

博士論文

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

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 生命機能分子工学分野

大城 理志

本論文の概要

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ヤ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が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(SA)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,SA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.

分子グラフティングによるヒトSA(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Human APAF-1 CARD(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HSA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.

略語一覽

ABD	Albumin binding domain
APAF-1 CARD	Apoptosis Activation Factor-1 Caspase Recruit Domain
ASA	Accessible Surface Area
BSA	Buried surface area
CD	Circular dichroism
CDR	Complementarity determining region
CPR	Consensus percentile rank
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
Fc	Fragment, crystallizable
FcRn	Neonatal Fc receptor
GA module	Protein G-related albumin-binding domain module
GST	Glutathione S-Transferase
hAC	Human APAF-1 CARD
HLA	Human leucocyte antigen
HRV	Human Rhinovirus
HSA	Human serum albumin
IEDB	Immune epitope database
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
MHC	Major histocompatibility complex
NMR	Nuclear magnetic resonance
OD	Optical density

PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylene glycol
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis
SPR	Surface plasmon resonance

目次

第1章 序論	1
第2章 HSA 接触残基の解析と改変対象となるヒトタンパク質の探索	12
第3章 hAC に対する HSA 接触残基の移植	16
第4章 構造インフォマティクスによる hAC 変異体の設計	27
第5章 hAC 変異体の親和性強化	37
第6章 hAC 変異体-HSA 間相互作用の熱力学的解析	42
第7章 hAC 変異体, GA module 間の競合試験	53
第8章 hAC 変異体, GA module の <i>in silico</i> 免疫原性評価	56
第9章 総括	64
参考文献	69
謝辞	75

第1章 序論

1. タンパク質医薬の開発と血中滞留性

1982年に組換え型ヒトインスリンが米国食品医薬品局に承認されて以来、遺伝子組換え技術を駆使したタンパク質医薬の開発が急激に進められてきた。承認済みタンパク質医薬には、組換え型酵素、ホルモン、サイトカイン、モノクローナル抗体などがあり、2008年の Nature Reviews Drug Discovery の総説によれば、130種類以上の承認済みタンパク質医薬のうち、95種類以上が遺伝子組換え技術によって製造されている [1]。

一方、タンパク質医薬の開発において常に障害となる要因は、タンパク質の薬物動態、特に投与後の消失時間の短さである。タンパク質は本来、生体内で分解と排出を受けやすい分子であり、長期の薬理作用を求められる用途では効果が限られることが多い。この問題は、モノクローナル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などを利用した次世代の抗体医薬の開発において顕著に表れている [2], [3]。例えば、ヒトにおける IgG の血中半減期は約 20 日であるが、抗体フラグメントの血中半減期は数時間程度である [4]。用途に応じた血中滞留時間の延長は今後のタンパク質医薬、特に次世代抗体医薬の開発において取り組まなければならない問題の 1 つである。

2. タンパク質医薬の開発における血中滞留性の改善

タンパク質医薬の血中滞留性を改善する方法として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の化学修飾、遺伝子工学を用いた IgG の Fc 領域および血清アルブミン (SA) のタンパク質医薬への融合、SA 結合性タンパク質の融合によるタンパク質医薬と SA の間接的な結合が報告されている [5].

PEG の化学修飾はタンパク質医薬の薬物動態の改善において最も古くから用いられている方法であり、1990 年に PEG 化 adenosine deaminase が承認されて以来 [6]、2010 年では 8 種の PEG 化タンパク質医薬が承認されている [7]. また、Fc 領域および SA を融合する方法も血中滞留性改善法として有効であることが知られている. TNF- α Receptor II の可溶性細胞外ドメインと Fc を融合した Etanercept をはじめ他 4 種の Fc 融合タンパク質医薬が承認されており [8]、SA を融合した Interferon α -2b, coagulation factor IX, HER2 + HER3 specific single-chain Fv がそれぞれ臨床試験の Phase III, Phase I, Phase I/II の段階にある [5]. しかし、臨床応用の段階にあるものの、PEG 化および Fc 領域および SA の融合には問題も存在している. PEG の化学修飾においては修飾部位の不均一性による薬効の変化を避けることが困難である. また、PEG は一般的に生体適合性が高く、低毒性であると知られているが、腎臓への蓄積に伴う毒性が指摘されている [9]. Fc 領域および SA を融合させる方法では、分子量の増大による組織移行性の低下が課題となっている.

一方, 臨床応用は最も遅れているが, SA 結合性タンパク質の融合によるタンパク質医薬と SA の間接的な結合は, PEG の化学修飾にみられる修飾部位の不均一性や PEG の毒性への懸念, Fc 領域および SA の融合による分子量の増大といった問題がないことから, 近年, 低分子量のタンパク質医薬の血中滞留性を改善する方法として有力視されている.

3. SA を介したタンパク質医薬の血中滞留時間の延長

SA は血清中に最も多く含まれるタンパク質であり (50 mg/ml (600 μ M)), ヒトにおける血中半減期は 19 日と血清タンパク質の中で最も血中滞留時間が長い [10].

SA の血中滞留時間が長い理由として, SA が約 66 kDa の高分子量であり腎臓の糸球体にろ過されないこと, 血管内皮細胞の新生児 Fc 受容体 (FcRn) を介した血中リサイクリングにより SA がリソソームで分解される経路を逃れていることが挙げられる [11].

SA の長い血中滞留時間を利用し, タンパク質医薬と SA の間に非共有結合を形成することで, 血中滞留時間の短いタンパク質医薬の滞留時間を延長することが示されている.

SA を介したタンパク質医薬の血中滞留時間の延長方法として, SA 結合ペプチドのタンパク質医薬への遺伝子工学的融合 [12], 抗 SA ドメイン抗体の融合 [13], [14], *Streptococcal* protein G の Albumin binding domain (ABD) の融合が報告されている. ABD の遺伝子工学的融合によるタンパク質医薬の体内滞留性の改善は 1996 年から報告されており, soluble complement receptor type 1, single-chain diabody の血中安定性を向上させることが報告されている [15], [16].

4. ABDによるタンパク質医薬の血中滞留性延長の分子機構

ABDは *Streptococcal protein G* の Albumin binding region の C 末端側に位置する 46 残基の小型ドメインである (図 1) [17]. 2011 年に Andersen らは, ABD は SA の FcRn との結合を阻害せずに, SA と非共有結合を形成することで, ABD を融合したタンパク質医薬の血中滞留時間を延長させていることを種々の阻害試験により明らかにした (図 2) [18]. ABD と HSA および HSA と FcRn の結合様式の解明も進められており, 2004 年に決定された ABD のホモログである *Fingoldia magna* Protein G related Albumin binding domain module (GA module) とヒト SA (HSA) の複合体結晶構造 [19], 2013 年に決定された HSA-FcRn の複合体結晶構造 [20] から, GA module が HSA のドメイン II に結合しており, HSA のドメイン I, III に結合している FcRn と結合サイトが重複していないことが明らかになった (図 3). 以上にあげるように, 細菌由来 HSA 結合性タンパク質は, SA との結合を介したタンパク質医薬の血中滞留性改善において最もその機構が明らかになっており, 種々のタンパク質医薬において効果があげられていることから, 今後のタンパク質医薬の開発において有力な分子であるといえる.

一方, Sjolander らによれば, ABD を融合したペプチドをマウスに投与すると, 融合ペプチドに対する抗体産生が起こることが報告されている [21]. これは, 中和抗体の産生によるタンパク質医薬の薬効の低下, アナフィラキシーショック等の重篤な免疫反応を惹起する可能性があることを意味しており, ABD を利用したタンパク質医薬の血中滞留性改善において ABD の免疫原性の解決が必要とされている.

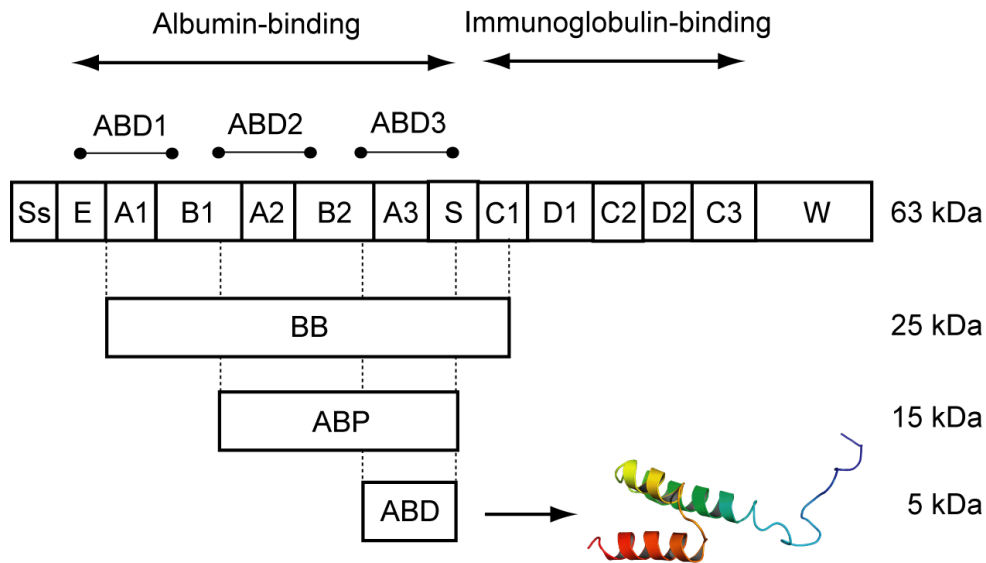


図1. *Streptococcal protein G*におけるAlbumin-binding domain (ABD)

*Streptococcal protein G*はN末端側のAlbumin-binding regionとC末端側のImmunoglobulin-binding regionに分割される。Albumin-binding regionはBB, ABP, ABDに分割され, Albumin-binding regionの最小単位であるABDは約5 kDaの安定した3helix-bundle構造をもつ。

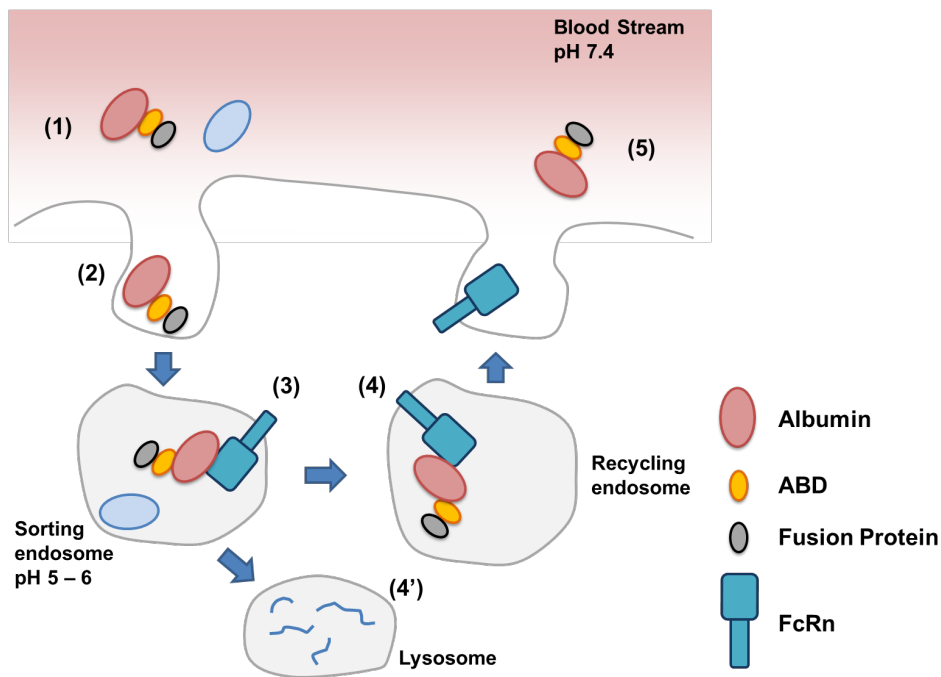


図2. ABDを融合したタンパク質医薬の新生児Fc受容体 (FcRn) を介した血中リサイクリング

(1) ABDを融合したタンパク質医薬が血中でSAと結合する. (2) エンドサイトーシスによってABD融合タンパク質医薬とSAが血管内皮細胞に取り込まれる. (3) エンドソーム内の弱酸性環境下でABD融合タンパク質医薬-SAがSAを介してFcRnと結合する. (4) FcRnと結合したタンパク質はリサイクリング経路に運ばれる. (4') FcRnと結合しなかったタンパク質はリソソームにおける分解を受ける. (5) 血中の中性環境下でFcRnとSAが解離し, ABD融合タンパク質が血中に放出される。

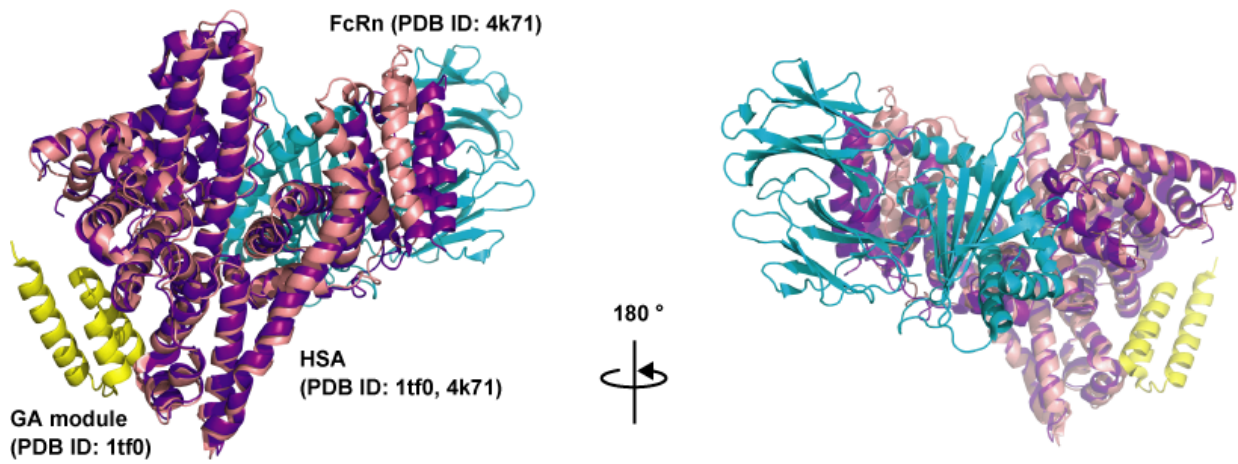


図3. X線結晶構造解析により明らかになったアルブミン結合性タンパク質-HSA-FcRn間の結合様式

GA module – HSA複合体の結晶構造 (PDB ID: 1tf0), FcRn – HSA複合体の結晶構造 (PDB ID: 4k71) においてHSAの構造を重ね合わせて作成. Yellow: GA module, Pink: HSA (PDB ID: 1tf0), Purple: HSA (PDB ID: 4k71), Cyan: FcRn

5. タンパク質工学による異種タンパク質の低免疫原性化

ABDをはじめとした異種タンパク質をタンパク質医薬として利用するには、4.にあげたように中和抗体の産生や予期せぬ免疫反応を惹起させる恐れがあり、従来から免疫原性を低下させるための改変方法が研究されてきた。

その中で最も成功している例は、マウスモノクローナル抗体の抗原結合部位における相補性決定領域を遺伝子組換え技術によって、ヒトモノクローナル抗体の相補性決定領域と入れ替えるマウスモノクローナル抗体のヒト化技術である(図4)[22]。この技術により、モノクローナル抗体の低免疫原性化に成功し、モノクローナル抗体を医薬として利用することが可能になったといっても過言ではない。

次に挙げられるのは、異種タンパク質におけるT細胞エピトープおよびB細胞エピトープの変異導入によるエピトープの低親和性化である。これは、異種タンパク質が抗原提示細胞に取り込まれ、主要組織適合複合体(MHC-II)とペプチドの複合体としてヘルパーT細胞の受容体に提示される際に、MHC-IIおよびT細胞受容体の認識に必要な領域であり、この領域に変異を加えることでMHC-IIおよびT細胞受容体の認識を弱め、ヘルパーT細胞によるB細胞への抗体産生の促進等を阻害するものである。B細胞エピトープの変異導入については、抗体産生を担うB細胞が認識するエピトープに変異導入することで、異種タンパク質に対する抗体産生を阻害する方法である。これらの方法で異種タンパク質の低免疫原性化を図った例として、L-AsparaginaseやImmunotoxinのT細胞エピトープおよびB細胞エピトープへの

変異導入が報告されているが [23], [24], エピトープの削除によるタンパク質の機能への影響や新たなエピトープの出現が課題となっている。

以上に挙げるようにタンパク質の低免疫原性化には確立された方法があるが、これらの方法を ABD に適用する際には以下の問題がある。1) 抗体と異なり, ABD が結合を担う部位はループ領域ではなく ヘリックス領域である。構造に柔軟性をもつループ領域と異なり, 構造の固いヘリックス領域を移植することは移植先のヒトタンパク質の分子内相互作用に与える影響が大きく, 立体構造を維持できない可能性が高い。2) ABD は 46 残基の小型タンパク質であり, 46 残基のみで SA への結合と 3-helix bundle 構造の維持を担っている。つまり, T 細胞および B 細胞エピトープの変異導入を行うことは SA への結合と構造安定性の両者に与える影響が大きいと予測される。

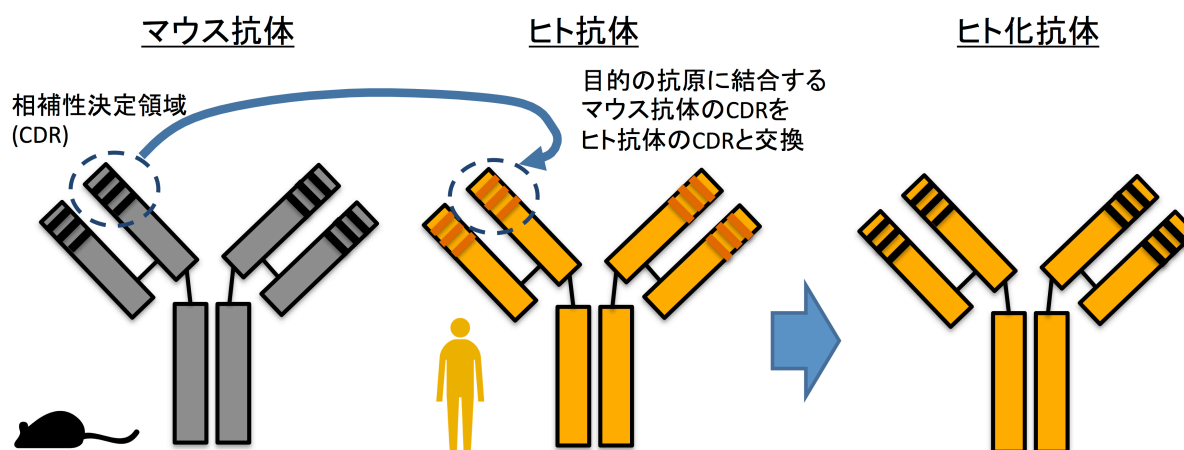


図4. マウスモノクローナル抗体のヒト化技術

目的の抗原に結合するマウスモノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR) を, 遺伝子工学的手法を用いてヒトモノクローナル抗体のCDRと置き換えることで, CDRを除く領域のアミノ酸配列をヒト配列にしたヒト化抗体を取得する。この技術により, マウスモノクローナル抗体をヒトに投与した時におこる免疫反応を大幅に低減することに成功した。

6. 分子グラフティングによる ABD を代替するヒトタンパク質の設計

ABD の低免疫原性化における問題は、小型ドメインに対する T 細胞および B 細胞エピートープへの変異導入では機能と構造へ与える影響が大きいこと、ヘリックス領域のヒトタンパク質への移植も移植先タンパク質への分子内相互作用への影響が大きいことにある。これらの問題を回避するには、構造を大きく変えることなく HSA 結合部位をヒトタンパク質上で再現するような改変が有効である。

