

3D ドメインスワッピングによる抗体軽鎖会合体の立体構造を原子レベルで特定



廣田 俊
Hirota Shun



酒井 隆裕
Sakai Takahiro

1 はじめに

抗体は新型コロナウイルス感染症の拡大で広く知られるようになった。特に、抗体医薬品は製薬及び医療用途の両方で近年注目されている。しかし、抗体は容易に凝集し、凝集すると抗原を認識する能力が大きく損なわれるという問題がある¹⁾。また、間違った構造で折り畳まれた抗体軽鎖は凝集しやすく、AL アミロイドーシスを引き起こす。AL アミロイドーシスでは、異常形質細胞から過剰発現した抗体軽鎖がアミロイド線維として組織に沈着する²⁾。以上のような抗体の凝集問題を解決するには、その会合挙動を詳細に知る必要があるが、原子レベルの情報に限られている。

タンパク質会合機構の1つである3D ドメインスワッピングは、同じタンパク質の異なる分子同士で同じ構造領域を3次元的に交換する現象である^{3,4)}。3D ドメインスワッピングはアミロイド形成タンパク質を含む様々なタンパク質で見られ、アミロイド線維化を促進する可能性が指摘されている⁵⁾。また、数は少ないが、抗体でも3D ドメインスワッピングが報告されている。HIV-1 中和抗体である2G12では、2つの抗原結合領域 (Fab) 間で重鎖の可変領域すべてを交換して2量化する (図 1a)⁶⁾。低分子抗体の一種であるラクダ科動物の重鎖抗体の可変領域 (VHH) の一種は、2分子間でC末端のβストランドを交換して2量化する (図 1b)⁷⁾。しかしながら、抗体の3D ドメインスワッピングに関する構

造情報は限られており、抗体軽鎖において3D ドメインスワッピングの報告はこれまでなかった。

抗体軽鎖の会合状態を原子レベルで特定できれば、抗体の品質を向上させ、将来の分子認識剤や医薬品の開発に大きく貢献できる。筆者らは4量化する抗体軽鎖の会合挙動を調べ、その会合状態を原子レベルで特定することに成功した⁸⁾。4量体構造では、3D ドメインスワッピングにより2量化した抗体軽鎖の立体構造がはじめて特定され、この2量体2つが更に疎水的に相互作用することで4量体を形成することが分かった。また、4量体は単量体よりも多くの2次構造を形成し、立体構造が安定化されていた。以上より、3D ドメインスワッピングは抗体の多量化に寄与する一方で、構造を安定化することが分かった。本稿では、これらの研究について紹介する。

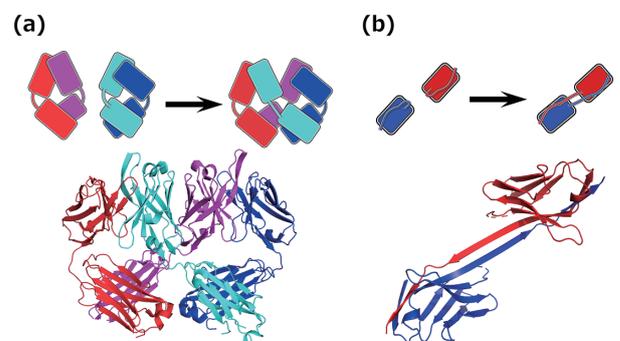


図1 これまで報告されている抗体の3D ドメインスワッピング構造

(a) Fabの2量体 (PDB: 6N32)。 (b) VHHの2量体 (PDB: 1SJV)

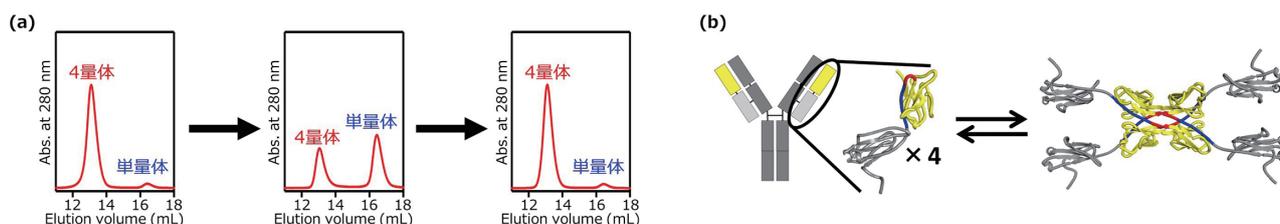


図2 抗体軽鎖 #4C214A のサイズ排除クロマトグラフィーおよび単量体と4量体の平衡状態の様子

(a) 様々な濃度での抗体軽鎖 #4C214A のサイズ排除クロマトグラフィーの溶出曲線。300 μM (左), 6 μM に希釈後 (中央), 300 μM に再濃縮後 (右)。
 (b) 抗体の模式図と #4C214A の単量体のモデル構造 (左), #4C214A の4量体のモデル構造 (右)

