

論文内容の要旨

論文題目

細菌由来ヒト血清アルブミン結合ドメインを模倣した人工ヒト型タンパク質の設計

氏名 大城 理志

序論

近年、モノクローナル抗体に代わる抗体医薬として、抗体の抗原結合部位を含む抗体フラグメントや非免疫グロブリンスキュフォールドタンパク質を利用した次世代抗体医薬の開発が進められている。しかし、これらのタンパク質は IgG と比較して血中滞留時間が短く、医薬としての治療効果や用途を限られていることが課題となっている。

タンパク質医薬の血中滞留時間を延長する方法として、*Streptococcal Protein G* のアルブミン結合ドメイン (ABD) を遺伝子工学的に融合させる方法が報告されている。ABD を介してタンパク質医薬を血中滞留時間の長い血清アルブミンに結合させるものであり、抗体フラグメントや他のタンパク質医薬においてその効果が実証されている。しかし、ABD はマウスの体内で抗原性をもつことが報告されており、臨床応用の際に予期せぬ免疫反応を惹起することが懸念される。

本研究では、ABD を代替する分子として、ヒトタンパク質を足場として改変を行い、血清アルブミンに結合する人工ヒト型タンパク質を得ることを目指した。ヒトタンパク質を改変する方法として、分子グラフティングとよばれるタンパク質工学的手法を用いた。

分子グラフティングは類似した部分構造をもつタンパク質間で機能部位を移植する方法であり、現在までに金属結合部位、HIV-I の CD4 結合部位、p53 の MDM2 結合部位を他のタンパク質に移植することに成功している。この分子グラフティングの手法を用いることで、細菌由来のアルブミン結合ドメインの結合様式を模倣した人工ヒト型タンパク質を取得することを本研究の目的とした(図 1)。

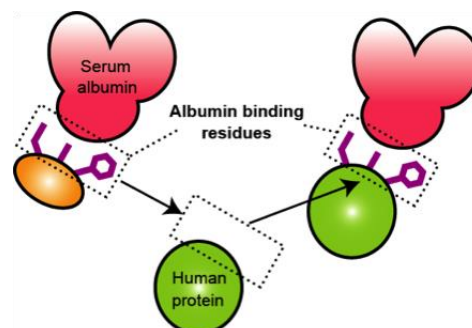


図 1. 分子グラフティングによるアルブミン結合性ヒト型タンパク質のデザイン

本論

1. HSA 接触残基の解析と改変対象となるヒタンパク質の探索

Protein G ABD のホモログである *Finigoldia magna* GA module とヒト血清アルブミン (HSA) の複合体結晶構造に対し, PISA server を用いることで, GA module の HSA 接触残基の解析を行った. その結果, GA module の 23-53 番目の領域に 18 個の HSA 接触残基が存在することを確認した.

続いて, GA module の HSA 接触残基を含む領域 (23-53) の構造データをクエリーとし, 最大 100 アミノ酸残基からなるヒタンパク質の結晶構造データ群を対象に, PDBefold を用いて, クエリーの主鎖構造と類似した部分構造をもつヒタンパク質を探索した. 探索の結果, human APAF-1 CARD (以下, hAC) が検索にヒットした. hAC (34-63) と GA module (23-53) における α 炭素の RMSD は 1.00 Å であり, 両者は互いに近い部分構造をもつことが確認された. 以上より, hAC を本研究における HSA 接触残基を移植する対象とした.

2. hAC に対する HSA 接触残基の移植

hAC に対し, HSA 接触残基 18 個すべてを移植した変異体 hAC_18m を作製した. 表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による相互作用解析の結果, hAC_18m と HSA の相互作用は弱いものであった (解離定数 K_D = 約 5 μ M). また冷蔵条件下においても, hAC_18m は多量体を形成するなど極めて不安定な状態にあることが判明した. これらの原因は, 導入した HSA 残基が hAC_18m の立体構造を著しく不安定化させ, HSA に結合することのできる構造をとりづらくなり, また同時に hAC_18m が会合しやすい状態になったためであると推測される.

3. 構造インフォマティクスによる変異導入部位の決定

3. では 18 個の HSA 接触残基のうち, 著しく hAC の構造を不安定化させると予測されるものを除外するために, hAC の溶媒接触面積 (ASA) 比の解析と変異導入によるフォールディング自由エネルギーの変化予測を利用し, 変異導入部位の決定に際して以下の条件を設定した. 1) ASA 比が 50 % 以上の部位の変異導入を許可, 2) ASA 比が 50 % 未満の部位だが化学的性質の似た残基への変異を許可, 3) 前述の条件を満たしていても $\Delta\Delta G$ が 1.5 kcal/mol 以上の場合は変異導入を行わない. 1)-3) の条件に基づき, 最終的に HSA 接触残基を 15 残基移植した hAC_15m を設計した.

4. hAC_15m-HSA 間相互作用の解析

SPR 法を用いた相互作用解析により, hAC_15m は HSA に対し K_D = 1.14 μ M で結合することが判明した. hAC_15m が hAC_18m よりも高い結合力を示した要因として, 構造インフォマティクスによる移植残基の選択により hAC 変異体の立体構造を不安定化させる変異導入を回避し, 結果として HSA と結合する構造を保持することが可能になったことが推測される.

