

計算化学的手法による新規抗体のデザイン

徳 久 賢 治

Design of a Novel Antibody by a Computational Method

Kenji TOKUHISA

Antibody mutants have been designed by using a simple and time-saving computational method, where the amino acid sequences with a high specific affinity to a target antigen are taken into account. Transformation of the anti-hen egg lysozyme (HEWL) antibody (HyHEL10) into the anti-human lysozyme (HLZM) antibody has been made by protein engineering, three residues Tyr53, Ser54 and Ser56 on the heavy chain complementarity determining region 2 (CDR-H2) being mutated in a computer. Total 36 candidates out of 8,000 possible HyHEL10 mutants are nominated for the anti-HLZM antibody by evaluating the characteristic energy of each modeled HLZM:HyHEL10 mutant complexes. The designed antibody mutants recognized well the target antigen, HLZM, in the experiments and showed higher affinity to HLZM than the mutants selected from the mutant library constructed by a phage display system. This study strongly suggests possibility of applying protein engineering to the creation of a designed antibody against an arbitrary antigen.

1. 緒 言

これまで、多くの蛋白質の立体構造がX線結晶解析などにより明らかになり、構造解析された蛋白質は、その機能を立体構造と関連づけて理解することが可能となった。その結果、立体構造に基づいて機能の付与や改良を目標とした変異蛋白質のデザインが試みられ、その発現・精製が遺伝子工学を応用して行われてきた。その一方で、蛋白質の物性研究の進展や近年のコンピュータの性能向上に伴い、機能改変を目的とした蛋白質分子のデザインをコンピュータ・ケミストリーを用いて理論的に行う事も可能となってきた。これらの手法は、蛋白質間の相互作用、分子認識機構の解明にも適用できそうである。生体の免疫系で重要な働きをする抗体の最も重要な機能は分子認識である。抗体分子や抗原抗体複合体の立体構造を知る事によって認識の機構を明らかにし、認識機能の改変を指向したデザインが可

能である。デザインされた変異抗体を発現出来れば、改変された機能の確認が可能であるし、その立体構造を明らかに出来れば、さらに合理的なデザインが可能である。機能・構造からデザイン、発現、さらに機能・構造へと連なる研究サイクルを効率よく回転させるには、蛋白質結晶構造解析学、コンピュータ・ケミストリー、遺伝子工学、蛋白質工学などの広い分野の連携が必要である。これらの技術を相互の連携のもとに発展させ、生体による抗体のマチュレーション過程を生体外のコンピュータ上でのデザイン・選択系を用いる手法に置き換える事が出来れば、新規な抗体を脊椎動物体外で構築する事が可能であろう。医薬品を指向して、ヒト型の構造を持ち、任意の望ましい機能を有する新規抗体分子の構築も期待出来る。しかし、多くの機能蛋白質や細胞が関わる生体系の解明が図られ、免疫系の理解も進展しているものの、生体外での抗体の構築とヒトへの臨床的利用を実現するには不十分であ

る。本研究では、未だ遠い目標への第一歩となる基礎的な要素技術の構築を目指した。

抗体は超可変領域或いは相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる分子先端で、抗原を認識する。CDR以外の部分は固定された骨格構造であり、CDRを支えている¹⁾。それぞれのCDRは1つのカノニカル構造をとっており²⁾、in vitroの実験系で新規機能を有する変異抗体を調整する際にはCDRをデザインして変異が導入される³⁾。本研究の共同研究者である、東北大学大学院工学研究科・熊谷 泉 教授のグループでは、すでに、抗体の抗原認識に関与する可変領域断片を微生物の効率的発現系により作製し、部位特異的アミノ酸置換法並びに熱量測定により抗原抗体反応の詳細な解析を行い、抗原抗体反応のいくつかの基礎的な特徴を明らかにしてきた^{4) 5) 6) 7)}。加えてこのグループは、最近報告された繊維状ファージのコート蛋白質に異種蛋白質を融合し機能を保持したまま提示するシステムを改良し、より安定なファージ提示系を開発した⁸⁾。この改良によりファージへの異種蛋白質提示系の汎用性が飛躍的に高められた。さらに、改良した系を用いて、ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) 認識モノクローナル抗体 (HyHEL10) のCDRに無作為な変

異を導入したファージライブラリーを作製し、有効な変異体を選別する事により抗原認識能の改良或いは改良を目指す研究を展開してきた⁹⁾。その結果、HyHEL10変異体と異種抗原が形成する複合体の結合様式の予測をもとに、抗体のごく少数の部位を選択して変異を導入する事により、野生型が結合能を持たないジニトロフェノール或いは異種由来リゾチームに対する親和性を有する変異抗体の調整に成功した。それら実験的に得られた知見とX線結晶構造解析による蛋白質の詳細な立体構造を基礎にすれば、より精密な変異抗体のデザインへと発展させる事が可能であると推測された。本研究では、これまでの熊谷教授のグループの成果を発展させ、簡便かつ高速・高精度を目標に、コンピュータ・ケミストリーによる抗体デザインの可能性を追求した。加えて、デザインした変異抗体の発現と抗原に対する親和性の測定を同グループで実施し、我々の手法による抗体デザインの有効性を実証した。コンピュータ・ケミストリーによるアミノ酸配列デザインと遺伝子工学を応用した蛋白質の発現を組み合わせた研究はこれまで例がない。本研究は計算機実験と生化学実験の連携を図るのに恰好のテーマであったが、その連携が巧く機能し変異抗体への異種抗原認識能の付与に成