そのような改変を実現する手法として分子グラフティングが挙げられる。分子グラフティングは、結合残基を異なるタンパク質に移植することで、あるタンパク質における結合残基を他のタンパク質表面上で模倣する Structure based Design の手法である (図 4)。今までに、金属結合サイト、CD4 の HIV-1 gp120 結合サイト、p53 の MDM2 結合サイトを scorpion toxin に移植することに成功している [25]–[27]。また、HIV-1 gp41 の C 末端領域を GCN4 ロイシンジッパーに移植したことも報告されている [28]。

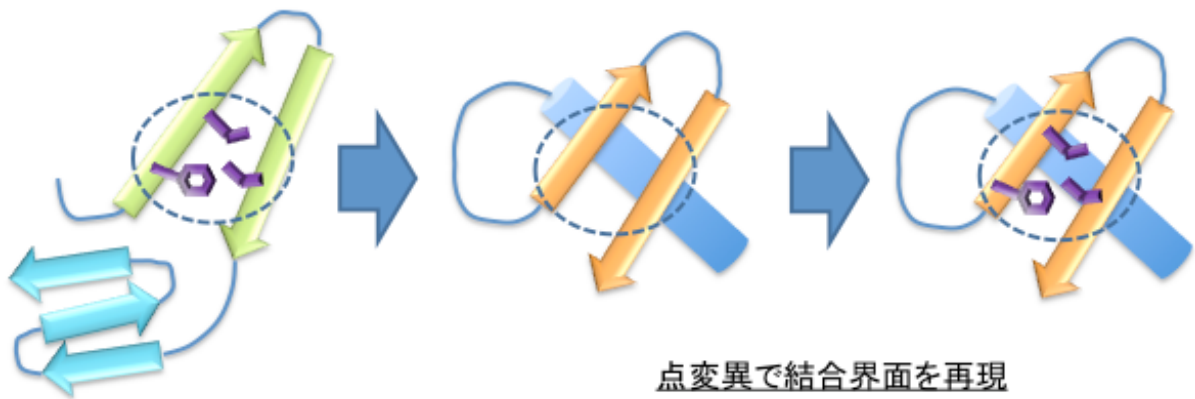
以上のように、分子グラフティングはタンパク質における結合サイトを他種のタンパク質上で再現する方法として確立されている。分子グラフティングを行う際には、予めタンパク質とリガンドの複合体結晶構造等の相互作用様式に関する情報が必要であるが、ABD と HSA の相互作用様式に関してはホモログである GA module と HSA の複合体結晶構造が決定されている [19]。したがって、分子グラフティングは細菌由来 SA 結合ドメインの HSA に対する相互作用様式をヒトタンパク質上で再現するうえで実現可能性の高い手法である。

また同時に,分子グラフティングの手法において結合サイトの移植先として,ヒトタンパク質を利用した前例は知られていない.理由として,タンパク質工学の手法としての分子グラフティングを確立する段階において *Scorpion toxin* などの安定性が高いタンパク質が優先的に研究対象とされてきたことが推測される.つまり,ヒトタンパク質を結合サイトの移植先に利用することは,分子グラフティングをタンパク質医薬の免疫原性を回避する手段として確立するうえで重要な試みであるといえる.

7. 本研究の目的

第1章を総括すると,本研究の目的は細菌由来 SA 結合ドメインである *Streptococcal Protein G ABD* もしくは *Fingoldia magna GA module* の結合様式を模倣したヒト型タンパク質を設計することである.設計されたタンパク質に求められる性質として,1) HSA への結合力がタンパク質医薬の血中滞留時間を延長するのに有効な強度 (解離定数 $K_D < 600$ nM) [5]である,2) HSA への結合サイトが FcRn との結合を阻害しない位置にあること,3) 生体内温度において安定した構造を維持すること,4) 結合様式を模倣する対象である GA module と比較して免疫原性が低いことが期待されること,が挙げられる.本研究では,分子グラフティングによる HSA 接触残基の移植により,これらの条件を満たすヒト型タンパク質を設計することを旨とした (図 5).

A



B

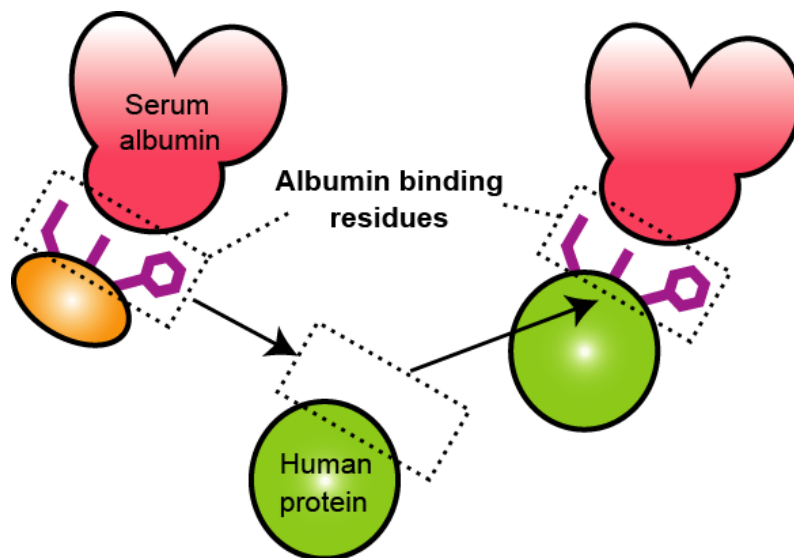


図5. 分子グラフティングによるSA結合性人工ヒト型タンパク質の設計

A. 分子グラフティングの概要. 目的タンパク質におけるリガンドとの接触残基を, 類似した部分構造をもつ他のタンパク質上に移植することで, 目的タンパク質のリガンド結合部位を他のタンパク質上で再現する. B. 分子グラフティングを用いることで細菌由来SA結合ドメインのSA結合界面を模倣した人工ヒト型タンパク質を得ることを本研究の目的とした.

第2章 HSA 接触残基の解析と改変対象となるヒトタンパク質の探索

概要

細菌由来の SA 結合ドメインのアルブミン結合残基をヒトタンパク質上に移植する分子グラフティングを実行するために, *Finergoldia magna* GA module/HSA の複合体結晶構造データを対象に HSA 接触残基を解析した. また, GA module の HSA 接触残基を含む主鎖構造と類似した部位をもつヒトタンパク質を探索することで, HSA 接触残基の移植先となるヒトタンパク質を探索した.

方法

PISA Server による *Finergoldia magna* GA module の HSA 接触残基の解析

PISA Server (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/cgi-bin/piserver) において *Finergoldia magna* GA module/HSA の複合体結晶構造 (PDB ID: 1tf0) を解析対象とした [29]. なお, 結晶構造中に含まれるクエン酸およびデカン酸は解析対象から除外した. 解析条件は既定の条件を利用し, Interface の解析結果より, 下記の条件を満たす残基を HSA 接触残基と定義した. 1) 埋没表面積 (Buried Surface Area (BSA)) が 0 \AA^2 より大きい. 2) 側鎖の原子が HSA と接触状態にある.

探索対象となるヒトタンパク質の結晶構造データセットの作成

低分子量化したタンパク質医薬の分子量の増加を避けることを目的として, PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) より最大 100 アミノ酸残基からなるヒトタンパク質の結晶構造データセットの作成を行った. データセットの作成条件を下記に示す.

Organism 'Homo sapiens', Number of chains (Biological assembly) '1', Resolution '0–3.0 Å', Chain length '20–100', Macromolecule type 'Protein', and Identity cutoff '70%'.

PDB efold を用いた移植先ヒトタンパク質の探索

構造類似性をもつタンパク質の検索は, PDBefold で行った [30]. *Fingoldia magna* 由来 GA module のアルブミン結合領域である 2-3 helix (residue No.23–53) を GA module-HSA との複合体結晶構造 (PDB ID: 1tf0) から抽出した構造データを query とした.

query とヒトタンパク質の結晶構造データセット間の構造比較は次の条件で行った.

Lowest acceptable match = 0 %, Precision = Highest, Align length = 29–31.

移植先のヒトタンパク質は次の基準に従って選択した. 1) ヒトタンパク質の主鎖構造が GA module 2–3 helix と重ね合わせ可能である. 2) ヒトタンパク質の主鎖構造を GA module-HSA 複合体構造に align した時に, ヒトタンパク質と HSA 間で主鎖の steric clash がない.

結果と考察

Finogoldia magna GA module の HSA 接触残基

PISA Server により, *Finogoldia magna* GA module の HSA 接触残基は 18 残基存在することを確認した. 接触残基は Ile23, Thr24, Ser25, Phe27, Tyr28, Ala31, Lys34, Ala35, Lys36, Thr37, Glu39, Glu40, Ala43, Leu44, Glu47, Ile48, Ala51, His52 であり, 全ての接触残基を合わせた BSA は 1784.0 \AA^2 (全 BSA のうち, GA module の BSA: 900.5 \AA^2 , HSA の BSA: 883.5 \AA^2) であった. これらの接触残基は GA module (23–53) に位置しているため, HSA 接触残基の移植先となるタンパク質を探索するクエリーとして, GA module (23–53) の主鎖構造を用いることとした.

HSA 接触残基を移植するヒトタンパク質の探索

GA module (23–53) をクエリーとして, 類似構造をもつヒトタンパク質を PDB に登録されている立体構造データから検索した結果, 3 種類のヒトタンパク質が HSA 残基の移植先候補として検索にヒットした. 検索にヒットしたタンパク質の 1 つである Human Apoptosis Activation Factor-1 Caspase Recruit Domain (APAF-1 CARD) (PDB ID: 1cy5) については, GA module (23 – 53) と APAF-1 CARD (34 – 64)における $C\alpha$ の RMSD が 1.00 \AA であり, 両者を重ね合わせた際の主鎖の構造はほぼ一致していた (図 6A). また, APAF-1 CARD (34–64) の主鎖構造を GA module/HSA の複合体構造 (PDB ID: 1tf0) における GA module (23–53) に重ね合わせた結果, APAF-1 CARD の主鎖は HSA の主鎖と衝突しないことを確認した.

なお、残りの2つの候補については、GA moduleの主鎖における α 炭素のRMSDが2.00 Å以上であり、重ね合わせ時にHSAと衝突を起こす配向であることから、2つの候補については移植先タンパク質としては利用できないと判断した(図6 B, C).

以上より、Human APAF-1 CARD (以下、hAC とする) を HSA 接触残基の移植先タンパク質として、HSA に結合する人工ヒト型タンパク質を設計することにした。

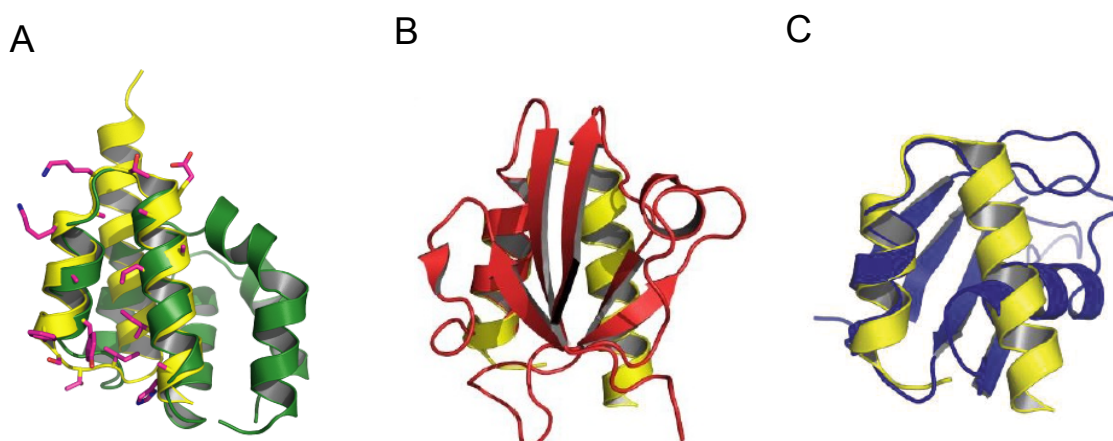


図6. HSA接触残基の移植先候補タンパク質とGA moduleの構造アライメント

A. GA module (23-53) (yellow) と human APAF-1 CARD (hAC) (PDB ID: 1cy5) (green) の構造アライメント. HSA接触残基をmagentaで表示した. B. 2番目の候補タンパク質 (PDB ID: 2uzc) (red) とGA module (23-53) の構造アライメント. C. 3番目の候補タンパク質 (PDB ID: 3s7r) (blue) とGA module (23-53) の構造アライメント.

第3章 hAC に対する HSA 接触残基の移植

3-1. hAC_18m の HSA 結合能の解析

概要

第2章で探索された GA module の HSA 接触残基の移植先である hAC に対し, HSA 接触残基を全て導入した変異体 hAC_18m を作製した. hAC_18m の HSA 結合能の有無を明らかにするために, 表面プラズモン共鳴法を用いて hAC_18m と HSA 間の相互作用解析を行った.

方法

1. hAC の発現と精製

発現ベクターの構築

コドン使用頻度を大腸菌発現系用に最適化した hAC 遺伝子を Overlap extension PCR 法で合成し, pET-16b(+) プラスミドベクター (Novagen) の NcoI サイトおよび BamHI サイトに導入した. 構築した発現ベクターを pET-16b(+)/hAC とする.

大腸菌発現系による hAC の合成

pET-16b(+)/hAC を大腸菌株 BL21 (DE3) (Novagen) にヒートショック法で導入し, 100 $\mu\text{g/mL}$ のアンピシリンナトリウムを含む LB 寒天培地で 37 $^{\circ}\text{C}$, 終夜培養することで寒天培

地上にコロニーを得た。コロニーを上記と同様の培地で 37 °C, 終夜浸透培養することで定常期に入った培地を得た。100 µg/mL のアンピシリンナトリウムを含む新たな LB 培地 100 mL に対し, 100 µL の定常期培地を入れ, OD₆₀₀ = 約 1.5 に達するまで 37 °C で浸透培養した。培地を 30 分間氷冷後, 終濃度 0.1 mM の IPTG を入れ, 25 °C, 16 時間浸透することで hAC の発現誘導を行った。

hAC の精製

hAC の精製は硫酸アンモニウム分画, 陰イオン交換クロマトグラフィー, ゲルろ過クロマトグラフィーによって行った。なお, この方法は Vaughn らの方法に従ったものである [31]。

発現誘導を行った菌体を遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4 °C) で回収し, 培地 100 mL あたり 5 mL の Lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) で懸濁後, 超音波破碎を行った。破碎液の可溶性画分を遠心分離で回収し, 終濃度 70 % (w/v) の硫酸アンモニウムを入れ, 室温で 1 時間攪拌後, 遠心分離 (14 000 g, 30 min, 25 °C) で上清を回収した。回収した上清に終濃度 90 % (w/v) の硫酸アンモニウムを入れ, 室温で終夜攪拌後, 遠心分離 (14 000 g, 30 min, 4 °C) で沈殿を回収した。

沈殿を 5 ml の 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で懸濁後, 1 L の透析外液 (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) に対し透析を行った。透析外液は 3 時間ごとに 2 回交換し, 2 回目の外液交換後は終夜透析を行った。透析後の試料を陰イオン交換クロマトグラフィーに供することで, hAC の精製を行

った。陰イオン交換クロマトグラフィーは下記に示す条件で実行した。カラム: Resource Q 1 mL (GE Healthcare), 流速 4 mL/min 結合バッファー: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 溶出バッファー: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) / 1 M NaCl, 溶出バッファーのグラジエント濃度: 0-50 % (20 column volume).

陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した試料を限外ろ過フィルターAmicon® Ultra 15 centrifugal device-10000 NMWL (Merck Millipore) で 500 μ L へ濃縮後, ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて最終精製を行った。ゲルろ過クロマトグラフィーは下記の示す条件で実行した。カラム: Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare), サンプル量: 500 μ L, 溶出バッファー: 1 \times PBS.

hAC 変異体 (hAC_18m) の発現

hAC 変異体は Glutathione S-Transferase (GST) 融合タンパク質として発現させた。Overlap extension PCR 法および Site-Directed Mutagenesis 法で作製した hAC_18m 遺伝子を, pET-49b(+) プラスミドベクター (Novagen) の SmaI, BamHI サイト間に挿入した。作製したプラスミドベクターを, ヒートショック法を用いて大腸菌株 BL21 (DE3) に導入し, 20 μ g/mL のカナマイシン硫酸塩を含む LB 寒天培地で 37 $^{\circ}$ C, 終夜培養することで寒天培地上にコロニーを得た。コロニーを上記と同様の培地で 37 $^{\circ}$ C, 終夜浸透培養することで, 定常期に入った培地を得た。20 μ g/mL のカナマイシン硫酸塩を含む新たな LB 培地 1 L に対し, 1 mL の定常期培

地を入れ, OD_{600} = 約 1.5 に達するまで 37 °C で浸透培養した. 培地を 30 分間氷冷後, 終濃度 0.1 mM の IPTG を入れ, 15 °C, 24 時間浸透することで GST-hAC_{18m} の発現を誘導した.

hAC_{18m} の精製

hAC_{18m} の精製は, GST アフィニティークロマトグラフィー, 陰イオン交換クロマトグラフィー, GST タグの切断, ゲルろ過クロマトグラフィーの 4 工程で行った.

発現誘導を行った菌体を遠心分離で回収し, 培地 1 L あたり 50 mL の Lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) で懸濁後, 超音波破碎を行った. 破碎液の可溶性画分を遠心分離 (5000 rpm, 10 min, 4 °C) で回収し, 0.45 μ m シリンジフィルター (HPF Millex[®]-HV (Merck millipore)) で不溶性粒子を除去した.

不溶性粒子を除去した破碎液を 4 mL の Glutathione Sepharose 4B ビーズ (GE Healthcare) と混合し, 4 °C, 30 分間, 転倒型ミキサーで混和した. ビーズを重力落下型カラムで回収後, 担体の 10 倍量の Lysis buffer でカラムを洗浄し, 担体の 2 倍量の溶出バッファー (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM GSH) で GST-hAC_{18m} の溶出を行った.

上記の工程で GST アフィニティークロマトグラフィーを行った試料を陰イオン交換クロマトグラフィーに供することで, GST-hAC_{18m} の精製を行った. 陰イオン交換クロマトグラフィーは下記に示す条件で実行した. カラム: Resource Q 1 mL (GE Healthcare), 流速 4 mL/min, 結合バッファー: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 溶出バッファー: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) / 1 M

NaCl, 溶出バッファーのグラジエント濃度: 0–50 % (20 column volume).

陰イオンクロマトグラフィーを行った試料に対し, タンパク質量 1 mg につき 10 units の Turbo 3C Protease (GST タグおよび His タグの付加した HRV 3C Protease) (Accelagen) を添加後, 4 °C, 16 h 反応させることで GST タグの切断を行った. 4 mL の Glutathione Sepharose 4B ビーズを添加後, 4 °C, 30 分間, 転倒型ミキサーで混和することで, GST タグ, 未切断の GST-hAC 変異体, Turbo 3C Protease の除去を行った.

GST タグの除去を行った試料を, 限外ろ過フィルター Amicon® Ultra 15 centrifugal device–10000 NMWL (Merck Millipore) を用いて 500–1000 µL へ濃縮後, ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて最終精製を行った. ゲルろ過クロマトグラフィーは下記の示す条件で実行した. カラム: Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare), 流速: 0.8 mL/min, サンプル量: 500 µL, 溶出バッファー: 1×PBS.

