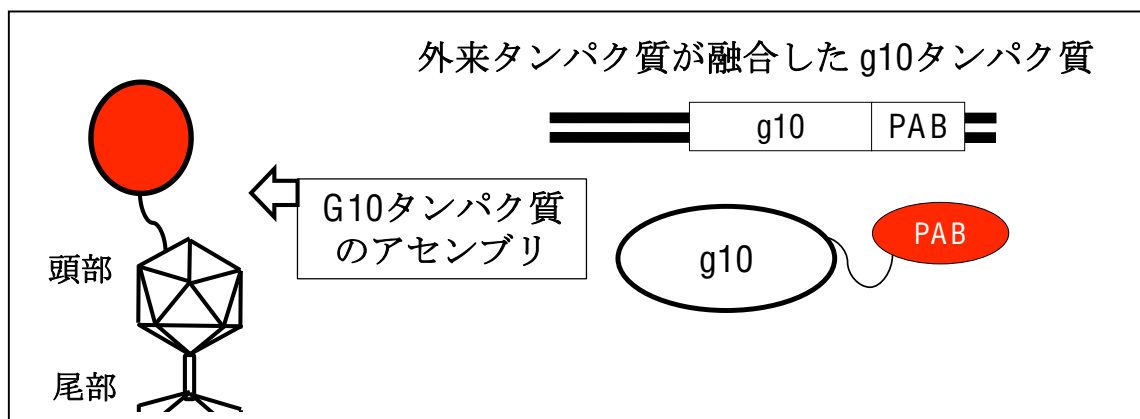


Fig. 3 T7 ファージの模式図

T7 ファージのベクターとしては、T7 Select シリーズが Novagen から販売されており、ベクターによって外来タンパク質が融合した G10 タンパク質の発現量を制御し、ファージ上に提示する数を限定することができるようになっている。そして、それに合わせて感染させる大腸菌株を変えて、ファージを形成するのに必要な G10 タンパク質の量を確保するようにしている。

### 3-3 実験方法

#### <T7 ファージ・ライブラリ作製>

2章で設計、合成を行った遺伝子ライブラリを制限酵素EcoRIとHindIIIで処理し、T7ファージベクター (T7 Select 1-1b) (Novagen) とライゲーション反応 (16 °C、16 h) を行って、T7ファージゲノム上のg10遺伝子の3'末端側に連結した。このT7ファージベクターは、T7ファージ上に約1個のPABを提示するように制御する。

T7ゲノムは、T7 Select1-1b (Novagen) の試薬を用いて付属のT7 Select System Manualの手順に従った。連結したT7ファージゲノムを用いて、試験管内でのT7ファージ粒子パッケージング反応 (22 °C、2 h) を行ってファージを作製した。この時点のファージ・ライブラリは、ブランク・アッセイ法で調べたところ、約 $5.4 \times 10^7$ 個のファージを形成していることがわかった。

これを初期ライブラリとして、200 mL LB培地にてO.D.<sub>600</sub> = 1.0まで培養した大腸菌BLT5403株 (T7プロモーター下流にG10遺伝子をコードし、恒常的なG10タンパク質の供給が可能なpAR5403ベクターを保有するBL21株) に感染させて増幅操作を行った。感染から約4時間後、遠心操作によって増幅したファージを上澄み溶液から回収した (T7ファージは溶菌作用があり、増幅後、大腸菌を壊して菌体外に放出する)。回収した上澄み溶液に、1/6容量の50%ポリエチレングリコール (PEG、分子量8000) 溶液と、1/10容量の5 M NaCl溶液を加えて4 °Cで一昼夜の攪拌を行った。

その後、遠心操作によるPEG沈殿でファージを粗精製した。PEG沈殿させたファージをTST buffer (10 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween20) で溶解させて、0.22 μm径の除粒フィルターで濾過した。これによって、変異型PABを提示したファージ・ライブラリ溶液を調整した。

#### <ヒトモノクローナル抗体に対する結合スクリーニング>

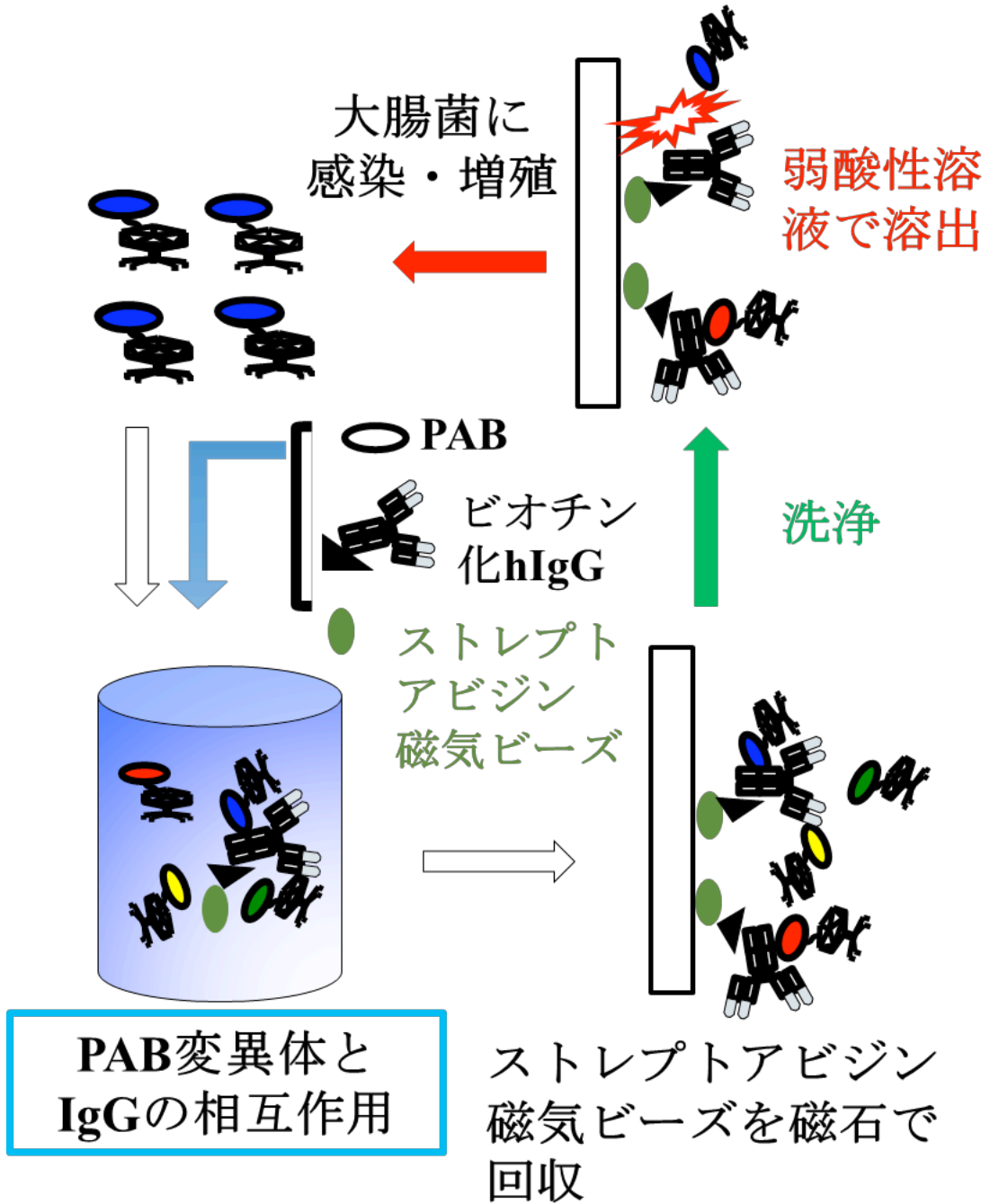
まず、モノクローナル抗体 (hIgG1) 溶液 (濃度3.36  $\mu\text{M}$ ) 500  $\mu\text{L}$ とジメチルスルホキシド 50  $\mu\text{l}$ にD-Biotinoyl- $\epsilon$ -aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide ester (Roche) 1.4 mgを溶かした溶液 25  $\mu\text{l}$ を混合して3時間反応させ、未反応のD-Biotinoyl- $\epsilon$ -aminocaproic acid-N-hydroxy-succinimide esterを取り除いて、ビオチン化hIgG1を作製した。

ついで、このビオチン化hIgG1溶液 (濃度0.5~0.6  $\mu\text{M}$ ) 500  $\mu\text{l}$ にストレプトアビジン磁気ビーズ (Promega) 0.6 mLを混合し、抗体を磁気ビーズに固定化させた。このビオチン化hIgG1を固定した磁気ビーズ0.6 mLに、上記で調整した変異型PABを提示したファージ・ライブラリ溶液を加えて25  $^{\circ}\text{C}$ で1 h振盪放置した。その後、TST buffer (10 mM Tris-HCl (pH = 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween20) で10~20回程度の洗浄操作を行うことで抗体と結合しないファージを除去した (Fig. 4)。

抗体と特異的に結合したファージを回収するために、50 mM 酢酸ナトリウム溶液 (pH=5.0) を加え、充分混合したのち溶出させた。溶出したファージは、上記2-2) に記載の感染-増幅-PEG沈殿操作を行って、変異型PABを提示したファージ・ライブラリ溶液を再び調整した (Fig. 4)。

上記の操作をファージ・ディスプレイ法の1ラウンドとし、合計5ラウンドのスクリーニング実験を繰り返し行った。なお、スクリーニング実験に用いた溶出液は、2ラウンド目からpH=6.0の50 mM 酢酸ナトリウム溶液を用い、かつストレプトアビジン磁気ビーズ (promega) の量を徐々に少なくしてスクリーニングの選択圧を段階的に変化させた。

Fig. 4 スクリーニングの方法について



#### <各ラウンドのPAB変異体の配列解析>

5ラウンドのスクリーニング実験を行ったのち、溶出液内のファージを、プラーク・アッセイ法を用いて、LB培地プレート上にクローン化する。そして、96ウェルプレートにO.D.<sub>600</sub> = 1.0まで培養した大腸菌BLT5403株を各ウェルに200 μLずつ加え、LB培地プレート上のプラークをつついた爪楊枝でウェルを攪拌してファージを感染させ、37 °Cで一昼夜培養するとファージが溶菌してクローン化したファージ溶液ができる。

上記操作で用意されたファージが提示している変異型PABのアミノ酸配列を確認するために、上記の96ウェルプレートからファージ溶液1 μLをPCR反応溶液に混合してPCR反応を行って、変異型PAB遺伝子を増幅した。使用したプライマーは、センスプライマーとして GTGGTCTTCGCCAGAA、アンチセンスプライマーとして CGCAAGCTTGTCTTATTTTGGTGCを用いた。センスプライマーはT7ファージゲノムのg10遺伝子上の配列をコードしたもので、アンチセンスプライマーは、PABのC末端の配列と塩基配列がAAGCTTのHindIIIの制限酵素サイトをコードしたものである。得られた増幅物を Exo nucleaseI (New England Biolabs) と Antarctic Phosphatase (New England Biolabs) で処理した後、DNA sequencing法 (GE Healthcare Bioscience, BigDye Terminator v1.1) によって、その核酸塩基配列を解析した。

### 3-4 結果と考察

#### <各ラウンドのアミノ酸出現頻度解析について>

本研究では、各ラウンドのスクリーニング後に配列解析を実施し、配列の収束状況を確認しながら行ってはなかった。今回のスクリーニングでは、複数ラウンドを実施して、配列が収束してきているかを確認し、更にラウンドを重ねるかを判断していく形にしていた。結果として、5ラウンド後に配列の明確な配列の収束が確認できたのでセレクションを止めた。そして、後述するように得られた収束配列の統計解析を利用して、



目的である pH 感受性の高い PAB 変異体を作製し、機能解析を行った。しかしながら、最終ラウンドで収束していた配列が進化工学的手法の観点から目的のタンパク質として有益なものであるが、後述するように目的とする分子特性を示さないものであったので、スクリーニングの経過を確認することにした (Fig. 5)。

各ラウンドで解析した配列の中でユニークな配列の割合は以下のようになった、100 % (84/84, 初期ライブラリ)、100 % (50/50, 1 ラウンド)、97.5 % (78/84, 2 ラウンド)、51.7 % (30/58, 3 ラウンド)、25.0 % (20/88, 4 ラウンド)、19.3 % (18/93, 5 ラウンド)。最終ラウンドで 61 個のクローンが同一の配列に収束していた。この結果を見ると、解析した配列数に違いはあるが、ラウンドを重ねるにつれて配列の収束に傾向にあることがわかった。そして、変異導入部位によって、野生型またはヒスチジン残基の出現頻度に明確な変動が見られた (Fig. 5)。初期ライブラリのアミノ酸出現頻度については、少し偏りがある部位は見られるが、その後の出現頻度の変動を見ると全体的には多様性の高いライブラリが作製できた。1 ラウンドのスクリーニングだけが、PAB と IgG を解離させる溶出条件が pH = 5.0 で、各変異部位ともに初期ライブラリと比べて大きな変動はなかったが、その後のラウンドでの変動を見ると、D36H の変異というのは 1 ラウンド後からヒスチジン出現頻度が高いままになっているので効果的な変異部位であると考えられる。2 ラウンドのスクリーニングから溶出溶液条件を pH = 6.0 で実施していくと、ラウンドを重ねるごとに相互作用に重要な部位は野生型、pH 感受性を高める可能性がある部位はヒスチジンの出現頻度が高くなっていくような変動が見られる。また、2 ラウンド以降のスクリーニングにおいて、複数回にわたって同じセレクションを重ねていくことで、各変異部位が野生型またはヒスチジン残基またはその他アミノ酸に収束していくのが明確にわかる (Fig.5)。

そこで、各変異部位のアミノ酸出現頻度解析から、ヒスチジンより野生型の出現頻度が高く相互作用への寄与がある部位は、13, 14, 17, 24, 31 である。13, 14, 17 は PAB と IgG の相互作用で重要な部位であることが実験的に明らかにされている。先行研究の相互作用解析において、F13H や Y14H や L17H は中性条件で野生型に比べて明確な結合力の減少が報告さ

れている [32, 36]。セレクションは、中性条件で IgG と相互作用するものを選択しているの  
これらの残基が保存されている変異体が多くなるように変動しているのがわかる。加えて、先行  
研究のシミュレーションでは、24 や 31 は PAB と IgG の相互作用への寄与が示されているの  
で、出現頻度が高くなったと考える [35, 36]。

一方で、ラウンドを重ねて、ヒスチジン残基の出現頻度が高くなる部位は pH 感受性変換に  
効果的な変異部位であるまたは本来の機能を大きく損なわない可能性が高い。野生型よりヒス  
チジン出現頻度が高くなっている部位は、5, 9, 10, 11, 15, 27, 28, 35, 36 である。上述のように、  
ヒスチジン変異による相互作用への影響が大きい部位は野生型の出現頻度が多くなっている。  
6 章の機能解析および先行研究 [31] から、N11, E15, R27, N28, K35 は中性条件での相互  
作用への影響が小さいので、ヒスチジン変異を選択的に許したと考える。加えて、ヒスチジン変  
異導入した変異体は、酸性条件で野生型に比べて結合力が落ちる傾向にあったので、溶出  
条件のセレクションで選択された考える。そして、Q9, Q10, D36 は中性条件で IgG との相互作  
用力を維持していたかつ酸性条件下で野生型と比べて明確な結合力の減少が見られた。そ  
れゆえ、ヒスチジン出現頻度が高くなっている部位は、効果の程度は様々ではあるが、ヒスチ  
ジン変異に伴って pH 感受性向上されるので、その出現頻度が高くなったと考える。従って、ス  
クリーニングは相互作用に重要な部位を選択し、結合能を中性条件下で維持して酸性条件下  
で減少させるヒスチジンの変異効果が期待できる部位を選択しているだろう。

Fig. 5 各アミノ酸変異部位のアミノ酸出現頻度

それぞれ変異部位ごとに0~5ラウンドまでのアミノ酸出現頻度割合を示している。各グラフの上部に変異部位の野生型アミノ酸とポジションを示している。

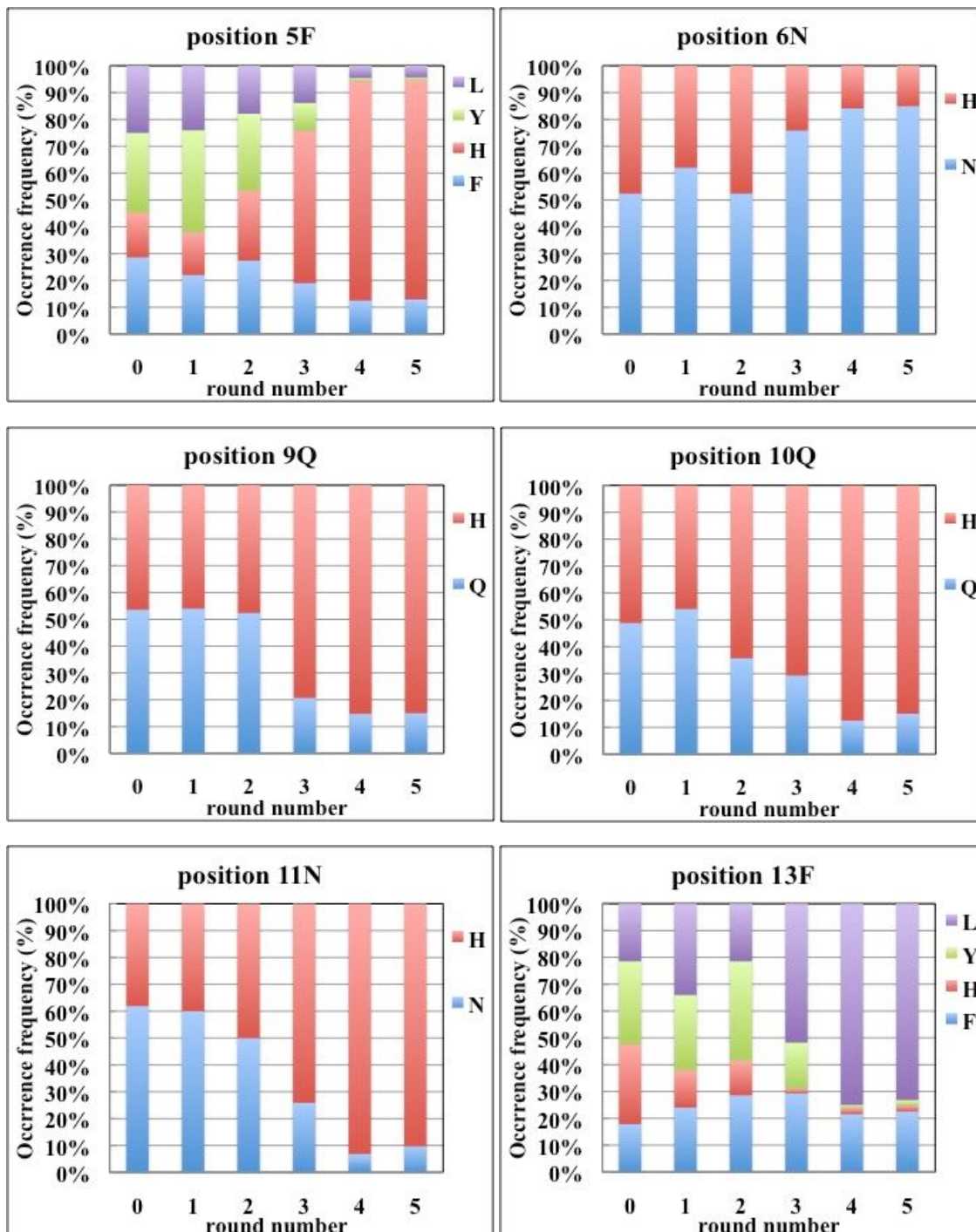


Fig. 5 各アミノ酸変異部位のアミノ酸出現頻度

それぞれ変異部位ごとに0~5ラウンドまでのアミノ酸出現頻度割合を示している。各グラフの上部に変異部位の野生型アミノ酸とポジションを示している。

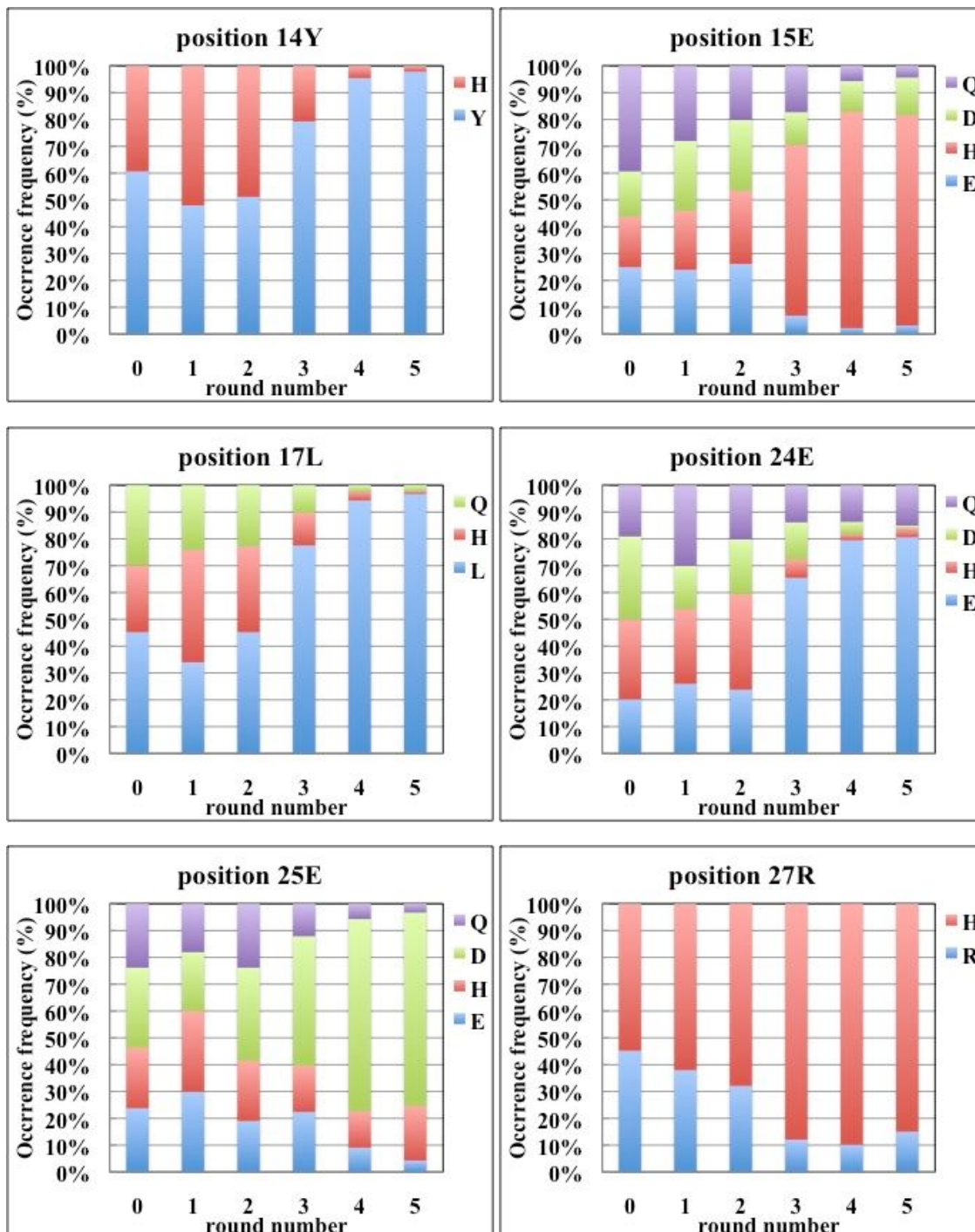
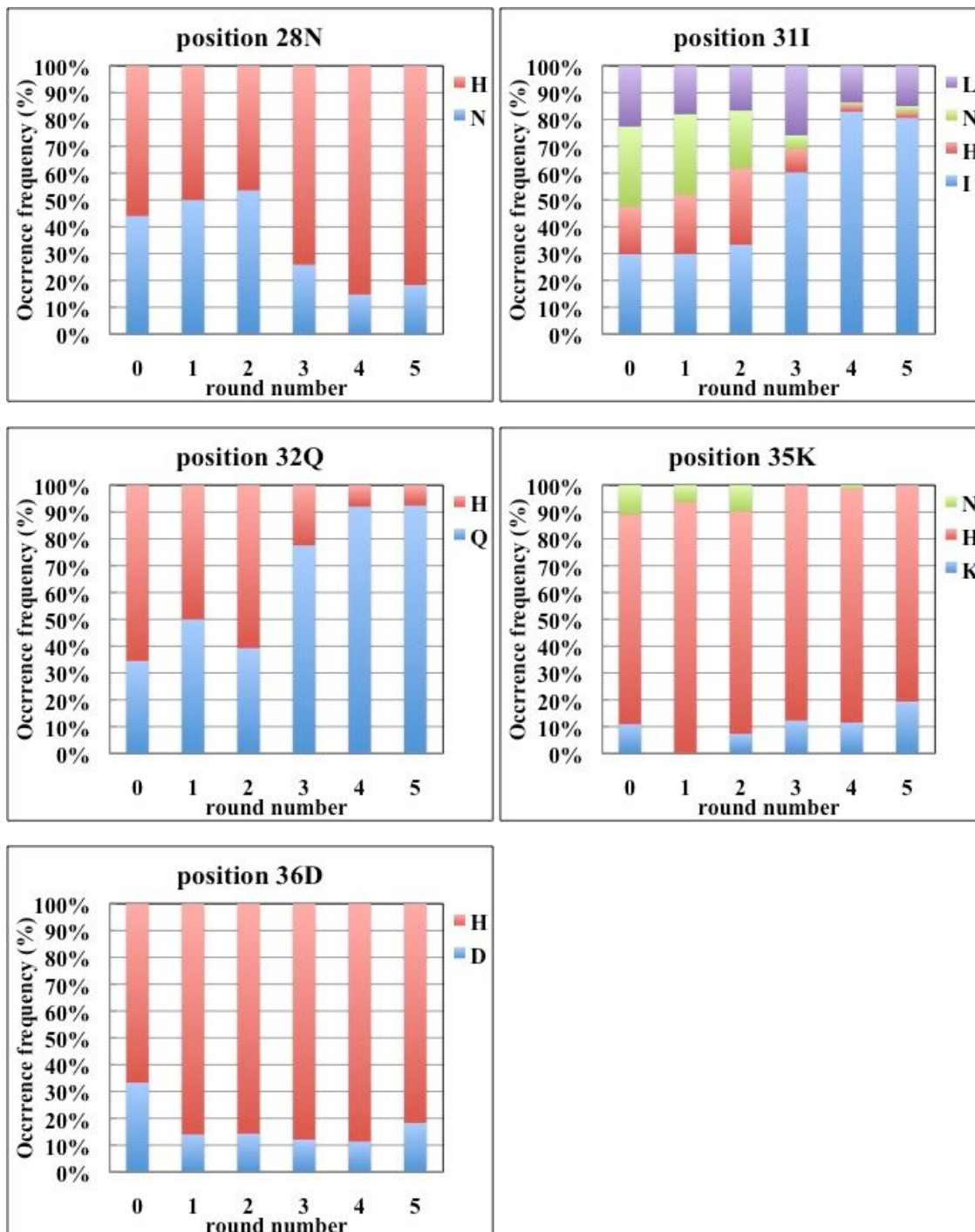