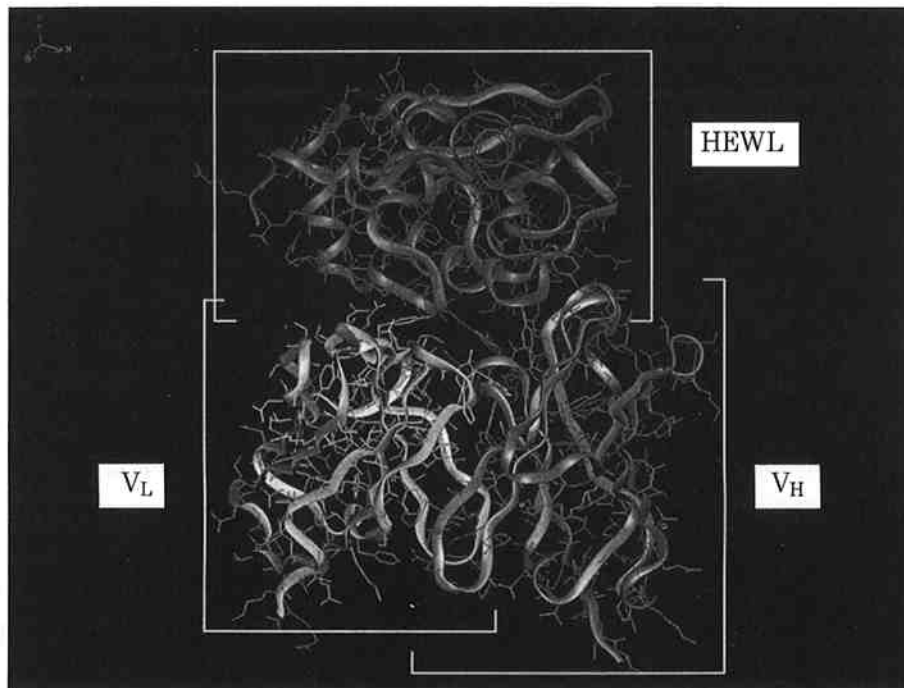


Fig. 1 The partial structure of the HEWL : HyHEL10 complex.

The C_L1 and C_H1 domains of HyHEL10 are deleted. The molecule of HEWL is shown in the upper side, V_L in the lower left side and V_H in the lower right side.

功した。抗体デザイン以外でも、分子認識や構造の安定性に検討を加える分野など応用範囲は広いと思われる。

具体的な研究目的は、X線結晶解析による詳細な立体構造が入手可能である事を条件に、「ニワトリ卵白リゾチーム (HEWL) 認識モノクローナル抗体 (HyHEL10) の認識能変換による構造類似異種抗原・ヒトリゾチーム (HLZM) 認識抗体の創成」とした。2つのリゾチーム (HEWL、HLZM) については、これらリゾチーム単独で結晶化して行った高分解能のX線結晶解析による詳細な立体構造を共同研究者である創薬技術研究所研究第3部松島正明部長が有していた^{10) 11)}。HEWL:HyHEL10複合体もX線結晶解析による立体構造の報告があり¹²⁾、座標がProtein Data Bank (PDB) に登録され公開されている (Fig. 1)。さらに、熊谷教授のグループによるファージ提示系による変異体ライブラリーを用いた検討で、HyHEL10変異体にHLZM認識能を獲得させる事に成功しており、適当なアミノ酸配列のHyHEL10変異体が異種抗原に対し親和性を示す事が明らかになっていた。しかし、ライブラリーからの選別で得られた変異体の

HLZMに体する親和性は、抗HEWL抗体である野生型の10倍程度であり、それほど高くは無かった。

2. コンピュータ・ケミストリーによるデザインの制約と利点

蛋白質や有機低分子化合物のデザインを行う際に、たかだか十個前後の限られた構造から、1ないし2個の望ましい機能を持つ構造を選択するのであれば、全ての構造について水中での精密なシミュレーションを行い^{13) 14) 15)}、その結果から得られる物理化学的性質の予測値をもとに判断するのが最も確実であろう。しかし、精密な計算機実験は大量の時間とコンピュータ資源を消費し、ワークステーション程度のコンピュータを用いても、手軽には実施出来ない。さらに、対象となる構造が大量に存在する場合はほとんどであり、現実的には、それぞれの構造に多くの時間や資源を充てる事は不可能である。本研究のデザインでは複数の残基を選択して変異させたが、アミノ酸の重合体である蛋白質の変異残基1カ所について20種類の自然界に存在するアミノ酸を考慮しなければならない。変異抗体を網羅的にモデリング・評価するためには20のn乗

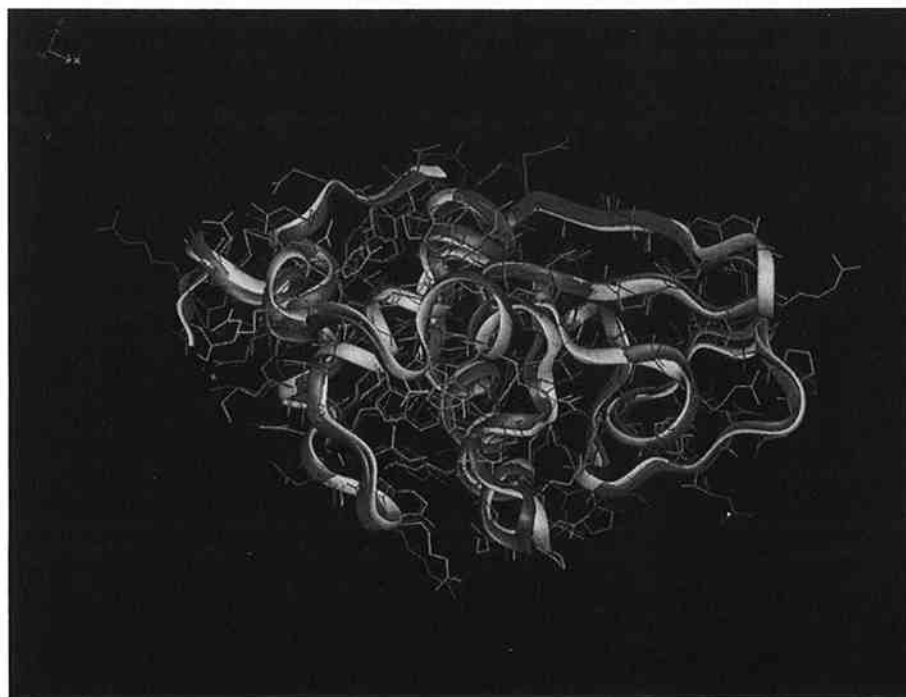


Fig. 2 The superposition of the molecule of HLZM on the molecule of HEWL in the complex.