5. hAC 変異体の親和性強化

血清アルブミンとの結合を利用してタンパク質医薬の血中滞留時間を延長するには, K_D = 600 nM より強い結合力が必要であるが, hAC_15m の結合力はその要求を満たすものではない. しかし, 結合力を増加させるために HSA 接触残基を追加することは hAC 変異体の構造安定性へ影響を与

えるリスクを伴う。そこで、hAC_15m に対し HSA 結合残基を 1 残基ずつ追加する慎重な改変により、hAC_15m よりも強い結合力をもつ hAC 変異体を得ることを目指した。hAC_15m の変異体 hAC_15m(T36S)、hAC_15m(E41N) の HSA に対する結合力は、それぞれ $K_D = 618 \text{ nM}$, 283 nM であった。また、T36S, E41N を掛け合わせた二重変異体 hAC_15m(T36S/E41N) では、HSA に対する親和性が $K_D = 105 \text{ nM}$ であることが確認された (表 1)。この結合力はタンパク質医薬の血中滞留時間の延長に充分なものである。

表 1. hAC 変異体-HSA 間相互作用の結合速度定数 (k_{on}), 解離速度定数 (k_{off}), 解離定数 (K_D)

	$k_{on} [(\text{M}\cdot\text{s})^{-1}]$	$k_{off} [\text{s}^{-1}]$	$K_D [\text{M}]$
hAC_15m	7.57×10^4	8.65×10^{-2}	1.14×10^{-6}
hAC_15m(L35T)	N.D.	N.D.	N.D.
hAC_15m(T36S)	1.02×10^5	6.33×10^{-2}	6.18×10^{-7}
hAC_15m(E40K)	N.D.	N.D.	N.D.
hAC_15m(E41N)	1.66×10^5	4.68×10^{-2}	2.83×10^{-7}
hAC_15m(T36S/E41N)	3.60×10^5	3.77×10^{-2}	1.05×10^{-7}
GA module	2.01×10^6	2.32×10^{-3}	1.15×10^{-9}

6. hAC 変異体-HSA 間相互作用の熱力学的解析

HSA 結合残基の追加によって親和性が向上した機構および GA module が hAC 変異体の 100 倍の親和性をもつ理由について考察することを目的として、hAC 変異体および GA module の HSA への結合における熱力学的解析を行った。

hAC_15m, hAC_15m(T36S), hAC_15m(E41N) の HSA に対する結合は、エンタルピー的に有利であり、エントロピー的には不利なものであることが判明した。一方、hAC_15m(T36S/E41N) の HSA に対する結合は、エンタルピー的にもエントロピー的にも有利なものであった。この熱力学的パラメータの傾向は GA module-HSA 間相互作用についても同様であることから、HSA 結合残基の追加により、hAC_15m の相互作用様式が GA module の相互作用様式に近づいたことが、親和性を向上させた要因であると考えられる。

一方、GA module-HSA 間相互作用においてのみ結合のエントロピー障壁が存在していないことが判明した。この結果は GA module-HSA 間相互作用には溶媒の再配向が寄与していることを示唆するものであり、hAC_15m(T36S/E41N) と GA module における 100 倍の親和性の違いを生み出す要因であると考えられる。

7. hAC 変異体, GA module 間の競合試験

ヒト型人工タンパク質 hAC_15m(T36S/E41N) が GA module と同様の結合部位を有しているかを検証するため、SPR を用いた競合試験を実施した。hAC_15m(T36S/E41N) が GA module の HSA 結合部位と競合することが確認され、HSA 結合残基のグラフトイングにより GA module の結合様式を模倣したヒト型タンパク質が得られたことが示された (図 2)。

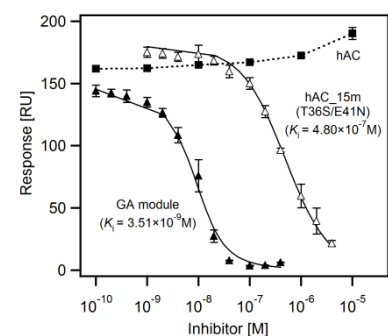


図 2. hAC 変異体, GA module 間の競合試験

8. hAC 変異体, GA module の *in silico* 免疫原性評価

hAC 変異体, GA module の T 細胞エпитープの *in silico* 予測を行った結果、GA module で免疫原性が高いと予測された領域を回避し、hAC 変異体に HSA 接触残基が移植されたことが確認された。一方、hAC 変異体において新たな T 細胞エпитープと予測される領域が生成されており、この領域が免疫原性に寄与するかについては更なる検証が必要であることが示された。

総括

分子グラフィティングによる HSA 結合性人工ヒト型タンパク質の設計において、構造インフォマティクスの手法により、有害と思われる変異を除外し中程度の親和性をもつ hAC 変異体を取得した。次に、1 残基ずつ結合残基を追加する戦略により、hAC 変異体の HSA に対する親和性が強化され、タンパク質医薬の血中滞留時間を延長するのに十分なものとした。また、hAC 変異体の HSA 結合部位は GA module と同様のものであることが競合試験によって確認された。HSA に対する親和性の強さ、結合部位の類似性から、本研究で設計された人工ヒト型タンパク質は細菌由来ヒト血清アルブミン結合性タンパク質を模倣したタンパク質として十分な機能を有していると考えられる。

また、構造インフォマティクスによって中程度の親和性をもつ変異体を取得し、結合残基の慎重な追加によって親和性を強化する本研究の手法は、構造安定性とのトレードオフを伴う分子グラフィティングをより高精度におこなう上で有効な手法であると考えられる。今後、汎用性が検証されることにより、タンパク質設計における一手法として確立されることが期待される。