表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon Resonances (SPR)) 法による hAC_18m の HSA に対する相互作用の解析

hAC_18m の HSA に対する結合解析においては, Biacore T200 instrument (GE Healthcare) を用いた. 購入した HSA (Sigma) をゲルろ過クロマトグラフィーでさらに精製後, 10 mM 酢酸ナトリウム (pH 5.0) に溶解した. HSA の CM5 チップへの固定化 (約 1000 RU) は製品説明に準じたアミンカップリング法で行った.

hAC_18m のインジェクト濃度は 62.5–1000 nM に振り分け、流速を 30 μ L/min, 298 K (25 °C) とした。Running buffer は PBST (0.005 % Tween 20) を使用した。チップの再生においては 10 mM HCl を流速 30 μ L/min でインジェクトした。

結合・解離における結合速度定数 k_{on} , 解離速度定数 k_{off} の算出は BIAevaluation 2.0 Software を用いた。実験結果のフィッティングは 1 : 1 結合モデルで行った。解離定数 K_D は $K_D = k_{on}/k_{off}$ として算出した。

結果と考察

1. hAC および hAC_18m の発現・精製

hAC は高純度で精製されたことが SDS-PAGE によって確認された (図 7A)。また、ゲルろ過クロマトグラフィーにおいてシングルピークが検出され、単分散状態で溶液中に安定に存在することが確かめられた (図 7B)。

hAC_18m は GST 融合タンパク質として可溶性発現が可能であり、GST アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、Turbo 3C Protease による GST タグの切断と除去、ゲルろ過クロマトグラフィーを経て高純度に精製されたことを SDS-PAGE にて確認した (図 7A)。また、ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて hAC_18m はシングルピークとして検出されたが (図 7C)、hAC と比較してピーク幅が広く (図 7D)、冷蔵状態で 2 日間保管した試料では多量体が形成されていたことが確かめられた (図 7E)。

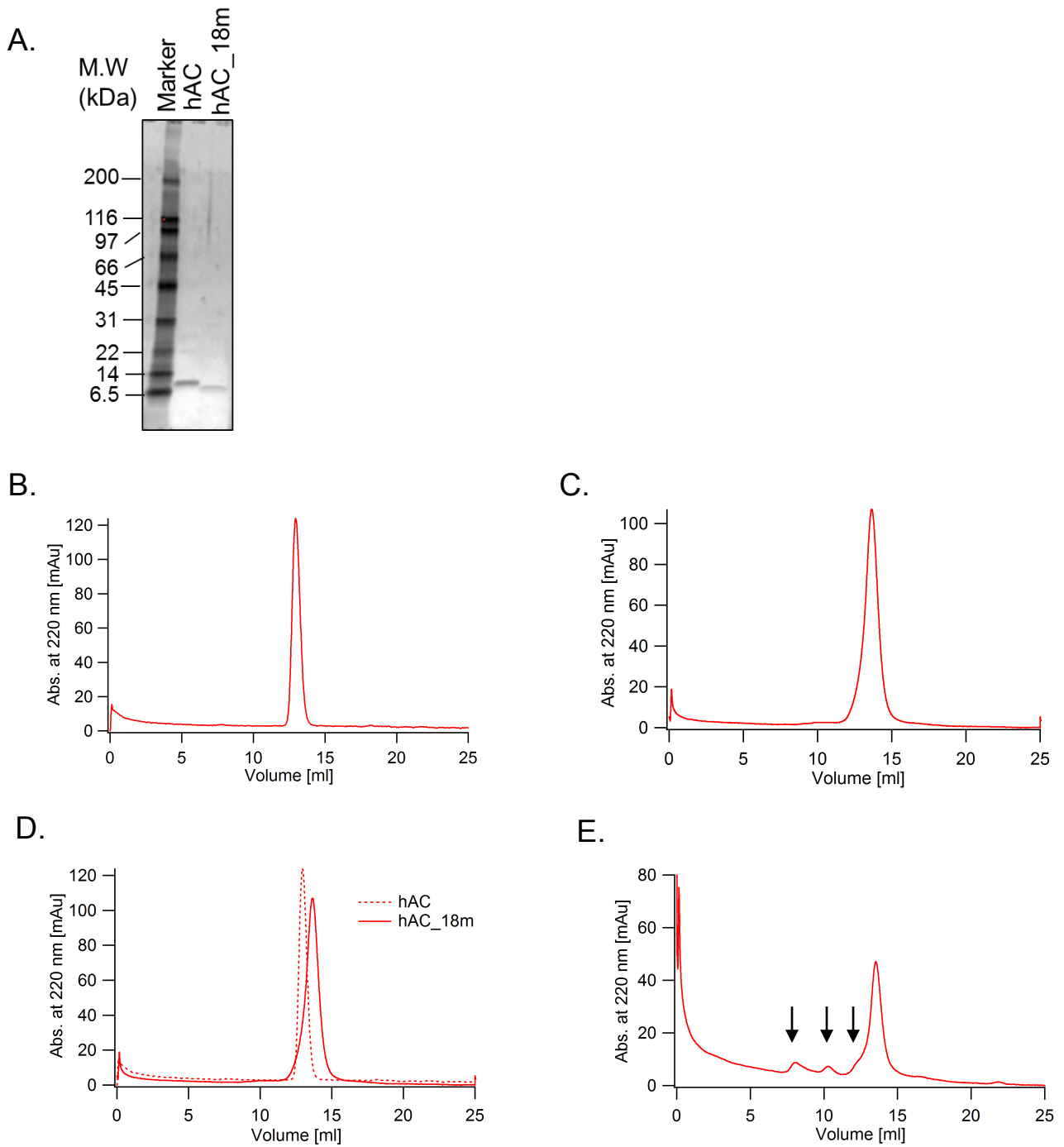


図7. hACおよびhAC_18mの純度確認

A. 精製後のhAC, hAC_18mのSDS-PAGE. タンパク質量 約100 ngを泳動後, Oriole™ Fluorescent Gel Stain (Bio-Rad)で蛍光染色を行った., B. hACのゲルろ過クロマトグラフィー, C. hAC_18mのゲルろ過クロマトグラフィー, D. hACおよびhAC_18mのクロマトグラムの重ね合わせ図. hACと比較して, hAC_18mの方がピーク幅が広い, E. 2日間冷蔵保存を行ったhAC_18mのゲルろ過クロマトグラフィー. 下向き矢印は多量体のピークを示す.

2. hAC_18m の HSA に対する結合能の解析

ゲルろ過クロマトグラフィーで単量体を得た直後の hAC_18m を用いて HSA に対する結合能の解析を行った。結合能の解析は表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いて行った。HSA を約 1000 RU 固定化した CM5 センサーチップ (理論上の Rmax 166.8 RU) において 1 μ M hAC_18m は約 4 RU という非常に低いレスポンス値を示した (図 8)。コントロールとして用いた 1 μ M protein G ABD は 125 RU (理論上の Rmax 144.6 RU) を示していたことから、hAC_18m の低レスポンスの要因はセンサーチップ上の HSA の失活ではなく、hAC_18m の HSA に対する結合力が弱いことにあることが判明した。

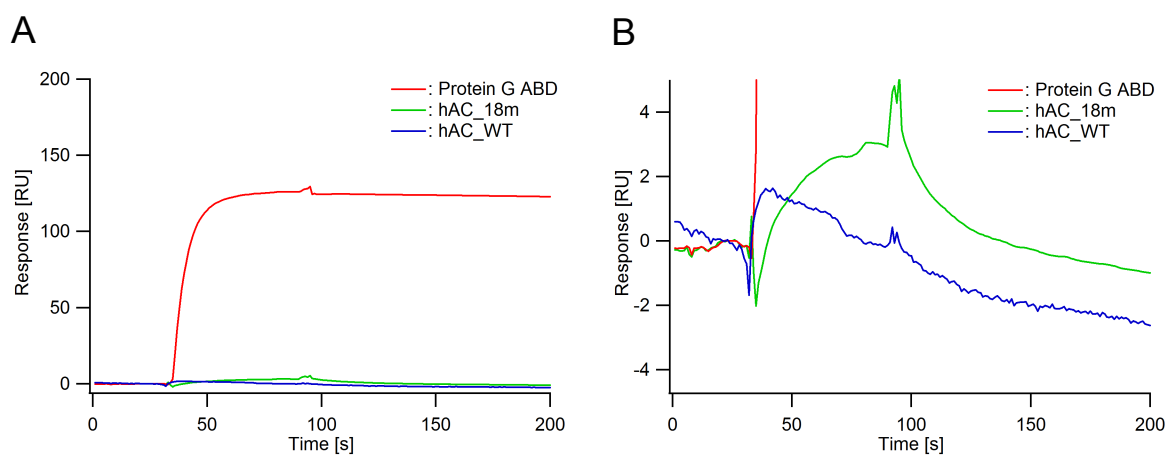


図8. SPR法によるhAC_18mのHSA結合活性の確認

A. HSAを1000 RU固定化したCM5 センサーチップにおける1 μ M ABD, 1 μ M hAC_18m, PBSTの結合、解離のセンサーグラム., B. 1 μ M hAC_18mのセンサーグラムに合わせた拡大図.

A, Bともに, HSAを固定化したフローセルのセンサーグラムから, HSAを固定化していないフローセルのセンサーグラムを差し引いて表示した.

続いて、hAC_18m – HSA 間相互作用の速度論解析を行ったところ、結合速度定数 k_{on} は $7.39 \times 10^3 \text{ (M} \cdot \text{s)}^{-1}$ 、解離速度定数 k_{off} は $3.82 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、解離定数 K_D は $5.17 \text{ } \mu\text{M}$ と算出された。しかし、1回目と2回目のセンサーグラムの形状が大きく異なっており (図 9)、今回の解析における k_{on} 、 k_{off} 、 K_D の算出値は信頼性が低いものと考えられる。センサーグラムの形状が1回目と2回目で異なる原因として、hAC_18m は冷蔵条件で保存しても凝集する傾向があることから、1回目の測定と2回目の測定で hAC_18m の分散性が変化し、HSA に対する結合様式に変化が生じたことが考えられる。以上より、hAC_18m は HSA に対する結合を示し、その結合力については信頼性の高い解離定数の値は得られなかったものの、HSA に対し nM オーダーの結合力をもつ ABD および GA module より低いことが明らかとなった。

GA module のすべての HSA 接触残基を移植した hAC_18m の結合力が GA module と比較して弱い理由として、以下の現象が想定される。1) 導入された HSA 接触残基が、hAC の残基と相互作用することで、HSA 接触残基の側鎖の配向が GA module の HSA 接触残基の配向と異なっている。2) 接触残基の導入により、hAC の熱力学的安定性が大きく低下し、一定温度において Fold している hAC_18m の割合が減少した結果、HSA に結合できる構造をもつ hAC_18m の分子数が減少した。3) HSA 接触残基の移植により、hAC の結合界面の構造が不安定になり、HSA に結合できる構造をもつ hAC_18m の割合が減少した。

1) の可能性を検証するには X 線結晶構造解析、NMR などタンパク質試料を大量に要する実験を行う必要があり、培地 1 L あたり 1 mg を下回る収量の hAC_18m では現実的に検証が

困難である。一方, 2), 3)については図 6D, E で示されたように hAC_18m のゲルろ過クロマトグラフィーにおけるピーク幅が広く, 冷蔵条件においても多量体を形成することから, hAC_18m は構造が不安定になっていることが示唆される。2), 3)のケースを検証する方法については円偏光二色性スペクトルの測定や円偏光二色性を利用した熱安定性解析等が有効であり, これらの方法を用いることで, 本節で明らかになった hAC_18m の HSA への弱い結合力との関係について考察することができるであろう。

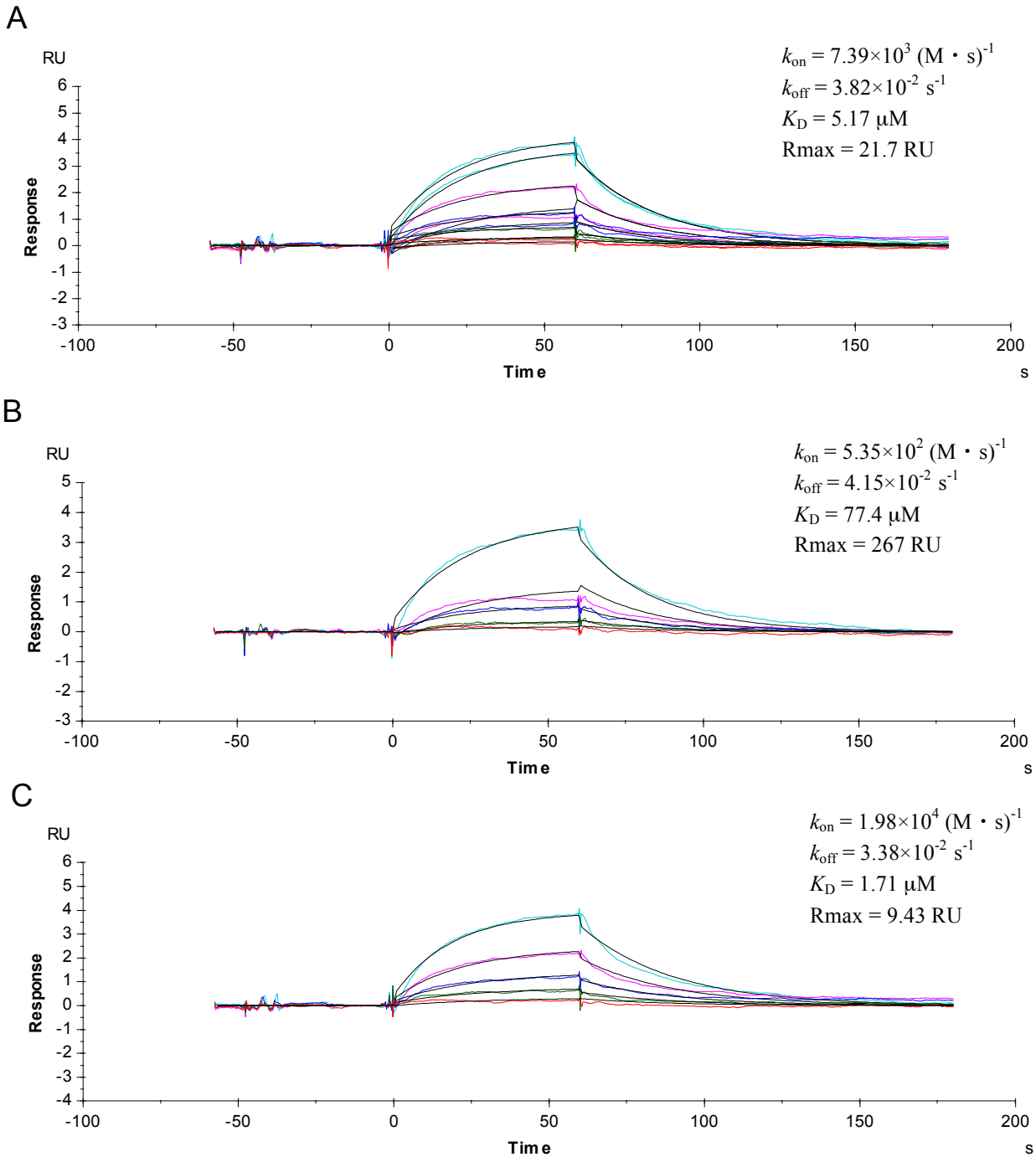


図9. hAC_18m-HSA間相互作用の速度論解析

Running bufferはPBST (0.005 % Tween20), Flow rateは30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。センサーグラムはblankの flow cellおよびrunning bufferを差し引きした。フィッティングモデルは1:1modelを採用し,Rmaxはglobalに算出した。hAC_18m濃度は62.5, 125, 500, 1000 nM. **A.** 同じロットのサンプルを2回測定し, 速度論パラメータを算出した., **B.** 1回目の測定におけるセンサーグラムから速度論パラメータを算出した., **C.** 2回目の測定におけるセンサーグラムから速度論パラメータを算出した.

3-2. hAC_18m の円偏光二色性 (CD) スペクトル測定および熱安定性測定

概要

3-1.において hAC_18m は HSA に対し $K_D = 5 \mu\text{M}$ 程度の結合力をもつことが判明したが、これは nM オーダーの結合力をもつ GA module と比較して非常に弱いものである。hAC_18m の親和性が弱い原因として、接触残基の導入による hAC の構造変化および hAC の熱力学的安定性の低下が原因の一つとして考えられる、3-2.では円偏光二色性 (CD) スペクトルの測定および熱安定性測定を行うことで、hAC_18m に二次構造上の変化および熱変性温度の変化があるかを検証した。

方法

CD スペクトルの測定は、JASCO 805 Spectropolarimeter (JASCO) において、光路長 0.2 cm の石英セルを用いて 293 K (20 °C) で行った。タンパク質濃度は 50 $\mu\text{g/mL}$ で 20 mM Na phosphate pH 7.4 に溶解した。熱安定性解析においては、278 K から 353K (温度上昇速度 1 K/min) における 222 nm のモル楕円率を解析し、二状態変性モデルに対するフィッティングにより Unfold 画分の割合を算出した [32]。カーブフィッティングは Igor Pro 5.03J を用いた。

結果と考察

hAC と hAC_18m の CD スペクトルを比較した結果、両者とも 207 nm と 222 nm 付近においてモル楕円率の極小値をもつ、 α ヘリックス構造に特有のスペクトルが得られた (図 10A)。

hAC_18m においては 222 nm のモル楕円率の値がわずかに高いものの、両者はほぼ同様の二次構造をもつことが示唆された。一方、278 K から 353 K における 222 nm のモル楕円率を測定することで hAC と hAC_18m の熱安定性を解析した結果、hAC、hAC_18m の変性中点温度 (T_m) はそれぞれ 325.9 K、314.8 K であり、hAC_18m は hAC と比較して T_m が 11.1 K 低下していた (図 10B)。つまり、hAC に GA module の HSA 接触残基を 18 残基移植することで熱安定性が低下したことが確認された。これらの結果より、GA module の HSA 接触残基を全て移植しても hAC_18m の親和性が GA module と比較して顕著に弱い原因として、HSA 接触残基の移植による hAC_18m の構造不安定化が関係している可能性が示唆された。

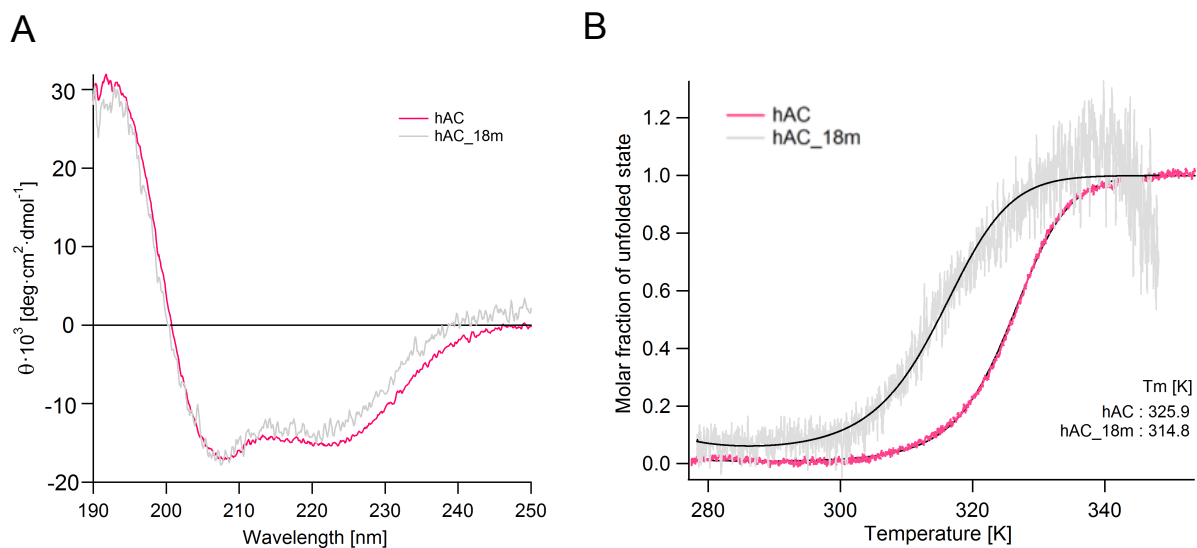


図10. hAC, hAC_18mのCDスペクトルおよび熱安定性測定

A. hAC, hAC_18mのCDスペクトル. 測定温度は293.15 K (20 °C), サンプル濃度は50 $\mu\text{g/mL}$, 溶液条件は20 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)

B. 278.15–353.15 K (5–75 °C) における熱変性測定. 222 nmのモル楕円率の変化を2状態熱変性モデルでフィッティングし、変性中点 T_m を算出した.

第4章

構造インフォマティクスによる hAC 変異体の設計

概要

第3章において, hAC に対し *Fingoldia magna* 由来 GA module の HSA 接触残基全てを移植した変異体, hAC_18m を作製したが, その HSA に対する親和性は解離定数にして 5 μ M 程度であり, nM オーダーの結合力をもつ GA module と比較して非常に弱いことが判明した. また, 熱安定性測定により, hAC_18m の変性中点温度は hAC と比較して 11 K 低いことが判明し, hAC_18m の結合力が弱い原因は, HSA 接触残基の移植による hAC の構造不安定化にある可能性が示唆された.