2 サイズ排除クロマトグラフィーによる多量体の評価

本研究では、蓄積されたデータから多量化する抗体軽鎖を見つけ出し、重鎖とジスルフィド結合 (S-S 結合) を形成する Cys 残基を Ala 残基に置換した抗体軽鎖 #4C214A を作製した。#4C214A は、大腸菌を用いて発現・培養し、クロマトグラフィーにより精製した。得られた #4C214A のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) の測定では2つのピークが観測され、SEC-多角度光散乱法 (SEC-MALS) の測定により、高分子量域のピークが4量体、低分子量域のピークが単量体であることが分かった。また、濃度を変えて SEC 分析を行うと、#4C214A の濃度が 300 μM のとき #4C214A は 96% が 4 量体であり、この溶液を #4C214A 濃度 6 μM に希釈すると 4 量体の割合は 40% に減少した (図 2a)。この溶液の #4C214A 濃度を再度 300 μM に濃縮すると 4 量体の割合が 96% に戻ったことから、#4C214A は単量体と 4 量体の平衡状態にあることが明らかになった。

#4C214A の 4 量化に寄与する構造領域を明らかにするため、#4C214A を可変領域と定常領域に分けた。#4C214A の可変領域と定常領域の間に Tobacco Etch Virus (TEV) プロテアーゼの認識配列を導入した変異体 (#4C214AinsCS^{TEV}) を調整した。#4C214AinsCS^{TEV} を精製後、TEV プロテアーゼで切断し、可変領域 #4V_L と定常領域 #4C_L をそれぞれ単離精製した。SEC 及び SEC-MALS 分析により、#4C_L は単量体のみで存在したが、#4V_L は単量体と 4 量体の平衡状態にあり、#4C214A は #4V_L で 4 量化することが示唆された (図 2b)。

3 X線結晶構造解析

#4V_L の立体構造を明らかにするため、4 量体を

結晶化し、SPring-8 の放射光 X 線を使って分子構造を解明した (PDB: 8KAD)。その結果、#4V_L は C 末端の β ストランドを分子間で交換して 3D ドメインスワッピングにより 2 量体を形成し、この 2 量体 2 つが更に相互作用することで 4 量体を構築することが判明した (図 3a)⁸⁾。#4V_L の 3D ドメインスワッピングによる 2 量体のプロトマーの結晶構造と AlphaFold2 (アミノ酸配列からタンパク質等の立体構造を予測する AI プログラム) で得られた #4V_L の単量体の予測構造を比較すると、相補性決定領域である CDR3 の一部 (Arg91-Pro95) が単量体と 4 量体間で構造変化し、ヒンジ領域となっていることが分かった (図 3b)。また、4 量体では、ヒンジ領域にある CDR3 の N 末端側の Arg91 は CDR1 の Ser32 と相互作用し、これらの残基は β シート構造の一部を形成していた (図 3c)。これまでに報告されている免疫グロブリンフォールドのタンパク質の 3D ドメインスワッピング構造では、ヒンジ領域間の水素結合やカチオン- π 相互作用が 2 量体を安定化している^{7,9)}。しかし、#4V_L の 3D ドメインスワッピングによる 2 量体のヒンジ領域間には、目立った相互作用は見られず、#4V_L の 3D ドメインスワッピング構造を安定化する他の要因が必要である。

#4V_L の 4 量体の立体構造を詳しく調べると、3D ドメインスワッピングにより形成した 2 つの 2 量体の間に多くの疎水性残基が存在していた (図 3d)。これらの疎水性残基には芳香族残基が多く含まれ、芳香族残基のクラスターが 2 量体間で確認され、疎水性相互作用が 4 量体構造の安定化に大きく寄与していることが示唆された。また、これらの芳香族クラスターの周りには 11 個の水素結合が取り囲み、疎水性相互作用を増強し、これらの水素結合が 4 量体構造の安定化にとって重要であると考えられる (図 3d)。