The molecule of HEWL is shown in dark gray and that of HLZM in light gray. The molecule of HyHEL10 is deleted. The structure of HLZM is crystallographically re-refined at 1.5 Å resolution.

(n は変異導入する位置数)の変異体候補を取り扱わねばならない。本研究を行うにあたっては、

- 1) デザインを行う研究者の資質に頼らない汎用性の高い方法である事
- 2) 事前の篩分けを必要としない高速な評価法である事

の2点を念頭に、簡便なモデル構築法と大量のモデルの評価方法について検討を加えた。

3. 変異体モデルの構築

〔1〕 HyHEL10変異体とHLZMの結合様式

HEWLとHLZMはアミノ酸配列の相同性が高く(Fig. 2)、立体構造もよく似ている。さらに、HyHEL10はHLZMに体して若干の親和性を有する。これらの実験的に明らかにされた知見より、「HLZMを認識するHyHEL10変異体とHLZMの形成する複合体の結合様式は、HEWL:HyHEL10複合体の結合様式と同じである。」との仮説を立てた。本研究はこの仮説に従ってHLZM:HyHEL10変異体仮想複合体のモデリング

を行った。

〔2〕 変異導入位置の選択

HEWL:HyHEL10複合体の立体構造を観察すると、抗体H鎖上の相補性決定領域のループの1つであるCDR-H2の近傍が、2分子間で相補的な相互作用を及ぼしている領域に含まれていた。この領域で相互作用を及ぼしているHEWLのループのアミノ酸配列はSer100-Asp-Gly-Asn-Gly104である。一方のCDR-H2の配列はVal51-Ser-Tyr-Ser-Gly-Ser-Thr-Tyr58であり、特にTyr53、Ser54、Ser56、Tyr58の側鎖は先に示したHEWLのループの方向へ向いている。また、HEWLのループに相当するHLZMのループの配列はArg101-Asp-Pro-Gln-Gly105である。2つのリゾチームのアミノ酸配列の差異に注目すると、HEWLでは構造の自由度の高いGly102である残基がHLZMでは固定された環状構造を有し自由度の低いPro103に変わっている。先の仮説に従い、コンピュータ上でHEWL:HyHEL10複合体の立体構造のHEWL上に、2つのリゾチームの相当する主鎖原子を立体構

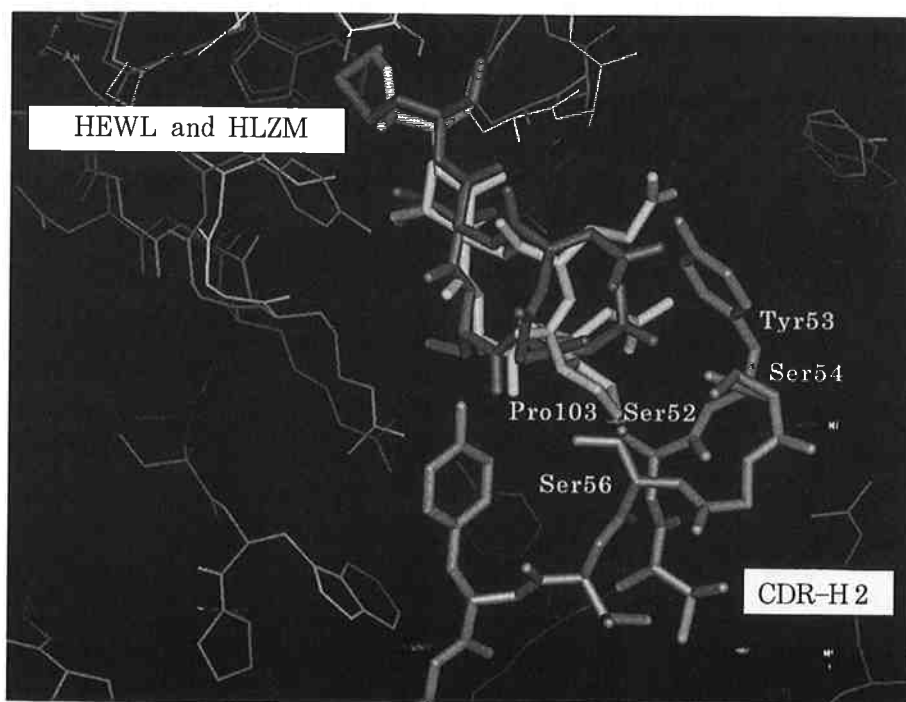


Fig. 3 The structural difference of HLZM and HEWL in the complex.

The super-imposed structures same as Fig. 2 are magnified around CDR-H2. The molecule of HEWL is shown in dark gray and that of HLZM in light gray in the upper side. The molecule of HyHEL10 is shown in dark gray in the lower side. CDR-H2 and closed loops of lysozymes are drawn as thick sticks. Gly101 of HEWL is replaced by Pro103 of HLZM. There are many short contacts between the Pro103 side chain atoms and the side chain atoms of Ser52 and Ser56 of CDR-H2.