Fig. 5 各アミノ酸変異部位のアミノ酸出現頻度

それぞれ変異部位ごとに0~5ラウンドまでのアミノ酸出現頻度割合を示している。各グラフの上部に変異部位の野生型アミノ酸とポジションを示している。



#### <最終ラウンドの収束配列のアミノ酸出現頻度解析について>

上述したように、先行研究 [30-36, 39] および 6 章で示すような変異体機能解析を通して、アミノ酸出現頻度解析から、pH 感受性変換に効果的な部位を特定していくことが可能であることがわかる。しかし、ここでは目的の分子特性をもったアフィニティ・リガンドとなる PAB 変異体を既存の情報 (先行研究) とコンビナトリアル・スクリーニングで得られた収束配列のアミノ酸出現頻度解析結果から合理的に設計したことについて以下に述べる。

上述の各変異部位の出現頻度解析は、すべての配列解析したものをを用いて解析した結果であるが、ここでは最終ラウンドで配列解析した 93 個の中で見られたユニークな配列 18 種類 (Table 5) の変異体タンパク質群が選択されてきたものと考えて、アミノ酸出現頻度解析した (Fig. 6)。

結果として、野生型のアミノ酸出現頻度が高い部位は Fc との相互作用に重要な部位が保存されていたことは先行研究から判断できる。そして、野生型アミノ酸の出現頻度よりヒスチジン出現頻度の高い部位は、pH 感受性変換に効果的な部位である可能性がある。と推測できる。その中で、先行研究で、N28 のアミノ酸へのヒスチジン変異導入は pH 感受性上昇に効果的であることがわかっていた [39]。そこで、ヒスチジン出現頻度が 70% 以上のものに絞ると、9, 10, 27, 35, 36 に絞ることができる。さらに、27 はアルギニン残基、35 はリジン残基であり、中性付近ですでに正電荷を帯びたアミノ酸なので、ヒスチジン変異導入に伴う効果があまり期待できないと判断した。従って、9、10、36 の 3 つの変異を用いて、1 置換または 2 置換変異体を作製して、アフィニティ・カラムを作製することにした。

Fig. 6 18種類の収束配列のアミノ酸出現頻度解析

横軸は変異部位を示し、縦軸はアミノ酸出現頻度の割合を示している。

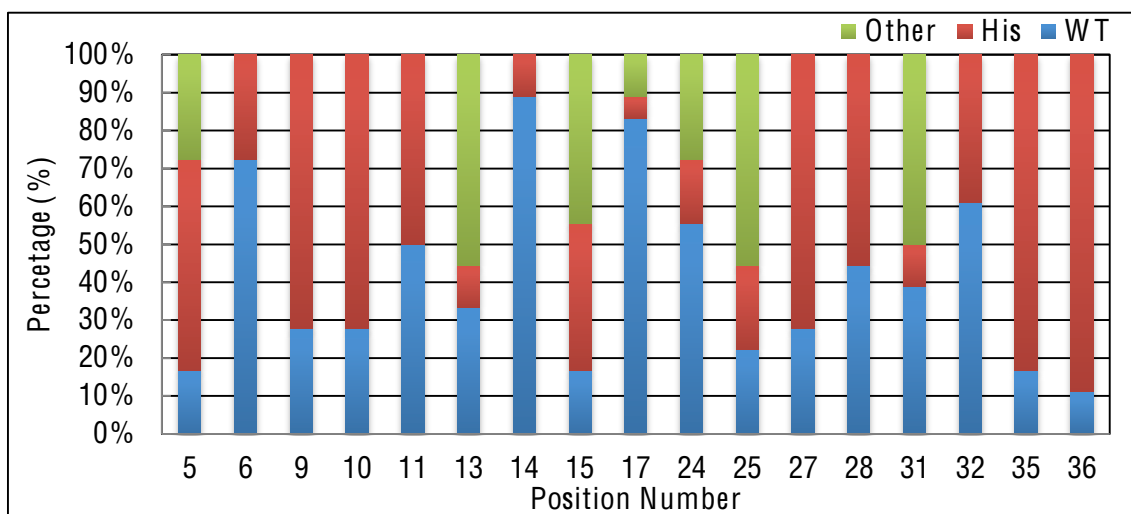


Table 5 18種類の収束配列

横軸は変異部位を示している。PAB<sub>wild-type</sub> は野生型の配列を示し、PAB<sub>T7Phage01-18</sub> は T7 ファージスクリーニングの 5 ラウンド後に得られた配列を示している。

クローン名	変異部位																配列数	
	5	6	9	10	11	13	14	15	17	24	25	27	28	31	32	35		36
PAB <sub>wild-type</sub>	F	N	Q	Q	N	F	Y	E	L	E	E	R	N	I	Q	K	D	-
PAB <sub>T7Phage01</sub>	H	N	H	H	H	L	Y	H	L	E	D	H	H	I	Q	H	H	61
PAB <sub>T7Phage02</sub>	F	H	Q	Q	H	F	Y	D	L	Q	H	R	N	I	Q	K	D	10
PAB <sub>T7Phage03</sub>	H	N	H	H	H	F	Y	H	L	E	H	H	H	L	Q	K	D	7
PAB <sub>T7Phage04</sub>	L	N	Q	Q	N	Y	Y	E	Q	E	D	R	N	N	Q	H	H	1
PAB <sub>T7Phage05</sub>	H	N	H	H	N	F	Y	Q	L	Q	E	H	H	I	H	H	H	1
PAB <sub>T7Phage06</sub>	H	N	H	H	N	Y	Y	D	Q	E	D	H	H	H	H	H	H	1
PAB <sub>T7Phage07</sub>	L	H	H	Q	N	H	H	E	L	H	H	H	N	I	H	H	H	1
PAB <sub>T7Phage08</sub>	F	N	H	H	N	F	Y	Q	L	E	E	H	N	I	Q	H	H	1
PAB <sub>T7Phage09</sub>	H	N	H	H	N	L	Y	H	L	E	H	H	N	L	Q	H	H	1
PAB <sub>T7Phage10</sub>	F	H	Q	Q	N	F	Y	E	L	H	Q	R	N	I	H	K	H	1
PAB <sub>T7Phage11</sub>	L	N	H	Q	N	H	Y	D	L	D	D	H	N	N	H	H	H	1
PAB <sub>T7Phage12</sub>	H	N	H	H	H	L	Y	H	L	Q	D	H	H	L	Q	H	H	1
PAB <sub>T7Phage13</sub>	H	N	H	H	H	L	Y	H	L	E	Q	H	H	L	Q	H	H	1
PAB <sub>T7Phage14</sub>	L	N	Q	H	H	F	H	Q	H	H	Q	R	N	H	H	H	H	1
PAB <sub>T7Phage15</sub>	H	N	H	H	H	L	Y	Q	L	E	E	H	H	L	Q	H	H	1
PAB <sub>T7Phage16</sub>	H	H	H	H	H	L	Y	H	L	E	D	H	H	I	Q	H	H	1
PAB <sub>T7Phage17</sub>	Y	H	Q	H	N	L	Y	D	L	Q	D	R	H	L	H	H	H	1
PAB <sub>T7Phage18</sub>	H	N	H	H	H	L	Y	H	L	E	E	H	H	L	Q	H	H	1

## 4章 タンパク質作製

### 4-1 タンパク質発現ベクターの作製

<作製するPABまたはPAZ変異体について>

以下に示すように、まず、野生型及び改良型のプロテインA・Bドメイン (PAB) またはZドメイン (PAZ) をコードする遺伝子を含むプラスミドベクターを合成し、ついで大腸菌を用いて、Metが付加された野生型PAB01および改良型PAB02~PAB20、野生型PAZ01及び改良型PAZ03、PAZ08を製造した。これらのタンパク質のアミノ酸配列の構成及び変異を表に示す。PAB20は、最終ラウンドで61個の同一配列 (PAB<sub>T7Phage01</sub>) を有していたものである。

Table 6 PAB変異体について

試料名	変異部位	試料名	変異部位	試料名	変異部位
PAB01	WT	PAB09	Q9H	PAB17	K35H, D36H
PAB02	N6H, N11H, E15D, E24Q, E25H	PAB10	Q10H	PAB18	Q9H, Q32H
PAB03	N6H, E24H, E25Q, Q32H, D36H	PAB11	E15H	PAB19	Q10H, Q32H
PAB04	N6H	PAB12	R27H	PAB20	PAB <sub>T7Phage01</sub> の配列
PAB05	E24H	PAB13	Q9H, D36H		
PAB06	E25Q	PAB14	Q10H, D36H	PAZ01	PAB01 の Zdomain
PAB07	Q32H	PAB15	E15H, D36H	PAZ03	PAB03 の Zdomain
PAB08	D36H	PAB16	R27H, D36H	PAZ08	PAB08 の Zdomain



#### <PABまたはPAZ変異体の発現用プラスミドの合成>

PAB02~PAB03、PAB20については、3章で作製したT7ファージDNAを鋳型に、制限酵素認識配列を含むプライマーを加えPCRを行い、PAB遺伝子領域を増幅した。使用したプライマーは、センスプライマーとしてGTGGTCTTCGCCAGAA、アンチセンスプライマーとしてCGCAAGCTTGTCTTATTTTGGTGCを用いた。得られた増幅物は、アガロース電気泳動法 (3%, 100 V) で確認後、QIAquick PCR Purification kit (Qiagen) を用いて精製した。その後、制限酵素NcoIとHindIII (日本ジーン, 37 °C, O/N) で消化した変異型PAB遺伝子 (PAB02またはPAB03またはPAB20) と、同じ制限酵素で消化し脱リン酸化 (Antarctic Phosphatase (New England Biolabs), 37 °C, 30 min) させたプラスミドpET16-b (Novagen) またはpET21-d (Novagen) をライゲーション (Ligation High (Toyobo), 16 °C, 1 h) し、得られたプラスミドベクターを用いて保存用大腸菌DH5 $\alpha$ 株 (Toyobo) を形質転換し、100  $\mu$ g/mLアンピシリンを含むLBプレート培地で選択した。

正しい挿入配列をもつ形質転換体をcolonyPCR法、DNA sequencing法 (ABI, BigDye Terminator v1.1) により選別し、QiaprepSpin Miniprep kit (Qiagen) を用いてPAB発現用プラスミドを抽出した。これを用い、さらに発現用大腸菌BL21 (DE3) 株 (Novagen) を形質転換した。

PAZ01については、本田研究室にpET16-bにPAZ01遺伝子が挿入されたものを所有していたので、その発現用プラスミドでBL21 (DE3) 株を形質転換した。

PAB01またはPAZ03については、PABおよび改良型PAZをコードする配列塩基を含む人工合成プラスミド (Biomatik) より調整した。まず、このプラスミドを制限酵素NdeIとXhoI (日本ジーン, 37 °C, O/N) で消化して、同じ制限酵素で消化し脱リン酸化 (Antarctic Phosphatase (New England Biolabs), 37 °C, 30 min) させたプラスミドpET21-a (Novagen) とライゲーション (Ligation High (Toyobo), 16 °C, 1 h) し、得られたプラスミドベクターを用いて、DH5 $\alpha$ 株を形質転換し、100  $\mu$ g/mLアンピシリン含むLBプレート培

地で選択した。Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen) を用いてPAB01またはPAZ03発現用プラスミドを抽出した。これを用い、さらにBL21 (DE3) 株を形質転換した。

PAB04~PAB08については、作製したPAB01またはPAZ01のプラスミドベクターを鋳型にして、QuickChange™ Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、変異導入を行った。その際に用いたプライマー配列は、次のページに示す。得られたプラスミドベクターを用いてDH5α株を形質転換し、100 µg/mLアンピシリンを含むLBプレート培地で選択した。正しい挿入配列をもつ形質転換体をcolony PCR法、DNA sequencing法 (ABI, BigDye Terminator v1.1) により選別し、Qiaprep Spin Miniprep kit (Qiagen) を用いてPAB発現用プラスミドを抽出した。これを用いて、さらに発現用大腸菌BL21 (DE3) 株を形質転換した。

PAB09~12については作製したPAB01のプラスミドベクターを鋳型に、PAB13~17については作製したPAB08のプラスミドベクターを鋳型に、PAB18~19は作製したPAB07のプラスミドベクターを鋳型に、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、変異導入を行った。その際に用いたプライマー配列は、次のページに示す。

PAZ08については、作製したPAZ01のプラスミドベクターを鋳型にQuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) を用いて、変異導入を行った。その際に用いたプライマー配列は、次のページに示す。

以下に上記の変異導入で用いたプライマー配列を示すことにする。

<PAB mutation primer配列>

>mutationprimerQ9 F

GATAACAAATTTAACAAAGAACATCAAACGCTTTCTATGAAATC

>mutationprimerQ9 R

GATTTTCATAGAAAGCGTTTTGATGTTCTTTGTTAAATTTGTTATC

>mutationprimer Q10H F

AACAAATTTAACAAAGAACAACATAATGCTTTCTATGAAATCTTAC

>mutationprimer Q10H R

GTAAGATTTTCATAGAAAGCATTATGTTGTTCTTTGTTAAATTTGTT

>mutation Primer E15H F

GAACAACAAAATGCTTTCTATCATATCTTACATTTACCTAACTTA

>mutation primer E15H R

TAAGTTAGGTAAATGTAAGATATGATAGAAAGCATTTTGTTGTTCC

>mutationprimer E24H

CATTTGCCGAACCTTAAACCATGAACAACGCAACGGCTTC

>mutationprimerR27 F

CCGAACCTTAAACGAAGAACAACATAACGGCTTCATTCAGAGC

>mutationprimerR27 R

GCTCTGAATGAAGCCGTTATGTTGTTCTTCGTTTAAGTTCCGG

>mutationprimer Q32H

CAACGCAACGGCTTCATTCATAGCTTAAAAGATGACCCA

>mutationprimer K35H F

GGCTTCATTCAGAGCTTACATCATGACCCAAGCCAAAGC

>mutation primer K35H R

GCTTTGGCTTGGGTCATGATGTAAGCTCTGAATGAAGCC

>mutationprimer D36H

CTTCATTCAGAGCTTAAAACATGACCCAAGCCAAAGCGCTA

## 4-2 タンパク質の発現・精製

### <組換えタンパク質の発現と精製>

LB培地で前培養した大腸菌BL21 (DE3) 形質転換体を、50  $\mu$ L/10 mLで100  $\mu$ g/mLアンピシリンを含むLB培地に継代し、O.D.<sub>600</sub> = 0.8~1.0になるまで振とう培養した。最終濃度 1 mM でIsopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosideを加え、さらに37°Cで2時間振とう培養した。回収した菌体を10 mLのPBSに懸濁し、超音波破碎を行った。破碎液は濾過滅菌後、濾液をTST (25 mM Tris-HCl (pH = 7.6), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween20) で平衡化したIgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Bioscience) microspinに加え、PAB、PAZタンパク質を結合させた。未吸着成分をTSTで洗浄後、TSTを50 mM クエン酸ナトリウム (pH7.0) に置換し、さらに0.5 M acetate (pH = 2.5) に置換してPAB、PAZタンパク質を溶出した。溶出液は50 mM リン酸ナトリウム (pH = 6.8) で透析を行った後、4°Cで保存した。PAB20については、IgG Sepharose 6 Fast Flowでは精製ができなかった。そこで、ヒスチジンを多く含む配列なので、His GraviTrap (GE Healthcare Bioscience) を用いて、His-tag精製した。

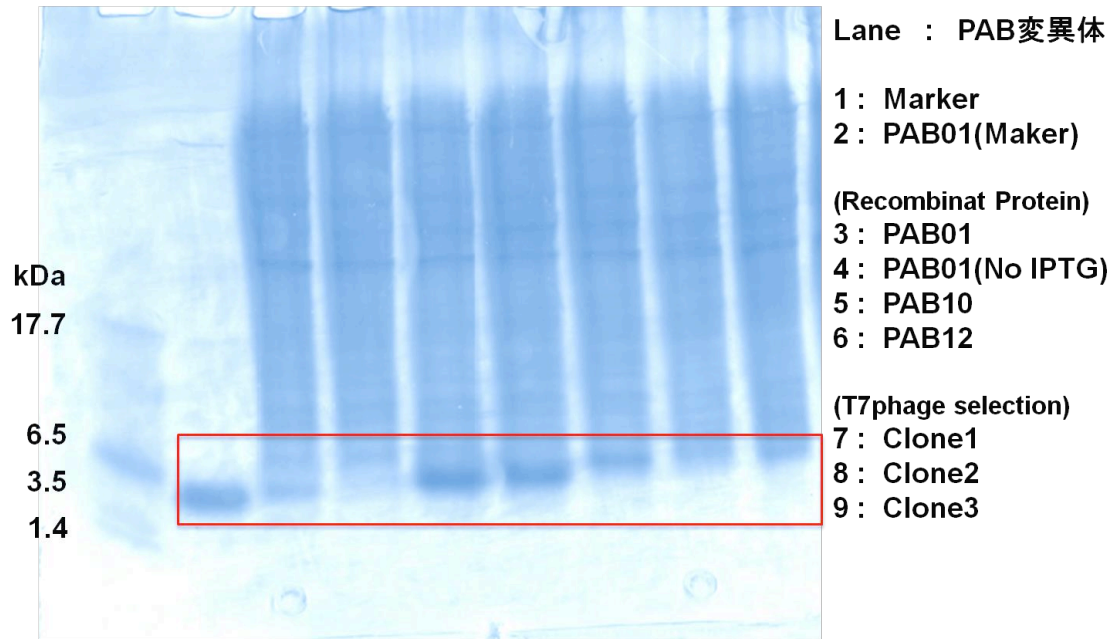
### <得られたタンパク質の純度>

上記で得られた、各PAB、PAZタンパク質の純度を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で以下のように確認した。精製後の各タンパク質をそれぞれ75  $\mu$ M程度の濃度の水溶液に調製したのち、Tricine-SDS-PAGE (100 V, 100 min) を行いCBB (G-250) 染色によりバンドを検出し純度を確認した。その結果、各タンパク質は、測定したすべての試料においてメジャーバンドとして検出され、純度も充分であることが確認した。

また、液体クロマトグラフィ装置 AKTApurifier (GE Healthcare Bioscience) に Superdex75 (GE Healthcare Bioscience) をセットして、ゲル濾過クロマトグラフィを実施したところ、精製後の各PAB、PAZタンパク質は、90%以上がモノマータンパク質として存在していることを確認した。

### 4-3 結果と考察

Fig. 7 BL21発現株によるPAB変異体の発現確認



上図において、Lane2のMarkerは、Lane3以降の同様に発現したものを精製したものを  
用いている。すべての変異体の精製において、同様にメジャーバンドであることを確認  
している。Lane4だけは、発現誘導するIPTGを加えないと発現しないことを確認するも  
のである。Lane5および6は、1置換変異体 (PAB10, PAB12) はしっかりと発現してい  
ることがわかる。そして、Lane7は、最終ラウンドの収束配列 (Table 5) で得られた  
PAB<sub>T7Phage02</sub>の配列でヒスチジンの数が3つ導入されたものは発現が確認できた。Lane8お  
よび9は、それぞれPAB<sub>T7Phage01</sub>およびPAB<sub>T7Phage03</sub>の配列でほとんど発現していないよう  
に思える。このことについては、7および8章で述べるがヒスチジン残基が多数導入され  
ることで熱安定性が非常に下がり、構造安定性が非常に悪くなっていると考えるので安  
定的に発現されていないのではないかと考えられる。

## 5章 アフィニティ・クロマトグラフィの評価

### 5-1 緒言

抗体医薬品作製過程において、SpAのアフィニティ・クロマトグラフィは一般的に用いられることは前述してきたが、これまでにアフィニティ・リガンドとして様々な改良が存在している [31, 37, 40, 41, 42]。ここでは、リガンドタンパク質 (プロテイン A) に絞って、先行研究について以下に示すことにする。

リガンドタンパク質の構造安定性を向上する研究として、前述した高い熱安定性と熱処理に対する可逆性を持つ非常に構造安定性の高い PAZ が作製されている [12]。また、このアフィニティ・カラムは、抗体医薬品作製過程で複数回の使用を行っていく上で、洗浄操作を水酸化ナトリウム水溶液で行われている。このアルカリ処理によって、カラム性能が落ちることが指摘されていた。それに対して、これまでよりもアルカリ耐性をもつ改変 SpA が作製されている [42]。

次に、確かに構造安定性は高いSpAの作製できたといっても、タンパク質のために変性などによる不活化が起こりやすい、また抗体医薬品作製工程でそのカラム作製コストが非常に高いことが示唆されている。このSpAに代わるアフィニティ・リガンドの開発が基礎研究のものから製品化されているものが存在している。例えば、SpAの抗体結合部位を模した低分子の有機化合物 (トリアジン誘導体) [23] で構成されている Prometic Bioscience社の MAb sorbent™ というものがあり、確かに構造安定性やコストの面などを含めてSpAより優れている部分はある。しかしながら、Ghoseらは、SpAを用いている業界標準のアフィニティ・カラムであるGEヘルスケア社の Mabselct™ との比較実験での評価では、抗体の回収率は高いレベルにあったが、不純物の混入率が高く、抗体医薬品作製過程の精製には適用が難しいものであった [43]。そのため、高い分離・精製ができる親和力および特異性が高いSpAが現在もアフィニティ・リガンドとして用いられている。

そして、本研究で着目しているSpAリガンドの欠点の1つとして述べた低いpH(3~4) 条件でしか抗体を解離できないことに対して、穏和なpH条件で抗体溶出できるアフィニティ・リガンドを開発する取り組みがいくつか存在する。Brownらは、複合体の構造解析を用いて、効果的なヒスチジン変異導入部位を的確に選択できたために、高いpH(最大の溶出pH値は5.0)で抗体の溶出を可能とした [31]。Gulichらは、SpAの構造を4または6つのグリシン残基をPAの3ヘリックスの2つ目と3つ目の間に挿入して構造を不安定化させることで高いpH (最大の溶出pH値は4.5) での抗体の溶出を可能とした [41]。私達の先行研究において、SpAにヒスチジン変異導入した2置換変異体を作製し、これまでより高いpH (最大の溶出pH値は5.6) での抗体の溶出を可能とした [53]。

従って、本研究の目標値としては、少なくともpH = 5.6以上のものを作製できることである。そこで、前章で決定したPAB変異体を用いて、アフィニティ・クロマトグラフィの評価を実施した。加えて、いくつかの変異体を別に作製したので、それについて評価も行っている。

## 5-2 実験方法

### <PAB変異体の固定化>

HiTrap NHS-activated HP (GE Healthcare) 1 mLのカラムを用いて、Sephacrose上のN-ヒドロキシスクシニンミド (NHS) とPAB上の第1級アミンとがアミド結合を形成することを利用してリガンドタンパク質を固定化する。固定化方法は、カラムに6 mLの1 mM HClを流してカラム中のイソプロパノール溶液を置換し、そこに1 mLのリガンドタンパク質溶液 (濃度 2.6~2.8 mg/mL) を注入して4 °Cで一昼夜反応させる。そして、溶液A (0.5 M Tris-HCl、0.5 M NaCl (pH8.3)) と溶液B (0.1 M acetate、0.5 M NaCl (pH = 4.0)) を用いて、洗浄操作およびブロッキング操作を行った。溶液Aを6 mL、溶液Bを6 mL、そして溶液Aを6 mLという順番で溶液を流し、溶液Aに置換した状態で4 °C、6時間反応させて未反応のNHSをTrisと反応させるブロッキング操作を行う。つづいて、溶液Bを6 mL、溶液Aを6 mL、溶液Bを6 mLという順番で溶液を流して洗浄操作を行って、TST buffer (25 mM Tris-HCl (pH = 7.6), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween20) で平衡化してアフィニティ・カラムの作製を完了する。

SulfoLink Immobilization Kits and Coupling Resin (Thermo) を用いて、Agarose上のIodoacetyl groupの活性基とタンパク質のシステイン基が反応してチオエステル結合が形成することを利用してリガンドタンパク質を固定化する。固定化方法は、固定化するProteinA Zドメイン (PAZ) を4つ直列に連結したタンデム型タンパク質 (Tandem PAZ) であるTandem PAZ01およびPAZ13タンパク質を2-Mercaptoethylamineで末端のシステイン残基を還元する。そして、Zeba Desalting Spin Columnを用いて、迅速かつ効率的に2-Mercaptoethylamineを除去する。リガンドタンパク質溶液の濃度を2.0 mg/mLに調整した1 mLとレジンを混合し、4 °Cで一昼夜反応させる。次に、付属のSulfoLink Coupling BufferとWash Solutionで洗浄操作を行う。最後に、L-Cystein溶液を用いて、未反応のAgarose上の活性基とL-Cysteinを反応させて、ブロッキング操作を行う。付属のSulfoLink Coupling



BufferとWash Solutionで洗浄操作を行って、TST buffer (25 mM Tris-HCl (pH = 7.6), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween20) で平衡化してアフィニティ・カラムの作製を完了する。

#### <抗体結合性評価>

##### pHグラディエント法

各PABまたはPAZタンパク質固定化カラムを液体クロマトグラフィ装置AKTApurifier (GE Healthcare Bioscience) にセットし、TST buffer (25 mM Tris-HCl (pH = 7.6), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween20) を0.5 mL/minの条件で流し平衡化させた後、100~200  $\mu$ Lの1 mg/mLのサンプル (IgG1タイプのヒト化モノクローナル抗体) を注入した。次いで、TST bufferを50 mM クエン酸ナトリウム (pH = 7.0) に置換し、さらに0.5 mL/minの流速で10 minかけて連続的に500 mM 酢酸溶液 (pH = 2.5) へ置換することで、pH勾配 (pH = 7.0  $\rightarrow$  2.5/10 min) を実現した。液体クロマトグラフィ装置に付属しているUV検出器 (280 nm) とpH検出器の出力から、モノクローナル抗体が溶出するピークのpHを記録した。

##### pHステップワイズ法

各Tandem PAZタンパク質を固定化したカラムを液体クロマトグラフィ装置AKTApurifier (GE Healthcare Bioscience) にセットし、50 mMリン酸buffer (pH = 7.0) を0.5 mL/minの条件で流し平衡化させた後、100~200  $\mu$ Lの5 mg/mLのサンプル (IgG1タイプのヒト化モノクローナル抗体) を添加した。リン酸bufferで洗浄、溶出buffer (50 mM 酢酸ナトリウム, pH = 5.0~6.0) で溶出を行った。その後、500 mM 酢酸溶液 (pH = 2.5) でカラムの洗浄を行った。液体クロマトグラフィ装置に付属しているUV検出器 (280 nm) の出力から、モノクローナル抗体のステップワイズpHの溶出するパターンを得られた。

### 5-3 結果と考察

<合理的設計およびコンビナトリアル・スクリーニングから設計した変異体について>

pH グラディエントモードでアフィニティ・クロマトグラフィを行い、溶出 pH を求めたところ、ヒスチジン変異導入した変異体は野生型に比べて高い位置で溶出した (Fig. 8, Table 7)。その中でも D36H は野生型と比べて pH 値が約 1 上昇した。次に、多置換体として、D36H/Q9H あるいは D36H/Q10H のアフィニティ・クロマトグラフィ実験を実施した。その結果、それらは最大で約 3.3 の大きな pH 値の上昇を示すことが明らかになった。

合理的設計による変異体作製では、一般的には様々な一置換変異体を作製して、カラムの評価を実施するだろう。結果、僅かに pH 値が上昇していることを考えると Q9H、Q10H、D36H の変異は効果があったと考えられる。しかしながら、D36H は効果的な変異であるとし、Q9H および Q10H は効果的ではないと考える可能性が高い。従って、目標とした溶出 pH 値が 5.6 以上なので、より効果的な 1 置換変異体はないかどうかをさらに調べていくことになると思う。加えて、仮に 2 置換変異体を作製していく場合、Q9H と Q10H の変異導入する優先順位は低いように思われる。実際に Q9 や Q10 の部位は、先行研究の合理的設計における機能解析から、ヒスチジンの変異効果が期待できないものと判断された [31]。

