

# 論文の内容の要旨

## 論文題目 コンビナトリアル・ヒスチジン・スキヤニングによるタンパク質間相互作用の pH 感受性変換

氏名 塚本 雅之

### はじめに

現在、抗体製品はバイオテクノロジーにおいて最も重要なアプリケーションの一つであり、バイオ医薬品産業において市場の拡大が著しい医薬品の一つである。その製造工程では、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可能性があることである。この抗体の変性・凝集は安全面、免疫原性、不都合な副反応の原因となる。

抗体精製において最も用いられるアフィニティ・リガンドは、黄色ブドウ球菌のプロテイン A(SpA)である。SpA は細胞壁に存在する膜タンパク質で、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 Fab 領域に対する弱い相互作用を示す。先行研究において、Brown らは複合体の構造データを用いて、効果的なヒスチジン変異導入部位を選択し、穏和な条件で抗体を溶出できる SpA 変異体の作製に成功した。しかしながら、構造や熱力学的な解析結果に基づく合理的設計が常に成功するわけではない。今日では、コンビナトリアルなライブラリーによるアプローチが発展してきている。コンビナトリアルなアプローチはロバストであり、原則的に細かな事前分析を必要としない。そのため、変異体ライブラリーの *in vitro* スクリーニングは、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、タンパク質工学を発展させてきた。その結果として、現在は合理的な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、様々なタンパク質の改変体の作製がなされてきている。

### 目的

本研究は構造情報とコンビナトリアル・スクリーニングの統計解析を用いて、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ーは、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。ライブラリーのセレクションによって 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、SPR 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 条件下で溶出できるアフィニティ・リガンドを開発する。

## 結果と考察

野生型/ヒスチジン残基からなるヒスチジンスキャニングライブラリーを作製するために、PAB と免疫グロブリン(IgG)の Fc との複合体 X 線結晶構造解析データを用いて PAB の相互作用界面上のヒスチジン変異導入部位を決定した。最終的に、T7ファージ・ライブラリーで選択可能なサイズを考慮して、17 個のヒスチジン変異導入部位を決定した。ヒスチジンスキャニングライブラリーを構築したのち、T7 ファージ・ディスプレイ法スクリーニングによって、pH 感受性が変化した PAB 変異体を単離した。

スクリーニングのラウンドを重ねるにつれて、PAB と IgG の相互作用への寄与が高い野生型アミノ酸は保存され、pH 感受性上昇に寄与する部位はヒスチジン変換が起こると考えた。そこで、最終ラウンドで得られた 18 個の収束配列を用いて、各変異部位におけるアミノ酸出現頻度を計算した (Fig.1)。それらのアミノ酸出現頻度と先行研究との比較から、PAB と IgG の相互作用で重要な部位は野生型の出現頻度が高く、相対的に保存されたと考えられる。そこでヒスチジン出現頻度が 70%以上の顕著に高い部位(9, 10, 27, 35, 36)は、本研究の目的の pH 感受性変換ができると考えた。加えて、D36H は、これまでの変異体研究やシミュレーション研究において、ほとんど調べられていない。そこで、D36H による一置換変異体を作製し、他の 4 つの部位と D36H の組み合わせによる二置換変異体を作製し、アフィニティ・クロマトグラフィの溶出実験を実施した。

pH グラジ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.2)。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において、更に高い pH 値での溶出ピークを確認した。それらは最大で、約 3.3 の大きな pH 値の上昇を示した。

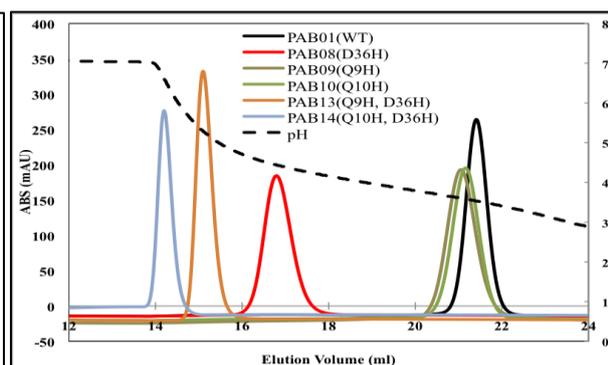
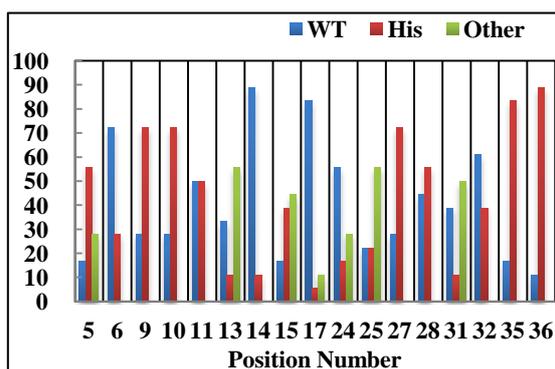


