

先端科学技術研究科 博士論文要旨

所属研究室 (主指導教員)	機能超分子化学研究室 (廣田 俊 教授)		
学籍番号	2 2 2 1 0 1 2	提出	令和6年12月17日
氏名	酒井隆裕		
題目	3Dドメインスワッピングで多量化する抗体軽鎖の会合挙動と金属イオンが多量化に及ぼす影響に関する研究		

第1章：序論

医薬品等に幅広く利用されている抗体は不安定で会合しやすく、凝集により抗原認識能が低下することが問題となる場合が多い。また、過剰に発現された抗体軽鎖は凝集体を形成し、組織に沈着することで疾患の原因になる。以上のように、抗体軽鎖の凝集を理解することは重要だが、その凝集様式の原子レベルでの解明に関する研究は限られている。一方、金属イオンは多くのタンパク質の凝集に影響を及ぼし、Cu(II)イオンが抗体軽鎖のアミロイド繊維形成速度を加速した例はあるが、Cu(II)イオンが抗体軽鎖の会合に及ぼす影響の詳細は不明である。これまでにタンパク質会合機構の一つである3Dドメインスワッピング(3D-DS)は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も指摘されているが、抗体軽鎖の3D-DSに関する報告例はない。そこで、本研究では、多量化する抗体軽鎖の会合挙動を調べるとともに、Cu(II)イオンがその会合に及ぼす影響を調べた。

第2章：3D-DSにより4量化する抗体軽鎖の熱力学的解析と構造解析

ヒト抗体軽鎖#4は、溶液中で多量化することが知られている。そこで、軽鎖が重鎖とジスルフィド結合を形成するためのCysをAlaに置換した変異体#4C214Aを調製し、その会合挙動を調べた。サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)及びSEC-多角度光散乱法(MALS)分析により、#4C214Aは溶液中で単量体と4量体の平衡状態にあった。#4C214Aの可変領域#4V_LのSEC分析により、#4C214Aは#4V_Lで4量化することが判明し、#4V_Lの解離定数の温度依存性から、#4V_Lは疎水性相互作用により4量化することが示唆された。また、#4V_Lの4量体から単量体への解離反応の緩和時間は25℃で1.7時間と求まった。こ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量体の解離には大きな構造変化を伴うと推測された。#4V_L4量体のX線結晶構造解析により、#4V_Lは3D-DSした

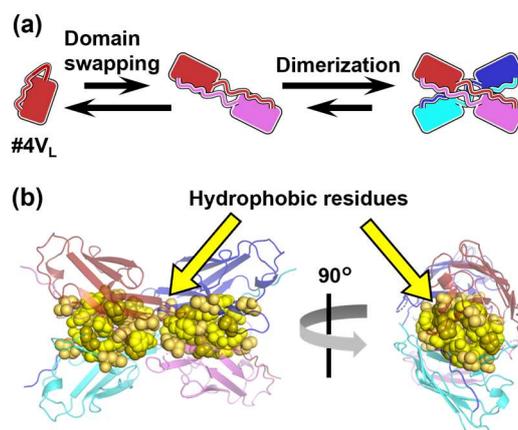


Fig. 1. (a) Schematic diagram of #4V_L tetramerization. (b) Crystal structure of #4V_L tetramer. Hydrophobic residues between #4V_L dimers are indicated as yellow sphere.

2量体がさらに2量化することで、4量体を形成していた (Fig. 1a)。さらに、2量体同士の相互作用界面には多くの疎水性残基が存在し、4量化に疎水性相互作用が寄与することが結晶構造からも確認された (Fig. 1b)。一方、円偏光二色性 (CD) スペクトル測定により、#4V_Lの4量体は単量体に比べてβシート含量が多いことが分かり、#4V_Lは4量化することで、構造安定性が向上することが示された。

第3章：3D-DSで4量化する抗体軽鎖の多量化にCu(II)イオンが及ぼす影響

3D-DSによる抗体軽鎖の多量化にCu(II)イオンが及ぼす影響を明らかにするため、#4V_Lの会合挙動にCu(II)イオンが及ぼす影響を評価した。SEC分析により、Cu(II)イオン存在下で#4V_Lの2量体と4量体の割合が増加した (Fig. 2)。比色定量法により、#4V_LとCu(II)イオンは1:1で結合することが確認された。一方、Cu(II)イオン存在下と非存在下で#4V_L4量体のCDスペクトルに大きな違いは見られず、Cu(II)イオンの有無で4量体の2次構造に変化はないことが分かった。以上から、Cu(II)イオンは部位特異的に#4V_Lに結合し、4量化を促進することが示唆された。

第4章：3D-DSで多量化する抗体軽鎖可変領域の探索

抗体軽鎖の3D-DSが#4に固有の現象でないことを示すために、#4V_Lと構造が類似した抗体軽鎖可変領域を探索し、構造類似性が高い抗体軽鎖としてSARS-CoV2中和抗体PR1077の軽鎖可変領域PR1077V_Lを見つけた。SEC分析より、PR1077V_Lの多量体形成が確認され、単量体と多量体は平衡状態にあった。また、PR1077V_LにおいてもCu(II)イオン存在下で多量体割合は増加した。SEC-MALS測定により、多量体は溶液中で2量体であり、X線結晶構造解析により、PR1077V_Lは3D-DSにより2量化していることが明らかになった。また、結晶中ではその2量体がさらに2量化した4量体を形成していた (Fig. 3)。PR1077V_Lの2量体から単量体への解離反応の緩和時間は25℃で26時間と求まり、#4V_Lと同様に2量体の解離には大きな構造変化を伴うことが推測され、PR1077V_Lは溶液中においても3D-DSで2量化していることが示唆された。