それに対して、合理的設計かつコンビナトリアル・スクリーニングを通して、Q9、Q10、D36 の 3 つはヒスチジンのアミノ酸出現頻度が高い部位であり、多くの収束配列の中に同時に変異導入されていた。このことから組合せることによって、pH 感受性が大きく変換されるのではないかと考えた。そして、本研究では、D36H の 1 置換変異体の溶出 pH 値のシフトが見られたので、Q9H と Q10H のそれぞれを加えた 2 置換変異体をまず作製することにした。作製した二置換変異体は、これまで先行研究で作製された穏和な条件で抗体溶出を可能とする PAB 変異体 (最大で pH = 5.6) よりも高い pH 値で抗体溶

出を可能にするものとなった。つまり、細かな機能解析を除いて、合理的な遺伝子ライブラリ設計およびコンビナトリアル・スクリーニングのアミノ酸出現頻度の統計解析による本研究の作製方法は、大きな労力を伴わずに効率よく目的の変異体を作製することに成功した。また、合理的設計では見過ごす可能性のある部位をコンビナトリアル・スクリーニングから得た情報をもとに組合せたことによって、抗体溶出ピークの pH 値を大きく中性側にシフトさせるような変異 (Q9H, Q10H) であることを特定できたことは本研究が期待していたものであった。

つづいて、アフィニティ・カラム性能について考えると、6章で示すように、PAB13 および PAB14 の結合力は、野生型のものに比べて大きな減少が見られるので、洗浄操作で緩衝溶液を流していくと抗体が解離する可能性が考えられた。実際に、PAB14 に関しては、サンプル注入後に数%の漏れが確認された。しかしながら、その後の洗浄操作では、抗体が漏れているようなピークを確認することはなかったので、カラム中で一定の結合力が保たれていると考えられる。そして、溶出操作で pH を徐々に下げていく、Fig. 8 のように溶出ピークを確認することができ、その回収率は野生型と比べてもほぼ同様のものであった。今後、産業応用する上では更なる実験は必要であるけれども、これまでよりも穏和な条件下で、抗体溶出を可能とする変異体を作製できたと考えている。

Fig. 8 アフィニティ・カラム性能の評価

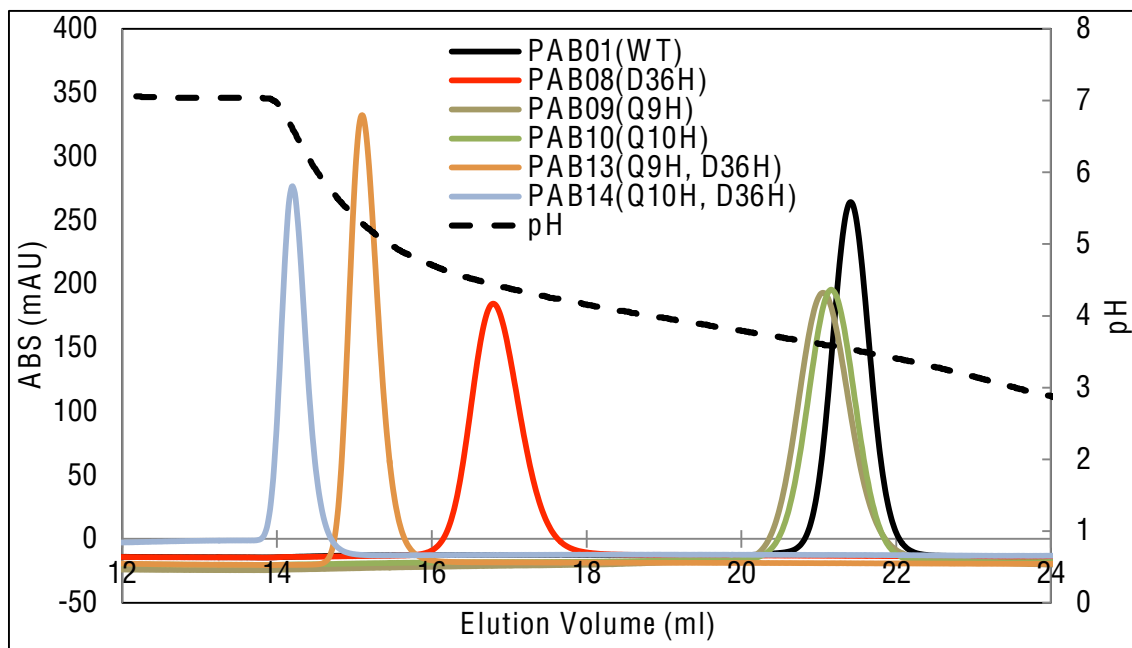


Table 7 各変異体の溶出ピークの pH 値

Protein	Elution Peak pH
PAB01 (Wild Type)	3.53
PAB08 (D36H)	4.58
PAB09 (Q09H)	3.88
PAB10 (Q10H)	3.67
PAB13 (Q09H, D36H)	5.48
PAB14 (Q10H, D36H)	6.82

### <作製した様々な PAB 変異体について>

また、上記の設計とは別に、いくつかの 1 置換または 2 置換変異体のアフィニティ・カラムを作製して pH グラディエントモードでアフィニティ・クロマトグラフィを行い、溶出 pH を求めた (Fig. 9, Table8)。

まずは、Q32H の 1 置換変異体のカラムの作製について、最終ラウンドの収束配列のアミノ酸出現頻度解析では、野生型に比べてヒスチジン出現頻度が低い部位であったが、6 章に述べる D36H の変異効果から考えて、効果的な変異部位の可能性が高いと判断した。実際に、抗体溶出ピークの pH 値は約 0.6 のシフトが見られ、Q9H や Q10H の 1 置換変異体のカラムよりも穏和な条件下で抗体溶出を可能とするものであった。この結果からも、合理的設計とコンビナトリアル・スクリーニングの組合せは、効果的に目的の変異部位を特定できることが示唆される。

次に、PAB15 (E15, D36H)、PAB16 (R27H, D36H)、PAB17 (K35H, D36H) の 3 つの 2 置換変異体のカラムを作製した。PAB15 は、E15 の最終ラウンドの収束配列のアミノ酸出現頻度解析では、ヒスチジン出現頻度が 38.9% と低いが、最終ラウンドのすべての配列のアミノ酸出現頻度解析では、その出現頻度が 78.7% と高いものであった。なぜなら、最も多かった同一配列の中に含まれているからである。従って、この変異は効果的なものかもしれないと考え、D36H と組合せると PAB13 や PAB14 のような変異体になることを期待して作製したが、その変異に大きな効果がなかった。つまり、その変異の効果が現れているのであれば、最終ラウンドのユニークな配列に多く含まれていることが重要なかもしれない。PAB16 と PAB17 は、3 章でアフィニティ・カラム作製に向けたアミノ酸出現頻度解析結果から変異体作製の際に、R27 や K35 は本来のアミノ酸残基の側鎖が中性条件で正電荷を帯びているので、ヒスチジン変異の効果があまり期待できないと考えて、変異対象部位からは除いた。しかし、コンビナトリアル・スクリーニングのアミノ酸出現頻度解析結果は、Fig. 8 に示したように、目的の PAB 変異体を作製につ

なだったので、ヒスチジン出現頻度が高くなった理由が他にあるのかもしれないと考えて作製した。結果としては、予想したように、本来のアミノ酸残基 (R27、K35) を代替できる能力を有しているだけで、抗体溶出ピーク値はほとんど変わらなかった。

以上より、最終ラウンドのユニークな収束配列のアミノ酸出現頻度解析でヒスチジン出現頻度が高い (70 %以上) ものは、セレクションによって pH 感受性変換に効果的な部位であると考えて設計する方法は有効なものであることがわかった。その際は、すべての配列のアミノ酸出現頻度解析にするよりも、その中に含まれているユニークな配列を決定して解析する方が効果的な変異を特定できると考える。さらに、効果的なヒスチジン変異導入部位 (D36H) の構造情報を考慮することで、Q32H のような変異部位を特定することができる。

Fig. 9 アフィニティ・カラム性能の評価

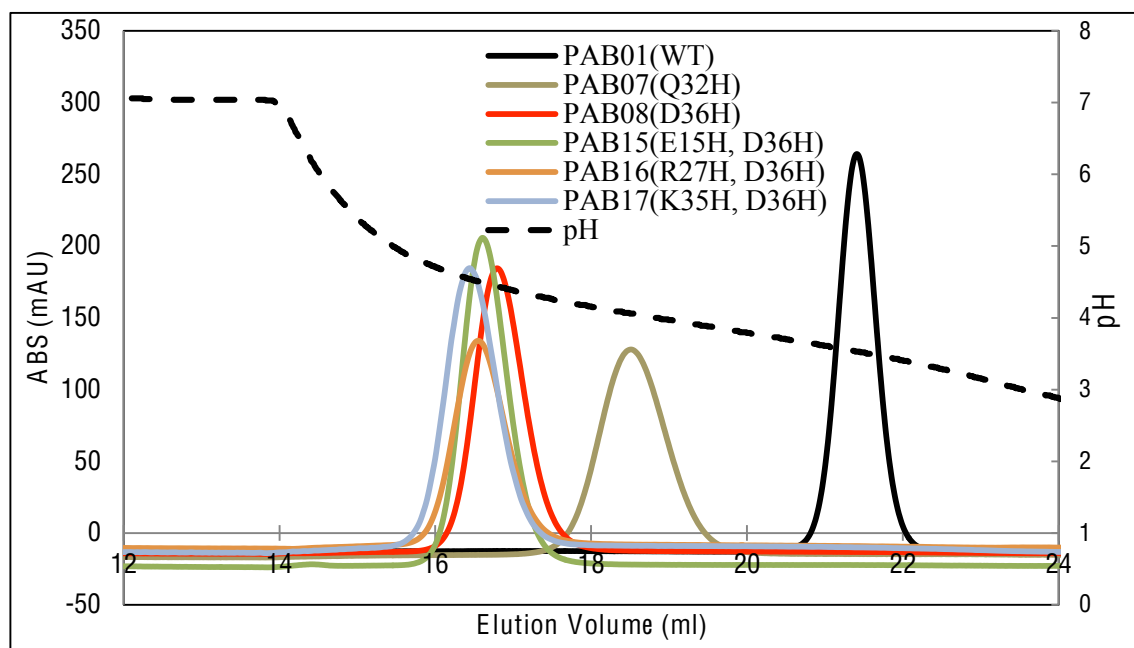


Table 8 各変異体の溶出ピークの pH 値

Protein	Elution Peak pH
PAB01 (Wild Type)	3.53
PAB07 (Q32H)	4.16
PAB08 (D36H)	4.58
PAB15 (E15H, D36H)	4.63
PAB16 (R27H, D36H)	4.69
PAB17 (K35H, D36H)	4.74

### <コンビナトリアル・スクリーニングで収束配列の PAB および PAZ 変異体について>

本研究では、18 種類の収束配列の多くは発現・精製することが困難だったが、2 つの収束配列だけは安定的に発現・精製できたので、pH グラディエントモードでアフィニティ・クロマトグラフィを行い、溶出 pH を求めた (Fig. 10, Table 9)。

PAB02 は、野生型と比べてもほとんど変わらないものであった。PAB03 は、上記でも示したように、効果的な変異である Q32H と D36H を含んでいるので抗体溶出ピーク値が中性側にシフトしたものになった。セレクションでの溶出条件が最終的に pH = 6 なので、これらの変異体は目的の pH 感受性変換を示すものではなかった。また、今後の応用を考えて、得られた配列を PAB 型から PAZ 型に変えてもヒスチジン変異の効果も保持したままになるかを確認した (Fig. 11, Table 10)。結果として、ドメインを変えても基本的にはヒスチジン変異効果が期待できることがわかった。



Fig. 10 アフィニティ・カラム性能の評価

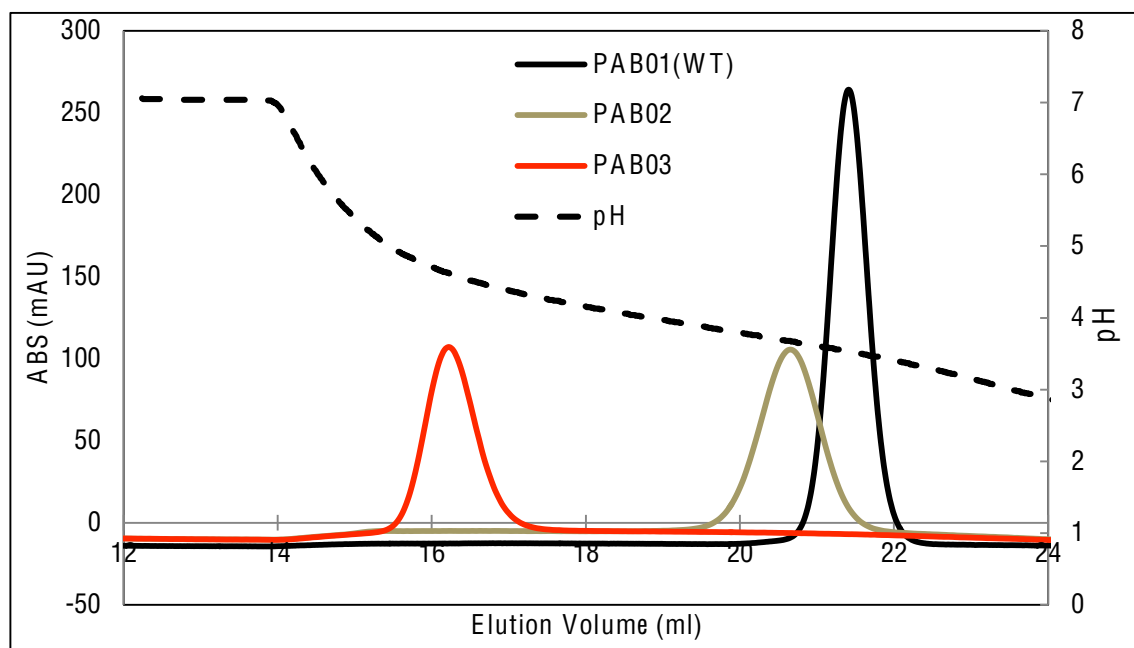


Table 9 各変異体の溶出ピークの pH 値

Protein	Elution Peak pH
PAB01 (Wild Type)	3.53
PAB02 ( N6H, N11H, E15D, E24Q, E25H)	3.66
PAB03 ( N6H, E24H, E25Q, Q32H, D36H)	4.86

Fig. 11 アフィニティ・カラム性能の評価

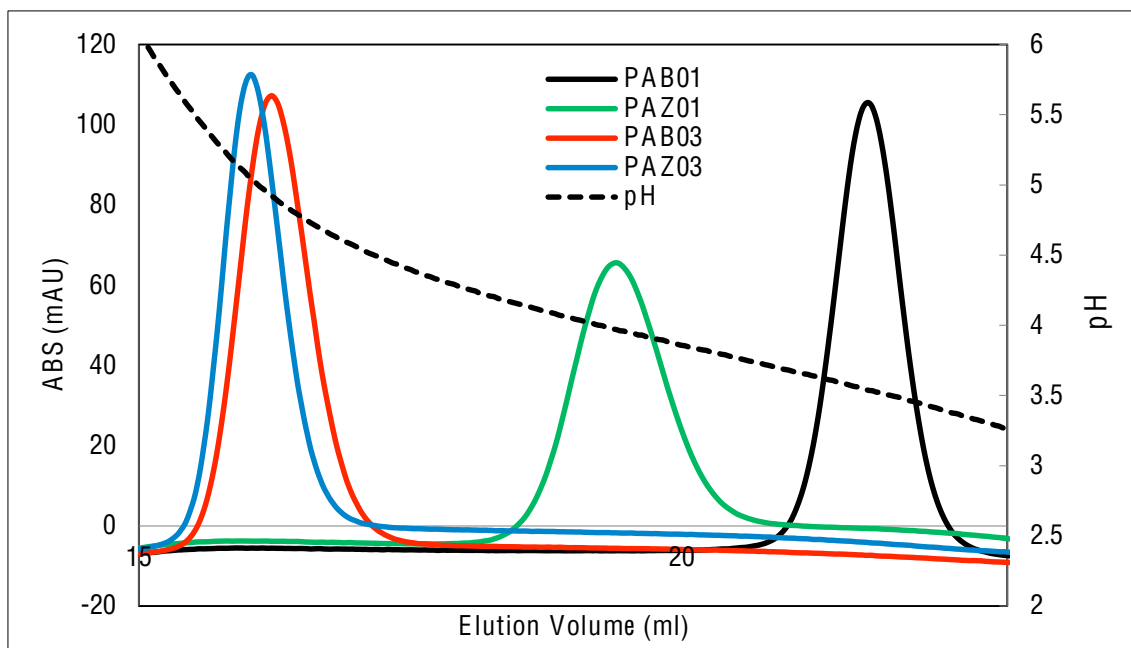


Table 10 各変異体の溶出ピークの pH 値

Protein	Elution Peak pH
PAB01 (Wild Type)	3.53
PAZ01	3.98
PAB03 ( N6H, E24H, E25Q, Q32H, D36H)	4.86
PAZ03	5.16

< PAZ ドメインを4つ直列に連結したタンデム型タンパク質 (4×PAZ) について >

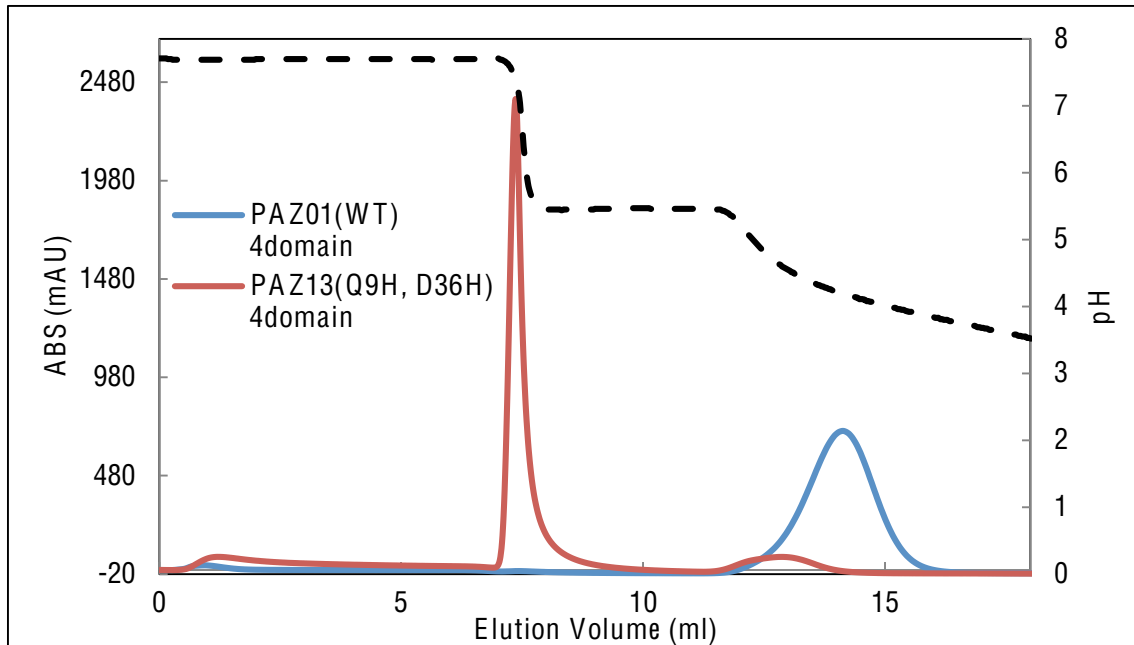
抗体精製製品として常用されている市販の SpA アフィニティ・カラムと比較検討するため、本研究で得られた pH 感受性効果の高い Q9H および D36H の二置換変異を PAZ に導入した。さらに、PAZ を4つ直列に連結したタンデム型タンパク質 (4×PAZ) を作製し、このアフィニティ・カラムを pH ステップワイズモードで評価した (Fig. 12)。その結果、結合した IgG が、Tandem PAZ13 (D36H/Q9H) のカラムからより穏和な条件下で溶出することを確認した (Fig. 12)。溶出溶液 (50 mM 酢酸ナトリウム) の pH 値に対する注入した IgG の溶出割合が、Tandem PAZ13 (D36H/Q9H) のカラムでは以下のようになった、pH = 6 で 72 %、pH = 5.5 で 89 %、pH = 5.0 で 98 % (Fig. 12 (a), (c), (d))。一方で、野生型配列の 4×PAZ01 からでは、すべての溶出溶液の pH 値において IgG の溶出を確認することはできなかった (Fig. 12 (a), (b))。また、HiTrap rProtein A FF Columns (GE Healthcare) の製品においても、pH = 5.0 において、抗体の溶出を確認することはできなかった (Fig. 12 (e))。

Fig. 12 Tandem PAZ 型のアフィニティ・カラムの性能評価

実線は抗体の溶出プロファイルを示し、破線は pH 値を示す。

(a) Tandem PAZ01 (WT) および Tandem PAZ13 (Q9H, D36H)の

pH = 5.5 での溶出プロファイル



(b) Tandem PAZ01 (WT) の pH = 6.0 および pH = 5.0 での溶出プロファイル

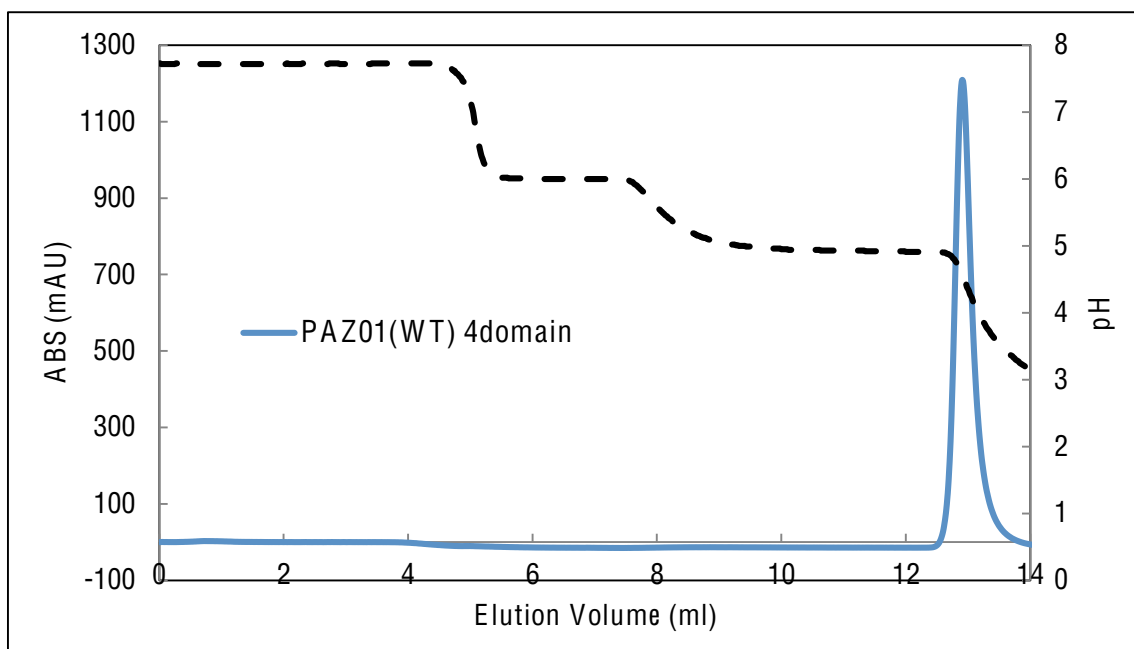
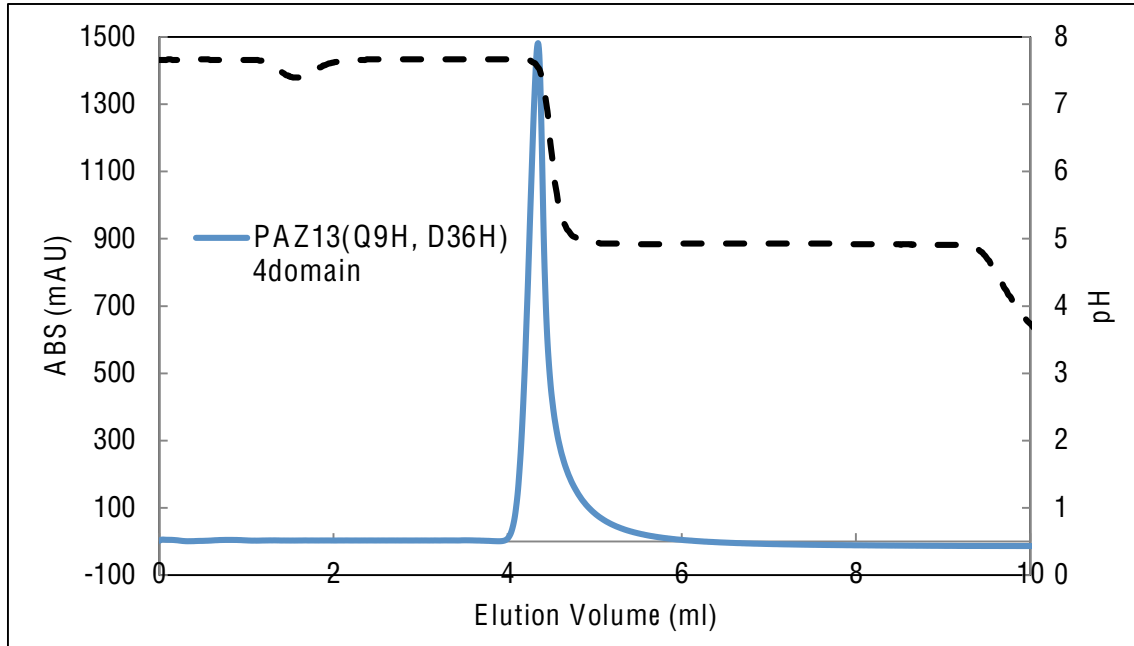