造上で重ね合わせてHLZM分子に置換すると、Pro103はCDR-H2と衝突する (Fig. 3)。CDR-H2の部分こそHyHEL10がHLZMを認識する障害となっていると推測された。東北大学・熊谷教授グループによるフェージライブラリーを用いた実験でも、CDR-H2のTyr53、Ser54、Ser56の3残基に無作為変異を導入し、同Tyr58も数種のアミノ酸に変異させている。得られたフェージライブラリーから、高くはないもののHLZM認識能を有する変異体が得られている。以上の経緯から、CDR-H2上のアミノ酸の内、複合体中でリゾチーム側に側鎖が延び、Pro103に近いTyr53、Ser54、Ser56の3残基への変異導入体をHLZMを認識する抗体としてデザインした。

[3] 構造最適化条件

本研究では変異抗体複合体のモデリングにおいて Simulated Annealingによる構造最適化を行った。HEWL:HyHEL10複合体やHLZM:HyHEL10仮想複合体について行った予備的な検討の結果、Table 1に示す条件を採用した。100stepsのminimizationで原子間の衝突を除いた後、1 step = 1 fs (フェムト秒)でスケジュールに従って昇降温しながら15.4ps (ピコ秒)の分子動力学 (MD) 計算を行った。非結合相互作用項については14 Åでcut-offし、11~14 Åではswitch smoothing functionを採用し、距離に依存して本来の値より徐々に小さくなるように設定した。また、距離依存の誘電率 (ϵ) を用い、

$$\epsilon = \epsilon_0 \cdot r \quad (\epsilon_0 = 4)$$

とし、極性残基は非荷電の状態での計算を実施した。これらは、シミュレーションを非現実的な真空中で行うことによる非合理的な構造の発生を抑えるために設定

した条件である。

なお、本研究で使用したコンピュータケミストリー環境は以下の通りである

力場 : CHARMm*/RS/6000 (IBM)

グラフィック : Quanta4.0*/Indigo (SGI)

*Molecular Simulations, Inc., 200 Fifth Ave, Waltham, MA02254

[4] HEWL:HyHEL10複合体構造の修正

PDBに公開されているHEWL:HyHEL10複合体のX線構造解析結果の座標には歪みが大きく非合理的と判断される構造が幾つか認められる。このPDB座標のX線構造解析の分解能は2.7 Åと低く、高分解能の解析結果に比べ、得られた電子密度分布情報から構造モデルを組み立てる際に誤り、特に主鎖のコンフォメーションに誤りをおかす可能性が高い。不合理な構造はCDR-H2上にも存在し、Tyr53-Ser54の構造ではペプチド結合のカルボニル結合とSer54のC α -C β 結合が平行しており、大きな歪みエネルギーを内包していると推測された。また、東北大学・熊谷教授のグループによるCDR-H2に関するフェージライブラリーからの選抜で得られたHLZM親和性変異体にPro54を含むものが存在していた。PDB座標のままではProへの変換は困難であり、主鎖構造の改変を伴う大きな構造変化が必須である。他のアミノ酸配列でもHLZMに対する親和性の向上が認められる中、Pro54を含む変異体に限って大きな構造変化が生じているとは考えにくい。以上の理由から、CDR-H2のTyr53のC α -C間の結合の周囲の二面角を180°回転させた構造が合理的であると判断した。HyHEL10変異体のデザインに先立って、HEWL:HyHEL10複合体構造の修正を行っ

Table 1 Simulated Annealing Conditions

Time step	1 fs	
Dielectric constant	$\epsilon = \epsilon_0 \cdot r$ ($\epsilon_0 = 4$)	
Handling of polar residues	not charged	
Long-range interaction	a switch smoothing function (invoked at 11 Å and turned off at 14 Å)	
Protocol for the structure optimization by Molecular Dynamics		
Stage	Steps	Temperature [K]
Fast heating	400	0~400 (linear)
Equilibration	5000	400 (const.)
Slow cooling	10000	400~0 (linear)

A steepest descents minimization with 100 steps was performed to removed bad collisions in the complex structures before MD.

た。

X線構造解析結果について構造に疑問のあるCDR-H2のTyr53とSer54にGly55を加えた3残基の主鎖の構造に他の蛋白質の連続する3残基の主鎖の構造を移植した。移植候補構造は構造既知の蛋白質構造ライブラリーより検索した。検索条件は「両端のアミノ酸のC α 間の距離がTyr53とGly55のC α 間と同じ距離をとる連続した3残基」である。検出されたほとんどの構造がTyr53のC α -C間の結合の周囲の二面角を180°回転させた構造であった。二面角が180°回転し、3残基の前後の残基との位置関係が妥当な主鎖の構造を移植した。そのままではTyr53のBenzene環が結晶構造とは異なる方向を向くため、Tyr53側鎖の二面角を調整して同じ方向に向け、初期構造とした。この構造をSimulated Annealingにより最適化した。

[5] HLZM : HyHEL10野生型仮想複合体の作成

本研究では、先に述べた「HLZMを認識するHyHEL10変異体とHLZMの形成する複合体の結合様式は、HEWL : HyHEL10複合体の結合様式と同じである。」

という仮説を立てて検討を進めている。HyHEL10はHLZMに対する弱い親和性を有することから、この仮定に沿ってHLZM : HyHEL10野生型仮想複合体を構築し、その構造をもとにHyHEL10変異体の複合体を作成した。最初に、HEWL : HyHEL10複合体修正結晶構造中のHEWLにHLZMを重ね合わせた（主鎖のみ、512原子）。次に、最初の重ね合わせでRMSDが1.0Å以下の原子のみで重ね合わせを行った（407原子）。この重ね合わせを元に、HEWLをHLZMに置換すると、HLZM・Pro103にCDR-H2のSer56とSer52がぶつかっていた。これを初期構造とし、HyHEL10のSer52-Ser56のみをフリー、それ以外の原子を固定する束縛条件下Simulated Annealingにより構造を最適化した（Fig. 4）。