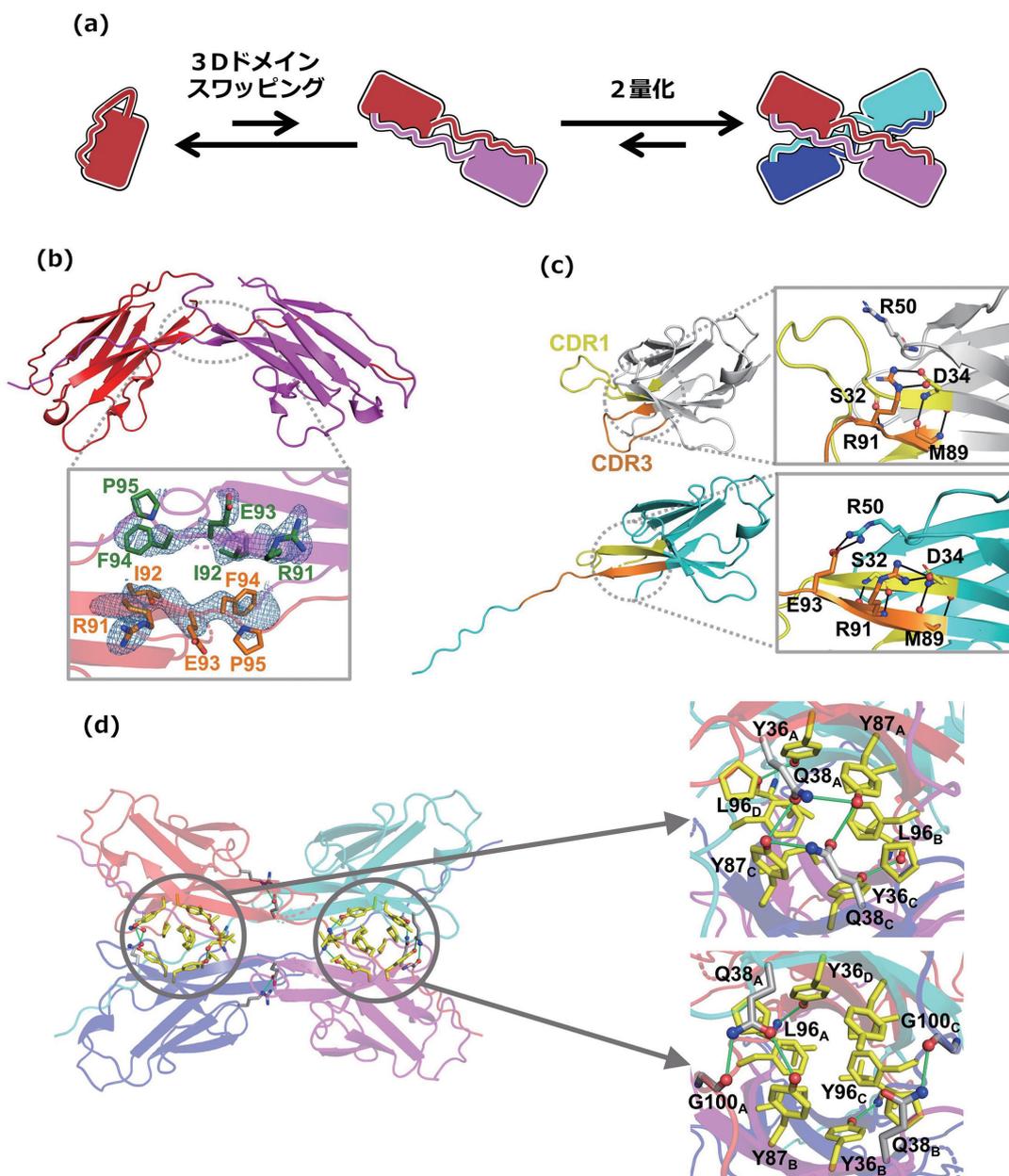


図3 #4V_Lの4量体のX線結晶構造

(a) 3Dドメインスワッピングによる2量化(左)と2量体から4量体の形成(右)の模式図。(b) #4V_Lの2量体構造(PDB: 8KAD)。ヒンジ領域を下から見た拡大図を下に示す。ヒンジ領域内の残基を緑とオレンジのスティックモデルで示す。(c) #4V_LのAlphaFold2によるモデル構造(灰色)とサブユニット結晶構造(シアン)。単量体でのループ構造から4量体でのβストランド構造に変化する残基の拡大図を右に示す。アミノ酸残基間の水素結合を黒線で示す。相補性決定領域CDR1とCDR3はそれぞれ黄とオレンジで示す。(d) #4V_Lの4量体の結晶構造(左)と2量体間の疎水性残基と水素結合を示す拡大図(右)。プロトマーA, B, C, Dはそれぞれ赤, マゼンタ, 青, シアンで示す。疎水性残基は黄のスティックで示す。水色の線は重要な水素結合を表す

4 単量体と4量体の平衡状態

3Dドメインスワッピングによる抗体軽鎖の多量化挙動を理解するため、#4C214Aと#4V_Lの熱力学的解析を行った。解離定数の温度依存性から熱力学的パラメータを算出すると、4量体から単量体へ解