Fig. 12 Tandem PAZ 型のアフィニティ・カラムの性能評価

実線は抗体の溶出プロファイルを示し、破線は pH 値を示す。

(c) Tandem PAZ13 (Q9H, D36H) の pH = 5.0 の溶出プロファイル



(d) Tandem PAZ13 (Q9H, D36H) の pH = 6.0 の溶出プロファイル

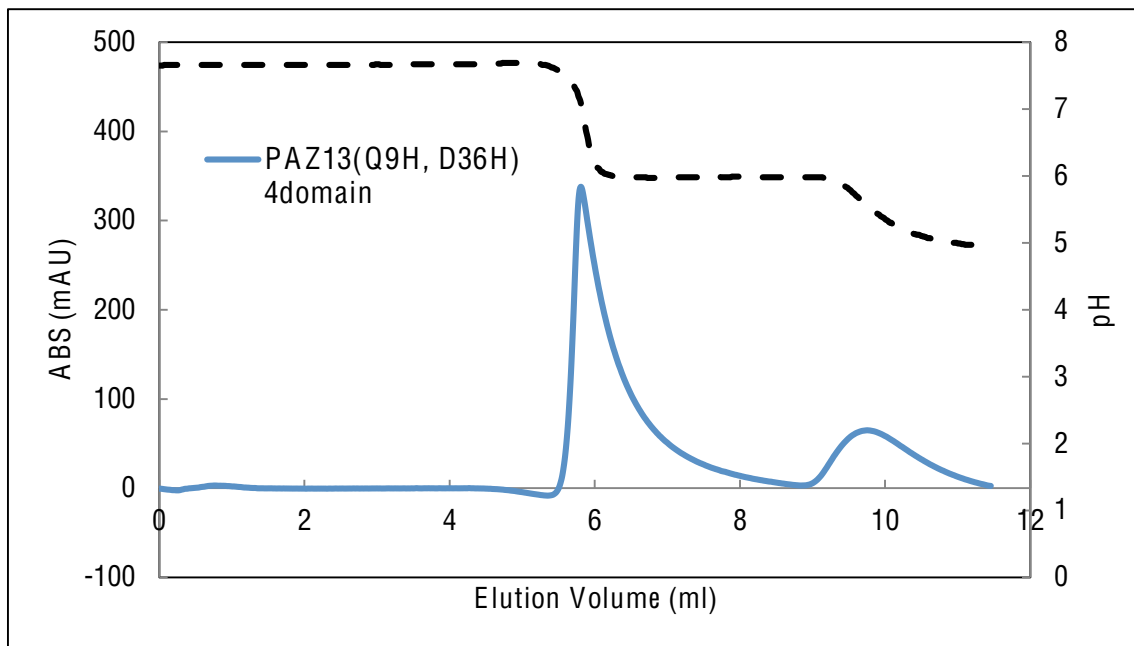
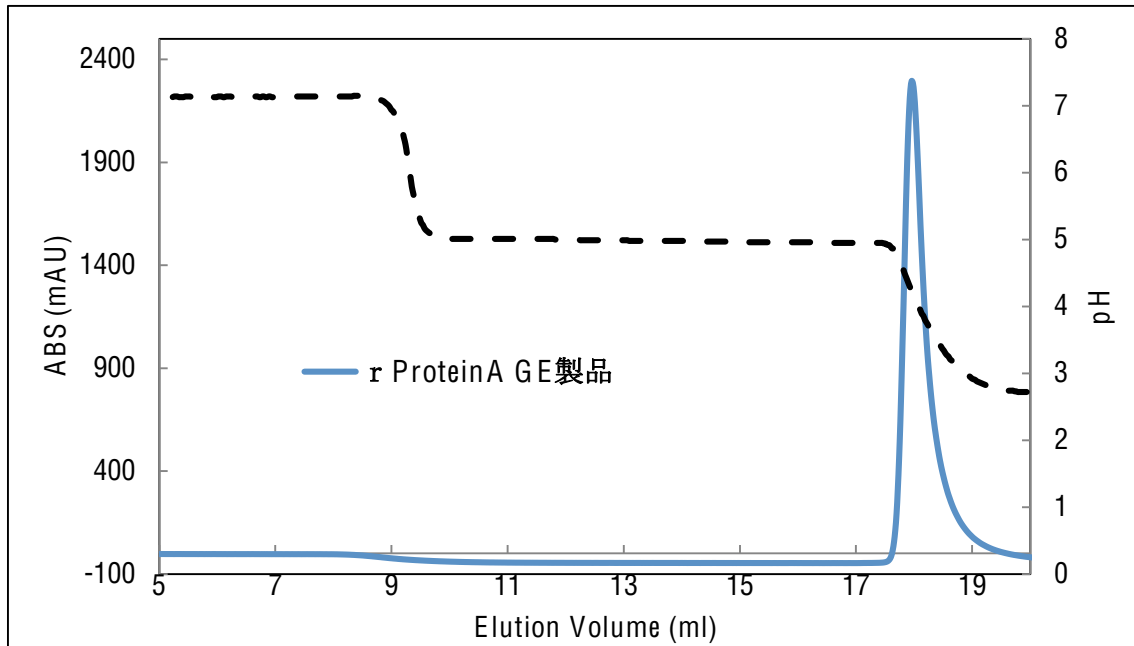


Fig. 12 Tandem PAZ 型のアフィニティ・カラムの性能評価

実線は抗体の溶出プロファイルを示し、破線は pH 値を示す。

(e) HiTrap rProtein A FF Columns の pH = 5.0 の溶出プロファイル



## 6章 タンパク質間相互作用の速度論的および熱力学解析

### 6-1 緒言

本章までに、PAB に対する既存の構造や機能情報を用いた合理的な遺伝子ライブラリ設計、またはコンビナトリアル・スクリーニングのアミノ酸出現頻度情報を組合せた合理的な変異体設計によって、目的の PAB 変異体作製に成功して示した。

本章では、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて、4章で示した一置換または二置換変異体を中性条件および酸性条件での相互作用解析を実施した。本研究のスクリーニングのセレクションに用いた分子は、ヒトモノクローナル抗体なので、相互作用解析でも同様のものを用いた。また、本研究の遺伝子ライブラリ設計では、IgG の Fc 部分と PAB の相互作用を改変することを狙って実施しているが、D36H という効果的な変異は Fc との相互作用にはほとんど関係していないことが構造から判断された。そこで、改めて PAB と抗体の相互作用について考察すると、Fab との弱い相互作用に D36 の部位が関係していることが構造から判断されたため、非常に pH 感受性変換に効果的だった D36H の一置換変異体については、ヒトモノクローナル抗体、Fc、そして Fab の 3 つの分子に対する相互作用を評価した。そして、相互作用へのヒスチジン置換効果について、構造情報をもとにした評価した。

## 6-2 実験方法

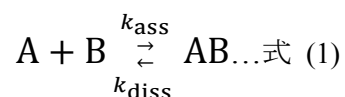
以下は、GE Healthcare 社のホームページを参考にしている。

### 表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いた速度論的解析

#### <結合の反応速度と平衡状態>

溶液中で分子 A と分子 B が相互作用する場合、この二種を混合すると複合体 AB が形成される。

これを一般的な二分子反応として、式 (1) で表わされる。



各分子の t 時間後における濃度を [A]、[B]、[AB] とすると、時間経過と共に [AB] が増加し、ある一定の割合となったとき平衡状態に達する。ここで二分子反応における結合速度定数 (単位:  $\text{Ms}^{-1}$ ) を  $k_{\text{ass}}$ 、解離速度定数 (単位:  $\text{s}^{-1}$ ) を  $k_{\text{diss}}$  とすると、複合体の濃度変化率  $d[AB]/dt$  は式 (2) で表され、測定時点での各濃度に比例する。

$$d[AB]/dt = k_{\text{ass}}[A][B] - k_{\text{diss}}[AB] \dots \text{式 (2)}$$

平衡状態では結合および解離速度は等しく、複合体 AB の濃度変化率は 0 になるので式

(2) より、

$$\frac{k_{\text{diss}}}{k_{\text{ass}}} = \frac{[A][B]}{[AB]} = K_D \dots \text{式 (3)}$$

$K_D$  は解離定数 (単位: M) である。この値が小さいほど結合力が強いことを示している。

また、結合定数  $K_A$  は解離定数の逆数となる。

更に、式 (2) において、初期濃度を  $[A_0]$ 、 $[B_0]$  とすると、 $[A] = [A_0] - [AB]$ 、 $[B] = [B_0] - [AB]$  を用いて書き換えることができる。

$$d[AB]/dt = k_{\text{ass}}\{[A_0] - [AB]\}\{[B_0] - [AB]\} - k_{\text{diss}}[AB] \dots \text{式 (4)}$$

A の濃度を B に対して「大過剰」を用いることにより、A の減少量を無視すると、

$[A] = [A_0] - [AB] = [A_0]$  となり、式 (4) を変形すると式 (5) が誘導される。



$$\begin{aligned} d [AB] / dt &= k_{\text{ass}}[A_0]\{[B_0] - [AB]\} - k_{\text{diss}}[AB] \\ &= k_{\text{ass}}[A_0][B_0] - \{k_{\text{ass}}[A_0] + k_{\text{diss}}\}[AB] \dots \text{式 (5)} \end{aligned}$$

さらに、 $k_{\text{ass}}[A_0] + k_{\text{diss}} = k_{\text{app}}$  と置き換えると、

$$d [AB] / dt = \text{constant} - k_{\text{app}} [AB] \dots \text{式 (6)}$$

以上より、[AB] の変化量は見掛け上の一次反応として取り扱うことができる。

求められる見掛けの反応速度定数  $k_{\text{app}} = k_{\text{ass}}[A_0] + k_{\text{diss}}$  は既知の  $[A_0]$  に依存するので、 $k_{\text{app}}$  を  $[A_0]$  に対してプロットすると結合速度定数  $k_{\text{ass}}$  を算出することができる。

#### <フローシステムを採用した SPR 測定における速度論の取扱い>

上述のように、速度定数の測定のためには二分子反応であっても見掛け上の一次反応の条件を作りだせば良いことがわかる。Biacore (GE Healthcare) のようなフロー法を採用している測定系では、固定化したリガンド分子 B にアナライト分子 A を一定の濃度で供給し続けるシステムを用いている。つまり、式(ii)において、[A] は時間に関係なく  $[A_0]$  の状態を保持することで、 $[A_0] \gg [B]$  の条件を満たさなくとも  $[A] = [A_0]$  として扱うことが可能である。アナライト濃度を  $[A_0]$ 、形成された複合体濃度をレスポンスの変化量 R に置き換えて、 $[B_0]$  を最大結合量  $R_{\text{max}}$  に対応させると、

速度式は

$$dR/dt = k_{\text{ass}}[A_0][R_{\text{max}} - R] - k_{\text{diss}}R = k_{\text{ass}}[A_0]R_{\text{max}} - \{k_{\text{ass}}[A_0] + k_{\text{diss}}\}R \dots \text{式 (7)}$$

結果、式 (5) と同形であり、一次反応の取扱いができることになる。

ここで、上述の反応速度論的解析法では、得られたセンサーグラムを非線形最小二乗法により直接カーブフィッティングさせる。解析する非線形解析法は、GE 社製 Biacore に付属の解析プログラムを用いることで可能となる。解析には、Local fitting (アナライトの各濃度に対する 1 本のセンサーグラムごとに 1 つずつパラメータを算出する) と Global fitting (アナライトの全濃度にわたって同時にカーブフィッティングを行う) が

ある。

低アフィニティーの相互作用では反応が極めて早く平衡へと移行し、その結果、結合領域と解離領域が極めて短く、速度論的解析のフィッティングが困難になることがあります。その場合については、アナライト濃度を変化させ、平衡に達したときのRU値の解析から  $R_{eq}$  を直接測定して  $K_D$  を求めることもできます。式 (7) において、 $dR/dt=0$ 、 $R=R_{eq}$ 、 $k_{diss}/k_{ass}=K_D$  と置き換えて変形すると、

$$R_{eq}/[A_0] = R_{max}/K_D - R_{eq}/K_D \dots \text{式 (8)}$$

$R_{eq}/[A_0]$  を  $R_{eq}$  に対してプロットすると直線が得られ、その傾きの逆数から  $K_D$  の算出が可能となる。

## 表面プラズモン共鳴(SPR)を用いた熱力学的解析

### <van't Hoff エンタルピー>

相互作用の結合定数の温度変化を求めることで、ファントホッフエンタルピーを計算することができます。結合のギブスエネルギー変化は

$$\Delta G/T = \Delta H/T - \Delta S \dots \text{式 (1)}$$

式(1)の温度微分は、

$$\frac{d(\Delta G/T)}{dT} = \frac{d(\Delta H/T)}{dT} - \frac{\Delta H}{T^2} - \frac{d\Delta S}{dT} \dots \text{式 (2)}$$

となり、ここで  $d\Delta H = \Delta C_p dT$  ならびに  $d\Delta S = \Delta C_p dT/T$  ですので、式 (2) は

$$\frac{d(\Delta G/T)}{dT} = \frac{\Delta C_p}{T} - \frac{\Delta H}{T^2} - \frac{\Delta C_p}{T} = - \frac{\Delta H}{T^2} \dots \text{式 (3)}$$

ギブスエネルギーと解離定数  $K_D$  は式(4)のようになる。

$$\Delta G = RT \ln K_D \dots \text{式 (4)}$$

式 (3)、(4) より

$$\frac{d \ln K_D}{d(1/T)} = - \frac{\Delta H}{R} \dots \text{式 (5)}$$

式 (5) から平衡定数の対数と温度の逆数をプロット (線形ファントホッフプロット) することで、反応エンタルピーを求めることができる。熱測定に頼らずにファントホッフエンタルピー変化量を求めることができる。

### <表面プラズモン共鳴法による改良型タンパク質の抗体結合性評価>

センサーチップの測定セルにIgG1タイプのヒトモノクローナル抗体、Fc、Fabをそれぞれアミンカップリング法により固定化した。測定のコントロールとして、カルボキシメチル基をエタノールアミンでブロッキングした対照セルを用いた。センサーチップとして、CM5 (Biacore) を用いた。次いで、単離精製した各PABまたはPAZタンパク質を、中性領域のランニング緩衝液であるHBS-P (10 mM HEPES pH = 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20) または酸性領域のランニング緩衝液であるAcONa (10 mM AcONa pH = 5.0, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween20) に溶解し、それぞれ3種の濃度の試料溶液を調製した。SPRの測定は、Biacore T100 (Biacore) を用い、反応温度25 °Cで行った。収集したデータは、Biacore T100 Evaluation Softwareを用いて解析し、1:1のラングミュアモデルにフィッティングさせ、解離平衡定数 $K_D$ を算出した。フィッティングの精度を向上させるため、pH=7.4では計算式【 $R_{max} = \text{リガンド固定化量} \times (\text{アナライトの分子量} / \text{リガンドの分子量}) \times \text{リガンドの結合部位数}$ 】を用いて $R_{max}$ を各PABまたはPAZ変異体について計算してフィッティングを行った。このとき、リガンド固定化量は固定化時の測定値、アナライト分子量は各PABまたはPAZ変異体、リガンド分子量はヒトモノクローナル抗体、リガンドの結合部位数はFcが2つあるので2とした。pH=5.0では、Biacore T100 Evaluation Softwareで $R_{max}$ をFit GlobalまたはFit Localで自動フィッティングさせるようにした。

また、熱力学的解析においては、5種の濃度の試料溶液を調整して、反応温度を15、20、25、30、35 °Cで行った。収集したデータは上記の方法と同様にBiacore T100 Evaluation Softwareを用いて解析した。そして、ファントホッフプロットによって熱力学パラメータを求めた。

### 6-3 結果と考察

#### <PAB の 1 置換変異体と IgG との相互作用評価>

中性条件 (pH = 7.4) において、基本的には強い相互作用を維持している (Fig. 13, Table 11)。その中で、相互作用の減少が見られるのは、PAB08 (D36H)、PAB09 (Q9H)、PAB10 (Q10H) であり、野生型に比べて、それぞれ 6.6 倍、2.7 倍、10 倍の減少が見られた。PAB08 の構造と相互作用については、あとに述べる。

PAB09 において、Q9 の部位には 4 Å 以内に 2 つのアミノ酸 (Ser254 (3.19 Å)、Ile253 (3.85 Å)) が存在している。PAB10 において、Q10 の部位には 4 Å 以内に 5 つのアミノ酸 (Leu251 (2.91 Å)、Met252 (3.27 Å)、Ile253 (3.32 Å)、Ser254 (3.59 Å)、Asn434 (3.92 Å)) が存在している。それぞれの Ser と Asn の水素結合が、ヒスチジン変異導入でも維持されることが考えられるが (ヒスチジン残基は水素結合を形成する可能性があるアミノ酸残基)、この場合は形成されない可能性が示唆される。なぜなら、先行研究において、Tyr13 へのヒスチジン変異導入で、His は Tyr の疎水的相互作用は維持しているが、Tyr 側鎖の OH 基が 4 Å 以内に存在するアミノ酸と形成する水素結合が失われることによって、結合力が減少することが示されているからである [30]。それゆえ、PAB09 および PAB10 の結合力の減少は、水素結合の損失が相互作用減少に影響していると考えられる。加えて、PAB10 は PAB09 より約 4 倍の相互作用減少になるのは、His 残基の大きな側鎖が挿入されることに伴って、立体障害が生じて相互作用形式に影響が現れるためだと考える。従って、ヒスチジン変異導入する部位は、4 Å 以内に複数のアミノ残基や水素結合形成する関係がある場合、ある程度の相互作用を維持する可能性や pH 感受性変換に効果的な部位の可能性を本研究のように含むけれども、優先順位を低くした方がいいと考えられる。

それに対して、ほとんど相互作用に変化がないまたは相互作用が増加した変異体は 4 Å 以内に IgG のアミノ酸が存在しない。その中で、PAB04 (N6H) は相互作用が増加す

る傾向が高い。構造情報から最も近接のアミノ酸は Ser254 (4.25 Å) で、Ser と Asn では水素結合形成する可能性があるが、アミノ酸間距離が遠い (4 Å 以上) コンフォメーションであるために形成しにくい関係であった。そこにヒスチジン変異導入が伴って、水素結合などを含む相互作用が形成されることによって、結合力が増加したことが示唆される。また、PAB11 (E15H) も結合力が増加する傾向が高かったが、最近接のアミノ酸は Asn434 (5.30 Å) なので、PAB04 のような可能性は考えにくい。そのような近接のアミノ酸とヒスチジン残基との水素結合などを含む相互作用の増加によって、結合力が増加したと考える。従って、遺伝子ライブラリ設計時に、ヒスチジン変異導入に伴って、5 Å の前後の距離にどのようなアミノ酸残基が存在するかを確認し、結合力の増加を期待できる変異ということで変異対象部位の優先順位を高くするということが考えられる。

Fig. 13 中性条件 (pH = 7.4) での 1 置換変異体と IgG の相互作用解析

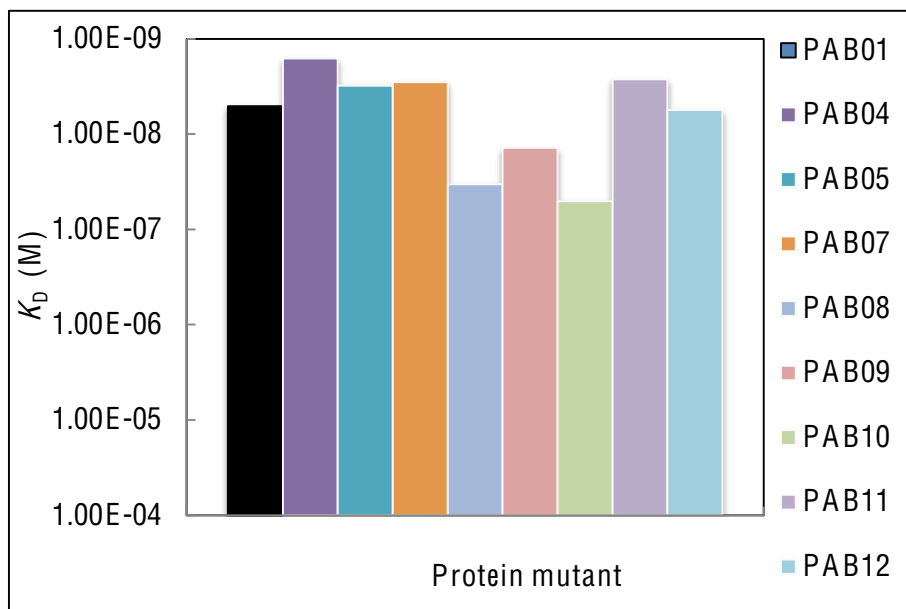


Table 11 中性条件 (pH = 7.4)での 1 置換変異体と IgG の速度論解析

名前	変異	$k_a$ (M/s) ( $\times 10^5$ )	$k_d$ (1/s) ( $\times 10^{-4}$ )	$K_D$ (M) ( $\times 10^{-9}$ )
PAB01	WT	2.8±0.9	11.5±4.9	5.1±3.2
PAB04	N6H	3.7±0.0	12.3±6.3	1.6±1.0
PAB05	E24H	4.8±1.6	12.5±3.9	3.1±1.7
PAB07	Q32H	3.3±0.3	9.1±3.5	2.8±1.3
PAB08	D36H	2.6±1.4	63.3±9.1	33.6±19.2
PAB09	Q9H	2.0±0.9	22.2±3.1	13.9±6.3
PAB10	Q10H	1.0±0.4	45.1±4.9	50.8±20.5
PAB11	E15H	3.9±0.1	10.3±2.2	2.7±0.6
PAB12	R27H	2.6±0.4	14.4±3.1	5.6±1.3

酸性条件 (pH = 5.0) において、野生型に比べて、相互作用の減少が見られたのは、PAB05 (E24H)、PAB07 (Q32H)、PAB08 (D36H)、PAB09 (Q9H)、PAB10 (Q10H) で、それぞれ 3.5 倍、12.8 倍、110 倍、4.0 倍、126 倍の減少があった (Fig. 14, Table 12)。それらの減少は、酸性条件で変異導入されたヒスチジン残基が正電荷を帯びることで、静電的反発力が増加することが主な原因である。PAB08 の構造と相互作用については、あとに述べる。

PAB05 と PAB09 は、数倍の減少であった。最近接の正電荷アミノ酸は、E24H および Q9H のそれぞれに対して、Lys317 (8.41 Å) および His310 (7.95 Å) である。正電荷アミノ酸間の距離が遠いことで、静電的反発力の増加が小さいことが考えられる。

PAB07 は、十倍程度の減少であった。最近接の正電荷アミノ酸は His310 (8.10 Å) である。そのため、PAB05 および PAB09 と同様に静電的反発力の増加は小さいが、数倍影響力が大きくなっている。この原因については、あとに PAB08 の解析のところで述べることにする。

PAB10 は、100 倍以上の減少であった。最近接の正電荷アミノ酸は His435 (4.19 Å) である。それゆえ、静電的反発力の増加が大きいことが示唆される。

それに対して、酸性条件で野生型とほとんど同様の相互作用を示している PAB04 (N6H)、PAB11 (E15H)、PAB12 (R27H) では、上記のようなヒスチジン残基が正に帯電するのに伴って、結合力を減少させるような影響がほとんどないことが構造情報から判断できる。

また、先行研究において、ヒスチジン変異導入に伴って酸性条件で相互作用の減少が確認された部位である L17 について確認すると、4 Å 内に 3 つのアミノ酸 (Gln311 (3.91 Å)、Lue314 (3.56 Å)、His435 (4.00 Å)) が存在しており、疎水的相互作用の減少もあるが、His435 との静電的反発力の増加が大きいことで、結合力の減少がすることが考えられる。更に、相互作用解析結果では数倍の減少であるが、アフィニティ・カラムとして溶出ピークの pH 値が高くなった部位である N28 について確認すると、最近接の正電荷



アミノ酸は Lys317 (6.93 Å) であり、相互作用解析結果から考えると静電反発力の増加の影響は小さいように思える。特に、これらの部位は疎水的相互作用を中心とする PAB と IgG の相互作用界面の中央に存在している残基なので、ヒスチジン残基が正電荷を帯びることによる影響が大きく、1 置換変異だけで溶出ピーク値が大きく中性側にシフトしたのだと考える。

従って、これらの結果から酸性条件下でヒスチジン残基が正電荷を帯びることによる結合力の大きな減少を引き起こすには、4 Å 前後に相互作用に寄与するようなアミノ酸残基 (疎水性相互作用への寄与が高いとより顕著になるかもしれない) が存在することまたは 5 Å 以内に正電荷のアミノ酸残基が存在するような部位であることが重要であることがわかる。

Fig. 14 酸性条件 (pH = 5.0) での1置換変異体と IgG の相互作用解析

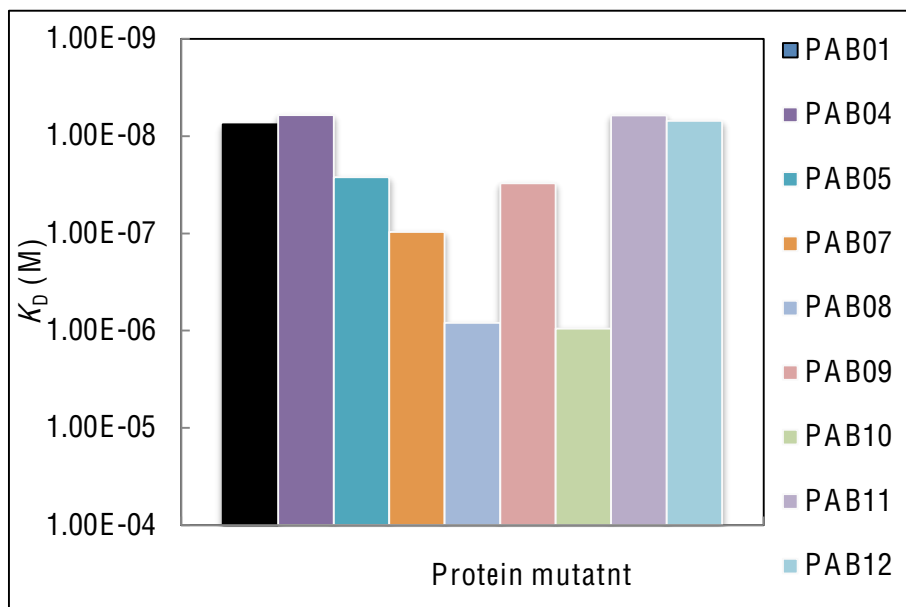


Table 12 酸性条件 (pH = 5.0) での1置換変異体と IgG の速度論解析

名前	変異	$k_a$ (M/s) ( $\times 10^5$ )	$k_d$ (1/s) ( $\times 10^{-4}$ )	$K_D$ (M) ( $\times 10^{-9}$ )
PAB01	WT	13.0 $\pm$ 5.9	83.0 $\pm$ 34.3	7.6 $\pm$ 4.3
PAB04	N6H	51.8	315.6	6.1
PAB05	E24H	36.2 $\pm$ 31.7	483.2 $\pm$ 298.6	26.4 $\pm$ 14.9
PAB07	Q32H	2.3	226.7	96.8
PAB08	D36H	2.2 $\pm$ 1.2	2083.1 $\pm$ 1372.7	832.1 $\pm$ 442.8
PAB09	Q9H	5.1	157.2	30.6
PAB10	Q10H	4.3	4072.0	951.3
PAB11	E15H	9.5	57.9	6.1
PAB12	R27H	7.0	48.8	7.0

### <D36Hの変異効果>

PAB08 は、本研究のようなコンビナトリアル・スクリーニングを用いて、幅広い部位を変異対象にして実施した結果として、得られたユニークな部位であることがわかった。まず、D36の周辺に存在するFc上のアミノ酸は、Ile253 (6.89 Å) と His310 (9.78 Å) が存在している。この距離は決して短くなく、D36よりFcに接近した変異箇所は複数存在しており、上述したように、効果的な変異部位はFcとの相互作用関係として、疎水的相互作用の減少や静電反発力の増加につながるアミノ酸残基の存在が重要であることがわかっている。すなわち、D36のpH感受性変換への変異効果をFcとの関係のみで説明するのは難しい。そこで、PABは、抗体の可変領域(Fab)とFcの両方に相互作用することに着目した。PABとFabの複合体結晶構造データを見直したところ、D36が相互作用に寄与していることがわかった [17]。

そこで、36Hについて、IgG, Fc, Fabのそれぞれとの相互作用のSPR法測定を実施した (Fig. 15, Table 13)。中性条件 (pH=7.4) において、野生型と比べて、相互作用がIgGとは6.6倍の減少、Fcとはほとんど変わらない、Fabとは2~3倍の減少であった。それは、Fabとの複合体構造からD36は4Å内に6つのアミノ酸 (Thr (3.14 Å)、Ser (3.30 Å)、Lys (2.46 Å)、Ile (3.65 Å)、Gln (3.67 Å)、Arg (2.87 Å)) が存在していることから、Fabとの相互作用の減少がIgGとの相互作用の減少の原因であることが示唆された。一方、酸性条件では、IgGとは110倍の減少、Fcとはほとんど変わらない、Fabは測定不能であった。ここでも、IgGとの相互作用の減少は、3Å内に正電荷のアミノ酸であるArgがFab上に存在していることから静電的反発力の増加による結合力の減少の影響が大きいと考えられる。よって、酸性条件 (pH=5.0) でもFabとの相互作用変化が、PABとIgGとの結合力の大きな減少の原因であることが示唆された。