第5章：結論

抗体軽鎖#4の可変領域#4V_Lは3D-DSにより4量体を形成していた。これは、抗体軽鎖において初めて3D-DSによる多量体化を明らかにした例である。また、#4V_Lと構造が類似した抗体軽鎖可変領域PR1077V_Lにおいても3D-DSで2量化することが明らかになった。両抗体軽鎖はCu(II)イオンの添加により3D-DSによる多量化が促進され、Cu(II)イオンにより、抗体軽鎖の3D-DSが促進されることも明らかになった。これらの結果は、金属イオンが抗体軽鎖の3D-DSによる多量化に及ぼす影響を示したものである。以上、本研究により、複数の抗体軽鎖が3D-DSで多量化し、Cu(II)イオンが3D-DSによる多量化を促進することが示され、抗体軽鎖の原子レベルでの会合メカニズムの解明は抗体の会合を防ぐ手法の開発に寄与する。さらに、3D-DSは他の分子を用いずに抗体を多量化することができるため、機能性抗体を創製する新しい方法としても期待される。

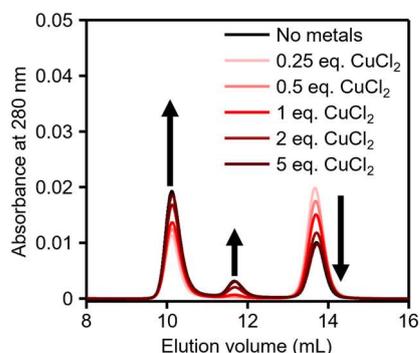


Fig. 2. SEC elution curves of #4V_L in the absence (black trace) and presence of 0.25–5 equivalents of Cu(II) ions (light to dark red traces).

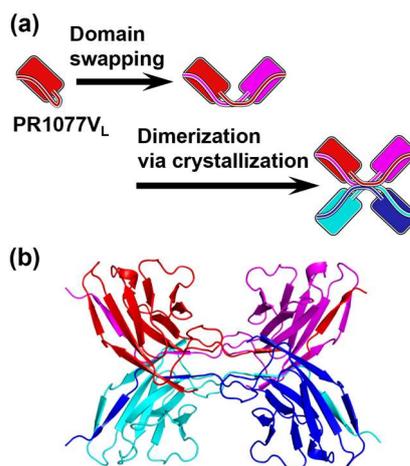


Fig. 3. (a) Schematic diagram of PR1077V_L tetramerization. (b) Crystal structure of PR1077V_L dimers.

(論文審査結果の要旨)

医薬品等に幅広く利用されている抗体は不安定で会合しやすく、凝集により抗原認識能が低下することが問題となっている。また、過剰に発現された抗体軽鎖は凝集し、生じた凝集体は組織に沈着することで疾患の原因になる。一方、金属イオンはタンパク質の凝集に関与することが多く、抗体軽鎖のアミロイド繊維形成速度が Cu(II) イオンにより加速する報告はあるが、 Cu(II) イオンが抗体軽鎖の会合に及ぼす影響の詳細は不明である。そこで本研究では、多量化する抗体軽鎖を探索し、その会合挙動を調査するとともに、 Cu(II) イオンが抗体軽鎖の会合挙動に及ぼす影響を調べた。本論文で得られた成果は以下の通りである。

1. 溶液中で多量化するヒト抗体軽鎖#4 において、重鎖とジスルフィド結合を形成する軽鎖の Cys を Ala に置換した変異体#4C214A を調製し、その会合挙動を調べた。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 及び SEC-多角度光散乱法 (MALS) 分析により、#4C214A は溶液中で単量体と 4 量体の平衡状態にあることが示された。また、#4C214A は可変領域#4V_L で 4 量化し、#4V_L の解離定数の温度依存性から、#4V_L は疎水性相互作用により 4 量化することが示唆された。4V_L 4 量体の X 線結晶構造解析により、#4V_L は 3D-DS を示す 2 量体がさらに 2 量化することで 4 量体を形成することが明らかとなった。

2. #4V_L の単量体に対する 2 量体と 4 量体の割合は Cu(II) イオン存在下で増加することが比色定量法により示された。また、#4V_L と Cu(II) イオンは 1:1 で結合することを明らかにし、 Cu(II) イオンは#4V_L に部位特異的に結合し、4 量化を促進することが示唆された。

3. 抗体軽鎖の 3D-DS が#4 に固有の現象でないことを示すために、#4V_L と構造類似性が高い抗体軽鎖として SARS-CoV2 中和抗体 PR1077 の軽鎖可変領域 PR1077V_L を選定し、PR1077V_L においても Cu(II) イオン存在下で 2 量体割合が増加することを明らかにした。さらに、PR1077V_L は 3D-DS により 2 量化することが X 線結晶構造解析により明らかになった。

以上のように、本論文では、複数の抗体軽鎖が 3D-DS により多量化することを明らかにし、 Cu(II) イオンが 3D-DS による多量化を促進することが示された。本研究成果は抗体軽鎖の 3D-DS を原子レベルで解明した初めての報告であり、タンパク質科学分野および生命科学分野の研究として高く評価でき、学術的に大きな意義がある。よって審査委員一同は本論文が博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認めた。