そこで本章では, hAC の側鎖の溶媒接触面積 (Accessible Surface Area (ASA)) 比および HSA 接触残基の導入時における hAC 変異体のフォールディング自由エネルギー変化の予測を実施することで, hAC 変異体を不安定化させる HSA 接触残基を除外し, hAC_18m よりも親和性の高い変異体を得ることを目指した.

4-1. 溶媒露出面積比の算出, 安定性変化予測に基づく変異導入部位の決定

方法

溶媒露出面積 (ASA) 比の算出

溶媒露出面積 (ASA) 比の算出は GETAREA (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>) [33]を用いた.

water probe の半径は 1.4 Å とし, その他の設定はデフォルトとした.

変異導入に伴うフォールディング自由エネルギー変化の予測

変異導入に伴う構造安定性変化の予測は Eris server (<http://troll.med.unc.edu/eris/login.php>)

[34] を用いた. Eris server は Medusa Force Field の導入および主鎖のフレキシビリティを導入

したフォールディング自由エネルギー計算プログラムであり, 側鎖の小さい残基から大きい

残基への変異導入における自由エネルギー計算の精度を高めている [35].

本章においては, 候補となる変異箇所 of 自由エネルギー変化 $\Delta\Delta G$ を 1 残基ずつ予測した.

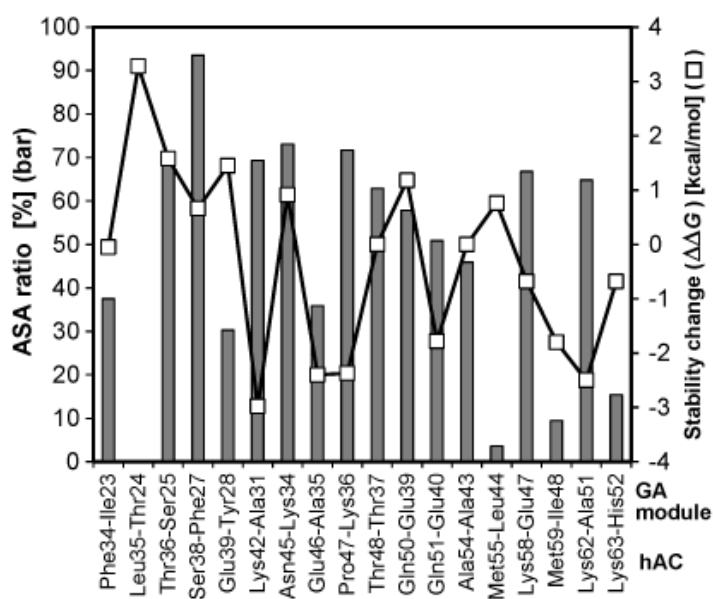
側鎖の小さい残基から大きい残基への変異導入における予測精度の向上のため, $\Delta\Delta G$ の予測

において backbone flexibility を導入した.

結果と考察

hAC の ASA 計算値および $\Delta\Delta G$ の予測値を図 11A に示す。ASA 比 > 50 % の残基は Thr36, Ser38, Lys42, Asn45, Pro47, Thr48, Gln50, Gln51, Lys58, Lys62 であった。一般的に側鎖の ASA 比の大きい残基は変異導入に寛容であることから [36], 溶媒に露出したこれらの残基については変異導入を行うこととした。さらに, 埋没した残基においても接触残基の移植を検討した。ASA 比が 50 %未満の残基において候補となる変異は F34I, L35T, E39Y, E46A, A54A, M55L, M59I, K63H であるが, A54A, M55L, M59I, K63H は化学的性質の似たアミノ酸への変異であるため, この 4 種類の変異を行うこととした。Thr36 については $\Delta\Delta G$ が 1.5 kcal/mol を上回ることから変異導入を行わないこととした。一方, E39Y はこの位置における Tyr 残基が HSA との結合に必須であることが GA module-HSA 複合体構造から判明しているため, この変異を導入することとした。以上の工程に基づき, hAC に GA module 由来の HSA 接触残基 15 残基を移植した hAC_15m を設計した (図 11B)。

A



B

GA module ¹⁹KKAGITSDFYFNAINKAKTVEEVNALKNEILKAHA⁵³
hAC_18m ³⁰ISDGI^{TS}IF^{YEE}AVR^{KAKTQE}ARA^{ALLIEI}IL^{AHD}⁶⁴
hAC_15m ³⁰ISDGF^{LT}I^{FYEE}AVR^{KAKTQE}ARA^{ALLIEI}IL^{AHD}⁶⁴
hAC ³⁰ISDGF^{LT}I^{SEEEKVR}NEPTQQ^{RAAMLIK}MIL^{LK}KD⁶⁴

図11. 構造インフォマティクスによるhAC変異体の設計

A. hAC (34–63) における溶媒露出面積 (ASA) 比 (棒グラフ) と変異箇所における予測上のフォールディング自由エネルギー変化 ($\Delta\Delta G$) (□でプロット).

B. GA module, hAC_18m, hAC_15m, hACのアミノ酸配列. 両端の数字は残基番号を示す. 赤字はHSA接触残基を示し, 下線はHSA接触残基を移植した残基を示す.

4-2. hAC_15m-HSA 間相互作用の解析

方法

hAC_15m の発現・精製

hAC_15m は第 3 章における hAC_18m の発現・精製と同様に, GST 融合タンパク質として発現させ, GST アフィニティークロマトグラフィー, 陰イオン交換クロマトグラフィーを経たのち, GST タグの切断・除去を行い, ゲルろ過クロマトグラフィーによって精製した.

SPR 法による hAC_15m-HSA 間相互作用の解析

第 3 章と同じく, HSA を約 1000 RU 固定化した CM5 センサーチップを用いて hAC_15m の結合・解離のセンサーグラムを取得し, 結合速度定数 k_{on} , 解離速度定数 k_{off} , 解離定数 K_D を算出した. hAC_15m のインジェクト濃度は 125–2000 nM とした.

CD スペクトルによる二次構造解析および熱安定性解析

CD スペクトルの測定は, 3-2. と同じく JASCO 805 Spectropolarimeter (JASCO) において, 光路長 0.2 cm の石英セルを用いて 293 K (20 °C) で行った. タンパク質濃度は 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 20 mM Na phosphate pH 7.4 に溶解した. 熱安定性解析においては, 278 K から 353 K (温度上昇速度 1 K/min) における 222 nm のモル楕円率を解析し, 二状態変性モデルに対するフィッティングにより Unfold 画分の割合を算出した.

結果と考察

hAC_15m の HSA に対する親和性を確認するため、表面プラズモン共鳴 (SPR) による結合解析を行った。結果、hAC_15m は HSA に対し特異的に結合することが確かめられた。さらに、hAC_15m のセンサーグラムは 1 : 1 結合モデルに対し良好なフィッティングを示し、 $K_D = 1.14 \mu\text{M}$ の親和性をもつことが確かめられた (図 12)。これは、全ての接触残基を導入した hAC_18m よりも HSA に対する高い親和性をもつことを示している。hAC_15m と hAC_18m の結合速度定数 k_{on} はそれぞれ $7.57 \times 10^4 (\text{Ms})^{-1}$ 、 $7.39 \times 10^3 (\text{Ms})^{-1}$ 、解離速度定数 k_{off} はそれぞれ $8.65 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ 、 $3.82 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ であり、hAC_15m における親和性の向上には k_{on} の上昇が寄与していることが判明した。

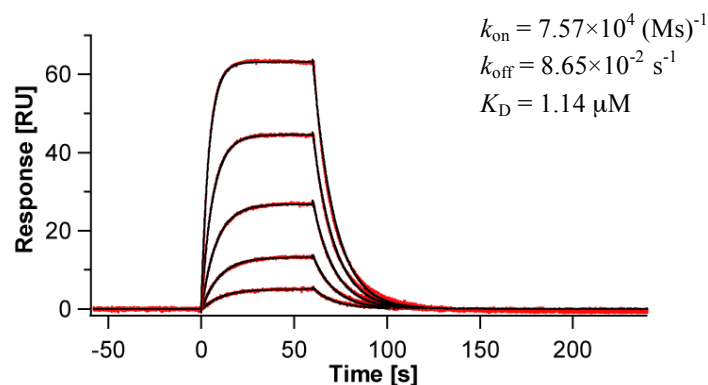


図12. HSAを固定化(約1000 RU)したCM5センサーチップにおけるhAC_15mのセンサーグラム
Running bufferはPBST (0.005 % Tween20), flow rateは30 $\mu\text{L}/\text{min}$. センサーグラムはblankのflow cell
およびrunning bufferを差し引きした。フィッティングモデルは1 : 1modelを採用し、 R_{max} はlocalに
算出した。hAC_15m の濃度は125, 250, 500, 1000, 2000 nM.

hAC_15m の CD スペクトルは hAC, hAC_18m と比較してモル楕円率がやや高いが、 α ヘリックス構造に特徴的なスペクトルを示していた (図 13A). この結果は hAC_15m, hAC, hAC_18m の間で二次構造に大きな違いがないことを示している.

また、モル楕円率変化に基づく熱安定性解析の結果、hAC_15m の T_m は 311.6 K であり、hAC_18m ($T_m = 314.8$ K) と比較すると 3 K 程度の差であり、両者の T_m の差はほとんどないことが明らかになった (図 13B). これらの結果より、hAC_15m は hAC_18m と比較して二次構造の大きな変化はなく、また熱安定性についても大きな差は確認されなかった.

これらの結果より、hAC_15m の結合力の強化には k_{on} の増加が関与しており、hAC_15m と hAC_18m 間の二次構造の割合と熱安定性に大きな変化がなかったことが判明した. タンパク質間相互作用における k_{on} が増加する要因として、結合に寄与する電荷の追加、結合可能なコンフォメーションの安定化によるシンプルな結合様式の実現があげられる. hAC_15m の設計では、hAC_18m よりも HSA 接触残基数を減少させていることから、結合に寄与する電荷の追加による k_{on} の増加は考えにくい. したがって、コンフォメーションの安定化によるシンプルな結合様式の実現が k_{on} の増加に寄与していると考えられる. また、熱安定性解析の結果から、hAC_15m は hAC_18m と比較して分子全体の熱安定性の向上がみられたわけではないため、hAC_15m の k_{on} の上昇、すなわち親和性の向上には、局所的な構造、特に HSA に対する結合界面を含む領域の構造の安定化が寄与したと考えられる.

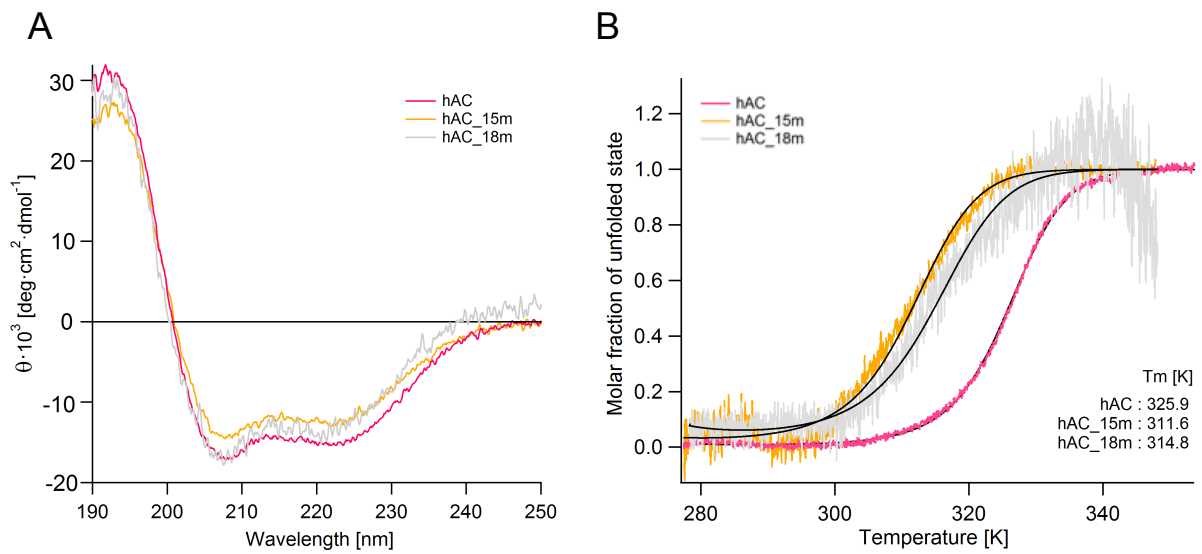


図13. hAC, hAC_15m, hAC_18mのCDスペクトル, 熱安定性測定, 疎水性プローブを用いた蛍光測定

A. hAC, hAC_15m, hAC_18mのCDスペクトル. 測定温度は293.15 K (20 °C), サンプル濃度は50 μ g/ml, 溶液条件は20 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)

B. 278.15 – 353.15 K (5–75 °C) における熱変性測定. 222 nmのモル楕円率の変化を2状態熱変性モデル[32]でフィッティングし, 変性中点 T_m を算出した.

第 5 章 hAC 変異体の親和性強化

概要

第 4 章で HSA 接触残基を選択することによって設計された hAC_15m は, HSA に対し K_D = 約 1 μM で結合するが, 血中半減期延長に有効な分子を得るためには解離定数が 600 nM より強いことが望ましいという報告がある [5]. 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. 第 5 章では, 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. また, HSA 結合残基については GA module のみではなく, Protein G ABD の HSA 結合残基の追加も試みた.

方法

GA module の Thr24, Ser25 というアルブミン結合残基を追加するために, Leu35 を Thr へ (hAC_15m(L35T)), Thr36 を Ser へ (hAC_15m(T36S)) 変更した変異体を作製した. 一方, *Streptococcal* Protein G ABD の変異体解析 (アラニンスキヤニング) から判明した結合残基 [37] を追加した変異体も作製した. hAC 変異体のアミノ酸配列を図 14 に示す.

結果と考察

変異体の HSA に対する親和性を SPR で測定した(表 1, 図 15). hAC_15m(T36S) では $K_D = 618$ nM, hAC_15m(E41N) では $K_D = 283$ nM であり, GA module および ABD の結合残基を hAC_15m に追加することで親和性の向上を確認した. また, T36S, E41N の双方を 15m に導入した hAC_15m(T36S/E41N) を作製した. hAC_15m(T36S/E41N) の HSA に対する親和性は $K_D =$ 約 105 nM であった. この結果は, 結合残基の追加による HSA への親和性の向上を示すものである. なお, hAC_15m(L35T) と hAC_15m(E40K) は, 発現および精製過程において解析に十分なタンパク質量を得ることができず, 解析を行うことができなかった (data not shown).

各変異体と HSA 間の相互作用における速度定数を比較すると, hAC_15m(E41N) では hAC_15m と比較して結合速度定数 k_{on} が 2.2 倍増加したのに対し, hAC_15m(T36S/E41N) と hAC_15m(T36S) を比較すると k_{on} が 3.5 倍増加していた. これは hAC_15m と hAC_15m(T36S) では, E41N という変異導入による k_{on} への影響が異なることを示しており, T36S と E41N という 2 重変異がもたらすシナジー効果によって, k_{on} がより増加したと考えられる.

CD スペクトルの解析から, 各変異体の二次構造は hAC とほぼ変わらないことが示された(図 16A). また, 熱安定性については, hAC_15m と比較して hAC_15m(T36S) では T_m が 2.5 K 上昇, hAC_15m(E41N) では T_m が 1.9 K 減少していたが, 変異体間の T_m は同程度のものであった(図 16B). これは, 変異体に共通する残基が, 似たような機構で安定性に影響を及ぼしていることを示唆している.

以上の結果から, hAC_15m に GA module および Protein G ABD の結合残基を 1 残基ずつ追加することで, タンパク質医薬の血中滞留性を向上させるのに必要な HSA 親和性をもつ変異体 hAC_15m(E41N) ($K_D = 283$ nM), hAC_15m(T36S/E41N) ($K_D = 105$ nM) が得られた.

Protein G ABD	¹³ DKYGV-SDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP ⁴⁶
GA module	¹⁹ KKAGITSDFYFNAINKAKTVEEVNALKNEILKAHA ⁵³
hAC_18m	³⁰ ISDGI <u>TS</u> I <u>FYEE</u> AVR <u>KAKT</u> Q <u>EARA</u> ALLI <u>EI</u> I <u>L</u> AHD ⁶⁴
hAC_15m	³⁰ ISDGFLTI <u>FYEE</u> AVR <u>KAKT</u> Q <u>EARA</u> ALLI <u>EI</u> I <u>L</u> AHD ⁶⁴

hAC_15m(L35T)	³⁰ ISDGF <u>T</u> TI <u>FYEE</u> AVR <u>KAKT</u> Q <u>EARA</u> ALLI <u>EI</u> I <u>L</u> AHD ⁶⁴
hAC_15m(T36S)	³⁰ ISDGF <u>L</u> S <u>I</u> FYEEAVR <u>KAKT</u> Q <u>EARA</u> ALLI <u>EI</u> I <u>L</u> AHD ⁶⁴
hAC_15m(E40K)	³⁰ ISDGFLTI <u>FY</u> <u>K</u> EAVR <u>KAKT</u> Q <u>EARA</u> ALLI <u>EI</u> I <u>L</u> AHD ⁶⁴
hAC_15m(E41N)	³⁰ ISDGFLTI <u>FY</u> <u>E</u> NAV <u>R</u> <u>KAKT</u> Q <u>EARA</u> ALLI <u>EI</u> I <u>L</u> AHD ⁶⁴
hAC_15m(T36S/E41N)	³⁰ ISDGF <u>L</u> S <u>I</u> FY <u>E</u> NAV <u>R</u> <u>KAKT</u> Q <u>EARA</u> ALLI <u>EI</u> I <u>L</u> AHD ⁶⁴

hAC	³⁰ ISDGFLTISEEEKVRNEPTQQRAAMLKMKILK ⁶⁴

図 14. Protein G ABD, GA module, hAC 変異体, hAC のアミノ酸配列

HSA 結合領域のみ表示. 両端の数字は残基番号を示す. 赤字は GA module の HSA 接触残基, 青字は Protein G ABD の HSA 結合残基, 下線は移植した HSA 接触残基および結合残基.