SPR法測定において、センサーチップにIgGが固定化されている状態でどの程度の自由度があり、相互作用様式がどのようになっているかを断定することは難しいと考え

る。先行研究において、E-domain を用いた研究ではあるものの、E-domain に対して、同モル数の IgG の存在下 (つまり、Fc の結合部位が 2 つあるので、2 倍量のモル数になる) で、等温滴定型熱量測定を用いた Fab との相互作用解析した結果が、IgG が存在しない場合とほとんど同じであった [19]。このことから、PAB と Fc の相互作用部位と PAB と Fab の相互作用部位は完全に独立しているとともに、改めて影響を及ぼしあう可能性が示唆される。それは、PAB と Fab との弱い相互作用における D36H の変異効果が、IgG との相互作用に影響を与えることを支持するものである。

次に、PAB07 において、酸性条件での相互作用が野生型に比べて、12.8 倍の減少には Fc との相互作用の影響の存在について述べたが、Q32H の変異も PAB08 と同様に Fab との関係に影響しているのではないかと考えられる。実際に、D36H と同じ Arg 残基が 3.35 Å に存在し、酸性条件での静電的反発力の増加の影響が考えられる。結果、Q32H も Fab との弱い相互作用の変化が、IgG との相互作用に影響を与えることが示唆される。この変異部位については、収束配列のアミノ酸出現頻度解析では、ヒスチジン出現頻度が野生型に比べて低いため、スクリーニングだけでは選択できない。しかし、D36H の変異効果に対する解析から Fab との関係に着目すると Q32 の部位をヒスチジン変異効果が期待できるとして合理的に設計することが可能であると考えられる。

この PAB と Fab との相互作用は、Fab の遺伝子が VH3 の場合、主に確認することができる [44]。そして、本研究のスクリーニングで用いた抗体の Fab 遺伝子も VH3 だったので、セレクションでの選択圧になることが考えられる。また、ヒトの B 細胞が産生する抗体の多くが VH3 遺伝子のものであるため、アフィニティ・リガンドとして十分に応用できると考えている。加えて、酸性条件での解離を促進する要因である Fab 上のアルギニン (Arg) は、VH3 遺伝子中で変異が起こりにくい部位であることもわかっているため、その効果が保存されることが期待できる。

Fig. 15 D36H の IgG との相互作用解析

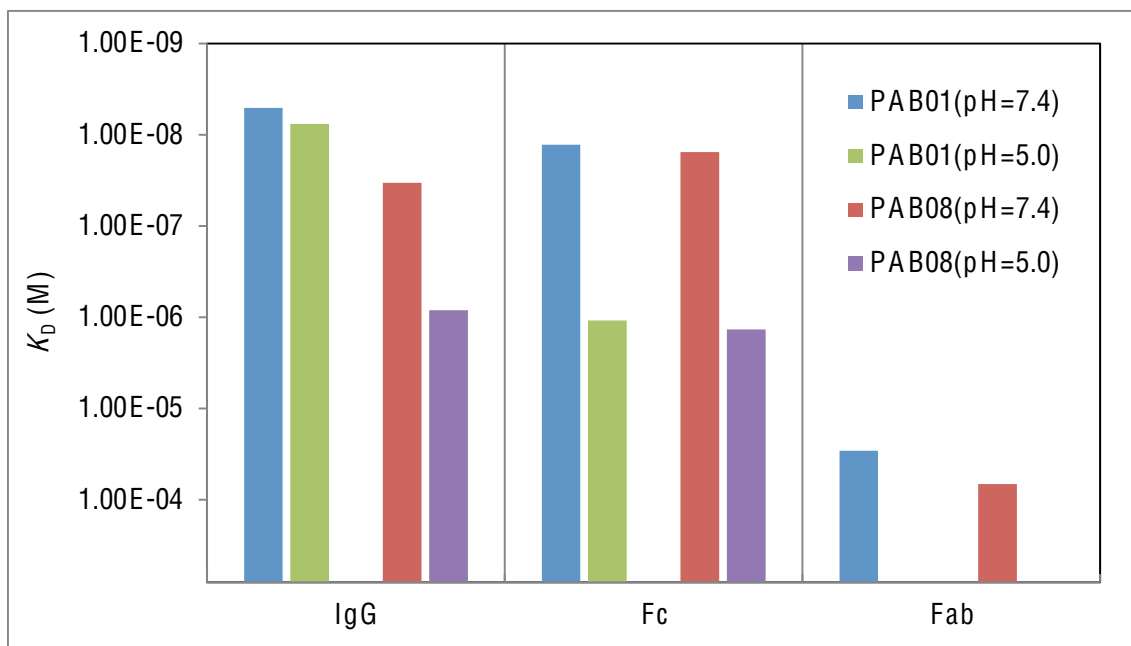


Table 13 D36H の速度論解析の  $K_D$  値

	IgG	Fc	Fab
PAB01 (pH = 7.4)	5.09E-09	1.28E-08	2.91E-05
PAB08 (pH = 7.4)	3.36E-08	1.55E-08	6.74E-05
PAB01 (pH = 5.0)	7.57E-09	1.08E-06	N.D
PAB08 (pH = 5.0)	8.32E-07	1.35E-06	N.D

#### <効果的な変異部位の酸性条件での相互作用の塩濃度依存性について>

塩濃度を変えることで、タンパク質間相互作用において、ヒスチジン残基が正電荷を帯びて影響を与えていることを示すことができると考えて実施した (Fig. 16, Table 14)。結果としては、ヒスチジン残基の正電荷の影響を判断することは難しいものになった。一般的に、塩濃度が高くなると溶液中の静電遮蔽によって斥力が減少すると考えられ、塩濃度が高くなるにつれて相互作用の増加を期待した。しかしながら、本研究の相互作用においては、明確に塩濃度の影響による差を確認することはできなかった。本研究の PAB 変異体において、効果的なヒスチジン変異部位は 5 Å 以内に正電荷アミノ酸が存在する関係のときに顕著にその効果を確認することができた。つまり、酸性条件において、そもそも PAB と IgG が相互作用して近接になったときに静電的反発力が生じていると考えると、タンパク質間が近接になっていく際に相互作用界面から溶媒分子は排除されて静電遮蔽の効果があまり現れないような関係になっているのかもしれないことが考えられる。また、PAB と IgG の相互作用は主に疎水的相互作用で結合している関係なので、塩濃度の上昇に伴って、疎水的相互作用の上昇による結合力の増加が期待されるが、PAB01 においてその効果が確認できなかった。このことを考慮すると、使用する Buffer の調整がもう少し必要であることや PAB と IgG との相互作用の系では難しいことが示唆される。結果としては、ヒスチジン残基が正電荷を帯びていることを今回は明確に示すことができなかった。

Fig. 16 酸性条件 (pH = 5.0) の塩濃度依存性の相互作用解析

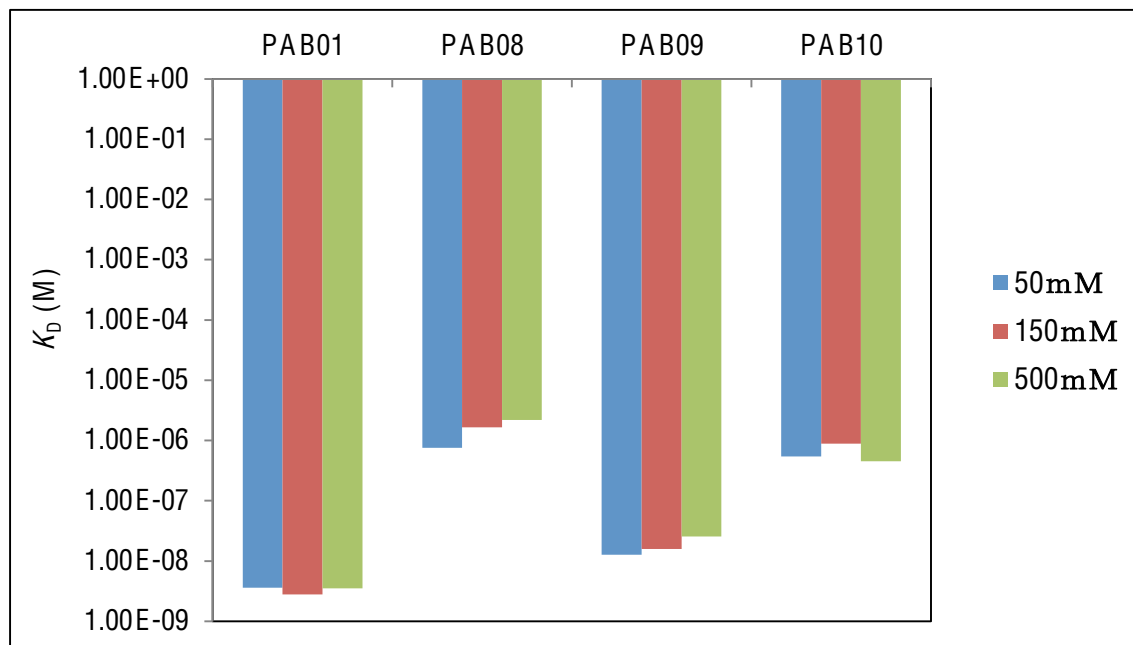


Table 14 酸性条件の塩濃度依存性の速度論解析

NaCl 濃度	50 mM	150 mM	500 mM
PAB01	3.63E-09	2.79E-09	3.52E-09
PAB08	7.54E-07	1.65E-06	2.19E-06
PAB09	1.27E-08	1.58E-08	2.56E-08
PAB10	5.44E-07	8.83E-07	4.53E-07

### <PAB の 2 置換変異体と IgG との相互作用評価>

2 置換変異体の多くは、上述で 1 置換変異体解析を実施した変異部位を組合せたものになっている。中性条件 (pH=7.4) において、各ヒスチジンの変異効果が相加的に影響しているものと、大きな変化を伴うものが存在した (Fig. 17, Table 15)。

PAB13 (Q9H, D36H) と PAB18 (Q9H, Q32H) では、各変異の影響は野生型に比べて、2.7 倍 (Q9H)、0.5 倍 (Q32H)、6.6 倍 (D36H)であるが、2 つ変異の組合せである PAB13 と PAB18 はそれぞれ 57 倍と 1.6 倍の減少であった。PAB13 においては、相加的な影響よりも大きな相互作用の減少があった。PAB14 においては、相加的に影響しているような減少であった。大きな違いは、Fab との相互作用への影響が構造情報と 1 置換変異体解析結果から考えて、D36H の方が Q32H よりも明確に大きいことである。そして、PAB と Fc の相互作用と PAB と Fab の相互作用は独立した関係にあるかつ 1 つの PAB に対して 1 つの抗体の Fab ともう 1 つの抗体の Fc が同時に相互作用することが示唆されているので [19]、D36H の Fab に対する相互作用変化が、Fc との相互作用様式に影響を与えていることが考えられる。または、PAB と IgG の強い相互作用が、Fab および Fc とのそれぞれの相互作用の相乗効果によって維持されているため、それぞれとの相互作用に影響がある変異が組合わされると相乗効果で減少しているのかもしれない。

同様にして、PAB14 (Q10H, D36H) と PAB19 (Q10H, Q32H) では、各変異の影響は野生型に比べて、10 倍 (Q10H)、0.5 倍 (Q32H)、6.6 倍 (D36H) であるが、2 つ変異の組合せである PAB14 と PAB19 はそれぞれ 1343 倍と 14 倍の減少であった。このことも上記のように、Fab の影響が、Fc との関係に影響していることを示唆するものである。

つづいて、PAB15 (E15H, D36H)、PAB16 (R27H, D36H)、PAB17 (K35H, D36H) においては、本研究の相互作用解析および先行研究の結果から、E15H、R27H、K35H の 1 置換変異体の場合はほとんど野生型と変わらない相互作用を示し、D36H が 6.6 倍の減少を示す。そこで PAB15、PAB16、PAB17 は、それぞれ 3.7 倍、15.9 倍、105 倍の減少を



示した。E15 や R27 の部位は、構造情報からもともと 4 Å 以内に IgG のアミノ酸が存在してない。それぞれの部位に最近接のアミノ酸は、E15 は Asn434 (5.30 Å)、R27 は Asp315 (4.96 Å) である。D36H との組合せで、少なくとも R27H の変異は相互作用の減少に影響していると考えられる。それは、E15 よりも最近接のアミノ酸が近くにあることと、PAB と Fc の相互作用の中央部に位置しており、先行研究から相互作用への寄与が存在することが考えられるからである [37, 38]。同様に、K35 は、4 Å 以内にアミノ酸が 1 つ (Leu309 (3.49 Å)) 存在し、1 置換変異体 (K35H) では、疎水的相互作用を維持していたのが、D36H の組合せで大きな減少を伴うのは Fab の影響が Fc との相互作用様式に影響を与えたため、相互作用が大きく減少したと考えられる。

Fig. 17 中性条件 (pH =7.4) での2置換変異体とIgGの相互作用解析

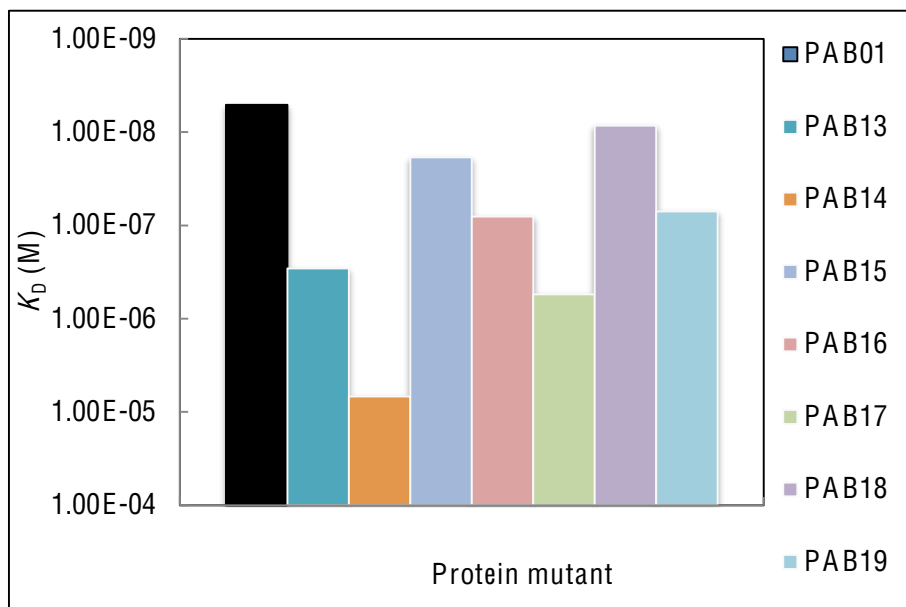


Table 15 中性条件 (pH =7.4) での2置換変異体とIgGの速度論解析

名前	変異	$k_a$ (M/s) ( $\times 10^5$ )	$k_d$ (1/s) ( $\times 10^{-4}$ )	$K_D$ (M) ( $\times 10^{-9}$ )
PAB01	WT	2.8±0.9	11.5±4.9	5.1±3.2
PAB13	Q9H, D36H	2.1±0.3	1258±981	288±146
PAB14	Q10H, D36H	2.0	5415	6832±3604
PAB15	E15H, D36H	3.6±0.9	63.1±4.3	18.6±4.2
PAB16	R27H, D36H	24.8	2004	80.7
PAB17	K35H, D36H	1.7±0.7	880±278	550±143
PAB18	Q9H, Q32H	2.7±0.5	22.0±0.7	8.6±1.8
PAB19	Q10H, Q32H	1.2±0.4	70.6±3.0	71.0±28.3

酸性条件 (pH = 5.0) において、すでに中性条件での相互作用の大きな減少を含んでいるが、相互作用の大きな減少を示すのは、1 置換変異体の解析でヒスチジン変異導入に伴って、静電的反発力の増加が確認された部位 (Q9H、Q10H、D36H) が合わさったものであった (Fig. 18, Table 16)。それら PAB13 および PAB14 は、測定のシグナルが非常に弱く、速度定数の決定には至らなかった。実際、試料濃度を数  $\mu\text{M}$ ~数十  $\mu\text{M}$  で調整すれば、PAB13 においては  $K_D$  値が  $10^{-5}$ ~ $10^{-6}$ M のオーダーで決定できる可能性はあるが、少なくとも PAB16~PAB18 よりも弱い相互作用であることは間違いない。

それに対して、PAB15、PAB16、PAB17 では、PAB08 に対して数倍の相互作用の減少であった。それは、E15H の影響は上述したようにほとんどない。そして、R27H や K35H は、野生型のアミノ酸がすでに正電荷を帯びている残基なので、ヒスチジンが酸性条件で正電荷を帯びることは野生型のアミノ酸の性質に戻るだけなので大きな相互作用の減少を示すことはない。

PAB18 および PAB19 は、中性条件での相互作用の減少が Q9H と Q10H の影響だけで、強い相互作用を維持していた。そして、酸性条件において、野生型に比べて、それぞれ 21 倍と解離定数を決定するのが難しいような大きな減少を示した。PAB18 では、それぞれの変異が野生型に比べて、4.0 倍 (Q9H) と 12.8 倍 (Q32H) の減少なので、組合せによる大きな効果はなかった。PAB19 では、それぞれの変異が 126 倍 (Q10H) と 12.8 倍 (Q32H) の減少なので、加算的であれば十分に  $K_D$  値を決定できるように思えたが、PAB14 と同様に速度定数決定が難しいものであった。この結果から、上述した Fab との相互作用の影響の強弱 (Q32H と D36H の影響の比較) が、Fc との相互作用への影響を示したことと同様に、Fc との相互作用の強弱が、Fab との相互作用に影響を与えていることが示唆される。

以上より、SPR 法による 1 置換変異体および 2 置換変異体の相互作用解析と構造情報から、Fab との相互作用への影響が大きい変異 (D36H) は Fc の相互作用様式に、Fc と

の相互作用への影響が大きい変異 (Q10H) が Fab の相互作用様式に、影響を及ぼしていることが示唆された。その中で、D36H での細かな相互作用解析で述べたように、非常に弱い相互作用である Fab (Fc との相互作用と比べて 1000 倍以上弱い) との相互作用への変化が全体の相互作用へ大きく影響していることがわかったのは、興味深いことであつた。そして、コンビナトリアル・スクリーニングの結果から特定することができた変異部位 (D36H) から、合理的に考えて Q32H の変異導入が有効であることを導いて PAB19 のような有望な変異体作製に成功したこともまた本研究の手法の有効性を支持するものであると考える。

Fig. 18 酸性条件 (pH = 5.0) での 2 置換変異体と IgG の相互作用解析

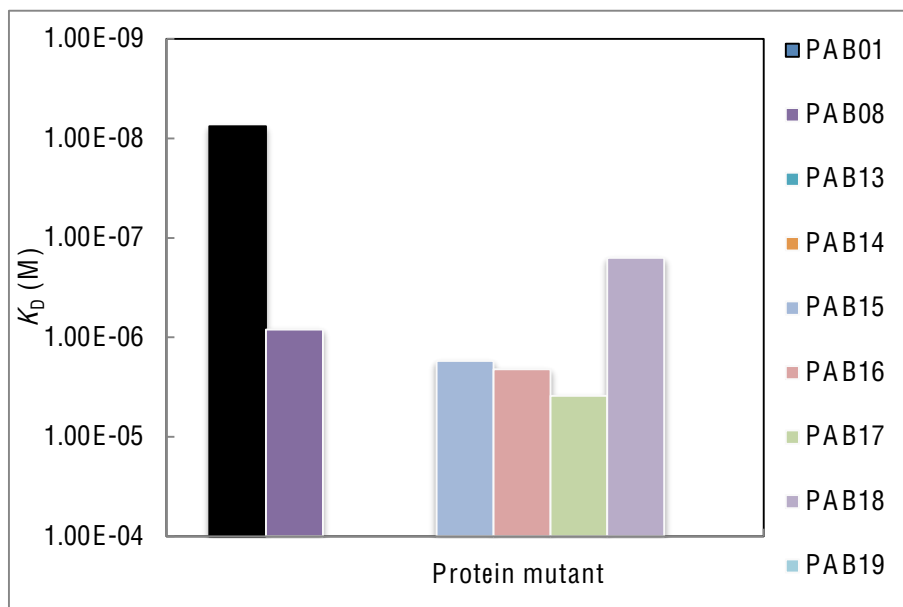


Table 16 酸性条件 (pH = 5.0)での 2 置換変異体と IgG の速度論解析

名前	変異	$k_a$ (M/s) ( $\times 10^5$ )	$k_d$ (1/s) ( $\times 10^{-4}$ )	$K_D$ (M) ( $\times 10^{-9}$ )
PAB01	WT	13.0 $\pm$ 5.9	83.0 $\pm$ 34.3	7.6 $\pm$ 4.3
PAB08	D36H	2.2 $\pm$ 1.2	2083.1 $\pm$ 1372.7	832.1 $\pm$ 442.8
PAB13	Q9H, D36H	N.D	N.D	N.D
PAB14	Q10H, D36H	N.D	N.D	N.D
PAB15	E15H, D36H	3.3	5725.0	1730.0
PAB16	R27H, D36H	3.9	8141.0	2094.0
PAB17	K35H, D36H	3.0	11420.0	3857.0
PAB18	Q9H, Q32H	7.6	1203.0	159.2
PAB19	Q10H, Q32H	N.D	N.D	N.D

#### <スクリーニングで得られた収束配列の PAB または PAZ の相互作用解析>

5 章において、pH グラディエントモードでアフィニティ・クロマトグラフィを行って、溶出 pH を求めた 2 つの収束配列において、その相互作用解析を行った。

中性条件では、PAB02 および PAB03 は、野生型に比べて、それぞれ 2.0 倍の増加と 2.7 倍の減少であった (Fig. 19, Table 17)。それぞれ PAB02 は 3 つ、PAB03 は 4 つのヒスチジンを含んでいるが、各変異の影響が加算的な影響しているからなのか、強い相互作用を維持している。特に、PAB03 は、効果的な 2 つの変異 (Q32H、D36H) を含んでいる。Q32H の変異において、Fc との相互作用への影響が示唆されたものの、D36H との組合せで相互作用が大きく減少しないことから、やはり Fab との相互作用への変異効果が強いことが示唆される。加えて、同じ領域 (Fab) に対する相互作用においては、各変異 (Q32H, D36H) の影響が加算的になることも示唆される結果となった。酸性条件では、中性条件と同様に各変異の相互作用への影響が加算的に現れている (Fig. 20, Table 18)。

また、PAB02 のように  $K_D$  値では野生型と変わらないが、 $k_d$  値が大きくなっていることから相互作用は減少するようにヒスチジン変異導入の影響が少なくとも現れていると考える。そして、PAB03 は、Q32H と D36H の変異効果による相互作用の減少が見られる。結果として、収束配列を用いた相互作用解析から、pH 感受性変換に効果的な変異が含まれているかどうかを判断できることがわかる。従って、コンビナトリアル・スクリーニングの収束配列のアミノ酸出現頻度解析と収束配列の相互作用解析を合理的に考えて、効率的かつ効果的に目的の分子を作製していくことができることが示唆された。

また、PAZ 変異体を作製して相互作用解析を実施した結果は、基本的に PAB 変異体におけるヒスチジン変異の影響を中性条件および酸性条件で保持していることがわかった。よって、PAB と相同性の高い他のドメインにヒスチジン変異導入しても同等の効果を示す可能性が高いことがわかった。

Fig. 19 中性条件 (pH =7.4) での収束配列の PAB または PAZ の相互作用解析

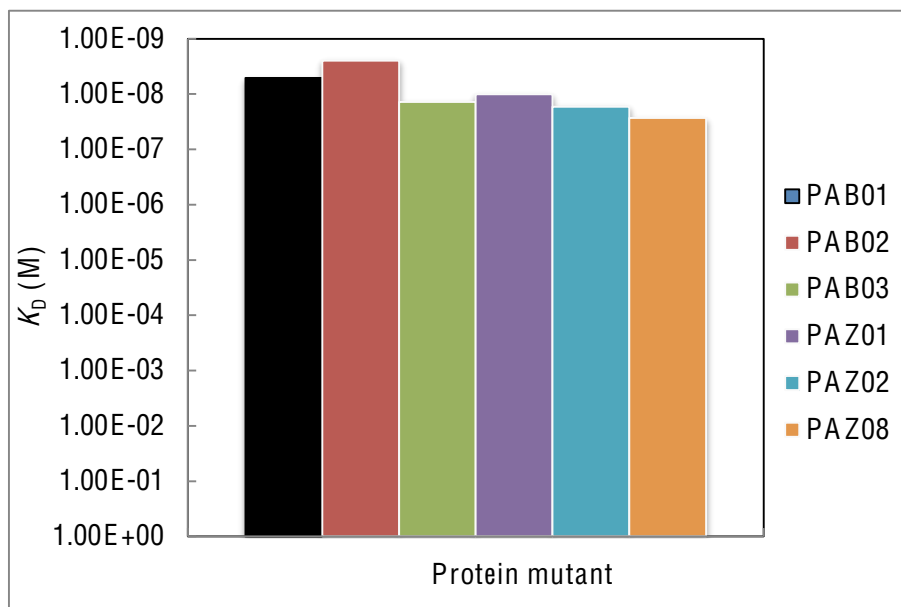


Table 17 中性条件 (pH =7.4)での収束配列の PAB または PAZ の相互作用解析

名前	変異	$k_a$ (M/s) ( $\times 10^5$ )	$k_d$ (1/s) ( $\times 10^{-4}$ )	$K_D$ (M) ( $\times 10^{-9}$ )
PAB01	WT	2.8±0.9	11.5±4.9	5.1±3.2
PAB02	N6H, N11H, E15D, E24Q, E25H	12.8±9.2	15.5±0.3	2.5±1.8
PAB03	N6H, E24H, E25Q, Q32H, D36H	73.1±69.3	1086±1036	13.9±1.0
PAB08	D36H	2.6±1.4	63.3±9.1	33.6±19.2
PAZ01	PAB01 の Zdomain	1.9±0.1	18.6±7.1	10.1±4.1
PAZ02	PAB03 の Zdomain	-	-	17.0
PAZ08	PAB08 の Zdomain	2.3±0.7	56.4±3.9	27.1±9.9

Fig. 20 酸性条件 (pH = 5.0) での収束配列の PAB または PAZ の相互作用解析

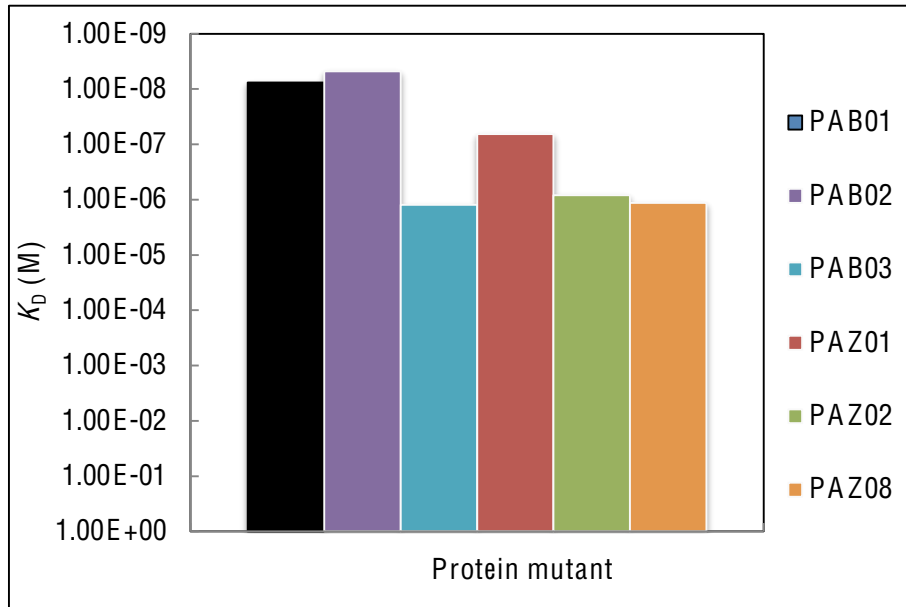


Table 18 酸性条件 (pH = 5.0)での収束配列の PAB または PAZ の相互作用解析

名前	変異	$k_a$ (M/s) ( $\times 10^5$ )	$k_d$ (1/s) ( $\times 10^{-4}$ )	$K_D$ (M) ( $\times 10^{-9}$ )
PAB01	WT	13.0±5.9	83.0±34.3	7.6±4.3
PAB02	N6H, N11H, E15D, E24Q, E25H	30.9	147.5	4.8
PAB03	N6H, E24H, E25Q, Q32H, D36H	2.2±1.0	3720.3±3774	1244.7±1002
PAB08	D36H	2.2±1.2	2083.1±1372.7	832.1±442.8
PAZ01	PAB01 の Zdomain	3.4±0.6	210.2±16.8	65.2±16.1
PAZ02	PAB03 の Zdomain	3.2	2669.0	836.3
PAZ08	PAB08 の Zdomain	2.7	3080.0	1137.0