[6] 変異体の発生

ファージ提示系を用いるライブラリーから親和性変異体を選択する実験では、アミノ酸ごとの発現効率やフォールディングの難易度、系中のプロテアーゼによる分解などの多くの不可避な因子の影響で変異体の存

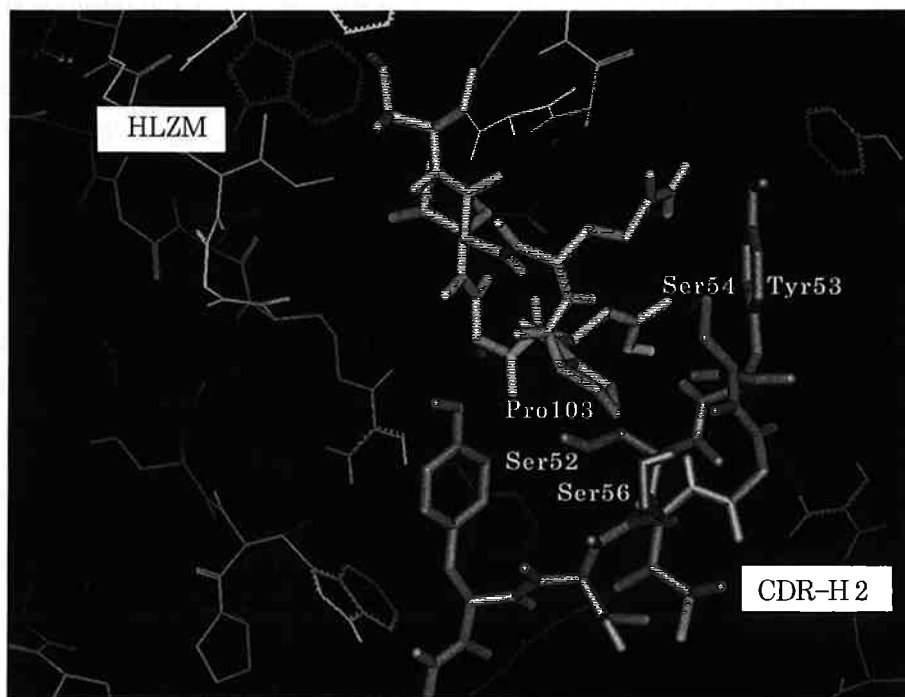


Fig. 4 The optimized CDR-H2 loop of the virtual HLZM : HyHEL10 complex.

The molecules are at same positions in Fig. 3. There are unrealistic structures in HEWL : HyHEL10 complex. The peptide bond between Tyr53 and Ser54 of CDR-H2 was turned and the loop structure was optimized. The HLZM molecule was super-imposed on the HEWL molecule and replaced, thus the initial structure of HLZM : HyHEL10 complex was obtained. After the succeeding optimization of CDR-H2, the loop structure was opened in order to release the collisions against the molecule of HLZM.

在に偏りや欠損が生じている可能性が高い。コンピュータ上では全ての変異体を同等に発生出来るため、事実上の網羅的な評価が可能である。CDR-H2のTyr53、Ser54、Ser56の3残基で20種類のアミノ酸全てへの変異を行うと、8000件の変異体を発生する必要がある。これら全てについて、Simulated Annealingによる構造最適化を行う事はワークステーションレベルでは現実的でない。一般に蛋白質に対して1ないし2残基程度の小規模な変異を導入しても、発現された蛋白質の立体構造はほとんど変化しないという経験がある。今回は変異を加える各残基位置ごとに全20種類のアミノ酸について最適コンホメーション(事実上、側鎖の最適コンホメーション)を求め、その最適コンホメーションを組み合わせる事によって全ての3残基変異体の仮想複合体を作成した。

(1) 各残基変異位置での各アミノ酸最適コンホメーションの作成

最初に、HLZM:HyHEL10野生型仮想複合体を用い、変異導入位置のいずれか1ヶ所のみ1残基変異

体を作成した。変異させた残基のみをフリー、それ以外の原子を固定する束縛条件下Simulated Annealingにより変異させた残基の構造を最適化した。この結果得られた残基のコンホメーションをその残基位置での変異したアミノ酸の最適コンホメーションとする。この操作を3ヶ所で20残基について行い、60件のSimulated Annealingを行った。この結果、60件のアミノ酸のコンホメーションからなる構造ライブラリーが得られた。

例: Tyr53をGluに変異させGlu53のみフリー、他の原子を固定する束縛条件下でSimulated Annealingを行った。得られたGluのコンホメーションをGlu53の最適コンホメーションとした。Glu53を含む400件の変異体では、Glu53に、ここで得られたコンホメーションを用いて全てのモデルを作製した(Fig. 5)。

(2) 8000件の変異体の作成

HLZM:HyHEL10野生型仮想複合体から変異を導入した3残基(Tyr53、Ser54、Ser56)を除いた部分構造と、作成した構造ライブラリーの各アミノ酸の最適コンホメーション3件を組み合わせHLZM:

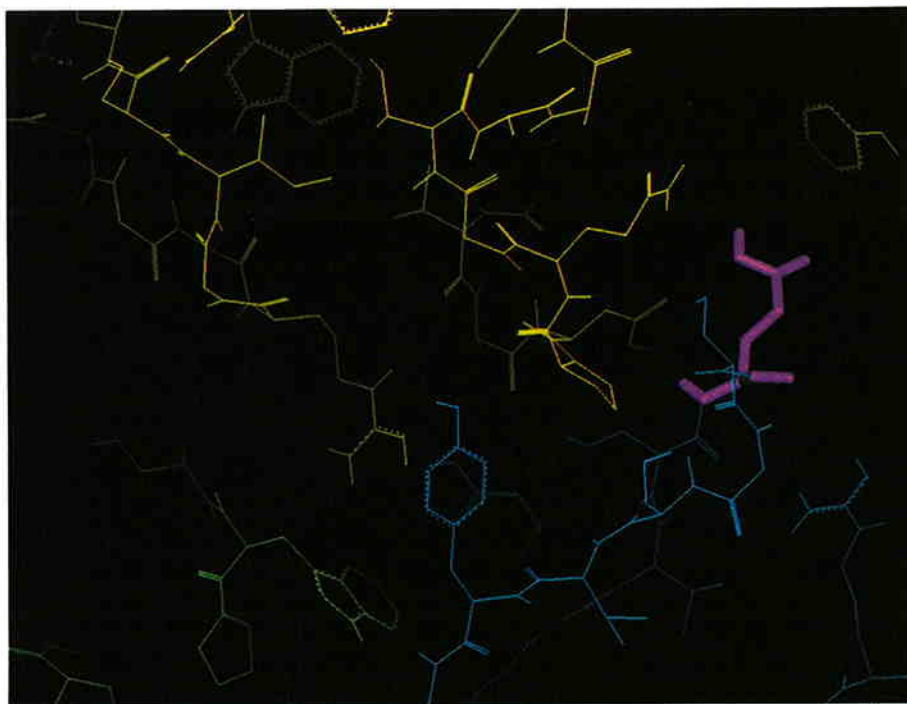


Fig. 5 The optimized conformation of Glu53 by one point mutation in the virtual HLZM:HyHEL10 complex.

HLZM in yellow, V_L in light green, V_H in blue and Glu53 in magenta. Tyr53 on CDR-H2 was mutated to Glu. Only Glu53 was optimized and other regions of complex were fixed. Throughout the modeling of HLZM:HyHEL10 mutant complexes, this conformation was used as a fragment structure of Glu53. In a similar manner, 60 fragments (3 residues \times 20 amino acids) were prepared.

HyHEL10変異体仮想複合体モデル8000件を作成した (Fig. 6)。

4. 変異体モデルの評価と高親和性変異抗体の予測

先の検討で構築した8000件の変異抗体の評価にも高速性と簡便さが求められる。簡便で汎用性の高い変異体評価法の確立と、その評価法を用いた高親和性変異抗体の選抜を目的に検討を行った。大部分の構造を固定して変異抗体を作成している事から、変異体間の差異にのみ注目し、分子力場により求まるエネルギー値を用いて評価を行った。抗原抗体複合体が安定ならば、2分子が結合した状態が長時間継続し、実験的には、抗原に対する抗体の親和性が観察される。すなわち、抗原抗体複合体の安定性と抗体の抗原への親和性は比例する。本研究では、抗原抗体複合体の形成安定性を評価し、複合体が安定に存在すると評価した変異体をHLZM親和性変異体と予測した。

〔1〕 変異抗体間ごとに異なる部分のエネルギー計算

今回のモデリング手法で8000件の変異抗体ごとに異なるのは変異させた3ヶ所の残基位置のアミノ酸のみ

である。分子力場を用いる計算では、分子のエネルギーを様々な要素(項)に分解し、その和を用いてシミュレーションやエネルギー計算を行っている。結合、結合角、二面角の結合相互作用項と、クーロン力、van der Waals力の非結合相互作用項の5項が主なエネルギー項である。この特徴を利用して各変異体に固有なエネルギーを求めるため、該当する3残基に含まれる原子が関与するエネルギー項のみの和を求めた。

なお、前述のモデルの作製と上記エネルギー計算に際し、変異した残基の周囲16Åに含まれる原子だけを抽出し、この部分構造のみを使った。その結果、数分の1への時間短縮を実現し、変異体モデルの作製とエネルギー計算による評価との通算で、1変異体1分以下の短時間で処理する事が出来た。

〔2〕 アミノ酸の内部エネルギーの減算による相互作用条件の統一

〔1〕の操作により得られたエネルギー値にはそれぞれのアミノ酸固有の構成原子に由来する内部エネルギー値、 E_{int} (intrinsic energy) が含まれる。すなわち、アミノ酸ごとに原子数や元素、結合様式が違い事などにより変異体ごとのエネルギー値の算出条件が異なっ