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} [(Ms) ⁻¹]	k_{off} [s ⁻¹]	K_D [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}

*N.D.: the parameter is not determined due to low solubility

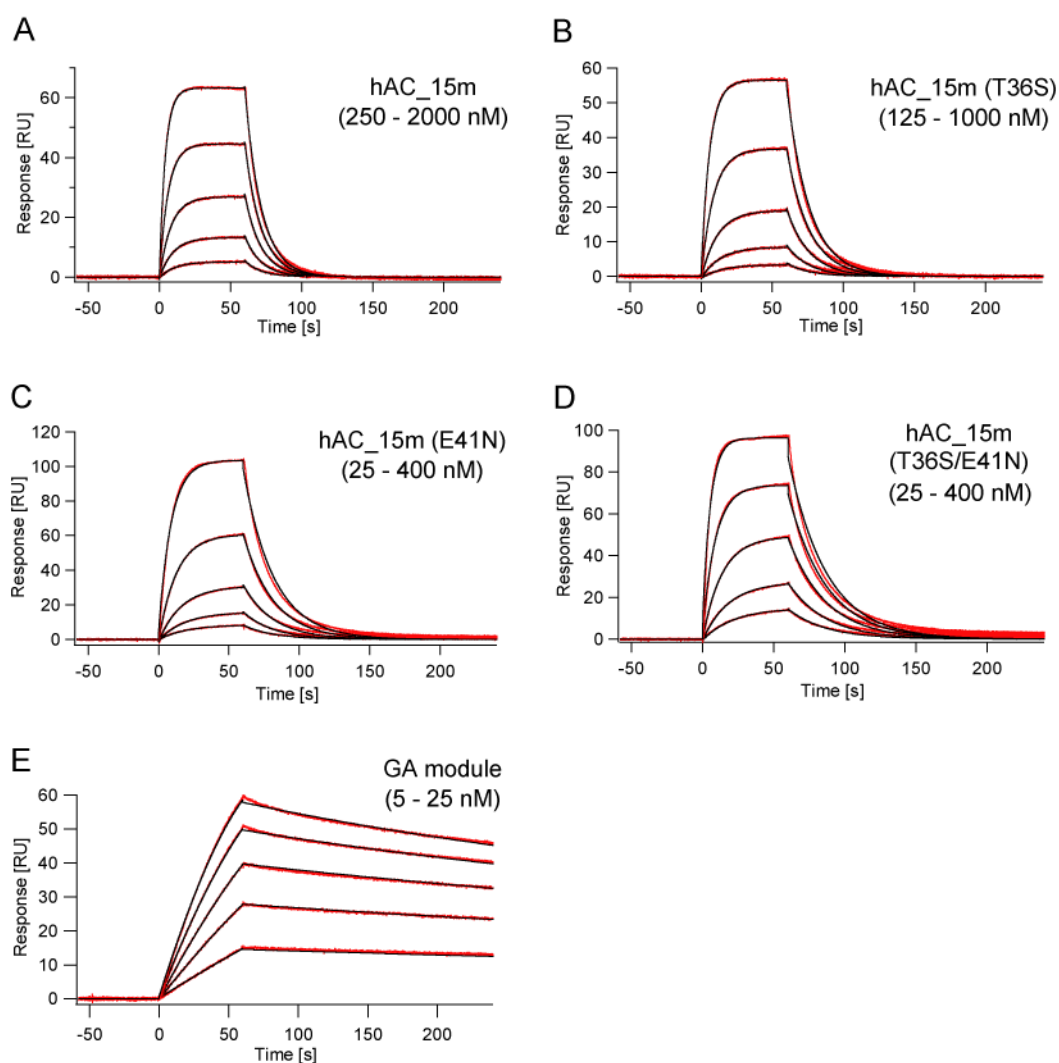


図15. HSAを固定化 (約1000 RU) したCM5センサーチップにおける各変異体のセンサーグラムとフィッティング。

Running bufferはPBST (0.005 % Tween20), flow rateは30 μ L/min. センサーグラムはblankのflow cellおよびrunning bufferを差し引きした。フィッティングモデルは1 : 1 modelを採用し,Rmaxはlocalに算出した。A. hAC_15m (125, 250, 500, 1000, 2000 nM), B. hAC_15m(T36S) (62.5, 125, 250, 500, 1000 nM), C. hAC_15m(E41N) (25, 50, 100, 200, 400 nM), D. hAC_15m (25, 50, 100, 200, 400 nM), E. GA module (5, 10, 15, 20, 25 nM)

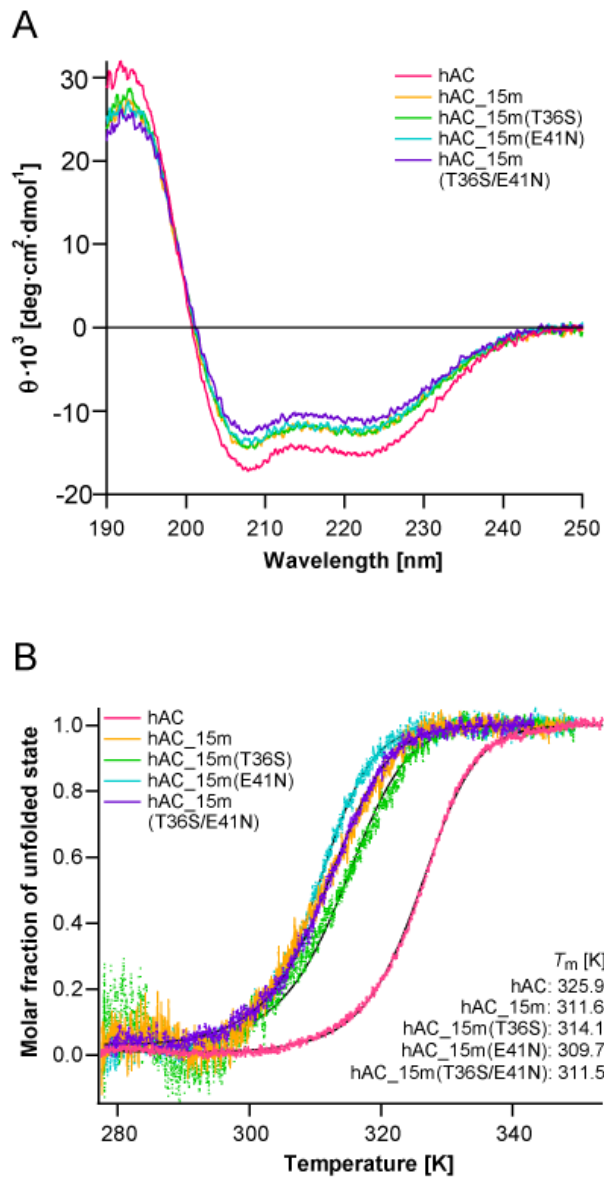


図16. hAC, hAC変異体のCDスペクトル, 熱安定性測定

A. hACおよびhAC変異体のCDスペクトル. 測定温度は293.15 K (20 °C), サンプル濃度は50 $\mu\text{g/mL}$, 溶液条件は20 mM リン酸ナトリウム (pH 7.4)

B. 278.15 – 353.15 K (5 – 75 °C) における熱変性測定. 222 nmのモル楕円率の変化を2状態熱変性モデル [32] でフィッティングし, 変性中点 T_m を算出した.

第6章 hAC 変異体 – HSA 間相互作用の熱力学的解析

概要

前章の HSA 結合残基の追加により, hAC の HSA に対する親和性が強化され, また二重変異の導入により, 結合速度定数 k_{on} が効果的に上昇するシナジー効果が観測された. しかしながら, hAC 変異体の HSA に対する親和性は GA module と比較すると約 100 倍低い.

本章では, hAC の親和性強化機構および GA module との親和性の差が生まれる原因について議論するため, van't Hoff 式に基づく熱力学的パラメータの算出および Eyring 式に基づく遷移状態解析を行った.

原理

van't Hoff 式に基づく熱力学的パラメータの算出

絶対温度 T において, 反応前の系と反応後の系が平衡状態にある時, その平衡定数 K は,

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (1)$$

ここで, ΔG は反応前と反応後の状態の自由エネルギーの差, R は気体定数 である.

また, ΔG とエンタルピー変化 ΔH , エントロピー変化 ΔS との関係は,

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

である.

式 (2) に式 (1) を代入すると,

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (3)$$

式(3)は van't Hoff 式である。温度の逆数に対する平衡定数(本論文ではタンパク質間相互作用における解離定数)の対数をプロットし, 最小二乗法を用いることで得られた直線の傾きと切片より, タンパク質間相互作用における ΔH および ΔS を求めることができる(図17)。

また, ΔH , ΔS , ΔG と熱容量変化 ΔC_p の関係は, 以下の式で表される。

$$\Delta H(T) = \Delta H(T_0) + \Delta C_p(T - T_0) \quad (4)$$

$$\Delta S(T) = \Delta S(T_0) + \Delta C_p \ln(T/T_0) \quad (5)$$

$$\Delta G(T) = \Delta H(T_0) - T\Delta S(T_0) + \Delta C_p[(T - T_0) - T\ln(T/T_0)] \quad (6)$$

ここで, T_0 は参照温度(通常は 298.15 K)である。

上記の式より, 式(3)は,

$$\ln K_D = \frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R} + \frac{\Delta C_p}{R} \left[\frac{(T - T_0)}{T} - \ln \left(\frac{T_0}{T} \right) \right] \quad (7)$$

に変形され, 温度の逆数に対する解離定数の対数のプロットに対し, 式(7)による非線形回帰分析を行うことで, ΔC_p を同時に求めることができる。

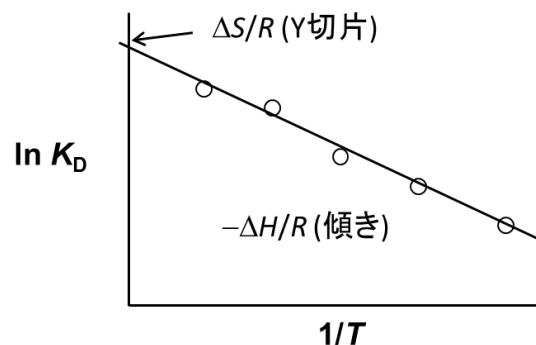
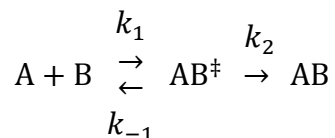


図17. van't Hoff プロットによる熱力学パラメータの算出

絶対温度の逆数に対する解離定数の対数のプロットをとり, 最小二乗法で求められた直線のY切片と傾きから反応系(タンパク質間相互作用)のエントロピー変化 ΔS とエンタルピー変化 ΔH を算出することができる。

Eyring 式に基づく遷移状態解析

分子 A と分子 B が結合し、複合体 AB が生成される系を想定すると、



AB^\ddagger は反応系における遷移状態 (Transition State) である。

未反応物と遷移状態の間の平衡定数を K^\ddagger とすると、 $K^\ddagger = [\text{AB}^\ddagger]/[\text{A}][\text{B}]$ であり、

各反応速度定数を k とすると、

$$k = \frac{k_B T}{h} K^\ddagger \quad (8)$$

k_B はボルツマン定数 ($1.381 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$), h はプランク定数 ($6.626 \times 10^{-34} \text{ J s}$) である。

K^\ddagger は式(3)における平衡定数 K と同じく、エンタルピー変化とエントロピー変化に相関があるので、

$$k = \left(\frac{k_B T}{h} \right) \exp \left(\frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \right) \quad (9)$$

ここで、 ΔS^\ddagger は活性化エントロピー、 ΔH^\ddagger は活性化エンタルピーである。

式(9)を変形して、

$$\ln \left(\frac{k}{T} \right) = \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \ln \left(\frac{k_B}{h} \right) \quad (10)$$

異なる絶対温度の逆数における、速度論パラメータ (k_{on} または k_{off}) を絶対温度で割った数値の対数のプロットに対し、式 (10) を用いた最小二乗法により得られた直線の傾きおよび切片から ΔS^\ddagger , ΔH^\ddagger が求められる (図 18)。また、式 (2) と同様の形で活性化エネルギー ΔG^\ddagger が求められる。

また, 式(4), (5), (6)を式 (10) に代入することにより,

$$\ln\left(\frac{k_{\text{on}}}{T}\right) = \frac{\Delta S_{\text{on}}^{\ddagger} - \Delta C_{\text{p,on}}^{\ddagger}}{R} + \ln\left(\frac{h}{k_{\text{B}}}\right) + \frac{\Delta C_{\text{p,on}}^{\ddagger} - \Delta H_{\text{on}}^{\ddagger}/T_0}{R}\left(\frac{T_0}{T}\right) - \frac{\Delta C_{\text{p,on}}^{\ddagger}}{R} \ln\left(\frac{T_0}{T}\right) \quad (11)$$

$$\ln\left(\frac{k_{\text{off}}}{T}\right) = \frac{\Delta S_{\text{off}}^{\ddagger} - \Delta C_{\text{p,off}}^{\ddagger}}{R} + \ln\left(\frac{h}{k_{\text{B}}}\right) + \frac{\Delta C_{\text{p,off}}^{\ddagger} - \Delta H_{\text{off}}^{\ddagger}/T_0}{R}\left(\frac{T_0}{T}\right) - \frac{\Delta C_{\text{p,off}}^{\ddagger}}{R} \ln\left(\frac{T_0}{T}\right) \quad (12)$$

$\Delta C_{\text{p,on}}^{\ddagger}$ は非結合状態から遷移状態に至る際の熱容量変化, $\Delta C_{\text{p,off}}^{\ddagger}$ は結合状態から遷移状態に至る際の熱容量変化である.

異なる絶対温度の逆数における, 速度論パラメータ(k_{on} または k_{off}) を絶対温度で割った数値の対数のプロットに対し, 式 (11) または式 (12) を用いた非線形回帰分析により, $\Delta C_{\text{p,on}}^{\ddagger}$ または $\Delta C_{\text{p,off}}^{\ddagger}$ を含めた熱力学パラメータの算出が可能となる.

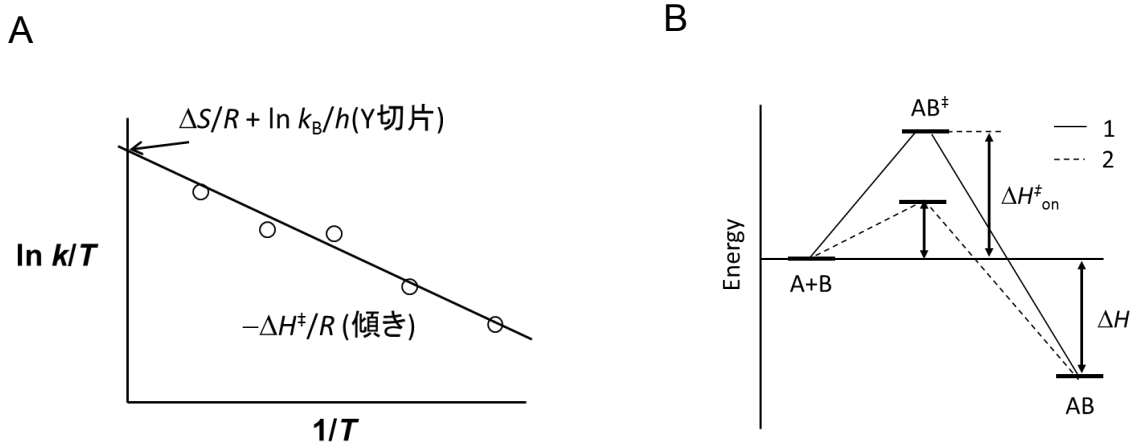


図18. Eyringプロットによる熱力学パラメータの算出と遷移状態解析

A. 絶対温度の逆数に対する, 速度論パラメータを絶対温度で割った数の対数のプロットをとる. 最小二乗法で求められた直線のY切片と傾きから反応系 (タンパク質間相互作用) の活性化エントロピー ΔS^{\ddagger} と活性化エンタルピー ΔH^{\ddagger} を算出することができる.

B. AとBが複合体ABを形成する反応系1と2における活性化エンタルピーの解析例. 反応系1, 2ともに平衡状態におけるエンタルピー変化 (ΔH) は同じであるが, 2は結合における活性化エンタルピー ($\Delta H_{\text{on}}^{\ddagger}$) が小さい, つまり結合におけるエンタルピー障壁が低いことがわかる.

方法

283 – 308 K (10 – 35 °C) において, hAC 変異体と GA module の HSA に対する K_D , k_{on} , k_{off} を前述の方法で決定した. 相互作用における Gibbs 自由エネルギー変化 (ΔG), エンタルピー変化 (ΔH), エントロピー変化 (ΔS), 熱容量変化 (ΔC_p) は van't Hoff プロットにおける非線形フィッティングから算出した (図 19A, B). 遷移状態に対する自由エネルギー変化 (ΔG^\ddagger_{on} , ΔG^\ddagger_{off}), エンタルピー変化 (ΔH^\ddagger_{on} , ΔH^\ddagger_{off}), エントロピー変化 (ΔS^\ddagger_{on} , ΔS^\ddagger_{off}), 熱容量変化 ($\Delta C_{p^\ddagger_{on}}$, $\Delta C_{p^\ddagger_{off}}$) は, 各温度における k_{on} , k_{off} から Eyring 解析によって算出した (図 20). van't Hoff プロット, Eyring プロットに対する非線形フィッティングは式 (7), (11), (12) を用いて行った.

結果と考察

hAC_15m と HSA 間の相互作用におけるエンタルピー変化(ΔH) は -37.74 kJ/mol, エントロピー変化($-T\Delta S$) = 3.82 kJ/mol であった (図 19C). この結果は, 両者の結合にエンタルピーが寄与していることを示している. hAC_15m(T36S), hAC_15m(E41N) においては, 結合によって有利なエンタルピー変化の増大と結合にとって不利なエントロピー変化の増大を観測し, エンタルピー・エントロピー補償を示唆する現象が観測された [38]. 反対に, hAC_15m(T36S/E41N) では, 結合によって有利なエンタルピー変化とエントロピー変化を観測した ($\Delta H = -29.43$ kJ/mol, $-T\Delta S = -10.41$ kJ/mol). 同様に, GA module と HSA 間の相互作用においても結合において有利なエンタルピー変化とエントロピー変化を観測した ($\Delta H =$

-21.82 kJ/mol, $-T\Delta S = -29.20$ kJ/mol). これは、平衡状態における hAC_15m(T36S/E41N)の結合様式が GA module の結合様式に類似していることを示唆しているものであり、二重変異による k_{on} へのシナジー効果にも関連があるものと考えられる.

Eyring 式に基づく遷移状態解析では、hAC_15m(T36S) が結合のエントロピー障壁 ($-T\Delta S_{on}^\ddagger$) を低下させ、hAC_15m(E41N) が結合のエントルピー障壁(ΔH_{on}^\ddagger)を低下させていることが判明した (図 21). 両者の変異を導入した hAC_15m(T36S/E41N) では、T36S 変異によって結合のエントロピー障壁 ($-T\Delta S_{on}^\ddagger$) が低下し、 T36S 変異によって生じる結合のエントルピー障壁 (ΔH_{on}^\ddagger) の増加を E41N 変異が抑え込む形で結合の活性化エネルギーを低下させていた (図 21). これにより、二重変異の導入によって生じたシナジー効果は、両者の変異が相補的に結合のエントロピー障壁およびエントルピー障壁を低下させた結果であることが判明した. その分子論的モデルとしては、T36S 変異 (第 5 章にて熱安定性を向上させた変異) は hAC 変異体の構造を安定させることで結合におけるエントロピーロスを軽減させることに寄与し、E41N 変異は HSA と非共有結合の形成を促すことに寄与していると考えられる. これらの性質が相補的に組み合わせることで hAC_15m に親和性を付与したというモデルが考えられる.

次に、遷移状態解析と熱容量変化をもとに、hAC_15m(T36S/E41N)と GA module の親和性の違いを生み出す原因について考えたい. 両者の遷移状態解析で得られる熱力学的パラメータは大きく異なっており、特に GA module においては活性化エントロピー ($-T\Delta S^\ddagger$) が存在しないことが判明した(図 21C).

また, GA module-HSA 相互作用の熱容量変化 (ΔC_p) は hAC 変異体-HSA 相互作用と比較して負の値が大きいという結果が得られた. hAC 変異体-HSA 相互作用における熱容量変化 (ΔC_p) は平均 $-1.9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ 程度であり, 典型的なタンパク質-タンパク質間相互作用における熱容量変化 ($\Delta C_p = -1.393 \pm 0.845 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) [39]に近い値であったが, GA module-HSA 間相互作用の ΔC_p は有意に大きい値を示した ($\Delta C_p = -4.03 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}\text{K}^{-1}$) (表 2).