### <効果的な変異部位の相互作用の熱力学的解析>

効果的な変異部位である Q9H、Q10H、D36H の効果について、熱力学的解析から評価する。ファントホッフプロットによる線形モデル解析で熱力学的パラメータを求めて、エンタルピーやエントロピーの変化から変異の影響について考える。また、以下の解析結果は、線形モデルでのプロットが良くない場合も存在しており、あくまでパラメータの変化の傾向に対して、構造情報から考えることにした。

中性条件 (pH = 7.4) において、PAB01 は、エンタルピーおよびエントロピー駆動型の相互作用であることがわかる (Fig. 21, Table 19-20)。特に、エントロピー変化が正になっていることは、X 線結晶構造解析から主に疎水的相互作用で結合しているとされている PAB と IgG の相互作用関係を説明していると考えられる。そして、PAB の各変異体のエンタルピーの減少から、ヒスチジン変異に伴って、様々な相互作用の増加が考えられる。つまり、ヒスチジン残基は、本来の相互作用を維持することができるまたは相互作用を強くするような効果を含む効果的な変異であることが示唆された。それに対して、エントロピー変化が PAB01 に比べて、減少していることが最終的な結合力に影響している。エントロピーが負になる影響は、エンタルピーの減少が示すように、タンパク質間に様々な相互作用が生じることによる自由度の減少が考えられる。特に、PAB08 (D36H) や PAB10 (Q10H) のエントロピー変化が大きいことは、X 線結晶構造データから近接に複数のアミノ酸が存在し、立体障害などが生じる、可能性が考えられ、相互作用様式の構造変化が示唆されたことを支持するものであると考える。

酸性条件 (pH = 5.0) での測定は、中性条件での測定 (pH = 7.4) よりも非常に解析が困難だったため、ここでもあくまでパラメータの傾向と構造情報から考えることにした (Fig. 22, Table 21-22)。結果としては、ここまでに考えてきた静電的反発力の増加がヒスチジン変異の効果として現れていることをエンタルピーの減少が示していると考えられる。また、エントロピーに着目すると、中性条件では野生型の PAB01 と PAB09 以外は、エ

ントロピー変化が負で結合に不利だったのが、酸性条件ではすべてにおいて、正で結合に有利なものになっている。先行研究でも同様の変化が見られ、構造解析からヒスチジン変異導入に伴って、新たな水和構造を形成していた [37] ので、PAB 変異体も同様に水和構造の形成が示唆される。従って、ヒスチジン変異導入によって、酸性条件での静電的反発力の増加による結合に不利になる効果とともに、水和構造を形成して結合に有利になる効果が生じる可能性を考慮して設計する必要があることが明らかになった。

Fig. 21 中性条件 (pH =7.4) での PAB 変異体の熱力学的解析

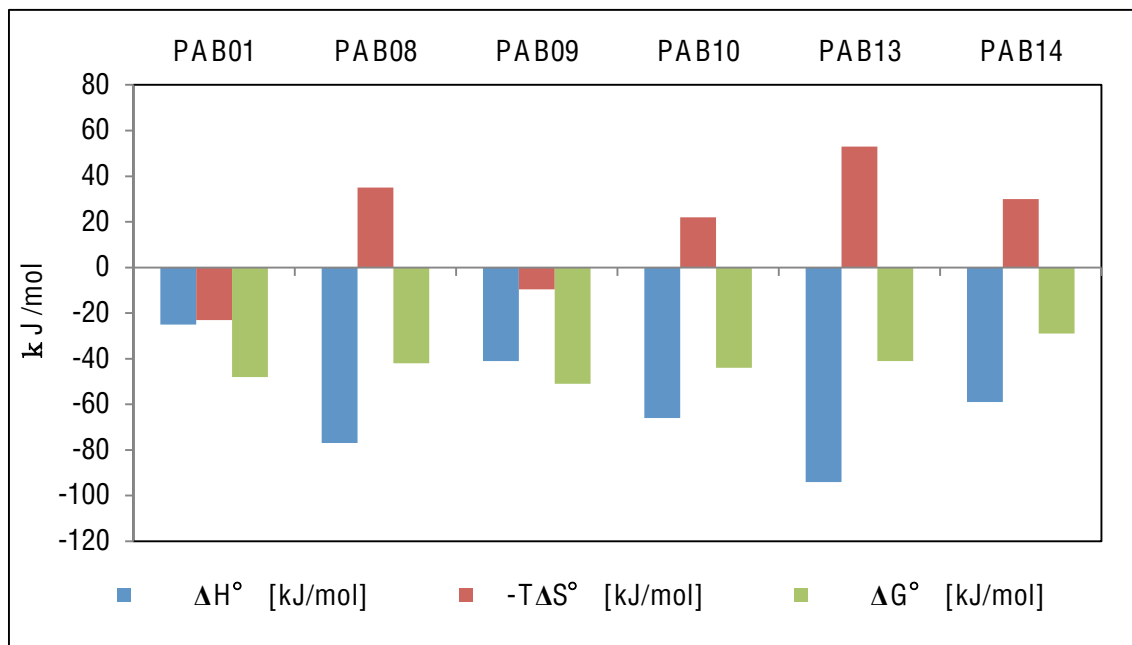


Table 19 中性条件 (pH =7.4) での PAB 変異体の熱力学的解析

Sample	PAB01	PAB08	PAB09	PAB10	PAB13	PAB14
$\Delta H^\circ$ [kJ/mol]	-25	-77	-41	-66	-94	-59
$-T\Delta S^\circ$ [kJ/mol]	-23	35	-9.6	22	53	30
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-48	-42	-51	-44	-41	-29

Table 20 中性条件 (pH =7.4) での PAB 変異体の速度論解析

Protein	Temperature (°C)	$k_a$ (M/s)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (1/M)
PAB01 (WT)	15	2.21E+05	5.06E-04	2.29E-09
	20	2.72E+05	7.41E-04	2.73E-09
	25	3.06E+05	1.10E-03	3.60E-09
	30	3.51E+05	1.34E-03	3.81E-09
	35	3.65E+05	1.65E-03	4.53E-09
PAB08 (D36H)	15	1.38E+05	2.79E-03	2.02E-08
	20	1.59E+05	4.16E-03	2.61E-08
	25	1.78E+05	7.57E-03	4.25E-08
	30	3.60E+05	2.83E-02	7.86E-08
	35	3.31E+05	5.29E-02	1.60E-07
PAB09 (Q9H)	15	4.80E+05	3.10E-04	6.46E-10
	20	5.34E+05	4.68E-04	8.78E-10
	25	5.54E+05	6.02E-04	1.09E-09
	30	5.89E+05	8.84E-04	1.50E-09
	35	6.20E+05	1.25E-03	2.01E-09
PAB10 (Q10H)	15	1.54E+05	1.62E-03	1.05E-08
	20	1.98E+05	2.47E-03	1.25E-08
	25	1.94E+05	3.45E-03	1.78E-08
	30	1.61E+05	5.86E-03	3.65E-08
	35	1.55E+05	8.92E-03	5.77E-08
PAB13 (Q9H, D36H)	15	3.61E+05	8.02E-03	2.22E-08
	20	7.46E+05	2.95E-02	3.96E-08
	25	4.44E+05	3.24E-02	7.30E-08
	30	8.52E+05	1.17E-01	1.37E-07
	35	5.26E+05	1.53E-01	2.90E-07
PAB14 (Q10H, D36H)	15	1.18E+05	4.15E-01	3.51E-06
	20	1.29E+05	5.96E-01	4.63E-06
	25	1.16E+05	7.76E-01	6.71E-06
	30	8.27E+04	8.50E-01	1.03E-05
	35	4.81E+04	8.51E-01	1.77E-05

Fig. 22 酸性条件 (pH = 5.0) での PAB 変異体の熱力学的解析

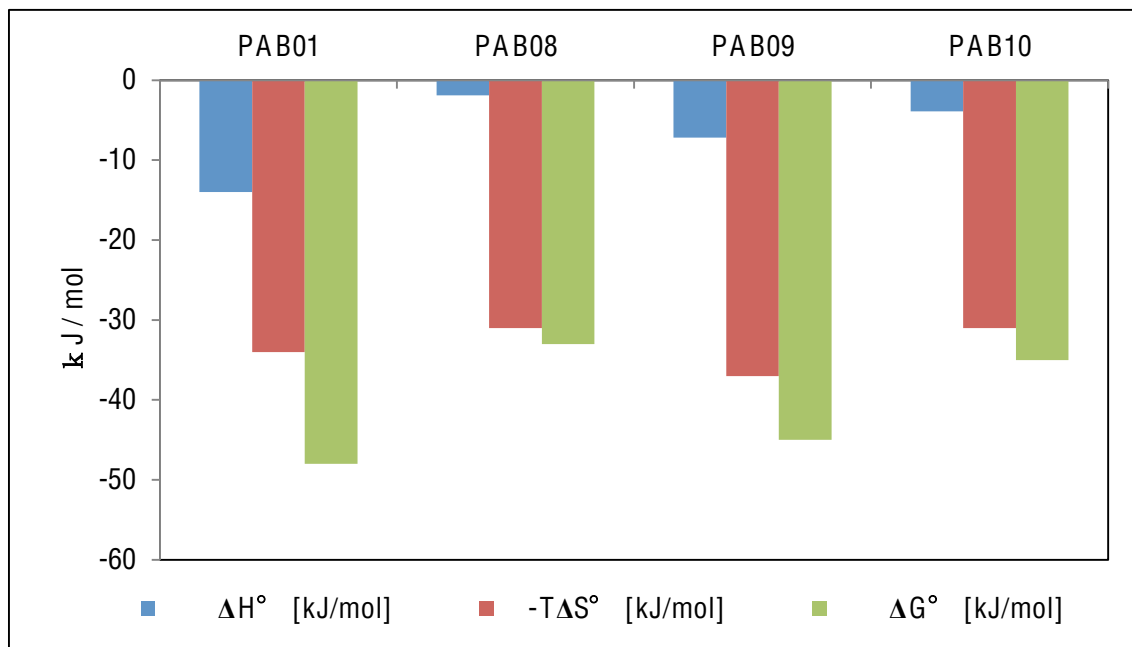


Table 21 酸性条件 (pH = 5.0) での PAB 変異体の熱力学的解析

sample	PAB01	PAB08	PAB09	PAB10
$\Delta H^\circ$ [kJ/mol]	-14	-1.9	-7.2	-3.9
$-T\Delta S^\circ$ [kJ/mol]	-34	-31	-37	-31
$\Delta G^\circ$ [kJ/mol]	-48	-33	-45	-35

Table 22 酸性条件 (pH = 5.0) での PAB 変異体の速度論解析

	Temperature (°C)	$k_a$ (M/s)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (1/M)
PAB01 (WT)	15	9.04E+05	2.82E-03	3.12E-09
	20	1.35E+06	3.99E-03	2.95E-09
	25	1.53E+06	5.14E-03	3.36E-09
	30	2.32E+06	8.46E-03	3.65E-09
	35	3.35E+06	1.52E-02	4.54E-09
PAB08 (D36H)	15	1.16E+05	1.37E-01	1.19E-06
	20	1.61E+05	2.50E-01	1.55E-06
	25	2.57E+05	4.23E-01	1.65E-06
	30	4.07E+05	6.60E-01	1.62E-06
	35	7.75E+05	9.48E-01	1.22E-06
PAB09 (Q9H)	15	1.375E+6	2.130E-2	1.549E-8
	20	1.368E+6	1.722E-2	1.259E-8
	25	1.059E+6	1.691E-2	1.598E-8
	30	1.750E+6	2.904E-2	1.660E-8
	35	1.874E+6	3.232E-2	1.725E-8
PAB10 (Q10H)	15	2.93E+05	2.30E-01	7.85E-07
	20	3.88E+05	3.37E-01	8.68E-07
	25	5.08E+05	4.48E-01	8.83E-07
	30	7.14E+05	6.53E-01	9.14E-07
	35	9.63E+05	8.38E-01	8.70E-07

<PAB と IgG の相互作用モデルについて>

5章および本章において、ヒスチジン変異効果の理解を進めてきた。先行研究において、PABの各ドメインがFcおよびFabのそれぞれと相互作用能を持つことがわかっている [15]。そして、Eドメインとの相互作用研究ではあるが、ProteinAの1つのドメインが、FcとFabに同時に相互作用することが示唆されている [19]。

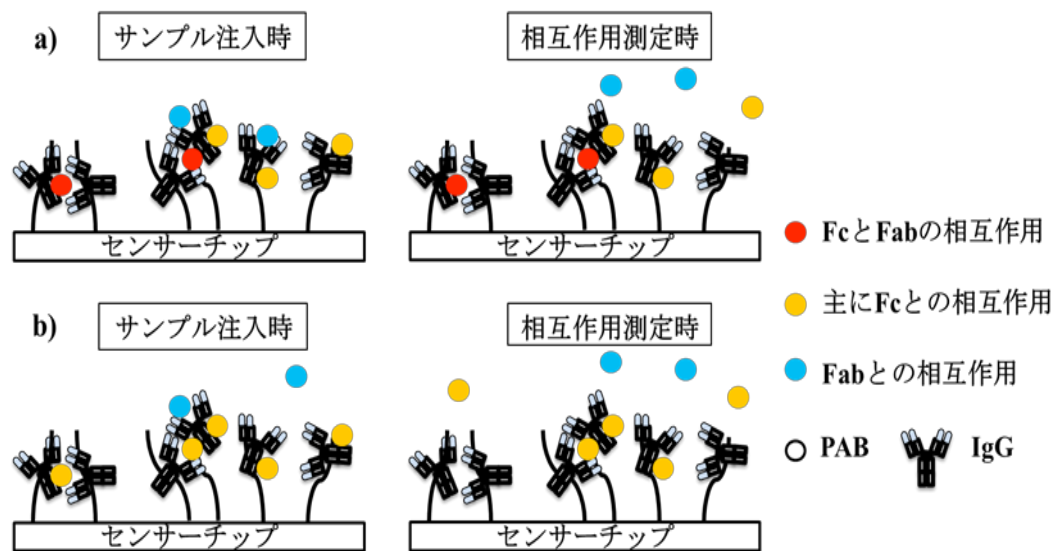


Fig. 23 中性条件での SPR 測定の相互作用

a) PAB01(WT)の場合    b) PAB08(D36H)の場合

D36H の変異効果の影響がユニークなものであるため、モデルを考える上で PAB01 (WT) と PAB08 (D36H) を例として図にしている (Fig. 23-24)。

中性条件において、PAB と Fc は強く相互作用し ( $K_D$  値が  $10^7 \sim 10^8$ )、PAB と Fab は弱い相互作用を示す ( $K_D$  値が  $10^4 \sim 10^5$ )。SPR 法測定やアフィニティ・クロマトグラフィのフローシステムの中での Fc と Fab のそれぞれの領域だけに対する相互作用測定では、Fc との結合を確認することは容易で、Fab との結合を確認するには高い濃度の PAB が必要である。その中で、IgG との相互作用においては、PAB と Fc の強い相互作用によって PAB の局所濃度が見掛け上で上昇することが示唆される。その結果、近くに別の IgG

の Fab が存在すると、PAB と Fab との相互作用が PAB と Fc の相互作用を更に支えるように、PAB と IgG の相互作用が強くなるという上述の <D36H の効果> のところで示した結果 ( $K_D$  値が  $10^8 \sim 10^9$ ) を支持することができるだろう。このアフィニティ効果 (多価の抗体が抗原に示す親和力) が D36H の変異効果で変化することがアフィニティ・クロマトグラフィ (Fig. 24) での溶出 pH 値のシフトに効いていることが考えられる。実際、D36H の変異体では、野生型と比べて、Fab との相互作用が約 2~3 倍の減少し、IgG との相互作用 (Fab が 2 つ存在) では 6.6 倍の減少につながる結果である。更に、酸性条件では、Fab との相互作用において、静電的反発力の増加と疎水的相互作用の減少が D36H の変異効果で考えられるので、PAB と IgG への相互作用に影響を与えることが考えられる。従って、野生型に比べて、PAB08 (D36H) は約 110 倍の相互作用の顕著な減少につながったことが理解できる。

同様にして、Fc との相互作用と Fab との相互作用のそれぞれの影響がアフィニティ・カラム上でどのように現れるかについて考えることにした。3 章において、pH 感受性変換に効果的な変異と考えた Q9H、Q10H、D36H の一置換変異体および二置換変異体について考える。まずは、一置換変異体の SPR 測定から考えると、酸性条件での相互作用の減少は、野生型と比べて、それぞれ 4 倍 (Q9H)、126 倍 (Q10H)、110 倍 (D36H) であった。それに対して、溶出 pH 値は D36H だけが明確に中性側に溶出ピークのシフトを示した。SPR 測定のセンサーチップ上とアフィニティ・カラム中での PAB と IgG の相互作用様式としては、中性条件では多点 (Fc および Fab の相互作用) または Fc での相互作用が関与していることは大きく変わらないように思える。しかしながら、酸性条件については、SPR 測定では PAB 変異体を酸性溶液中に溶かしたものをセンサーチップ上に注入しているので、すでに変異部位のヒスチジン残基が正電荷をもっている割合が高く、静電反発力の増加と疎水的相互作用の減少が生じてセンサーチップ上の IgG と相互作用をしにくいものになっている。それに対して、アフィニティ・カラム中では、pH



グラディエントによって徐々に pH 値を下げていくため、酸性溶媒との接触によってヒスチジン残基が正電荷を帯びると考えると、PAB と Fc の強い相互作用に参与している部位 (Q9H、Q10H) と PAB と Fab の弱い相互作用に参与している部位 (D36H) のそれぞれのヒスチジン残基の正電荷を帯びる割合の変化が異なる可能性が示唆される。ここでも、アビディティ効果の存在がカラム上で考えられ、D36H 変異によって、中性条件での相互作用が減少傾向にあり、そのヒスチジン残基が正電荷を帯びる割合が高く、静電的反発力の増加と疎水的相互作用の減少による Fab との相互作用への影響が残りの2つの変異 (Q9H、Q10H) よりも早く現れることで、野生型よりも約 1 ポイントもの溶出 pH 値のシフトが見られたのではないかと考える。そして、残りの2つの変異では、Fab によるアビディティ効果が野生型と変わらずに、PAB と IgG の相互作用に効いているのでほとんど溶出 pH 値のシフトが見られないと考える。

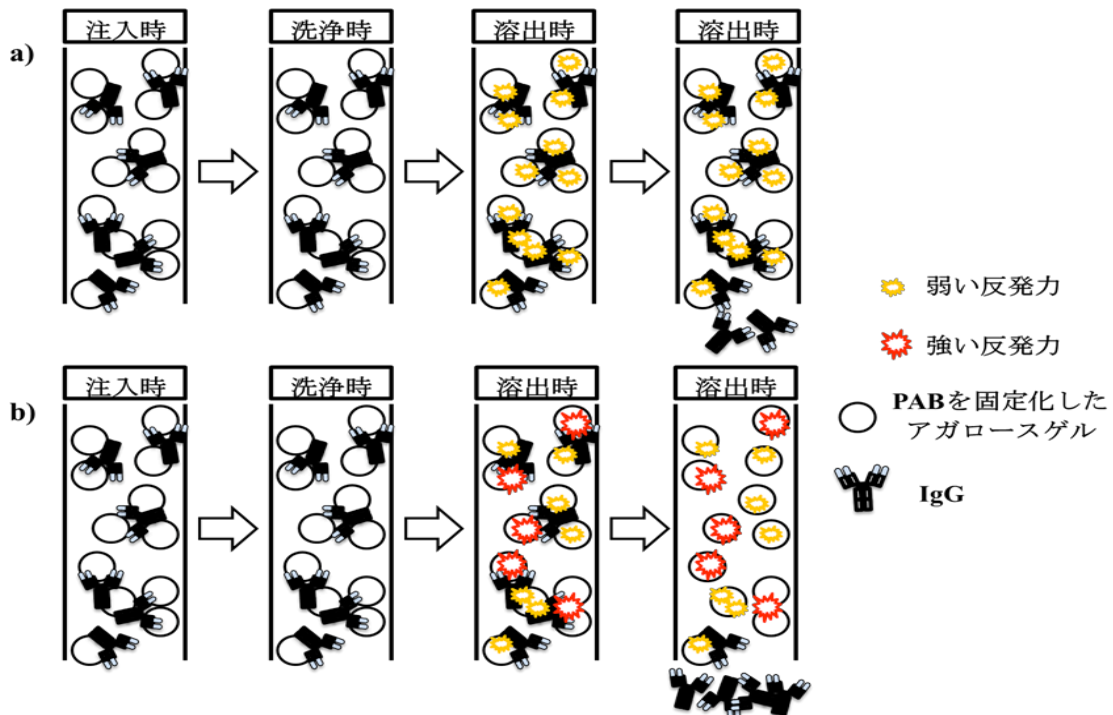


Fig. 24 アフィニティ・クロマトグラフィ操作での PAB と IgG の相互作用

a) PAB01(WT) b) PAB08(D36H)

## 7章 タンパク質の熱安定性評価

### 7-1 緒言

アフィニティ・カラムのリガンドタンパク質としては、構造安定性が低いと劣化が早くなることが考えられるので、作製した PAB 変異体の構造安定性を評価した。さらに、酸性条件での相互作用の変化が、ヒスチジン残基の側鎖が正に帯電することによる効果が主な原因であることを支持するために、酸性条件での構造安定性への影響を評価した。

また、本研究では、ヒスチジンの変異導入の対象部位を決定する際に、構造安定性への影響をあまり考慮していないが、今後のヒスチジン・スキャンニング・ライブラリの設計の際に、構造安定性を下げる変異部位を排除できるような選択条件が存在するのか考えた。

### 7-2 実験方法

タンパク質の CD 測定値より平均残基モル楕円率を算出する。変性の可逆性を確認する。また、222 nm での CD 値が測定したタンパク質の熱変性曲線および未変性・変性状態の割合を算出する。

#### ① 平均残基モル楕円率の算出【 $\theta$ : MRE (degree cm<sup>2</sup>dmol<sup>-1</sup>)】

平均残基モル楕円率は、実測値  $\theta$  を 1 mol/100mL、光路長 10 cm あたりに規格化した値であり、式 (1) より算出される。

$$[\theta] = 100 \times \theta / (C \times l \times R) \dots \text{式 (1)}$$

C : 試料のモル濃度 (M)    l : 測定セルの光路長    R : 残基数

#### ② タンパク質変性の熱力学的解析

タンパク質の濃度を  $C_0$  として、変性状態 (U) と未変性状態 (N) が平衡状態にあると

考えられる。

変性状態の占める割合を  $\alpha$  とすれば、変性状態の濃度  $C_U = C_0 \cdot \alpha$

未変性状態の濃度  $C_N = C_0 \cdot (1 - \alpha)$

$$C_0 = C_0 \cdot \alpha + C_0(1 - \alpha) \dots \text{式 (2)}$$

また、その時の平衡定数  $K$  は

$$K = \frac{C_0 \cdot \alpha}{C_0 \cdot (1 - \alpha)} = \frac{\alpha}{(1 - \alpha)} \dots \text{式 (3)}$$

よって変性状態の割合は

$$\alpha = \frac{K}{1 + K} \dots \text{式 (4)}$$

計測された CD 値 (222 nm での MRE)  $[\theta]$  は、変性状態 (U) の CD 値  $\theta_U$  と未変性状態の CD 値  $\theta_N$  の混合値である。

$$[\theta] = [\theta_N] \cdot (1 - \alpha) + [\theta_U] \cdot \alpha = [\theta_U] + \frac{1}{1 + K} \{[\theta_N] - [\theta_U]\} \dots \text{式 (5)}$$

また、定圧比熱  $C_p$  はエンタルピー (H) と温度 (T) によって表わされる。

$C_p$  が一定の条件下において

$$\int C_p dT = \int \frac{\delta H}{\delta T} dT$$
$$\Delta H = \Delta C_p \cdot T + C \dots \text{式 (6)}$$

変性温度 ( $T_m$ ) におけるエンタルピー ( $H_m$ ) は、 $\Delta H_m = \Delta C_p \cdot T_m + C \dots \text{式 (7)}$

式 (6)、(7) より

$$\Delta H - \Delta H_m = \Delta C_p \cdot T - \Delta C_p \cdot T_m$$

$$\Delta H = \Delta H_m + \Delta C_p \cdot (T - T_m) \dots \text{式 (8)}$$

平衡定数  $K$  は van't Hoff 式

$$\left( \frac{\delta \ln K}{\delta T} \right)_P = \frac{\Delta H}{RT^2} \dots \text{式 (9)}$$

式 (9) の  $\Delta H$  に式 (8) を代入して積分すると

$$\int \left( \frac{\delta \ln K}{\delta T} \right)_P dT = \int \frac{\Delta H_m + \Delta C_p \cdot (T - T_m)}{RT^2} dT$$

$$\ln K = -\frac{\Delta H_m}{R} \cdot \left( \frac{1}{T} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \left( \ln T + \frac{T_m}{T} \right) + \text{constant} \dots \text{式 (10)}$$

変性温度  $T=T_m$  のとき、平衡定数  $K=1$  となるので式 (10) に代入して

$$0 = -\frac{\Delta H_m}{R} \cdot \left( \frac{1}{T_m} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \cdot (\ln T_m + 1) + \text{constant} \dots \text{式 (11)}$$

式 (10)、(11) より

$$\begin{aligned} \ln K &= -\frac{\Delta H_m}{R} \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \left\{ \left( \ln T + \frac{T_m}{T} \right) - (\ln T_m + 1) \right\} \\ &= -\frac{\Delta H_m}{R} \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \left\{ \frac{T_m}{T} - 1 - \ln \frac{T_m}{T} \right\} \end{aligned}$$

$$K = \exp \left[ -\frac{\Delta H_m}{R} \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \left( \frac{T_m}{T} - 1 - \ln \frac{T_m}{T} \right) \right] K \dots \text{式 (12)}$$

加えて、未変性状態の  $\theta_N$  および変性状態  $\theta_U$  は温度  $T$  の一次関数に近似されるので

$$\text{未変性状態} \quad [\theta_N] = A_N \cdot T + B_N \dots \text{式 (a)}$$

$$\text{変性状態} \quad [\theta_U] = A_U \cdot T + B_U \dots \text{式 (b)}$$

と表わすことができる。

式 (5) に式 (12)、(a)、(b) を代入すれば、

$$\begin{aligned} [\theta] &= [\theta_U] + \frac{1}{1+K} \{ [\theta_N] - [\theta_U] \} \\ &= (A_U \cdot T + B_U) + \frac{\{ (A_N \cdot T + B_N) - (A_U \cdot T + B_U) \}}{1 + \exp \left[ -\frac{\Delta H_m}{R} \cdot \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) + \frac{\Delta C_p}{R} \cdot \left( \frac{T_m}{T} - 1 - \ln \frac{T_m}{T} \right) \right]} \dots \text{式 (c)} \end{aligned}$$