Fig.1 各変異部位のアミノ酸出現頻度

Fig.2 アフィニティ・カラム溶出実験

どのような部位のヒスチジン置換が高い効果を得ることができるのだろうか。SPR 法測定と構造情報から考察した。PAB と Fc の複合体 X 線結晶構造解析データを用いて確認したところ、9 位と 10 位については、以下のように説明できる。中性条件下での結合力において野生型と比較すると、Q9H はほとんど変わらないが、Q10H では 10 倍の減少が見られた。Q10H の相互作用減少は、Q10 が相互作用の寄与が高い部位であり、ヒスチジン置換によって立体障害を起因とする相

相互作用様式の変化が起こることが原因と考えられる。一方、酸性条件での結合力減少を促進するため、ヒスチジン出現頻度が高くなったと考える。実際に、Q9H の変異体は 4.0 倍の減少であるのに対して、Q10H は 126 倍の減少であった。Q10 は、5Å 内に正電荷のアミノ酸が Fc 上に存在していることから、プロトン化したヒスチジンとの静電的反発力の増加によって結合力が大きく減少したと考えられる。次に 36 位について考察する。D36 の近傍に存在する Fc 上のアミノ酸は Ile253 と His310 で、それぞれ 6.89Å、9.78Å 離れた位置に存在している。この距離は決して短くない。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。SpA の D ドメインと 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。

D36H 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。中性条件での結合力において野生型と比べて、IgG とは 6.6 倍の減少、Fc とはほとんど変わらない、Fab とはわずかな減少がみられた。Fab との複合体構造から D36 は、4Å 内に 6 つのアミノ酸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と推察される。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。D36 近傍には、3Å 内に正電荷のアミノ酸が Fab 上に存在している。このことからプロトン化したヒスチジンとの静電的反発力の誘起が IgG との相互作用減少の主原因と思われる。以上、アフィニティ・クロマトグラフィ実験で確認された D36H の効果は、Fc よりも、むしろ Fab との相互作用変化が大きく影響していると考えられることで合理的に説明できる。

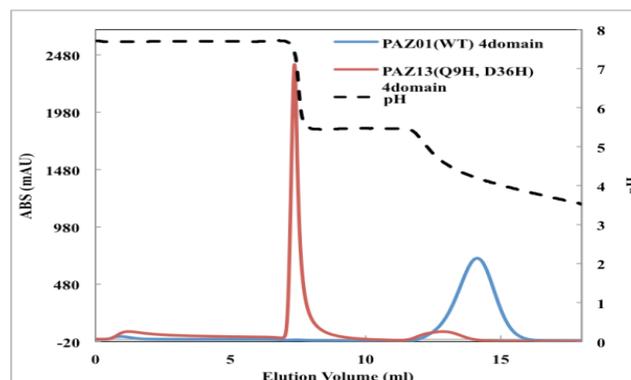


Fig.3 PAZ タンデム型のアフィニティ・カラムの溶出実験

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 D36H/Q9H 二置換変異を Protein A Z ドメイン (PAZ) に導入した。さらに、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) 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。結合した IgG が、4×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.3)。溶出溶液 (50 mM 酢酸ナトリウム溶液) の pH 値に対する注入した IgG の溶出割合が、4×PAZ13(D36H/Q9H) のカラムでは以下ようになった、pH=6 で 72%、pH=5.5 で 89%、pH=5.0 で 98%。一方で、野生型配列の 4×PAZ01 からでは、すべての pH 値において IgG の溶出を確認することはできなかった。

本研究では、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それぞれの欠点を補うことに成功した。スクリーニングで得られた収束配列には多くのヒスチジン置換が導入

されていたが、結果的に有意な効果を示さないヒスチジン置換も含まれたため、この収束配列が最適な配列であるのか（さらには、この配列に複数置換の相乗効果が反映されているのか）を直ちに判断することは難しかった。しかしながら、構造情報やアミノ酸出現頻度解析および SPR 測定結果を通して効果的な変異部位を選別し、最終的に新規なアフィニティ・リガンドを合理的設計することができた。その中で、PAB の主要な結合部位である Fc との相互作用に比べて 1000 倍以上も弱い Fab 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。この弱い相互作用を合理設計で考慮する可能性は低く、仮に実験的に検証するとしてもその優先順位は低いと思われる。しかしながら、 $10^8$  種の分子を評価できるコンビナトリアル・スクリーニングの特徴を活かし、変異対象部位を広げた結果、偶然にも合理設計では発見しにくい効果的な変異部位を特定することに成功した。これはスクリーニングの採用によって始めて実現できたことだろう。

#### <まとめ>

本研究では、合理的設計とコンビナトリアル・スクリーニングを組合せることで上述の利点と欠点を補完することを目指した。その結果、作製したアフィニティ・カラムは、従来報告されたいずれのものより穏和な条件で抗体精製を実施することができる。ライブラリー設計では、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アプリケーションのエンジニアリングを発展させることを期待できる。