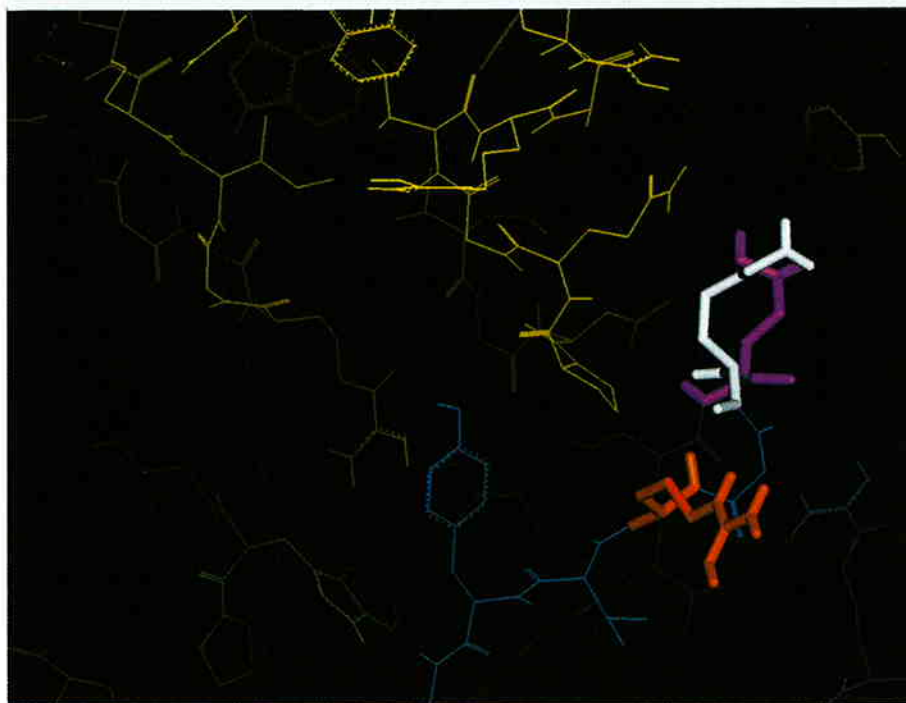


Fig. 6 The modeled structure of the HLZM : HyHEL10 mutana complex.

This figure shows the model structure of the Tyr53Glu/Ser54Lys/Ser56Arg mutant that was expected to be one of the most probable anti-HLZM antibodies. The residues at site 53 (magenta), 54 (white), and 56 (red) were replaced by the amino acid fragment structures that were prepared from the amino acid optimized conformations at those site.

ている。全ての変異体の相互作用条件を統一にするために、各アミノ酸単独のglobal minimum energy ($=E_{int}$) を求め、各変異体のエネルギー値より、それぞれ該当する3個のアミノ酸のglobal minimum energy値を差し引いた値を求めた。global minimum energy値はそれぞれのアミノ酸単独の構造について2000KのSimulated Annealingを行って求めた最安定構造のエネルギー値を用いた。また、Proは固定されて自由度の低い環状構造をとっている。主鎖の初期構造をほぼ固定した今回の最適構造探索方法ではProのラクタム環に歪みがかかった構造となっている。この問題を解決するためProの歪みによるエネルギーの増分を見積もり、エネルギー値より差し引いた。各残基の最適構造を求めた時に使用した初期構造のProの前後2残基、計5残基をフリーにしてSimulated Annealingを行い、Proの歪みをのぞき、その構造でProに含まれる原子が関与するエネルギー項のみの和を求めた。同様に、Proの最適構造を求めたときの構造でProに含まれる原子が関与するエネルギー項のみの和を求めた。この2エネルギー値間の差を歪みによるエネルギーの増分とした。なお、Pro56は構造に歪みが大きくかかっており、5残基のみでの最適化後の構造が初期構造より大きくずれた。このため、Pro置換の際の補正が困難と見なし、Pro56については歪みによるエネルギーの増分を見積もらなかった。以上の通り、内部エネルギーの減算とPro53、Pro54の歪みの補正を行って得られたエネルギー値は各変異体に特徴的なエネルギー値である。この特徴的なエネルギー値を以後、Ech (Characteristic Energy) と呼ぶ事にする。

$$Ech = E - (E_{int1} + E_{int2} + E_{int3}) - Eps$$

ここで、 E は変異した3残基に含まれる原子が関与するエネルギー項のみの和であり、 E_{int1} 、 E_{int2} 、 E_{int3} はアミノ酸残基53、54、56の内部エネルギー項、 Eps はPro53もしくはPro54が存在する場合の補正項である。以上の計算の結果得られたEchを用い、8000件の変異体の評価を行った。

5. 選抜した変異抗体のHLZM結合能の測定

共同研究者である東北大学・熊谷教授のグループにより、高親和性を予測した各変異抗体の発現・精製とHLZMへの親和性の測定を行った。本研究によるデザインの精度を実験的に検証するとともに、親和性を獲得した要因を明らかにする事が目的である。各変異

体はscFvフラグメントとして発現し、HLZMの親和、解離定数を測定した。

(1) HyHEL10変異体scFvの発現と精製

目的とする変異抗体scFvの配列に調整した変異体発現ベクターで大腸菌BL21 (DE3) を形質転換して培養し、IPTGにて発現を誘導した。可溶性蛋白質として大量発現された遺伝子産物はそのC末端に融合させたヒスチジン6量体に特異的結合能を持つ金属キレートクロマトグラフィーにて精製した。

(2) 表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析

発現した変異体のHLZMへの親和性はIASysシステム (BIOSENSORS、UK) により決定した。このシステムでは、各変異体の親和定数 Ka 、親和速度定数 k_{ass} 、解離速度定数 k_{diss} の決定はSPRによる反射光の強度の減少が起こる入射角度が、金属薄膜に接している溶液の屈折率によって変化する事を利用している。各リゾチームに対する結合を様々な濃度で測定し、その結合曲線から k_{on} を求め k_{on} の濃度に対してプロットする事により、 k_{ass} を、解離曲線から k_{diss} を決定し、これら2定数から Ka を導出した。

6. 抗原特異性の予測

本研究で開発した手法によれば、高い親和性を示す変異抗体をデザインする事が可能であった。認識を機能とする抗体のデザインにおいては、抗原特異性まで予測出来る事が望ましい。これまでの実験系では、特異性を有する変異抗体の選抜は困難であったし、モデリングでも、抗原特異性を明確に予測する事は困難であった。高速かつ網羅的な我々の手法を応用して、HLZM特異的な変異抗体の選抜を試みた。

(1) HEWL : HyHEL10変異体仮想複合体モデルの作成とエネルギー計算

HLZM特異的認識能を示す変異抗体はHEWLに親和性を示さない。本研究の手法を用いれば、HEWLと安定な複合体を形成しないとの評価が期待出来る。少なくとも、HEWLと安定な複合体を形成すると評価されない事が予測される。HEWL : HyHEL10変異体複合体の系について、これまでのHLZM : HyHEL10変異体複合体と同様の計算と評価を行った。最初に、HEWL : HyHEL10複合体PDB座標上にHEWL単独の結晶構造を重ね合わせてHEWLを置換した。次に、残基位置53、54、56の1残基変異体を作成して変異させたアミノ酸の構造を最適化し、得られた最適構造60件を組み合わせて8000件の変異抗体を作成した。複