式 (c) を用いて、測定で得られた各温度での MRE ( $\theta$ ) について回帰分析を行うと  $\Delta H_m$ 、

$T_m$ 、 $C_p$ 、 $A_N$ 、 $B_N$ 、 $A_U$ 、 $B_U$  の各値が算出できる。各温度での変性状態の割合  $\alpha$  は、式 (4)

より求めることができる。

### <円偏光二色性スペクトル法による改良型タンパク質の熱安定性評価>

各PABおよびPAZタンパク質の熱安定性を円偏光二色性 (CD) スペクトルにより評価した。なお、CDスペクトルは、タンパク質の二次構造の変化を鋭敏に反映する分光学的分析方法であることが知られている。CDスペクトルの強度に相当するモル楕円率を試料の温度を変化させながら観測することで、どの程度の温度で各々の改良型プロテインAが変性するのかを明らかにすることができる。

まず、単離精製した各タンパク質をそれぞれ5~25  $\mu\text{M}$ の濃度で含む水溶液 (50 mMリン酸ナトリウムBuffer、pH = 7.0) に調製した。この試料溶液を円筒型セル (セル長 0.1 cm) に注入し、J805型円偏光二色性分光光度計 (日本分光) を用いて、20 °Cの温度で測定波長を260 nmから195 nmに移動させCDスペクトルを得た。同じ試料を98 °Cに加熱、さらに98 °Cから20 °Cに冷却し260 nmから195 nmのCDスペクトルを得た。

次いで、測定波長を 222 nm に固定し 20 °C から 100 °C に 1 °C /min の速度で昇温させてモル楕円率の経時変化を測定した。得られた熱融解曲線について二状態相転移モデルの理論式 (文献: 有坂、バイオサイエンスのための蛋白質科学入門) を用いて解析し、変性温度  $T_m$ 、および  $T_m$  における変性のエンタルピー変化  $dH_m$  を決定した。

### 7-3 結果と考察

#### <PAB の 1 置換または 2 置換変異体の熱安定性評価>

ヒスチジン変異導入に対して、本研究では安定性を減少させるものであった (Fig. 25-30, Table 23)。その中で、PAB16 の安定性の減少は、R27H の影響が大きいと考えるが、約 30 °C もの安定性の減少がみられた。この安定性の減少は、R27 が PAB の分子内部に存在しており、様々な PAB 中の近接のアミノ酸と相互作用を形成していることが考えられ、それらがヒスチジン変異によって壊れたことが原因であると考えられる。それでもこの構造安定性減少がタンパク質間相互作用には大きく影響していないと考える。なぜなら、PAB12 (R27H) は中性および酸性条件で野生型とほとんど同じ相互作用を示すからである。

それに対して、PAB04 や PAB08 のように安定性を大きく減少させなかったのは、PAB 中の近接のアミノ酸との相互作用の形成がほとんどないためだと考える。結果としては、構造安定性へのヒスチジンの影響を考慮する場合は、構造情報をもとに分子内の相互作用を形成しているのが多い部位および分子内部に存在するような部位は避けた方がいいと考える。また、Z ドメインという安定性を高める配列に PAB01、PAB03、PAB08 を変えると、基本的には B ドメインから Z ドメインへの安定性の向上する形になることがわかる。

そこで以下に改めて、各変異の安定性の減少と露出表面積比の関係を図で示すことにする。このとき、各変異の安定性の影響が加算的なものであると考えて、E15、R27、K35 の構造安定性への影響を 2 置換変異体から D36H 変異の影響を引いて算出することにした。

Fig. 25 1 置換変異体の熱安定性評価 (測定値)

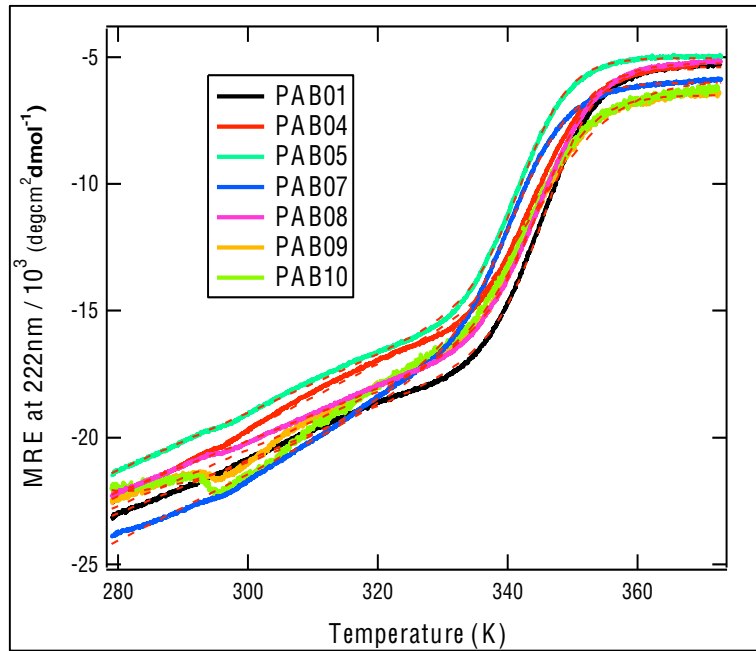


Fig. 26 1 置換変異体の熱安定性評価 (変性の割合)

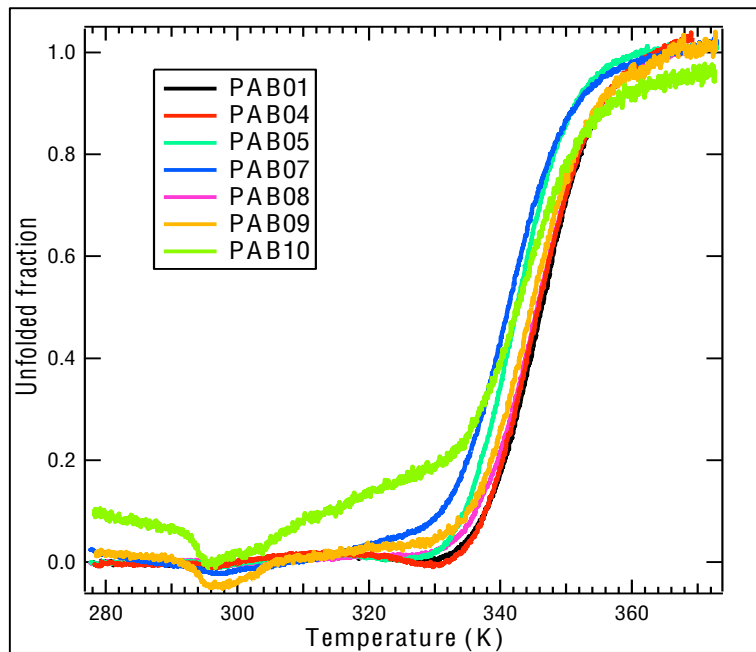


Fig. 27 2置換変異体の熱安定性評価 (測定値)

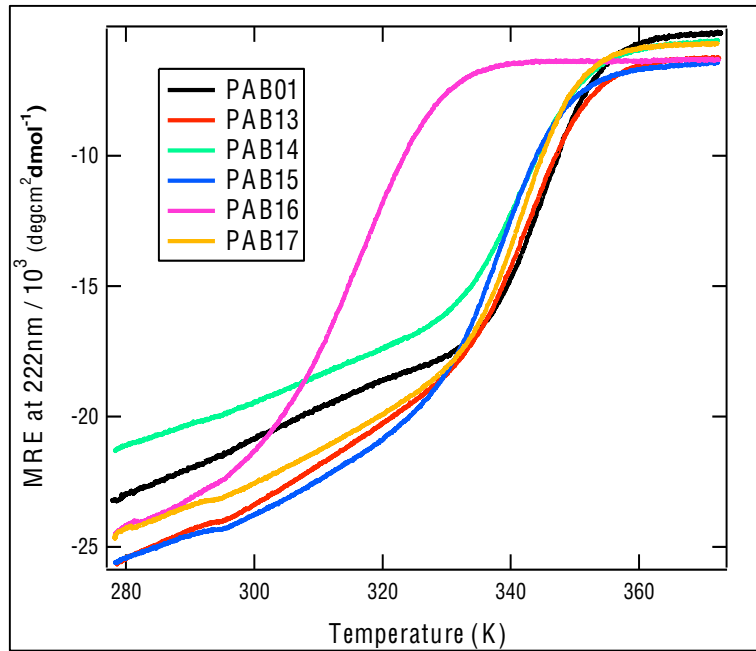


Fig. 28 2置換変異体の熱安定性評価 (変性の割合)

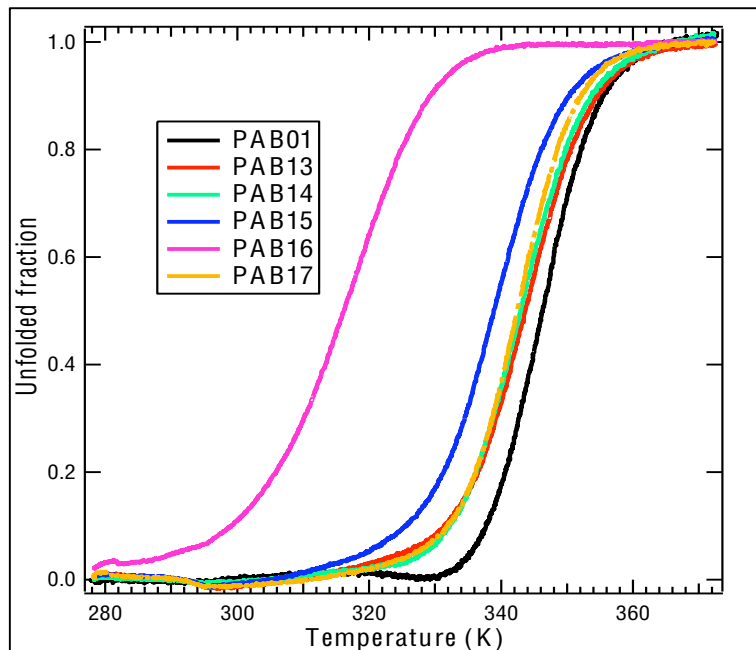




Fig. 29 PAB および PAZ 変異体の熱安定性評価 (測定値)

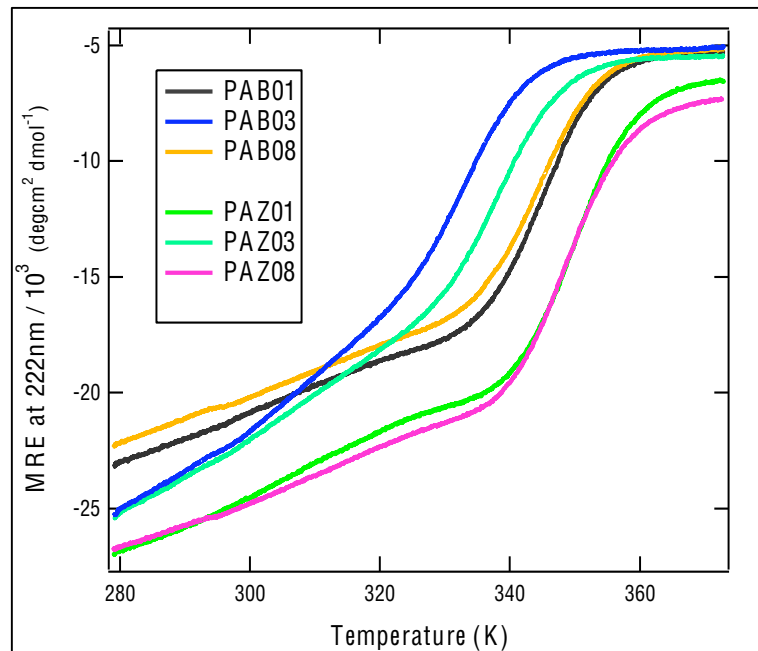


Fig. 30 PAB および PAZ 変異体の熱安定性評価 (変性の割合)

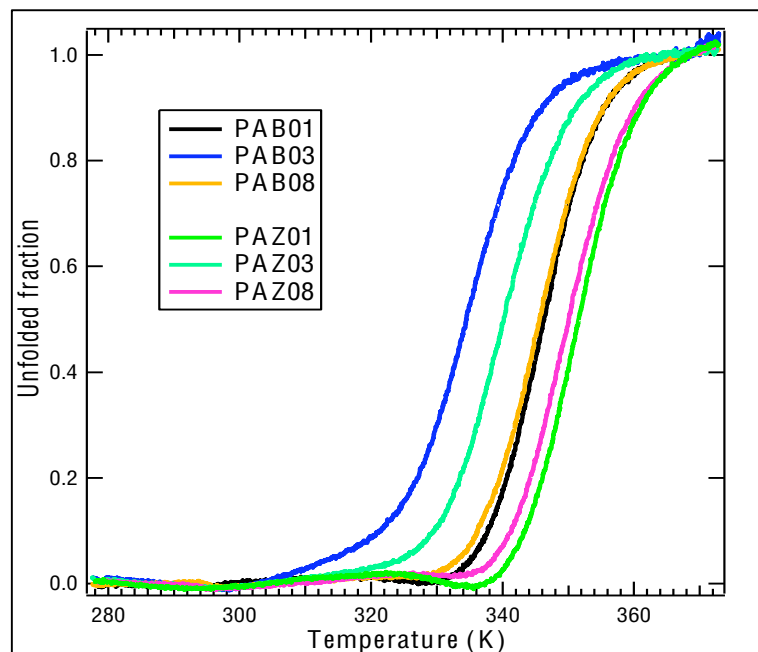


Table 23 PAB および PAZ 変異体の熱安定性評価

名前	変異	$T_m$ (K)	$T_m$ (Mutant)- $T_m$ (WT)
PAB01	WT	346.41	0.00
PAB03	N6H, E24H, E25Q, Q32H, D36H	334.53	-11.88
PAB04	N6H	346.04	-0.37
PAB05	E24H	342.68	-3.73
PAB07	Q32H	341.34	-5.07
PAB08	D36H	345.75	-0.66
PAB09	Q9H	344.91	-1.50
PAB10	Q10H	342.36	-4.05
PAB13	Q9H, D36H	343.68	-2.73
PAB14	Q10H, D36H	343.08	-3.33
PAB15	E15H, D36H	338.96	-7.45
PAB16	R27H, D36H	316.15	-30.26
PAB17	K35H, D36H	342.45	-3.96

名前	変異	$T_m$ (K)	$T_m$ (Mutant)- $T_m$ (WT)
PAZ01	PAB01 の Zdomain	351.77	0.00
PAZ03	PAB03 の Zdomain	340.35	-11.42
PAZ08	PAB08 の Zdomain	350.29	-1.48

Fig. 31 熱安定性の変化と露出表面積比の関係

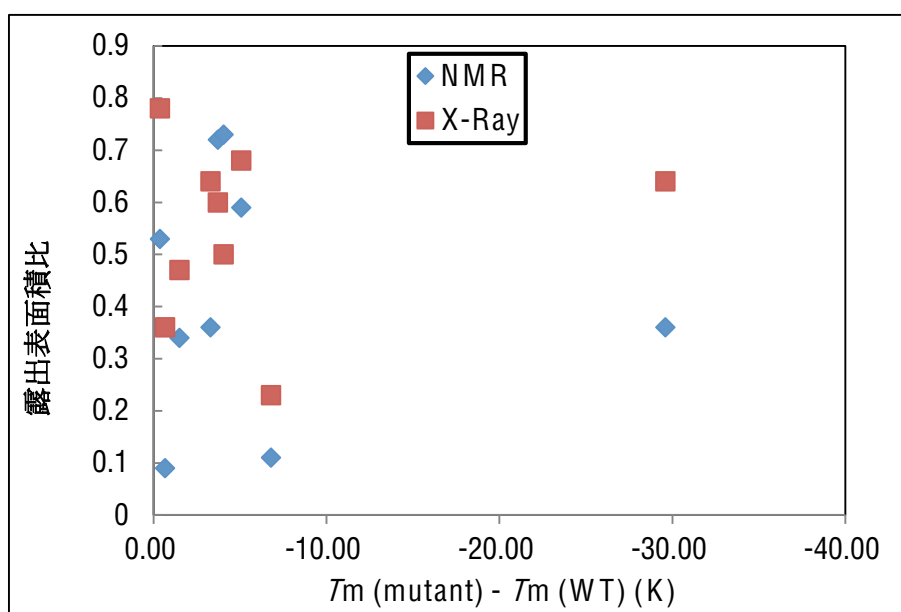


Table 24 熱安定性の変化と露出表面積比の関係

変異部位	$T_m$ (Mutant)- $T_m$ (WT)	NMR (露出表面積比)	X-ray (露出表面積比)
N6H	-0.37	0.48	0.94
E24H	-3.73	0.53	0.78
Q32H	-5.07	0.72	0.6
D36H	-0.66	0.59	0.68
Q9H	-1.50	0.09	0.36
Q10H	-4.05	0.34	0.47
E15H	-6.79	0.73	0.5
R27H	-29.60	0.11	0.23
K35H	-3.30	0.36	0.64

PAB 単独の構造安定性評価なので、NMR の構造情報からの露出表面積比に着目して考えることにする (Fig. 31, Table 24)。露出表面積比が高いと分子表面に露出しており、分子内の周辺のアミノ酸残基との相互作用が少なく、安定性に影響があまり与えないと考えて、変異対象部位を選択する際の条件設定するのは必ずしも良いと限らないことがわかる。例えば、Q9 は 9% と低いですが、それほど大きな安定性の減少を示さないが、E15 は 73%、Q32 は 72% と高いが 5°C 以上の安定性の減少を示すというように絶対的なものではないことがわかる。構造レベルで、それらの変異部位の周辺のアミノ酸との分子内相互作用の変化が影響することを考慮して選択できるかと言え、R27 ほど明確なものではない。しかしながら、R27 のように、構造データから分子内部に位置し、周辺と相互作用している部位を探す指標としての第一選択としては、露出表面積比を用いるのは簡便であって、明確にヒスチジン変異対象部位として好ましくないと判断できる場合の方が多いと考える。それによって、少なくとも数十°C 以上もの構造安定性の減少を避けることができるだろう。

次に、ヒスチジン変異導入に伴って、効果的な変異部位であった Q9H、Q10H、D36H は、上述したように酸性条件で解離を促進するのは、静電的反発力の増加が主な要因であることを示した。さらにここで、pH 変化に対してタンパク質間相互作用変化するような変異体を作製できたことを強調するために、酸性条件で構造安定性がどのように変化するかを以下に示す (Fig. 32, Table 25)。

酸性条件において、2 次構造はすべての変異体において大きく変わらないことは確認している。その中で構造安定性は中性条件に比べて減少している。このとき、PAB09 (Q9H) の安定性が大きく減少しているのは、NMR の露出表面積比が示すように、Q10H および D36H に比べて、分子内部に存在しているので、ヒスチジン残基が正電荷を帯びることによる影響が大きいことが考えられる。そして、この PAB 分子としての構造安定性が下がることで、酸性条件での Q9H によるタンパク質間相互作用の減少に影響が考えられる。しかしながら、2 次構造の大きな変化はなかったため、R27H の安定性の減少が相互作用に影響しなかったことと同様に大きな影響はないと考える。従って、効果的な変異部位として特定した Q9、Q10、D36 は、ヒスチジンの pH スイッチの効果によって相互作用変化を狙った目的にあった部位であることがわかる。

Fig. 32 PAB 変異体の中性および酸性条件での熱安定性評価 (変性の割合)

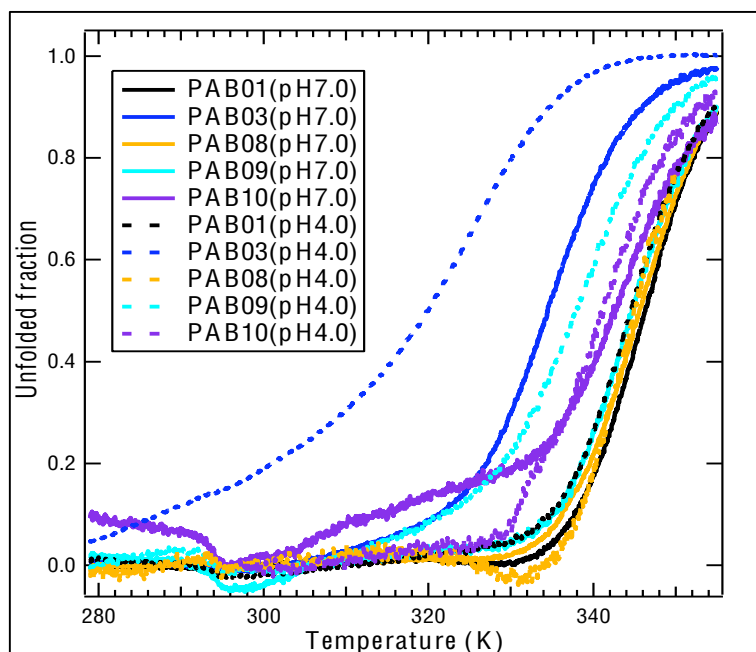


Table 25 PAB 変異体の中性および酸性条件での熱安定性評価

名前	変異部位	$T_m$ (K) pH7.0	$T_m$ (K) pH4.0	$T_m$ (K) pH4.0 – $T_m$ (K) pH7.0
PAB01	WT	346.41	344.7	-1.71
PAB03	N6H, E24H, E25Q, Q32H, D36H	334.53	325.42	-9.11
PAB08	D36H	345.75	345.34	-0.41
PAB09	Q9H	344.91	337.78	-7.13
PAB10	Q10H	342.36	341.35	-1.01

## 8 章 スクリーニングの収束配列の構造と機能評価

### 8-1 緒言

コンビナトリアル・スクリーニングを用いた研究では、得られた収束配列を構造・機能解析を進めて目的のタンパク質分子を作製する 경우가一般的である。しかしながら、本研究では、スクリーニングで得られた収束配列の多くが安定的なタンパク質発現・精製が難しく、機能解析を実施することが難しかった。そこで、収束配列のアミノ酸出現頻度解析を行うと、出現頻度において相互作用に重要な部位は野生型、目的の pH 感受性変換に効果的な部位はヒスチジンが相対的に高いことが先行研究から考察して 1 置換または 2 置換変異体を作製していくことで目的のタンパク質を作製できた。従って、スクリーニングで得られた分子集団は目的の分子特性を持つように選択されてきたことが示唆される。本章では、ここまで述べてきた相互作用や構造安定性の評価を用いて、最も多くの同一の収束配列由来のタンパク質 (PAB20) について考察し、本研究のスクリーニングについて考えることにする。

### 8-2 スクリーニングの収束配列の相互作用能評価

6 章での相互作用解析および先行研究の結果から、1 置換変異体の解析において、ヒスチジン変異導入は、基本的に中性条件で相互作用を維持することができること、効果的な部位では酸性条件で大きく相互作用を減少させることがわかった。そして、2 置換変異体の解析において、変異の組合せによって、中性条件で大きな相互作用の減少を伴うことがわかった。結果、PAB20 の配列では相互作用が大きく減少することが明確であり、野生型に比べて、 $10^4$ ~ $10^5$  倍の相互作用の減少する非常に弱い相互作用の PAB 変異体であることが考えられる。よって、スクリーニングの中性溶液による洗浄操作で除かれる可能性が高いことが考えられる。実際、His-tag 精製によって PAB20 を作製して、簡易的な実験で IgG Sepharose 6 Fast Flow microspin で結合するかを確認したところ、注

入した PAB20 は野生型と同程度の結合が見られたが、中性溶液中での洗浄操作を行うと、野生型は漏れないが、PAB20 は漏れることを確認した。つまり、非常に弱いながらも IgG に相互作用能を持つタンパク質であることがわかったので、セレクションの中で相互作用する分子として選択されてきている可能性がある。しかしながら、やはり非常に相互作用が弱いため、セレクションの洗浄操作で除かれる可能性が高いことを支持する結果となった。

それでも PAB20 の配列が多く最終ラウンドで得られたということは、セレクションの洗浄操作では除かれなかったことになる。これは、PAB20 のような分子でも T7 ファージ上に発現していることでその相互作用が増加し、IgG と結合しているのかもしれない。また、セレクションに用いた T7 ファージと相互作用させるビオチン化 IgG の濃度や洗浄操作が積極的に弱い相互作用分子を積極的に除くような溶液で選択しなかったことなどが原因と考える。つまり、強い相互作用するものを選択するような十分な選択圧を考えることが必要であることがわかる。そして、当然ながら酸性条件で IgG から解離しやすいのは、ヒスチジン残基を多く含み、効果的な変異部位 (Q9H、Q10H、D36H) を含む PAB20 ような配列であるから、多くの収束配列はヒスチジン変異導入が多いものになったと考えられる。

### 8-3 スクリーニングの収束配列の熱安定性評価

7章の熱安定性の評価からヒスチジン変異導入は基本的に安定性を減少するものである。PAB20 は 10 個のヒスチジン変異導入があるので、安定性の減少は大きいと考えられる。更には、PAB の構造を維持しているかどうかも含めて、以下に 7 章と同様に、2 次構造 (Fig. 33) と熱安定性 (Fig. 34, 35) の評価を行った。

Fig. 31 に示す CD の測定値から、PAB20 は  $\alpha$ -ヘリックス構造を取っていることがわかるとともに、野生型の PAB と同じような波形であることを確認した。従って、PAB20 は 3 つのヘリックスバンドル構造をしっかりと形成していることがわかる。そして、IgG と相互作用できる分子であることが支持される。

Fig. 32 及び 33 より、PAB20 の熱安定性は、7 章から予想されたように約 50 °C もの減少が見られ、相互作用を測定する 25 °C の条件ではその構造の半分以上が変性した状態であることが Fig. 32 から確認できた。そのため、相互作用が更に減少することが示唆される。ただし、本研究のスクリーニングのセレクションでは 4 °C に保存していた溶液を用いて実施していたので、構造は比較的未変性状態のものが多い環境で相互作用させている。そのため、セレクションの中では弱い相互作用を保っていたと考えられる。そして、PAB20 のような構造が非常に不安定化したものが収束してきたことから、セレクションでは構造不安定性に対する選択圧がほとんどかかっていないことがわかる。

さらに、構造の面から PAB20 が pH に対する影響が存在するのかを Fig. 36 に示す。50 mM 酢酸ナトリウム (pH=6) の溶液で 2 次構造を評価した。PAB20 は、明確に変性しており、二次構造を取っていないことがわかる。つまり、本研究のセレクションにおいて、中性条件で弱い相互作用し、pH=6 の溶液で溶出する際に瞬間的に相互作用が失われる分子である PAB20 のような非常に多くのヒスチジン残基を含む収束配列が獲得されたと考える。従って、本研究のスクリーニングでは pH 感受性の高いかつ酸性条件で IgG に相互作用しない分子を獲得することはできていると考える。