GA module-HSA 間相互作用における活性化エントロピーの存在しない遷移状態, 大きな負の熱容量変化より考えられる現象は, GA module と HSA の結合においてタンパク質分子および水和水においてエントロピーロスがない状態, すなわち結合前と結合後に主鎖構造および側鎖構造に動きがない「鍵と鍵穴モデル」の結合, および結合前と結合後でエントロピーを低下させない水和水の配置である. また, 負の熱容量変化は主に脱水和に起因しており, この脱水和は両者が非常に相補性の高い結合を形成することで引き起こされたものであると考えられる. この相補性の高い「鍵と鍵穴モデル」の結合が, GA module がもつ高い親和性の要因であると考えられる.

一方, hAC_15m(T36S/E41N) では, 遷移状態におけるエントロピーロスが発生し, また熱容量変化の大きさも GA module の 2.5 分の 1 程度であった. hAC 変異体の作製時点で熱安定性が大きく低下していることから, 結合におけるエントロピーロスは, 主鎖の柔軟性および側鎖の配向の違いから生まれていると考えられる. また, 熱容量変化が小さいことから, HSA との相補性の高さに関しても GA module には及んでいないことが推測される.

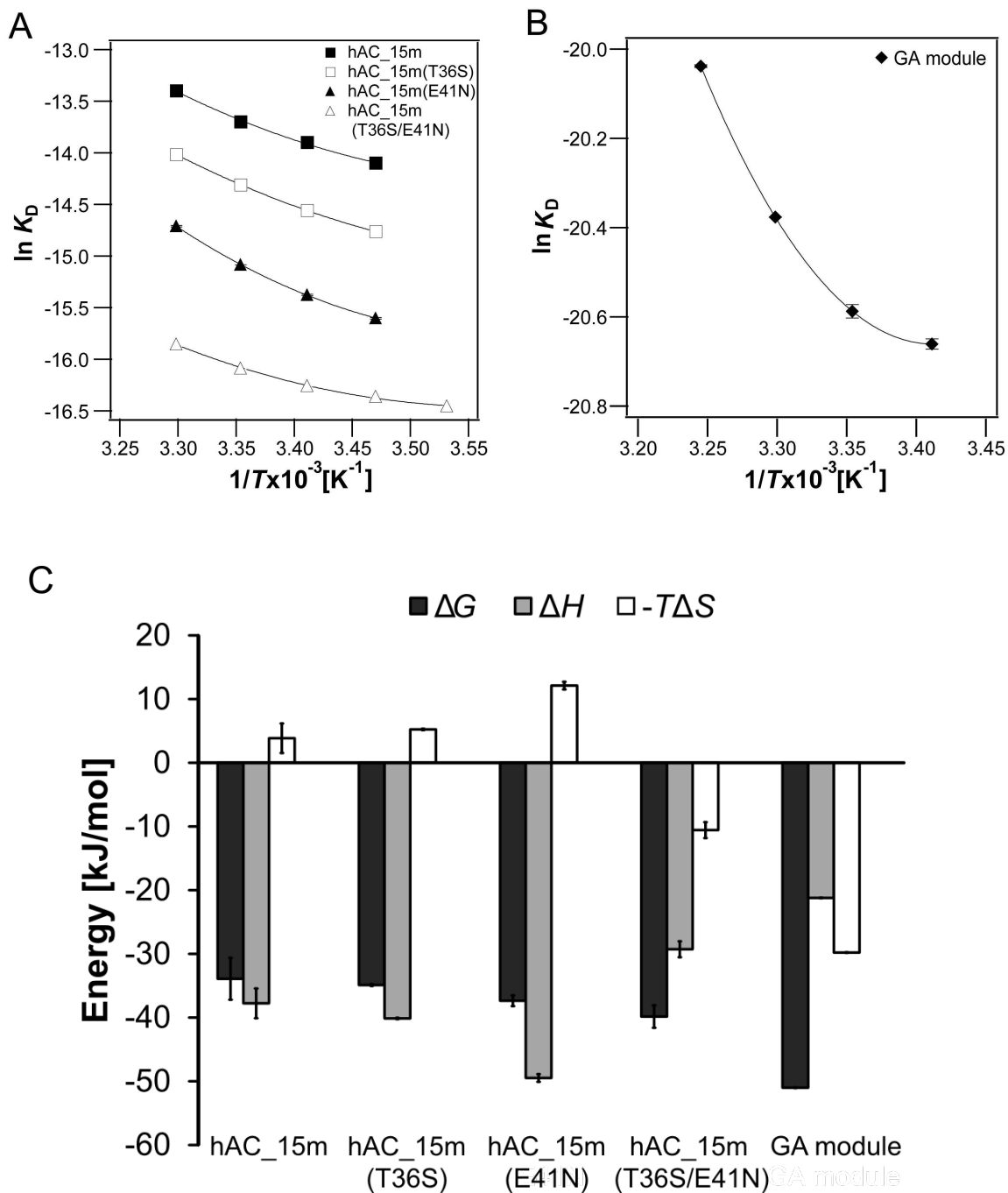


図19. hAC変異体およびGA module ンタルピー間相互作用における熱力学解析

A. hAC変異体-HSA間相互作用のvan't Hoffプロット

式(2)を用いて非線形フィッティングを行った. 各プロットはduplicate (n = 2) の平均値を示す.

square : hAC_15m, open square : hAC_15m(T36S), triangle : hAC_15m(E41N), open triangle : hAC_15m(T36S/E41N).

B. GA module-HSA間相互作用のvan't Hoffプロット.

C. 各変異体およびGA module-HSA間相互作用における自由エネルギー (ΔG), エンタルピー変化 (ΔH), エントロピー変化 ($-T\Delta S$). エラーバーは非線形フィッティングにおけるエラー値を示す.

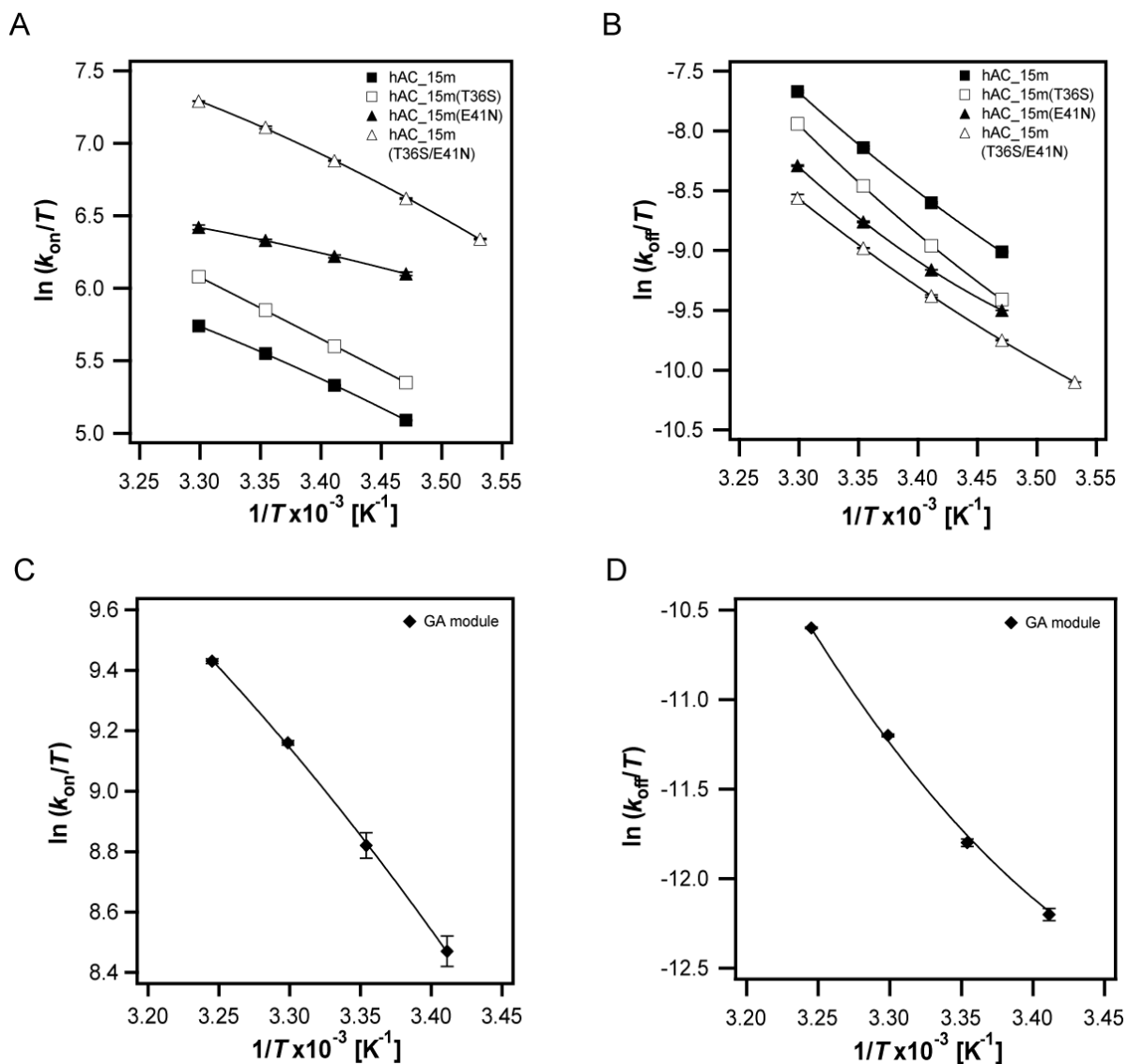


図20. hAC変異体およびGA module – HSA間相互作用におけるEyringプロット

A, B. 各変異体における k_{on} , k_{off} のEyringプロット. 各プロットはduplicate ($n = 2$) の平均値を示す.

非線形フィッティングは式(11),(12)を用いて行った. C, D. GA moduleにおける k_{on} , k_{off} のEyringプロット.

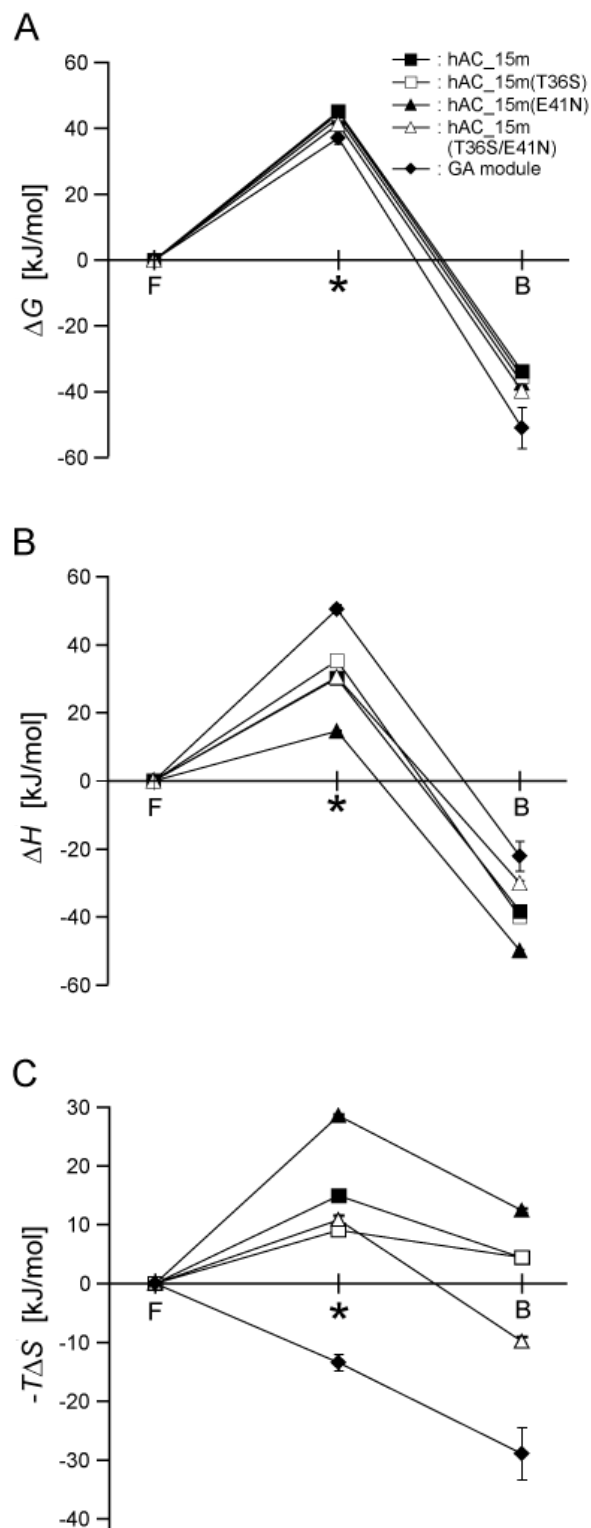


図21. hAC変異体-HSA間相互作用およびGA module-HSA間相互作用における遷移状態

A. 相互作用における活性化エネルギー, B. 相互作用における活性化エンタルピー, C. 相互作用における活性化エントロピー. エラーバーは非線形回帰分析におけるエラー値を示す.

表2. 平衡状態における熱容量変化 (ΔC_p) と遷移状態における熱容量変化 ($\Delta C_{p,\text{on}}^\ddagger$, $\Delta C_{p,\text{off}}^\ddagger$)

	ΔC_p [kJ mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta C_{p,\text{on}}^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹ K ⁻¹]	$\Delta C_{p,\text{off}}^\ddagger$ [kJ mol ⁻¹ K ⁻¹]
hAC_15m	-1.51±0.67	-0.51±0.08	1.32±0.25
hAC_15m(T36S)	-2.08±0.63	-0.42±0.13	1.66±0.18
hAC_15m(E41N)	-2.42±0.17	-0.33±0.07	2.21±0.10
hAC_15m(T36S/E41N)	-1.56±0.21	-0.66±0.12	0.90±0.03
GA module	-4.03±0.01	-0.46±0.42	3.56±1.30

ΔC_p は図 18 における van't Hoff プロットより算出し, $\Delta C_{p,\text{on}}^\ddagger$ と $\Delta C_{p,\text{off}}^\ddagger$ は図 19 における Eyring プロットより算出した. プラスマイナス記号は非線形回帰分析におけるエラー値を示す.

第7章 hAC 変異体, GA module 間の競合試験

概要

GA module は SA の II A-B ドメインに結合し, SA の FcRn 結合サイトには位置していない [19], [20]. FcRn は第1章で述べたように, SA と IgG の血中滞留時間を維持するうえで重要な受容体である [11]. 本研究でデザインしたタンパク質の HSA に結合する部位が GA module の結合サイトと同様であるかを確かめるために, GA module を固定化したセンサーチップを用いて SPR 測定を利用した競合アッセイを行った.

方法

SPR 測定を利用した競合アッセイは, Viht らの方法に従って行った [40]. 阻害剤 (0.1 nM-400 nM GA module または 1 nM - 4 μ M hAC_{15m}(T36S/E41N)) と 10 nM の HSA を混合し, 4 °C で終夜静置して平衡化させた. 平衡化した試料を, 1000 RU の GA module を固定化した CM5 センサーチップに 180 秒間インジェクトし, 阻害剤濃度ごとの結合レスポンスをプロットした. 阻害定数(K_i) は下記の式から算出した. 0.1 nM - 10 μ M hAC を阻害剤のネガティブコントロールとした.

$$Y = \left(\frac{A - K_i - 10^{\log_{10}(I)}}{2} + \frac{\sqrt{(10^{\log_{10}(I)} - A + K_i)^2 + K_i \times A}}{2} \right) \times \frac{(Y_{\max} - Y_{\min})}{A} + Y_{\min} \quad (13)$$

ここで Y は結合レスポンス, Y_{\max} と Y_{\min} はフィッティング式における結合レスポンスの最大値と最小値を示す. A は混合した HSA の濃度, I は阻害剤濃度, K_i は阻害定数を示す. Igor Pro 5.03J を用いて非線形回帰分析を実施した.

結果と考察

GA module と HSA を混合した試料では, GA module を固定化したセンサーチップ上で GA module 濃度依存的にレスポンスが低下することを確認した. K_i は 3.51 nM であった. これにより, センサーチップ上に固定化した GA module が溶液中の GA module と同様の HSA 結合サイトをもつことが確認された. 続いて, hAC_15m(T36S/E41N) と HSA を混合した試料において同様のアッセイを行ったところ, hAC_15m(T36S/E41N) 濃度依存的にレスポンスが低下していくことを確認した. K_i は 480 nM であった. なお, hAC を混合した試料では hAC 濃度依存的にレスポンスが低下していないことから, hAC_15m(T36S/E41N) 濃度依存的なレスポンスの低下は, hAC の改変によって生じたものであることが示された(図 22). 以上より, hAC_15m(T36S/E41N) が GA module と同様の HSA 結合サイトを所有していることが示された.

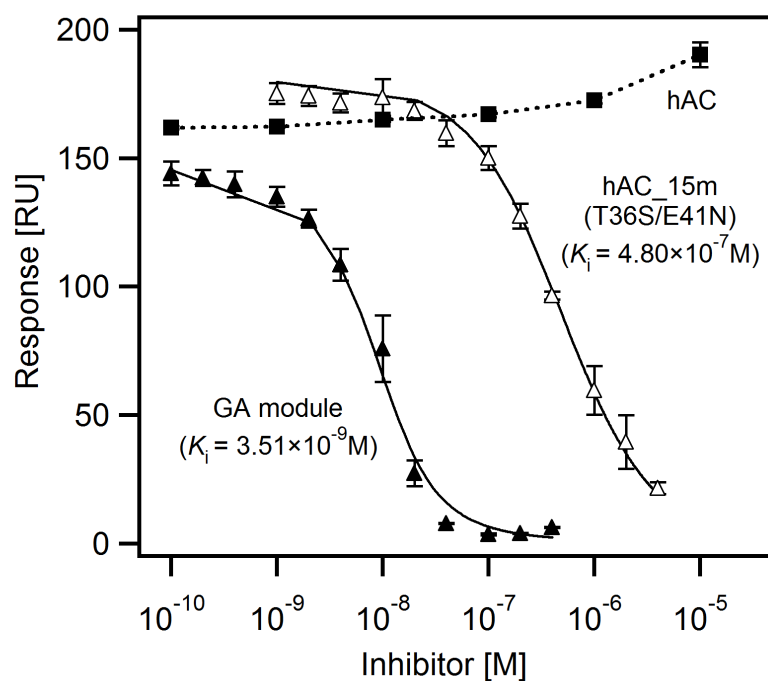


図22. GA module – HSA間相互作用に対する競合阻害

GA moduleをCM5センサーチップに固定化(約1000 RU)し、1 nM – 4 μ MのhAC_15m(T36S/E41N) (open square)と10 nMのHSAを混合・平衡化したアナライトのレスポンスを測定した。ポジティブコントロールとして、0.1 – 400 nMのGA module (closed square),ネガティブコントロールとして0.1 nM – 10 μ MのhAC (triangle, dashed line) を混合・平衡化したアナライトのレスポンスを測定した。プロットに対するフィッティングは式 (13) に基づく非線形回帰分析によって行い、 K_i 値を算出した。

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

概要

構造インフォマティクスに基づいて GA module の HSA 接触残基を移植し, さらに結合残基を追加することで HSA への親和性を強化したヒト型タンパク質 hAC_15m(T36S/E41N) は, タンパク質医薬の血中滞留性向上に必要とされる HSA への結合力をもち, 結合部位も HSA の GA module 結合部位と同様の位置であることが確認された. しかしながら, 合計で hAC の 17 残基が改変の対象となっており, 変異導入によって免疫反応に寄与する領域が新たに生成されたことが懸念される.

免疫原性を評価する方法として, *in vivo* 血中投与試験があるが, *in vivo* 血中投与試験は, ヒトタンパク質をベースとして設計されたヒト型タンパク質をマウスに投与する形となり, マウスで検出された免疫反応が hAC 変異体によるものであるか, 本来的にヒトタンパク質を投与したことによるものであるかを判断することは困難である.

これらの背景より, 本章では, hAC_15m(T36S/E41N) の免疫原性を *in vivo* 試験を用いることなく評価するために, hAC_15m(T36S/E41N) の T 細胞エピトープをコンピュータ上で予測する *in silico* 免疫原性評価を行うこととした.