合体の安定性評価は前出の各変異体に特徴的なエネルギー値 E_{ch} を計算して用いた。

〔2〕 HyHEL10変異体のHLZMに体する特異性の予測

以上の検討でHyHEL10変異体のHLZMに対する親和性の評価とHEWLに対する親和性の評価が終了した。評価の基準とした仮想複合体の特徴的なエネルギー値 (E_{ch}) を比較する事によりHLZMに特異的な変異抗体を選択した。すなわち、任意の変異体について、以下の式でエネルギー差 ΔE_{ch} を求めた。

$$\Delta E_{ch} = E_{ch}(m) - E_{ch}(a)$$

ここで、 $E_{ch}(m)$ はHLZMで得られた E_{ch} であり、 $E_{ch}(a)$ はHEWLで得られた E_{ch} である。任意の変異抗体の ΔE_{ch} が負の大きい値を示せば、HLZM複合体がHEWL複合体と比較して相対的に安定であり、HLZM特異的な変異抗体であると言う事が出来る。逆に正の大きな値を示せば、HEWL複合体がHLZM複合体と比較して相対的に安定であり、HEWL特異的な変異抗体であると言う事が出来る。

7. 結 果

〔1〕 HLZM : HyHEL10変異体複合体のモデリング

モデリングに先立って行った、HEWL : HyHEL10複合体のPDB座標の修正では、最後に構造最適化のために行ったSimulated Annealingの前後で、大きな構造の差異はないが、最適化した構造ではSer54のカルボニル結合が $C_{\alpha}-C_{\beta}$ 結合と同一平面上にあり、歪みを生じさせていると考えられた。一方、初期構造では $C(Ser54)-N(Gly55)$ 間の結合とSer54の $N-C_{\alpha}$ 間の結合が平行に近く、この歪みを解消させた結果として収束した構造と考えられる。構造修正の対象としている範囲より広範囲の構造再構築を行わない限り、この問題は解決されない。一般に、CDR-H2のTyr58などのBenzene環はX線結晶解析で比較的正確に位置が決まるはずであるし、結晶構造解析の測定データを所有しない報告者が現在よりも広範囲の構造再構築を行う事には問題がある。しかし、蛋白質構造ライブラリの検索でもTyr53の $C_{\alpha}-C$ 間の結合の周囲の二面角を 180° 回転させた構造が大部分であり、構造としてもPDB座標よりは妥当である。PDB座標に替えて今回の修正結果を採用し、以降の検討に用いた。

HLZM : HyHEL10野生型仮想複合体の構築では、Simulated Annealingによる構造最適化で、CDR-H2のSer52とSer56がHLZMのPro103の背面に回り込む構造に収束した。これ以降、主鎖構造はこの仮想

複合体のものに固定し、その側鎖を改変する事によりHLZM : HyHEL10変異体仮想複合体8000件を構築した。

〔2〕 HLZM親和性変異抗体の評価

CHARMmによる分子力場計算で求めた8000件の変異抗体の複合体の特徴的なエネルギー値 (E_{ch}) の分布はFig. 7の通りとなり、正規分布に近い。 E_{ch} が低いものほど、安定な複合体を形成すると考えられ、該当する変異抗体はHLZMに高い親和性を有すると予測される。53番の残基を特定のアミノ酸に固定したときの400件の変異体の E_{ch} の分布はFig. 8の通りであり、それぞれ異なる分布を示し、20種類のアミノ酸ごとに異なる分布を示した。54番、56番についても同様であり、それぞれFig. 9、Fig. 10に示した。

〔3〕 高親和性変異抗体の選抜

E_{ch} 値の分布を元に、 E_{ch} が低い変異体により多く分布し、複合体の安定化に寄与すると考えられるアミノ酸をTable 2の通り、CDR-H2の各残基位置ごとに選抜した。すなわち、HLZMに親和性を示すHyHEL10変異体の残基位置53のアミノ酸としては、Glutamic acid(E)、Glutamine(Q)、Lysine(K)、Tryptophan(W)が好ましいと予測された。同様に、残基位置54のアミノ酸としてはLysine(K)、Tryptophan(W)、Tyrosine(Y)が好ましく、残基位置56のアミノ酸としてはArginine(R)、Tyrosine(Y)、Leusine(L)が好ましいと予測された。選抜したアミノ酸を組み合わせるとTable 3に示す通り、36種類のアミノ酸配列が得られる。これらの配列を構成するアミノ酸は前述の通り変異体の高親和性を予測して選択したものであるが、36件の変異抗体は8000件中の安定性の順位も550位以上でありHLZMに高親和性を示すと予測される。これら36件の変異抗体を高親和性変異体の候補として選抜した。

〔4〕 HyHEL10変異体scFvの発現とHLZM親和性

変異抗体のデザイン結果の検証のため、8000件中の複合体安定性予測値上位14変異体の発現を検討した。大腸菌発現系を用い位置特異的に変異を導入して変異体を調整した。14変異体の内、Gln53を含む変異体は発現出来ず、Tyr53Glu/Ser54His/Ser56Arg変異体(EHR; 以降、変異体はアミノ酸を1文字表記で表し、残基位置53、54、56の順番で並べて表現する。)は精製の際に金属キレートクロマトグラフィー(IMAC)から流出せず、あわせて5変異体が調製出来なかった。発現と精製の出来た9変異体はSPR分析によりHLZM