Fig. 33 PAB20 の 2 次構造評価

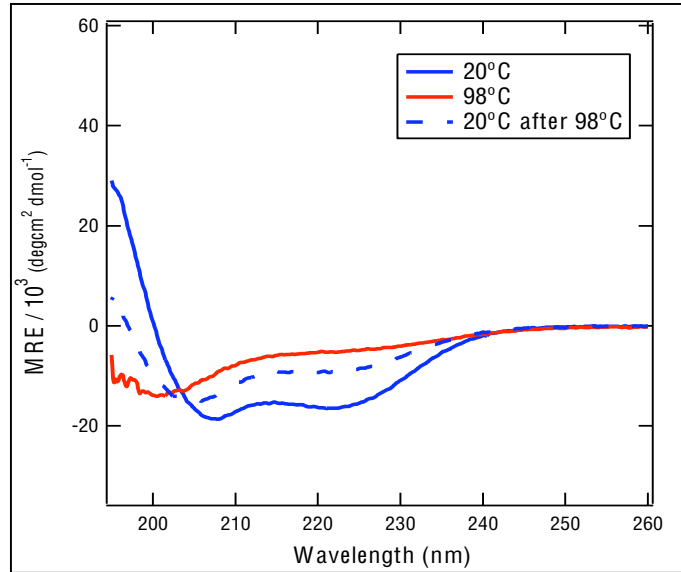


Fig. 34 PAB 変異体の熱安定性評価 (測定値)

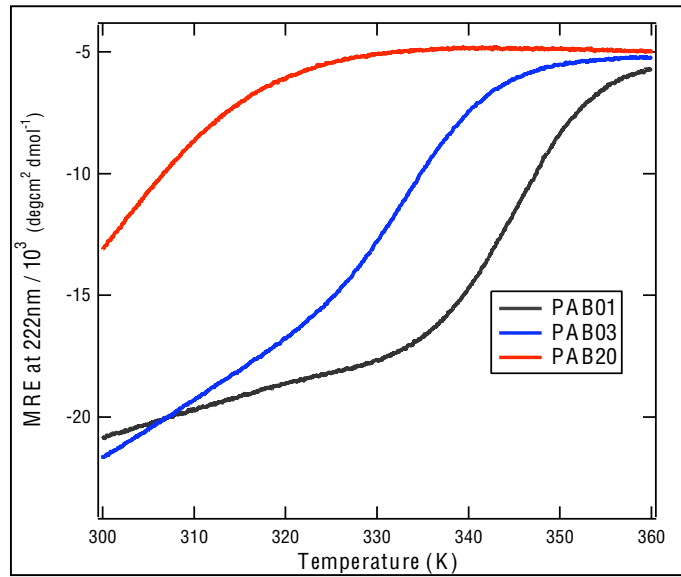


Table 26 PAB 変異体の熱安定性評価

名前	変異部位	$T_m$ (K)	$T_m$ (Mutant) - $T_m$ (WT)
PAB01	WT	346.41	0.00
PAB03	N6H, E24H, E25Q, Q32H, D36H	334.53	-11.88
PAB20	PAB <sub>T7Phage01</sub> の配列	296.43	-49.98

Fig. 35 PAB 変異体の熱安定性評価 (変性の割合)

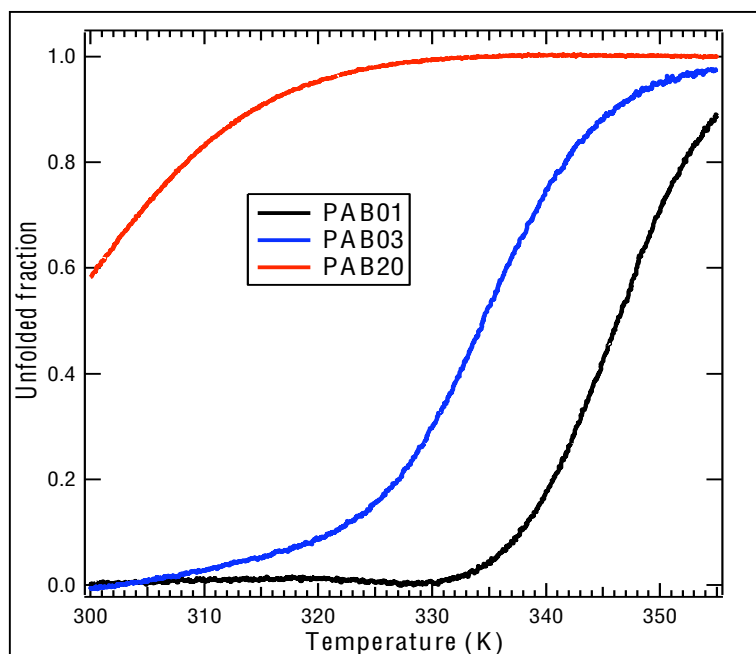
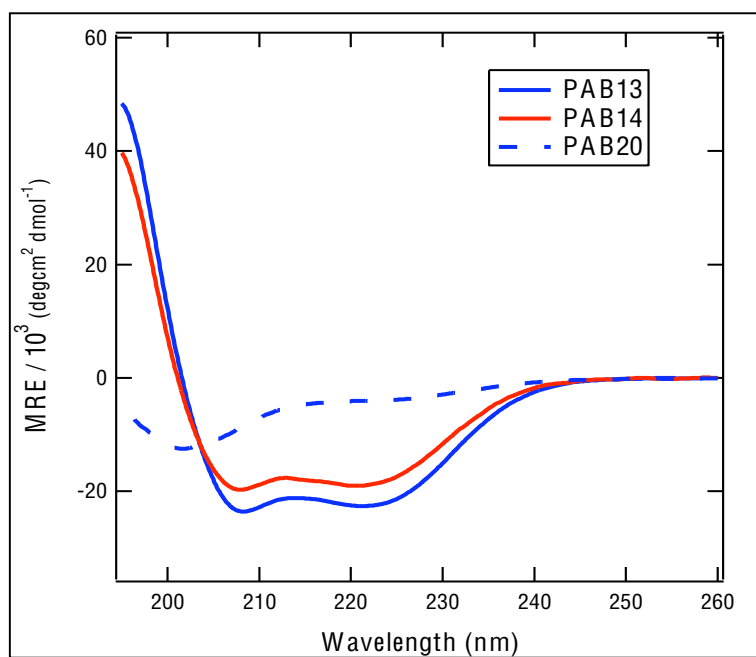


Fig. 36 PAB 変異体の pH = 6 での 2 次構造評価



#### 8-4 考察

本研究では、スクリーニングによって得られた収束配列は、目的の分子特性を有していないものだった。それは上述したように、中性条件で強い相互作用する分子の選択と構造安定性の高い分子の選択がセレクションを通してできていないことが原因である。そして、早い段階から溶出条件 (pH = 6) を厳しくしたことで、pH = 6 でとにかく相互作用しないもの選択された結果、ヒスチジン変異導入が予想以上に多く含まれた配列群になってしまったと考える。実際、近年にヒスチジン・スキニング・ライブラリを用いたコンビナトリアル・スクリーニングによって、pH 感受性の高いタンパク質設計に成功した研究報告がある [52]。その報告では、スクリーニングによって得られたものが目的の分子特性を示していた。彼らは、中性条件で強い相互作用のものを選択するために、セレクションに用いているターゲットタンパク質の濃度が最終的に数十 nM の溶液中で相互作用するもの獲得するように実施していた。本研究でも最終的には 100~200 nM のターゲット分子濃度で相互作用させていたものの強いものが得られなかったことを考えると、数十 nM 以下のオーダーで実施すれば、強い相互作用の分子を選択することが可能であると考え。次に、彼らの溶出条件の選択では、pH 値を 4~5.5 まで 4 ラウンドで少しずつ選択圧をあげる形であり、本研究のようにシビアな選択圧がかかっていないと考える。実際、第 6 章の相互作用解析結果からも酸性条件 (pH = 5.0) で効果的な変異であれば、顕著な相互作用の減少が確認されているので、ヒスチジン変異を用いた本研究の場合は最大でも pH = 5 前後で選択することで十分であることがわかる。結果としては、コンビナトリアル・スクリーニングを用いた研究では、あるセレクション条件設定で複数ラウンドのスクリーニングを行って得られた配列の機能解析を行ってどのような選択圧がかかって得られたものかを考える。そして、改めてセレクション条件設定を精査して新たに複数ラウンドのスクリーニングを実施するような方法が適切なものかもしれないと考える。

また、ヒスチジン・スキヤニングを用いた最近の研究 [54] で、構造情報から 10 箇所の部位を決定してヒスチジンの 1 置換変異体を 10 種類作製して機能解析を重ねて合理的に質設計する方法とランダム変異ライブラリのコンビナトリアル・スクリーニングから設計する方法で pH 感受性の高いタンパク質を獲得する実験を行って比較しているものが報告された。その結果を見るとどちらの場合も pH 感受性の高いものが得られていたが、中性条件の相互作用が強かったヒスチジン置換による合理的に設計された分子の方が良いものであると考えられる。

以上より、ヒスチジン・スキヤニング・ライブラリのコンビナトリアル・スクリーニングによるタンパク質間相互作用の pH 感受性変換は、セレクションの選択圧を適切にできれば、目的の分子特性を有する収束配列の獲得が可能であること、加えてヒスチジン変異導入が中性付近での pH 感受性変換において効果的な変異であるので、本手法は有効であると考えられる。

## 9 章 結論

pH 依存的な相互作用能力を持つタンパク質設計の取り組みはこれまで様々にある [31, 37, 45-53]。例えば、薬剤の半減期の延長の分野 [47, 48]、本研究と同様のタンパク質精製の分野 [31, 37, 50, 51, 53]、そして診断や検出の分野への応用を目指して高い pH 感受性相互作用を有する抗体作製 [52] など、有効なものが作製されている。それらは、合理的設計だけまたはコンビナトリアル・スクリーニングだけによる改変タンパク質設計であった。そして、多くは構造情報をもとにした合理的設計による報告が多いのが現状で、本研究遂行当初はコンビナトリアル・スクリーニングによるものはまだ報告されていなかった。加えて、それぞれの方法には、1 章の緒言で述べたように利点または欠点が存在し、今日では互いの利点・欠点を補完するように、合理的設計かつコンビナトリアル・スクリーニングによって新規タンパク質設計に取り組むようになってきている。

そこで、本研究では、合理的設計かつコンビナトリアルなスクリーニングによって、プロテイン A と抗体のタンパク質間相互作用の pH 感受性変換をモデルケースとして実施し、pH 依存的なタンパク質間相互作用の技術のエンジニアリングを発展させていくために有効な方法のひとつとなることを示すことができると考えて実施した。

第 2 章と 3 章では、タンパク質相互作用の pH 感受性変換に向けて、遺伝子ライブラリ設計方法と目的の PAB 変異体を獲得するためのスクリーニングについて示し、pH 感受性変換に効果的な変異部位を特定したことについて述べた。遺伝子ライブラリ設計では、ヒスチジン残基の pH スイッチの性質 (アルカリおよび中性条件では電荷をもたず、低い pH で電荷をもつ) を利用し、ヒスチジン変異導入に絞ることで、合理的設計だけでは変異導入を試みないような広範囲を変異対象部位 (17 個) としたものが作製できた。そして、T7 フェージ・ディスプレイ法によるスクリーニングによって、多様性が担保された配列群を有する初期ライブラリからセレクションを通して配列の収束を確認した。そして、その収束配列のアミノ酸出現頻度解析を実施すると、先行研究の情報か

ら、野生型アミノ酸出現頻度がヒスチジン出現頻度よりも高い部位は相互作用に重要な部位であることが示唆された。結果、ヒスチジン出現頻度が高い部位 (70%以上) はセレクションを通して、pH 感受性変換に効果的な部位として選択されたのではないかと考え、17 個の変異部位から 5 個に絞ることができた。更に、それら 5 個の野生型アミノ酸の性質を考慮して、Q9、Q10、D36 の 3 つに決定した。

第 4 章では、様々な 1 置換または 2 置換変異体と最も多く収束していた配列の作製方法について述べた。

第 5 章では、本研究の目的の 1 つでもあるアフィニティ・カラムの作製とその評価を実施し、コンビナトリアル・スクリーニングで得られた結果 (アミノ酸出現頻度) と既存の情報をもとに、合理的に考えて特定した 3 つの変異 (Q9、Q10、D36) を組合せることで、これまでのアフィニティ・リガンドよりも穏和な条件で抗体溶出を可能とする PAB 変異体 (PAB13、PAB14) を効率よく作製できたことを示した。なぜなら、別に作製した PAB または PAZ 変異体を含めたすべての中で、PAB14 が高い pH での抗体の溶出ピークを示したからである。また、合理的設計では、Q9H や Q10H は pH 感受性変換に効果が小さいと考えられたものをコンビナトリアル・スクリーニングから得た情報をもとに組合せたことによって、効果的な変異 (Q9H, Q10H) であることを特定できたことは本研究が期待していたものであった。

第 6 章では、表面プラズモン共鳴測定を用いて、ヒスチジン変異効果や適切な変異導入部位について、速度論的または熱力学的解析による評価を行った。1 置換変異体解析において、ヒスチジン変異は、中性条件下で相互作用を維持する可能性が高いことがわかった。そして、酸性条件下では、顕著に相互作用を減少させるヒスチジン変異部位は、構造から静電的反発力の増加が判断できることがわかった。そのことから構造情報がわかっていれば、合理的にヒスチジン変異導入部位の条件を設定できる可能性が高いことが示唆される。その一方で、2 置換変異体解析において、僅か 2 つの変異の組合せでも、

その相互作用の影響が各変異効果の加算的な場合とそうでない場合が存在した。変異の組合せ効果を期待した変異体作製には、やはりコンビナトリアル・スクリーニングから得られる情報が有効であることが示唆される。よって、本研究の取り組みが効率的かつ効果的な変異体作製方法であることを支持できると考える。

その中でも特に、PAB と IgG の主要な相互作用である Fc との相互作用に比べて 1000 倍以上も弱い Fab との相互作用界面に効果的な変異部位 (D36H) が存在することがわかった。コンビナトリアル・スクリーニングが可能なライブラリ・サイズまで変異対象部位を広げた結果、偶然にもスクリーニング後にヒスチジン出現頻度が高く、pH 感受性変換の効果が高いことが分かった。これはコンビナトリアルなスクリーニングによって改めて確認することができた部位であるだろう。加えて、変異対象部位を広げることができたのは、変異導入方法をヒスチジン残基に絞ってライブラリ設計をした合理的設計の利点でもあったことから、それぞれの利点と欠点を補完する形で特定した変異部位である。

第 7 章では、タンパク質の熱安定性へのヒスチジン変異の影響について評価を行った。PAB では、基本的に熱安定性を減少させることがわかった。そして、ヒスチジン変異による熱安定性への影響は加算的である可能性が高いことが示唆された。その中で、露出表面積比が小さい、分子内部に存在するアミノ酸 (R27) にヒスチジン変異導入すると予想した通りに熱安定性が大きく減少したが、露出表面積比と熱安定性の減少に絶対的な関係はないことがわかった。それでも、露出表面積比を用いるのは簡便であって、構造情報から明確にヒスチジン変異対象部位として好ましくないと判断できる場合の方が多いため、ライブラリ設計の際に考慮することを推奨する。また、pH 感受性変換に効果的なヒスチジン変異 (Q9H, Q10H, D36H) は、中性溶液に比べて、酸性溶液中で熱安定が減少するものの相互作用への影響が小さいことが示唆され、ヒスチジンの pH スイッチ効果が相互作用変化の主な要因であることを確認した。

第8章では、第6および7章の解析を含めて、スクリーニングの収束配列の構造と機能の評価を行った。本研究のスクリーニングを通して、最終ラウンドの配列解析で最も多かった配列 (PAB20) は、10個のヒスチジン変異導入されたものだった。6章と簡易的な実験から、中性条件で非常に弱い相互作用能をもった分子であることがわかり、本研究のセレクションでは中性条件での相互作用能力に対する選択圧がほとんどなかったことが示唆された。そして、酸性条件ではヒスチジン変異導入が多いほど解離が進むことが示唆されるので、多くのヒスチジンが導入された PAB 変異体群が収束したのではないかと考える。さらに、熱安定性評価から、PAB20 は非常に構造が不安定化しているが、PAB 構造が壊れていないので、少なくとも相互作用する分子であると考え。その結果から構造安定性に対する選択圧もほとんどなかったことが示唆される。また、 $\text{pH} = 6$  の溶液中で PAB20 は、PAB 構造を取らないことが明らかになり、瞬間的に相互作用しなくなる分子になることが示唆され、スクリーニングで選択される可能性が非常に高くなることがわかった。以上より、本研究のスクリーニングは、セレクションの溶出条件 ( $\text{pH} = 6$ ) で限りなく相互作用しない PAB 変異体群を選択することができているので、より目的の分子特性を示すものをスクリーニングで獲得するには、中性条件での選択圧(洗浄操作や洗浄溶液条件)と構造安定性の選択圧 (熱処理など) を調整することが重要であることがわかった。また、 $\text{pH}$  感受性変換に効果的な変異であれば優先的に解離する可能性が高い分子になることがわかったので、溶出条件の  $\text{pH}$  値を高くすることなく、 $\text{pH} = 5$  程度で実施することで十分な選択圧になると考える。そして、近年の研究報告を含めて [51, 52]、本研究手法はセレクションを適切に実施できれば、目的のタンパク質設計ができるだろう。

以上より、本研究のように合理的設計とコンビナトリアル・スクリーニングを組み合わせることで利点と欠点を補完することを目指した取り組みはタンパク質工学において有効な方法である。その中で、アフィニティ・カラムの性能は、これまでより穏和な条件



で抗体精製できるもの作製ができた。ライブラリ設計では、スクリーニング方法のライブラリ・サイズに合わせて、変異部位と変異方法を選定することは重要である。その際には、合理的設計から明らかに相互作用に重要な部位は優先順位を下げて、広範囲に変異部位を選択することを推奨する。それによって、本研究のように D36H のような予期せぬ部位を特定することができるかもしれない。そして、得られた分子集団の配列情報は先行研究などを含めて考えると、野生型出現頻度が高い部位は相互作用に重要な部位であり、ヒスチジン出現頻度が高い部位は pH 感受性変換に効果的な部位であった。本研究で言えば、17 個の変異部位の 1 置換から複数置換変異体までの網羅的な相互作用解析をすることなく、3 つの部位 (9、10、36) の 1 置換および複数置換変異体が目的の pH 感受性変換に効果があることを明らかにすることができた。それゆえ、合理的設計かつヒスチジン・スキャンニングを用いた pH 感受性変換は、pH 依存的なタンパク質間相互作用の技術のエンジニアリングを発展させることを期待できる。

## 参考文献

1. International Human Genome Sequencing Consortium (2004) *Nature*, 431, 7011, 931-945.
2. Genome Online Database ([www.genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi](http://www.genomesonline.org/cgi-bin/GOLD/index.cgi))
3. Smith, B. and Hecht, M. (2011) *Current Opinion in Chemical Biology*, 15, 421-426.
4. Urvoas, A., Valerio-Lepiniec, M. and Minard, P. (2012) *Trends in Biotechnology*, 30, 10, 512-520.
5. Siegel, J., Zanghellini, A., Lovick, H., Kiss, G., Lambert, A., St.Clair, J., Gallaher, L., Hilvert, D., Gelb, M., Stoddard, B., Houk, K., Michael, F. and Baker, D. (2010) *Science*, 329, 309-313.
6. Bloom, J. and Arnold, F. (2009) *PNAS*, 106, 9995–10000.
7. Eigen, M. (1971) *Naturwissenschaften*, 58, 10, 465-523.
8. Lutz, S. (2010) *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 734–743.
9. Whitehead, T., Chevalier, A., Song, Y., Dreyfus, C., Fleishman, S., Mattos, C., Myers, C., Kamisetty, H., Blair, B., Wilson, I. and Baker, D. (2012) *nature biotechnology*, 30, 6, 543-548.
10. Langone, J. (1982) *Adv. Immunol.* 32, 157-252.
11. Uhlen, M., Guss, B., Nilsson, B., Gatenbeck, S., Philipson, L. and Lindberg, M. (1984) *J. Biol. Chem.*, 259, 1695-1702.
12. Nilsson, B., Moks, T., Jansson, B., Abrahmsen, L., Elmlblad, A., Holmgren, E., Henrichson, C., Jones, T. and Uhlen, M. (1987) *Protein Engineering*, 2, 107-113.
13. Amersham Pharmacia Biotech, Handbook, Antibody Purification, 2000.
14. Jendeborg, L., Nilsson, P., Larsson, A., Denker, P., Uhlen, M., Nilsson, B. and Nygren, P. (1997) *J. Immunol. Methods*, 201, 25.
15. Jansson, B., Uhlen, M. and Nygren, P. (1998) *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 20, 69-78.
16. Deisenhofer, J. (1981) *Biochemistry*, 20, 2361-2396.
17. M. Graille, E.A. Stura, A.L. Corper, B.J. Sutton, M.J. Taussig, J. B. Charbonnier, G.J. Silverman, (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97, 5399.
18. Gouda, H., Torigoe, H., Saito, M., Arata, Y. and Shimada, I. (1992) *Biochemistry*, 31, 9665-9672.
19. Starovasnik, M., O'connell, M., Fairbrother, W. and Kelley, R. (1998) *Protein Science*, 8, 1423-1431.
20. Lofblom, J., Feldwisch, J., Tolmachev, V., Carlsson, J., Stahl, S. and Frejd, F. (2010) *FEBS Letters*, 584, 2670–2680
21. Unverdorben, F., Faber-Schwarz, A., Richter, F., Hutt, R. and Kontermann, R. (2012) *PEDS*, 25, 2, 81-88.
22. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. and Chiswell, D. J. (1990) *Nature*, 348, 552–554

23. Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D. and Winter, G. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 16007–16010.
24. Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E. and Hoogenboom, H. R. (1994) *Annu. Rev. Immunol.*, 12, 433–455.
25. Marks, C. and Marks, J. D. (1996) *N. Eng. J. Med.*, 335, 730–733.
26. Elvin, J., Couston, R. and van der Walle, C. (2011) *International Journal of Pharmaceutics*, 440, 1, 83-98.
27. Besenmatter W, Kast P, Hilvert D. (2004) *Methods Enzymol.*, 388, 91–102.
28. Hecht, M., Das, A., Go, A., Bradley, L. and Wei, Y. (2004) *Protein science*, 13, 1711-1723.
29. Stemmer WP. (1994) *Nature*, 370, 389–91
30. Gore, M., Ferris, W., Popplewell, A., Scawen, M. and Atkinson, T. (1992) *Protein Engineering*, 5, 577-582.
31. Brown, N., Bottomley, S., Scawen, M. and Gore, M. (1998) *Molecular Biotechnology*, 10, 9-16.
32. Cedergren, L., Andersson, R., Jansson, B., Uhlén, M. and Nilsson, B. (1993) *Protein Engineering*, 6, 441-448.
33. Tashiro, M. and Montelione, G. (1995) *Current Opinion in Structural Biology*, 5, 47 1-481.
34. Jendeberg, L., Persson, B., Andersson, R., Karlsson, R., Uhlen, M. and Nilsson, B. (1995) *Journal of Molecular Recognition*, 9, 270-278.
35. Salvalaglio, M., Zamolo, L., Busini, V., Moscatelli, D., Cavallotti, C. (2009) *J. Chromatogr., A*, 1216, 8678–8686.
36. Huang, B., Liu, F., Dong, X. and Sun, Y. (2011) *J. Phys. Chem. B*,
37. Watanabe, H., Matsumaru, H., Ooishi, A., Feng, Y., Odahara, T., Suto, K. and Honda, S. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 12373-12383.
38. Grönwall, C. and Ståhl, S. (2009) *Journal of Biotechnology*, 140, 254–269.
39. Brown, N., Bottomley, S., Scawen, M. and Gore, M. (1998) *Biochemical Society Transactions*, 26, S249.
40. Li, R., Dowd, V., Stewart, D., Burton, S. and Lowe, C. (1998) *Nature Biotechnology*, 16, 190-195.
41. Gülich, S., Uhlén, M. and Hober, S. (2000) *Journal of Biotechnology*, 76, 233–244
42. Linhult, M., Gülich, S., Gräslund, T., Simon, A., Karlsson, M., Sjöberg, A., Nord, K. and Hober, S. (2004) *PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics*, 55, 407–416.
43. Ghose, S., (2006) *J. chromatogr. A*, 1122, 144
44. Hillson, J, Karr, N., Oppliger, I., Mannik, M. and Sasso, E. (1993) *J. Exp. Med.*, 178, 331-336.

45. Tawfik, D., Chap, R., Eshhar, Z. and Green, B. (1994) *Protein engineering*, 7, 431-434.
46. Nordlund, H. R., Hytonen, V. P., Laitinen, O. H., Uotila, S. T., Niskanen, E. A., Savolainen, J., Porkka, E., and Kulomaa, M. S. (2003) *FEBS Lett.* 555, 449 – 454
47. Sarkar, C., Lowenhaupt, K., Horan, T., Boone, T., Tidor, B. and Lauffenburger, D. (2002) *Nat. Biotechnol.*, 20, 908-913.
48. Igawa, T., Ishii, S., Tachibana, T., Maeda, A., Higuchi, Y., Shimaoka, S., Moriyama, C., Watanabe, T., Takubo, R., Doi, Y., Wakabayashi, T., Hayasaka, A., Kadono, S., Miyazaki, T., Haraya, K., Sekimori, Y., Kojima, T., Nabuchi, Y., Aso, Y., Kawabe, Y. and Hattori, K. (2010) *Nat. Biotechnol.*, 28, 1203-1207.
49. Linder, M., Nevanen, T., and Teeri, T. T. (1999) *FEBS Lett.* 447, 13–16
50. Sagermann, M., Chapleau, R., DeLorimier, E. and Lei, M. (2009) *PROTEIN SCIENCE*, 18, 217—228
51. Gera, N., Hill, A., White, D., Carbonell, R. and Rao, B. (2012) *PLOS ONE*, 7, 11.
52. Murtaugh, M., Fanning, S., Sharma, T., Terry, A. and Horn, J. (2011) *PROTEIN SCIENCE*, 20, 1619-1631.
53. Watanabe, H., Matsumaru, H., Ooishi, A. and Honda, S. (2013) *J. Chromatogr. B*, 929:155-160.

Masayuki Tsukamoto, Hideki Watanabe, Ayako Ooishi and Shinya Honda (2014) *Journal of Biological Engineering*, 8, 15.

## 謝辞

本論文は、東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻の客員教授で、産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門副研究部門長兼分子細胞育種研究グループ長 本田真也先生には指導教官として、本研究を実施する機会を与えて頂いたこと、また多くの時間を割いて懇切丁寧なご指導および御鞭撻を頂いたことに、心より深く感謝申し上げます。

また、メディカルゲノム専攻教授 津本浩平先生、同専攻教授 伊藤耕一先生、同専攻准教授 富田野乃先生、東京理科大学教授 和田猛先生には、副査として、本論文を執筆するにあたり、有益な御意見または御助言を頂きましたことを、ここに心より深く感謝申し上げます。

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門合成生物工学研究グループ研究グループ長兼東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻客員教授 宮崎健太郎先生、産業技術総合研究所生命情報工学研究センター細胞機能設計チーム長兼東京大学大学院新領域創成科学研究科情報生命科学専攻客員准教授 富井健太郎先生には、有益な御意見または御助言を頂きましたことを、ここに心より深く感謝申し上げます。

産業技術総合研究所分子細胞育種研究グループ主任研究員 渡邊秀樹氏には、本研究を遂行するうえで、蛋白質工学、遺伝子工学、進化分子工学などの実験手法について熱心に御指導を頂いたこと、有益な御討論、御助言を頂いたこと、そして博士学生として

の意識付けや研究環境構築にお心配りを頂いたことを、ここに心より深く感謝申し上げます。

蛋白質の熱力学的安定性評価における実験手技から解析まで御指導または御助言を頂きました同研究グループテクニカルスタッフ 大石郁子氏に深く感謝申し上げます。

本研究を含めた研究生活において、数々の便宜を図り、親切にご助言下さった同研究グループの皆様に、深く感謝申し上げます

最後に、これまで私の進むべき道をいつも温かく見守り、そして大きな愛情で支えてくださった両親に、優しくも厳しく見守ってくれた姉に、心より深く感謝申し上げます。