離する際の#4C214A及び#4V_Lの標準エンタルピー変化量は、温度上昇に伴い増大した。一般的に、温度が上昇すると水素結合や静電相互作用は弱くなり、解離反応における標準エンタルピー変化量は減少する。しかし、4量体から単量体へ解離する際の標準エンタルピー変化量が温度上昇に伴い増大した

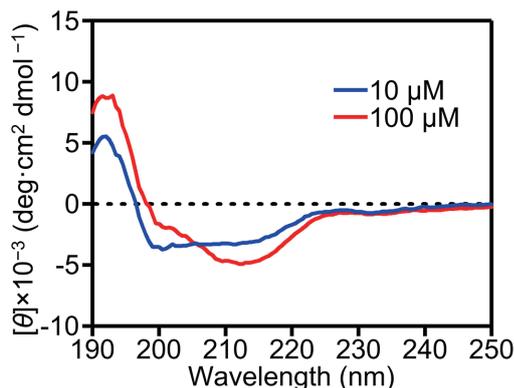


図4 #4VLのCDスペクトル
10 μ M (青)と100 μ M (赤)

ことから、#4C214A及び#4VLは疎水性相互作用により4量体を形成することが示唆され、X線結晶構造解析の結果と一致した。また、#4C214Aの4量体から単量体への解離の緩和時間は4~45℃で13.5~0.3時間、#4VLの4量体から単量体への解離の緩和時間は4~45℃で11.8~0.2時間だった。これらの緩和時間は一般的なタンパク質複合体の解離反応の緩和時間よりも著しく長く、4量体から単量体への解離はタンパク質の大きな構造変化を伴うことが示唆され、4量体が準安定な3Dドメインスワッピング構造を有していることと一致した⁴⁾。

円偏光二色性(CD)測定により#4VLの2次構造量を異なるタンパク質濃度で比較したところ、100 μ Mのときのほうが10 μ Mより β シート構造に由来する215nmのコットン効果が増大した(図4)。SEC分析により、#4VLの単量体:4量体の割合は#4VL濃度10 μ Mと100 μ Mでそれぞれ61:39と14:86であった。これらの結果は、#4VLは4量体状態のほうが単量体状態より β シート含量が多いことを示しており、3Dドメインスワッピングにより4量化すると立体構造が安定化されることが分かった。

5 まとめ

筆者らの研究では、4量化する抗体軽鎖の会合挙動を調査し、3Dドメインスワッピングで会合した抗体軽鎖の立体構造を初めて原子レベルで特定する

ことに成功した。4量化には疎水性相互作用が大きく寄与していることが示され、これらの情報は抗体の会合を防ぐことに役立つ。また、この抗体軽鎖は、3Dドメインスワッピングにより4量体で存在するときのほうが単量体として存在するときよりも2次構造量が多く、安定であることが示唆された。以上より、3Dドメインスワッピングによる会合は、抗体の安定化に有効であると考えられる。化学修飾やタンパク質融合等、抗体を多量化して機能化させる手法はいくつか存在するが、3Dドメインスワッピングは他の分子を用いずに抗体を多量化することができ、機能性抗体を創製する新しい方法としても注目される。

謝辞

本研究成果は、真島剛史助教、小林直也助教(奈良先端科学技術大学院大学)、緒方英明教授(兵庫県立大学)、段練氏、藤木涼助教、Kowit Hengphasatporn助教、重田育照教授(筑波大学)、宇田泰三名誉教授、一二三恵美教授(大分大学)との共同研究により得られたもので、共同研究者の皆様へ感謝申し上げます。本研究はJSPS科研費(JP26288080)とJST CREST(JP20338388)の支援を受けて行われました。また、X線回折実験にSPring-8のBL45XUを利用しました(課題番号:2021B2534, 2022A2534)。

参考文献

- 1) Wang, W., *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, **96**, 1-26 (2007)
- 2) Glenner, G. G., *et al.*, *Science*, **174**, 712-714 (1971)
- 3) Liu, Y., *et al.*, *Protein Sci.*, **11**, 1285-1299 (2002)
- 4) Hirota, S., *et al.*, *Chem. Commun.*, **57**, 12074-12086 (2021)
- 5) Louis, J. M., *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **348**, 687-698 (2005)
- 6) Calarese, D. A., *et al.*, *Science*, **300**, 2065-2071 (2003)
- 7) Spinelli, S., *et al.*, *FEBS Lett.*, **564**, 35-40 (2004)
- 8) Sakai, T., *et al.*, *Nat. Commun.*, **14**, 7807 (2023)
- 9) Trinh, T. T. N., *et al.*, *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.*, **77**, 171-176 (2021)

(奈良先端科学技術大学院大学 先端科学技術研究科 物質創成科学領域)