方法と原理

タンパク質医薬における *in silico* 免疫原性試験

in silico 免疫原性試験は主に T 細胞エピトープを予測する手法 [41], B 細胞エピトープを予測する手法 [42] に大きく分けられる. T 細胞エピトープ予測においては, 細胞内で増殖するウイルス等が対象となる主要組織適合複合体 (MHC) クラス I と CD8 陽性 T 細胞の相互作用を対象にしたものと [43], 細胞外毒素等が対象となる MHC クラス II と CD4 陽性 T 細胞の相互作用を対象にしたもの [44] に分けられる. 本研究において設計した人工タンパク質は細胞外の抗原とみなされる可能性があるため, MHC クラス II と CD4 陽性 T 細胞の相互作用が予測対象となる. MHC クラス II と CD4 陽性 T 細胞の相互作用における T 細胞エピトープは, 1) 抗原提示細胞 (APC) による取り込みと消化, 2) 抗原が消化されてできた抗原ペプチドと APC 内の MHC II の複合体形成, 3) 抗原ペプチド-MHC II 複合体の CD4 陽性 T 細胞への提示, というプロセスにおいて T 細胞が認識する抗原ペプチドの配列を指す [45] (図 23). ただし, MHC II – CD4 陽性 T 細胞の相互作用を対象とした *in silico* T 細胞エピトープの予測においては, 認識機構が複雑な抗原ペプチド – MHC II と T 細胞間の認識ではなく, 抗原ペプチドと MHC II の複合体形成を予測することが主流であり, T 細胞エピトープの予測は MHC II 結合領域の予測と同義であるといえる.

B 細胞エピトープは, 抗原ペプチド – MHC II 複合体によって活性化されたヘルパー T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞) から刺激を受けることで抗原に対する抗体産生を行う B 細胞が抗原を取

り込む際に B 細胞受容体が認識する領域のことである (図 23). MHC との複合体形成とは異なり, B 細胞による認識には抗原の配列だけでなく立体構造も大きく関係することから, 立体構造が不明な抗原に対する B 細胞エピトープの予測はより難しいとされている [42]. hAC 変異体に関しては立体構造に基づいた B 細胞エピトープの予測は困難であるため, 本研究における hAC 変異体の *in silico* 免疫原性試験では T 細胞エピトープ予測を実施することとした.

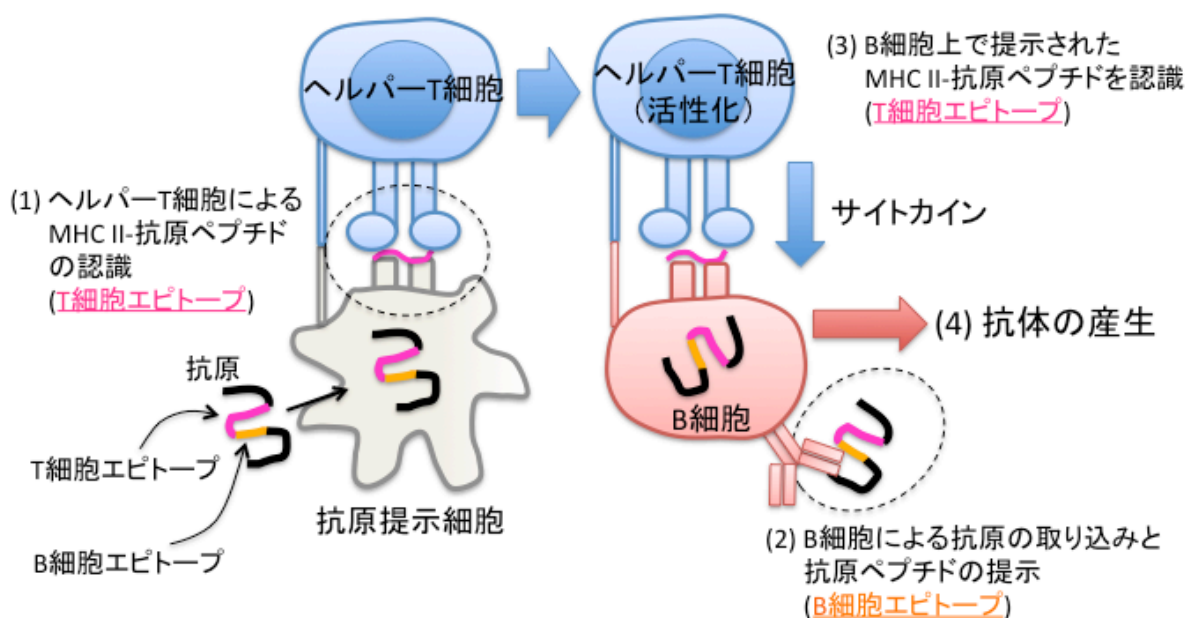


図 23. 抗原認識における T 細胞エピトープと B 細胞エピトープ

(1) 抗原提示細胞 (樹状細胞) が抗原を取り込み, 細胞内の消化を経て抗原ペプチド-MHC II の複合体をヘルパーT細胞に提示する. 抗原ペプチド-MHC II 複合体はヘルパーT細胞のT細胞受容体を介して認識され, ヘルパーT細胞が活性化する. このT細胞受容体の認識に必要な抗原ペプチドをT細胞エピトープという. (2) 一方, B細胞においても抗原の取り込みと提示が行われており, B細胞受容体と結合した抗原がB細胞に取り込まれ, 細胞内の消化を経て抗原ペプチド-MHC II 複合体として活性化されたヘルパーT細胞に提示される. このB細胞が認識する抗原の領域をB細胞エピトープという. (3) 活性化されたヘルパーT細胞はB細胞上に提示された抗原ペプチド-MHC II複合体を認識することで, B細胞に対しサイトカインを分泌する. (4) 活性化ヘルパーT細胞から刺激を受けたB細胞は抗原に対する抗体を算出する.

T 細胞エピトープ予測における Consensus 法

T 細胞エピトープ予測には MHC クラス I と MHC クラス II が対象のものに分けられるが前述の理由より, MHC クラス II を対象とした予測を行うこととした. T 細胞エピトープの予測ツールには, Immune Epitope Database (IEDB) の T Cell Epitope Prediction Tools を用いた[46]. このツールは, 過去に報告されている T 細胞エピトープ予測法を組み合わせる Consensus 法に基づいた予測を行うものである. T Cell Epitope Prediction Tools における Consensus 法は, T 細胞エピトープ予測ツールである NN-align [47], SMM-align [48], Combinatorial peptide scanning library, Sturniolo [49], NetMHCIIpan [50]のなかから信頼性の高い 3 種類のツールを選択し, 選択された 3 種類のツールにおける MHC と抗原ペプチド間の結合力に関するスコアの中央値を採用する方法である [44]. Consensus 法はエピトープ予測法を単独で用いた場合と比較して, 種々の HLA (ヒト白血球型抗原 = ヒト MHC) 型に対する予測精度が向上したことが確かめられている [44]. ヒトがもつ HLA 型には本質的に多様性があるが, 種々の HLA 型に対し予測精度を高めている Consensus 法は, 様々なヒトにおける抗原の免疫原性を予測する上で有効な手法であるといえる.

予測対象とエピトープペプチドの判定

本章では, T Cell Epitope Prediction Tools においてエピトープペプチドとの親和性を予測する HLA 型として, HLA-DRB*0101, HLA-DRB*0301, HLA-DRB*0701, HLA-DRB*0801, HLA-DRB*1101, HLA-DRB*1301, HLA-DRB*1501 を用いた. これらの HLA 型は人類の 95 % をカバーする組み合わせである [51]. 抗原における T 細胞エピトープの予測対象は hAC_15m(T36S/E41N) の改変箇所と改変箇所の前後 15 残基を含む領域 (21-73) および hAC (21-73) とした. hAC_15m(T36S/E41N) の領域を限定した理由は, HSA 結合残基を導入することで新たに生じた配列が免疫原性をもつ可能性を検証するためである.

各 HLA 型とエピトープペプチドとの親和性予測においては, タンパク質のアミノ酸配列を 15-mer の Overlapping ペプチドフラグメント (例えば, 残基番号 1 - 15, 残基番号 2 - 16, . . . のペプチド) に分け, それぞれの 9-mer コア領域がもつ MHC への親和性を前述の 5 つのツールで予測した. 5 つのツールのうち最も信頼性の高い 3 つのツールの予測スコアの中央値を consensus percentile rank (CPR) というスコアとして採用した (図 24). なお, CPR スコアと予測ツールが算出した raw スコアおよび IC_{50} は変換可能であり, 本章では CPR スコアから IC_{50} を算出し, $IC_{50} < 1000$ nM と予測されたペプチドをエピトープとして判定した. なお, CPR スコアとして採用された予測ツールが Sturniolo 法であった場合, IC_{50} は算出されないため結合力の判定には raw score を利用し, Sturniolo に記録されているデータセットのうち上位 2% の raw score が算出されたペプチドをエピトープとして判定した.

IEDB Consensus Methods

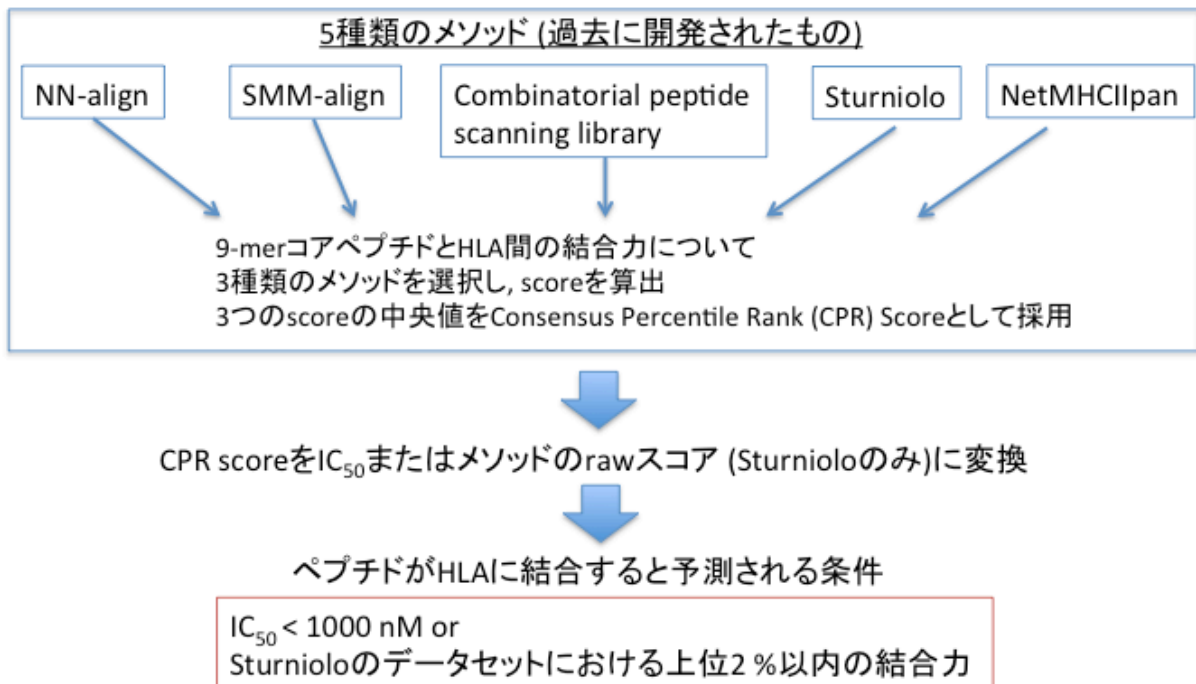


図24. Consensus法によるT細胞エピトープの判定

Consensus法はIEDBのT Cell Epitope Prediction Tools を用いて実施した。7種類のHLA型 (クラスII) を対象に、抗原を15-merのOverlappingペプチドに分け、その中の9-merコアペプチドとHLA間の結合力を過去に開発された5つのツールで予測した。その中から信頼性の高い結果を出した3種類のツールを選択後、各scoreを算出した。3つのscoreの中央値をConsensus Percentile Rank (CPR) scoreとして採用した。CPR scoreは各ツールのraw scoreおよび IC_{50} と対応しており、CPRスコアから各ペプチドとHLAの結合力を予測することができる (ただし、Sturnioloはraw scoreのみ)。 $IC_{50} < 1000$ nM またはSturnioloに記録されているデータセットにおける上位2%以内の結合力をもつと予測されたペプチドをエピトープとして判定した。

結果と考察

hAC, hAC 変異体, ABD, GA module における T 細胞エピトープの分布

予測上の $IC_{50} < 1000$ nM または Sturniolo の raw score がデータセット中の上位 2%以内と判定された場合を基準として, hAC, hAC_15m(T36S/E41N), Protein G ABD, GA module の T 細胞エピトープの分布を解析した (図 25). hAC (21 – 73), hAC_15m(T36S/E41N) (21 – 73), Protein G ABD, GA module のエピトープ数はそれぞれ 7, 17, 22, 15 であり, hAC_15m (T36S/E41N) のエピトープ数が野生型の hAC と比較して増加していると予測された.

しかし, Protein G ABD と比較すると hAC_15m(T36S/E41N) のエピトープ数は少なく, 複数の HLA 型に対して結合可能なエピトープ (プロミスキャスエピトープ) を含めた HLA 結合数についても少ないと予測された. HLA 結合数が少ないことは抗原提示細胞における抗原提示の機会が少ないことを意味しており, hAC_15m(T36S/E41N) は Protein G ABD と比較して抗原提示の機会が少ない, すなわち抗体産生をはじめとした免疫反応を惹起するリスクが低いことが期待できる.

また, GA module と比較すると hAC_15m(T36S/E41N) のエピトープ数が多いと予測されたが, プロミスキャスエピトープの HLA 結合数については GA module の方が多いと予測された. プロミスキャスエピトープは抗原提示の機会が多い領域であることが知られており [52], 異種タンパク質の低免疫原性化やワクチン設計において注目されている領域である. したが

って, hAC_15m(T36S/E41N) は抗原提示の機会が多い領域が GA module より少なく, GA module と比較しても免疫原性のリスクが低減されたことを期待できる.

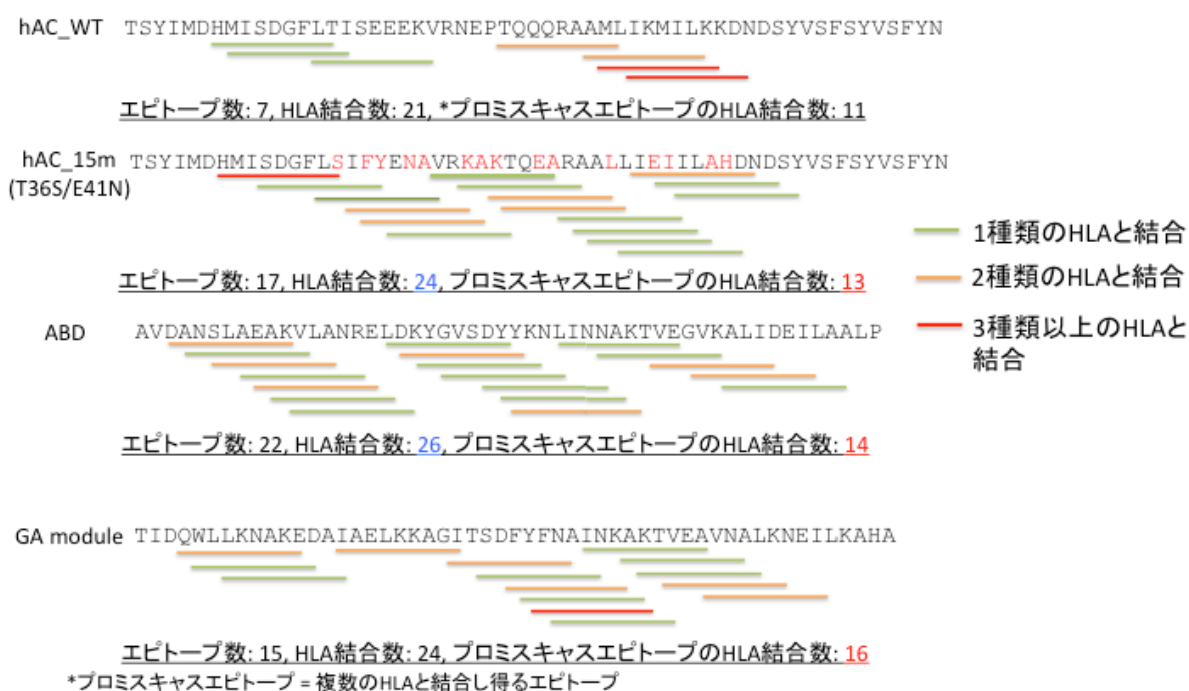


図25. hAC, hAC_15m(T36S/E41N), Protein G ABD, GA moduleの予測上のT細胞エピトープの分布

IEDBのT Cell Epitope Prediction Tools を用いて, 各タンパク質の15-mer overlappingペプチドの9-merコアと7種類のHLA型 (クラスII) の結合力を予測した. $IC_{50} < 1000$ nM またはSturmioloに記録されているデータセットにおける上位2 %以内の結合力をもつと予測されたペプチドをT細胞エピトープとして判定した. 1種類のHLAと結合するエピトープは緑色, 2種類以上のHLAと結合するエピトープは橙色, 3種類以上のHLAと結合するエピトープは赤色で示した. hAC_15m(T36S/E41N) の配列における赤字はhACに変異を導入した部位を示す.

