

進歩賞

タンパク質結晶化に応用可能な新規小型抗体

フォーマット Fv-clasp の開発

有森 貴夫

(大阪大学蛋白質研究所)

抗体は、標的分子（抗原）に対して高い特異性で結合する性質から、医療や研究の様々な分野で利用されている。タンパク質の結晶構造解析においては、標的分子の結晶化を促進させる「結晶化シャペロン」として利用されている。これは、抗体の結合により標的分子の構造が安定化したり、結晶格子の形成が促進されたりするためである。特に膜タンパク質では、抗体の結合により親水性表面が拡大しパッキングしやすくなるため、多くの分子の構造解析に抗体が用いられている。

抗体を結晶化シャペロンとして用いる場合、抗原結合活性を保持した小型の「フラグメント抗体」が用いられる。代表的なものとして Fab と単鎖抗体 (scFv) が挙げられる (図 1)。しかし、実はこれらは結晶化シャペロンとしては理想的とはいえない問題を抱えている。例えば、ほとんどの Fab は比較的安価に培養が可能な大腸菌での生産が困難であり、動物細胞により発現させた全長抗体を酵素処理することで得るため、生産にコストがかかる。また、Fab は可変 (V) 領域と定常 (C) 領域の間の可動性が高いことが知られている。一方、V 領域 (Fv) を構成する V_H ドメインと V_L ドメインを長いリンカーで遺伝子工学的につないだ scFv は、大腸菌での生産が可能であるが、 V_H と V_L の相互作用が弱いため、しばしば不安定化や活性の低下を招いてしまう。

我々はこれらの問題を克服するため、

V_H と V_L の C 末端にヒト Mst1 という分子が持つ SARAH ドメインを融合したフラグメント抗体フォーマット「Fv-clasp」を考案した (図 2)。SARAH ドメインは、逆平行のコイルドコイルを形成して二量体化するが、その N 末端間距離は、抗体の V_H と V_L の C 末端間距離とほぼ一致する。したがって、これらを融合することで、Fv の構造を崩すことなく安定な Fv フラグメントをつくることができる。さらに、デザインの最適化を目指し結晶構造解析や MD シミュレーションなどを行った結果、最終的に V_H ドメインの底部と、 V_L に繋げた SARAH ドメインの間にジスルフィド結合を導入したデザインにたどり着いた (図 2)。このジスルフィド結合により、2 本のポリペプチド鎖は解離できなくなると同時に、Fv と SARAH ドメインの間の動きも制限される。

これまでにヒト、ラット、マウス由来の 20 種以上の抗体について Fv-clasp 化してきたが、いずれにおいても活性のある Fv-clasp を大腸菌で生産することが可能だった。しかもそれらの中には scFv では生産ができなかった抗体も含まれている。また、複数の抗体について scFv と Fv-clasp で熱安定性を比較したところ、すべてにおいて Fv-clasp の方が $4^{\circ}\text{C}\sim 11.5^{\circ}\text{C}$ も高い T_m 値を示した。さらに、Fv-clasp は極めて結晶になりやすく、しかも質の高い結晶が得られる傾向にあった。多くの場合、初期スクリーニングで得られた

結晶で 2.0~2.5 Å 分解能程度のデータが得られ、結晶化条件を最適化したものでは、最高で 1.17 Å という非常に高分解能のデータも得られている。

このように Fv-clasp は、生産性、安定性、抗原結合活性、結晶化能のいずれにおいても優れた性質を有しているが、結晶化シャペロンとしてもその有用性が実証されている。我々はこれまでに、肝細胞増殖因子 (HGF) や低密度リポタンパク質受容体 (sorLA)、そしてラミニン受容体インテグリンにおいて、それぞれの特異抗体の Fv-clasp を結合させることで、結晶構造の決定や分解能の改善に成功している。中でもラミニン受容体インテグリンは、基底膜と細胞の間の接着を担う分子であり、増殖や分化など、細胞の基本的な活動をコントロールする非常に重要な分子であるが、その立体構造は報告されておらず、インテグリンによるラミニン認識機構の詳細も不明であった。我々も 15 年以上も前から結晶化に取り組んでいたが、Fab などを利用して一向に結晶が得られていなかった。ところが Fv-clasp を結晶化シャペロンとして用いたところ、初めて結晶が得られ、構造決定に成功した。このことは、Fv-clasp が Fab よりも結晶化シャペロンとして優れ

ていることを強く示唆するものである。

さらに我々は、Fv-clasp をクライオ電子顕微鏡法 (cryo-EM) による構造解析にも応用することで、インテグリン-ラミニン複合体の構造を決定し、詳細な分子認識機構を解明することにも成功している。Cryo-EM では、標的分子の構造の安定化や、観察対象のサイズの増大、画像のアラインメントにおけるマーカーとしての利用などの目的でフラグメント抗体が利用されることがある。試料調製が容易で、スナップショット画像や 2 次元平均画像でも識別可能な特徴的な三角形の構造を有する Fv-clasp は、cryo-EM においても有用なツールとなる。しかも、Fv-clasp は単独での結晶化が容易であるため、高精度に解析された結晶構造を、初期モデルとして cryo-EM のモデル構築時に利用できるのもメリットの一つである。

以上のように、Fv-clasp はタンパク質の立体構造解析に大きく貢献できる技術であると考えられる。また、最近では国内外の多くの研究者に Fv-clasp の試料や技術の提供を行っており、その用途も構造生物分野だけにとどまらず、多様化してきている。今後、益々幅広い分野で Fv-clasp が活躍することを期待する。

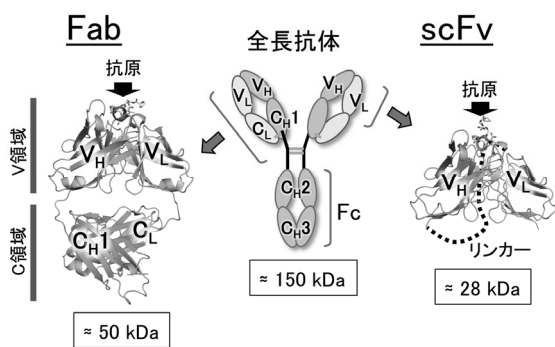


図 1 従来のフラグメント抗体

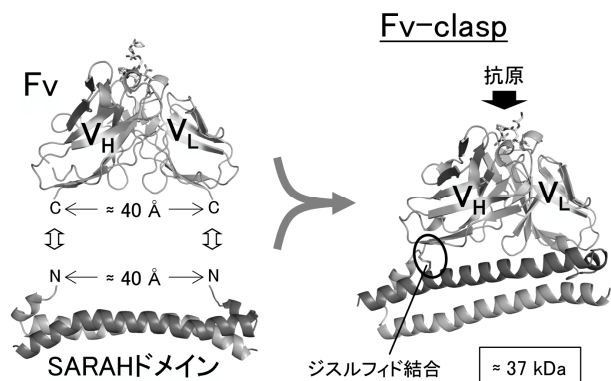


図 2 Fv-clasp のデザイン