第9章 総括

本研究では、タンパク質医薬の血中滞留性を改善する分子として有用ではあるが、抗原性が確認されている細菌由来の SA 結合ドメインを代替する分子を得ることを目的とした。主な研究手法としては、*Fingoldia magna* の HSA 接触残基をヒトタンパク質上に移植する分子グラフティングを実施することで、細菌由来の SA 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得ることを試みた。本章では、その過程で得られた知見を総括し、考察を行いたい。

第2章から第3章では、GA module の HSA 接触部位である2本のヘリックスと類似した主鎖構造をもつヒトタンパク質 hAC を対象に、全ての HSA 接触残基を移植した変異体 hAC_18m を作製した。nM オーダーの結合力をもつ GA module と比較して hAC_18m の HSA に対する親和性は非常に弱いものであった。222 nm のモル楕円率の変化を指標とした熱安定性解析により、hAC_18m は hAC と比較して変性中点温度 (T_m) が約 11 K (ケルビン) 低下していたことから、親和性が弱い原因は変異導入による構造の不安定化にあることが示唆された。

第4章では、変異導入による構造の不安定化を防ぐために、溶媒接触面積 (ASA) 比の算出と変異導入に伴うフォールディング自由エネルギー変化 ($\Delta\Delta G$) の予測をもとに、hAC に導入する HSA 接触残基を選択した。選択された15残基を移植した hAC_15m の HSA に対する親和性は解離定数 $K_D =$ 約 1 μM 程度まで向上したことが確認された。この親和性の向上が安定性の向上によるものであるかを検証するために、CD スペクトルの測定、熱安定性測定を行っ

たが、hAC_15m と hAC_18m においては大きな変化が確認されなかった。この結果は、移植残基の選択では、熱変性温度を上昇させるには至らなかったが、hAC_18m でみられた局所構造の不安定性を抑えたことが親和性の向上につながったことを意味していると考えられる。

第 5 章では、hAC 変異体の親和性をタンパク質医薬の血中滞留時間延長に有効な強度に向上させるため、GA module および Protein G ABD の HSA 結合残基を 1 残基ずつ導入する慎重な改変を行った。その結果、2 つの変異 (T36S, E41N) を組み合わせることにより、タンパク質医薬の血中滞留時間延長に有効な結合力をもつ変異体 hAC_15m(T36S/E41N) を取得することができた。この章では、HSA に対する非接触残基である E41N の方が結合力に対する寄与が大きいことが確認された。また 2 つの変異を組み合わせることで、1 つの変異による効果を足し合わせたものよりも大きい、いわゆるシナジー効果を確認した。これらの現象は、過去に報告があるものの、新規の結合タンパク質を設計する際に見積もることが難しく、今後のタンパク質設計において考慮すべき課題の 1 つであるといえる。

また、各変異体の熱安定性解析により、変異体間の熱安定性は大きく変わらないことが確認された。これは 1 残基ずつ慎重に結合残基を入れていく改変が有効であることを示している。一方、T36S という変異は $\Delta\Delta G$ の予測で不安定化すると見積もられていたが、実際は熱安定性を上げていることが判明した。本研究においては、主鎖の Flexibility を取り入れることで小さい側鎖から大きな側鎖への変異に対応した安定性変化予測を行う Eris server による予測結果のみを利用したが、一般的に $\Delta\Delta G$ の予測精度は現段階では高くなく [53]、一種類の手法

による予測結果をもとにした改変では構造安定化を精度良く行うことが困難であったと考えられる。主鎖の Flexibility を考慮するのであれば分子動力学シミュレーション等、他の手法を同時に取り入れることで、より精度の高い構造安定性変化予測と構造安定化に向けた改変を行うことができた可能性がある。また、基本的に $\Delta\Delta G$ の予測は1残基の変異に対するものであり、同時に複数残基に変異が入った場合の予測結果は各変異の予測値を加算した結果を示すのみである。複数変異によって起こる構造安定性への影響、すなわち複数変異によるシナジー効果を予測するのは計算過程がより複雑となるため困難である。複数変異による構造安定性変化の予測精度の向上は、今後の分子グラフィティンを含めたタンパク質の合理的デザインにおいてもより重要な課題となるであろう。

第6章では、熱力学的解析により hAC 変異体と HSA 間および GA module と HSA 間の相互作用における熱力学パラメータを算出し、hAC 変異体で親和性が向上した要因および GA module が hAC_15m(T36S/E41N) の 100 倍の親和性をもつ要因を考察した。その結果、hAC_15m(T36S/E41N) は他の hAC 変異体と異なり、エンタルピー・エントロピーの双方が結合に有利に働くことが判明した。これは 2 重変異によるシナジー効果とも関連があると考えられ、同時に結合様式が GA module に近づいたことが示唆された。遷移状態解析を行った結果、結合速度定数に対する 2 重変異のシナジー効果は、T36S による結合エントロピー障壁の低下と E41N による結合エンタルピー障壁の低下によって起こっていることが判明し、その分子機構としては T36S による局所構造の安定化および E41N による非共有結合の形成の促

進の組み合わせであることを提唱した。一方, GA module には活性化エントロピーが存在しておらず, また熱容量変化も非常に大きいことから, GA module と HSA 間の相互作用は脱水和を起こしながら高い相補性で結合する典型的な「鍵と鍵穴モデル」の結合をしていることを示唆しており, 結合におけるエントロピーロスをほとんど発生させないほどの相補性の高さが hAC 変異体との親和性の差を生み出していることが示唆された。

第 7 章では, SPR 法を用いた競合阻害試験により, hAC_15m(T36S/E41N) が GA module と同等の HSA 結合部位を持つことを明らかにし, 第 8 章では, hAC 変異体における免疫原性リスクを評価するために T 細胞エピトープ予測を行った。hAC_15m(T36S/E41N) では hAC と比較すると新たな T 細胞エピトープが生成されていると予測されたものの, HLA 結合数およびプロミスキュラスなエピトープの HLA 結合数は Protein G ABD および GA module と比較して少ないと予測された。これにより, hAC 変異体の免疫原性リスクは ABD および GA module よりも低減されたことが期待される。免疫原性リスクが予測されていることは, 免疫原性をより正しく判断できるが高コストな試験, 例えば末梢血単核細胞を利用した *in vitro* 試験や臨床試験に進む際にも重要な判断基準であり, 今回の *in silico* 免疫原性予測は, hAC 変異体の低免疫原性化の証明を進める際にも重要な結果を示しているといえる。

以上を踏まえて, hAC 変異体のタンパク質医薬の血中滞留性を向上させる分子としての性質を評価したい。親和性および HSA 結合部位については, 血中滞留時間を延長するには十分な結合力をもっており, HSA 結合部位についても GA module と同等であることから, HSA と

FcRn の相互作用を阻害しないことが期待される。生体内における安定性については、変性中点温度 (T_m) が 311.5 K (38.4 °C) にとどまっており、生体内で HSA への結合が可能なフォールドを保つことは困難であり、血中におけるプロテアーゼ耐性も低下している可能性が高いといえる。この構造不安定性は、第 5 章で述べたように hAC 変異体に共通した変異が関係している可能性が強いため、結合への寄与が少なく安定性を損ねるような変異を野生型の残基に戻す工程を経ることで、HSA への親和性を保ちながら安定性を向上させることが有効であると考えられる。免疫原性のリスクについては、第 8 章で述べたように、HSA 結合残基の導入により、新たな T 細胞エピトープの産生が予測されたが、Protein G ABD や GA module と比較して HLA に対する結合数が少ないと予測されており、これらの細菌由来アルブミン結合ドメインと比較して hAC 変異体は免疫原性のリスクが低下したことを期待できる。

以上を総括すると、構造情報に基づく変異箇所の慎重な選択と結合残基の追加による親和性の強化という 2 段階の分子グラフティングにより、細菌由来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ヒトタンパク質が設計された。設計過程で得られたタンパク質間相互作用の創出、タンパク質の構造安定性への影響に関する知見が今後のタンパク質工学研究の発展に貢献し、本研究で設計された人工タンパク質が新規の低リスク性アルブミン結合タンパク質のプロトタイプとして今後の医薬開発に貢献することを期待したい。

参考文献

- [1] B. Leader, Q. J. Baca, and D. E. Golan, “Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification.,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, pp. 21–39, 2008.
- [2] H. K. Binz, P. Amstutz, and A. Plückthun, “Engineering novel binding proteins from nonimmunoglobulin domains.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, pp. 1257–1268, 2005.
- [3] A. L. Nelson and J. M. Reichert, “Development trends for therapeutic antibody fragments.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 27, pp. 331–337, 2009.
- [4] E. D. Lobo, R. J. Hansen, and J. P. Balthasar, “Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics,” *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 93. pp. 2645–2668, 2004.
- [5] R. E. Kontermann, “Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 22. pp. 868–876, 2011.
- [6] Y. Levy, M. S. Hershfield, C. Fernandez-Mejia, S. H. Polmar, D. Scudiery, M. Berger, and R. U. Sorensen, “Adenosine deaminase deficiency with late onset of recurrent infections: response to treatment with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase.,” *J. Pediatr.*, vol. 113, no. 2, pp. 312–7, Aug. 1988.
- [7] S. Jevševar, M. Kunstelj, and V. G. Porekar, “PEGylation of therapeutic proteins,” *Biotechnol. J.*, vol. 5, pp. 113–128, 2010.
- [8] C. Huang, “Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY™ technology,” *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 20. pp. 692–699, 2009.
- [9] V. Gaberc-Porekar, I. Zore, B. Podobnik, and V. Menart, “Obstacles and pitfalls in the PEGylation of therapeutic proteins.,” *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, vol. 11, pp. 242–250, 2008.
- [10] T. P. Jr., *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*. Academic Press, San Diego, CA, 1995.
- [11] C. Chaudhury, S. Mehnaz, J. M. Robinson, W. L. Hayton, D. K. Pearl, D. C. Roopenian, and C. L. Anderson, “The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan.,” *J. Exp. Med.*, vol. 197, pp. 315–322, 2003.

- [12] M. S. Dennis, M. Zhang, Y. G. Meng, M. Kadkhodayan, D. Kirchhofer, D. Combs, and L. A. Damico, "Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins.," *J. Biol. Chem.*, vol. 277, pp. 35035–35043, 2002.
- [13] L. J. Holt, A. Basran, K. Jones, J. Chorlton, L. S. Jespers, N. D. Brewis, and I. M. Tomlinson, "Anti-serum albumin domain antibodies for extending the half-lives of short lived drugs," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 21, pp. 283–288, 2008.
- [14] A. Walker, G. Dunlevy, D. Rycroft, P. Topley, L. J. Holt, T. Herbert, M. Davies, F. Cook, S. Holmes, L. Jespers, and C. Herring, "Anti-serum albumin domain antibodies in the development of highly potent, efficacious and long-acting interferon," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 23, pp. 271–278, 2010.
- [15] S. C. Makrides, P. A. Nygren, B. Andrews, P. J. Ford, K. S. Evans, E. G. Hayman, H. Adari, M. Uhlén, and C. A. Toth, "Extended in vivo half-life of human soluble complement receptor type 1 fused to a serum albumin-binding receptor.," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 277, pp. 534–542, 1996.
- [16] R. Stork, D. Müller, and R. E. Kontermann, "A novel tri-functional antibody fusion protein with improved pharmacokinetic properties generated by fusing a bispecific single-chain diabody with an albumin-binding domain from streptococcal protein G," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 20, pp. 569–576, 2007.
- [17] L. Björck, W. Kastern, G. Lindahl, and K. Widebäck, "Streptococcal protein G, expressed by streptococci or by *Escherichia coli*, has separate binding sites for human albumin and IgG.," *Mol. Immunol.*, vol. 24, pp. 1113–1122, 1987.
- [18] J. T. Andersen, R. Pehrson, V. Tolmachev, M. B. Daba, L. Abrahmsén, and C. Ekblad, "Extending half-life by indirect targeting of the neonatal Fc receptor (FcRn) using a minimal albumin binding domain.," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, pp. 5234–5241, 2011.
- [19] S. Lejon, I.-M. Frick, L. Björck, M. Wikström, and S. Svensson, "Crystal structure and biological implications of a bacterial albumin binding module in complex with human serum albumin.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, pp. 42924–42928, 2004.
- [20] M. M. Schmidt, S. A. Townson, A. J. Andreucci, B. M. King, E. B. Schirmer, A. J. Murillo, C. Dombrowski, A. W. Tisdale, P. A. Lowden, A. L. Masci, J. T. Kovalchin, D. V. Erbe, K. D. Wittrup, E. S. Furfine, and T. M. Barnes, "Crystal structure of an HSA/FcRn complex reveals

- recycling by competitive mimicry of HSA ligands at a pH-dependent hydrophobic interface,” *Structure*, vol. 21, pp. 1966–1978, 2013.
- [21] A. Sjölander, P. Å. Nygren, S. Ståhl, K. Berzins, M. Uhlén, P. Perlmann, and R. Andersson, “The serum albumin-binding region of streptococcal protein G: A bacterial fusion partner with carrier-related properties,” *J. Immunol. Methods*, vol. 201, pp. 115–123, 1997.
- [22] P. Carter, L. Presta, C. M. Gorman, J. B. Ridgway, D. Henner, W. L. Wong, A. M. Rowland, C. Kotts, M. E. Carver, and H. M. Shepard, “Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 89, pp. 4285–4289, 1992.
- [23] J. R. Cantor, T. H. Yoo, A. Dixit, B. L. Iverson, T. G. Forsthuber, and G. Georgiou, “Therapeutic enzyme deimmunization by combinatorial T-cell epitope removal using neutral drift.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, pp. 1272–1277, 2011.
- [24] R. Mazor, A. N. Vassall, J. a Eberle, R. Beers, J. E. Weldon, D. J. Venzon, K. Y. Tsang, I. Benhar, and I. Pastan, “Identification and elimination of an immunodominant T-cell epitope in recombinant immunotoxins based on *Pseudomonas* exotoxin A.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, pp. E3597–603, 2012.
- [25] C. Li, M. Liu, J. Monbo, G. Zou, C. Li, W. Yuan, D. Zella, W. Y. Lu, and W. Lu, “Turning a scorpion toxin into an antitumor miniprotein,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 130, pp. 13546–13548, 2008.
- [26] C. Vita, C. Roumestand, F. Toma, and A. Ménez, “Scorpion toxins as natural scaffolds for protein engineering.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, pp. 6404–6408, 1995.
- [27] C. Vita, E. Drakopoulou, J. Vizzavona, S. Rochette, L. Martin, A. Ménez, C. Roumestand, Y. S. Yang, L. Ylisastigui, A. Benjouad, and J. C. Gluckman, “Rational engineering of a miniprotein that reproduces the core of the CD4 site interacting with HIV-1 envelope glycoprotein.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, pp. 13091–13096, 1999.
- [28] S. K. Sia and P. S. Kim, “Protein grafting of an HIV-1-inhibiting epitope.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, pp. 9756–9761, 2003.
- [29] E. Krissinel and K. Henrick, “Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State,” *J. Mol. Biol.*, vol. 372, pp. 774–797, 2007.

- [30] E. Krissinel and K. Henrick, "Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions," *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 60, pp. 2256–2268, 2004.
- [31] D. E. Vaughn, J. Rodriguez, Y. Lazebnik, and L. Joshua-Tor, "Crystal structure of Apaf-1 caspase recruitment domain: an alpha-helical Greek key fold for apoptotic signaling," *J. Mol. Biol.*, vol. 293, pp. 439–447, 1999.
- [32] S. Honda, N. Kobayashi, and E. Munekata, "Thermodynamics of a beta-hairpin structure: evidence for cooperative formation of folding nucleus," *J. Mol. Biol.*, vol. 295, pp. 269–278, 2000.
- [33] R. Fraczekiewicz and W. Braun, "Exact and efficient analytical calculation of the accessible surface areas and their gradients for macromolecules," *J. Comput. Chem.*, vol. 19, pp. 319–333, 1998.
- [34] S. Yin, F. Ding, and N. V. Dokholyan, "Eris: an automated estimator of protein stability," *Nature methods*, vol. 4, pp. 466–467, 2007.
- [35] S. Yin, F. Ding, and N. V. Dokholyan, "Modeling Backbone Flexibility Improves Protein Stability Estimation," *Structure*, vol. 15, pp. 1567–1576, 2007.
- [36] M. Go and S. Miyazawa, "Relationship between mutability, polarity and exteriority of amino acid residues in protein evolution," *Int. J. Pept. Protein Res.*, vol. 15, pp. 211–224, 1980.
- [37] M. Linhult, H. K. Binz, M. Uhlén, and S. Hober, "Mutational analysis of the interaction between albumin-binding domain from streptococcal protein G and human serum albumin," *Protein Sci.*, vol. 11, pp. 206–213, 2002.
- [38] J. D. Dunitz, "Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions," *Chem. Biol.*, vol. 2, pp. 709–712, 1995.
- [39] W. E. Stites, "Protein-Protein Interactions: Interface Structure, Binding Thermodynamics, and Mutational Analysis," *Chem. Rev.*, vol. 97, pp. 1233–1250, 1997.
- [40] K. Viht, S. Schweinsberg, M. Lust, A. Vaasa, G. Raidaru, D. Lavogina, A. Uri, and F. W. Herberg, "Surface-plasmon-resonance-based biosensor with immobilized bisubstrate analog inhibitor for the determination of affinities of ATP- and protein-competitive ligands of cAMP-dependent protein kinase," *Anal. Biochem.*, vol. 362, pp. 268–277, 2007.

- [41] V. Jawa, L. P. Cousens, M. Awwad, E. Wakshull, H. Kropshofer, and A. S. De Groot, “T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics: Preclinical assessment and mitigation,” *Clinical Immunology*, vol. 149. pp. 534–555, 2013.
- [42] Y. El-Manzalawy and V. Honavar, “Recent advances in B-cell epitope prediction methods.,” *Immunome Res.*, vol. 6 Suppl 2, p. S2, 2010.
- [43] K. C. Parker, M. Shields, M. DiBrino, A. Brooks, and J. E. Coligan, “Peptide binding to MHC class I molecules: implications for antigenic peptide prediction.,” *Immunol. Res.*, vol. 14, pp. 34–57, 1995.
- [44] P. Wang, J. Sidney, C. Dow, B. Mothé, A. Sette, and B. Peters, “A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 4, 2008.
- [45] M. G. Rudolph, R. L. Stanfield, and I. A. Wilson, “How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors.,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 24, pp. 419–466, 2006.
- [46] P. Wang, J. Sidney, Y. Kim, A. Sette, O. Lund, M. Nielsen, and B. Peters, “Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules.,” *BMC Bioinformatics*, vol. 11, p. 568, 2010.
- [47] M. Nielsen and O. Lund, “NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction.,” *BMC Bioinformatics*, vol. 10, p. 296, 2009.
- [48] M. Nielsen, C. Lundegaard, and O. Lund, “Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method.,” *BMC Bioinformatics*, vol. 8, p. 238, 2007.
- [49] T. Sturniolo, E. Bono, J. Ding, L. Radrizzani, O. Tuereci, U. Sahin, M. Braxenthaler, F. Gallazzi, M. P. Protti, F. Sinigaglia, and J. Hammer, “Generation of tissue-specific and promiscuous HLA ligand databases using DNA microarrays and virtual HLA class II matrices.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 17, pp. 555–561, 1999.
- [50] M. Nielsen, C. Lundegaard, T. Blicher, B. Peters, A. Sette, S. Justesen, S. Buus, and O. Lund, “Quantitative predictions of peptide binding to any HLA-DR molecule of known sequence: NetMHCIIpan,” *PLoS Comput. Biol.*, vol. 4, 2008.

- [51] S. Southwood, J. Sidney, A. Kondo, M. F. del Guercio, E. Appella, S. Hoffman, R. T. Kubo, R. W. Chesnut, H. M. Grey, and A. Sette, "Several common HLA-DR types share largely overlapping peptide binding repertoires.," *J. Immunol.*, vol. 160, pp. 3363–3373, 1998.
- [52] P. Panina-Bordignon, A. Tan, A. Termijtelen, S. Demotz, G. Corradin, and A. Lanzavecchia, "Universally immunogenic T cell epitopes: Promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells," *Eur. J. Immunol.*, vol. 19, pp. 2237–2242, 1989.
- [53] V. Potapov, M. Cohen, and G. Schreiber, "Assessing computational methods for predicting protein stability upon mutation: Good on average but not in the details," *Protein Eng. Des. Sel.*, vol. 22, pp. 553–560, 2009.

*Reproduced in part with permission from

S. Oshiro and S. Honda, "Imparting Albumin-Binding Affinity to a Human Protein by Mimicking the Contact Surface of a Bacterial Binding Protein," *ACS Chem. Biol.*, vol. 9, pp. 1052–1060, 2014.

DOI: 10.1021/cb400946m

Copyright © 2014 American Chemical Society

謝辞

本博士論文は私が東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 博士後期過程に入学後、3年半の研究成果をもとに執筆したものです。

本博士論文の指導教官および主査の本田 真也 客員教授 (独立行政法人 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 副部門長 兼 分子細胞育種研究グループ長) には研究計画から論文執筆にあたり多大なるご指導を賜りました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。本田先生には研究の様々な作法を教わり、私が目指す研究者像に大きな変化をもたらしました。尊敬する研究者として一歩でも近づくことのできるよう精進して参りたい次第です。

また、本論文副査の津本 浩平 先生, 伊藤 耕一 先生, 深井 周也 先生, 富井 健太郎 先生には、本論文の執筆にあたり研究の方向性について大変有意義なアドバイスを賜りました。先生方のご指導は博士課程における研究を様々な視点から考えるきっかけとなりました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

独立行政法人 産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門の渡邊 秀樹 主任研究員, 福田 展雄 研究員, 宮房 孝光 博士研究員には実験手法, 実験結果に対する考察, 論文執筆において多くの議論の機会とアドバイスを賜りましたことを御礼申し上げます。

また、原著論文の作成に際しご指導を賜りました清水 隆 名誉リサーチャー・客員研究員, 実験手法について様々なご助言を賜りました高橋 尚 博士研究員, 今村 比呂志 博士研究員, 大石 郁子 契約研究員, 馮 延文 契約研究員, 塚本 雅之 契約研究員に御礼申し上げます。

本田研究室の学生の八桁君, 鈴木さん, 卒業生の大原さん, 林田さんには日々研究に励んでいる姿を見て、自分も頑張ろうという気持ちになることができました。本当にありがとうございました。

最後に、様々なご心配をおかけしたと思いますが、博士課程修了まで温かく見守って下さりました両親には感謝の気持ちで一杯です。この場を借りて厚く御礼申し上げます。