

188. 非天然型アミノ酸導入技術による次世代 ADC の開発

横山 茂之

理化学研究所 横山構造生物学研究室

Key words : 抗体薬物複合体, 膜タンパク質, 非天然型アミノ酸, クリックケミストリー

緒言

近年、低分子医薬品のみでは十分な効果の得られない疾患に対して、抗体医薬への期待が高まっている。実際、抗体医薬等のバイオ医薬品の売り上げは上昇する傾向で、創薬研究が盛んに行われている。しかし、抗体分子のみではその高い標的指向性（抗原に対する特異性）にもかかわらず、十分な治療効果を得られない場合がある。そこで、低分子化合物等の薬剤を結合した抗体である抗体薬物複合体（antibody drug conjugate: ADC）が注目を集めている。優れた ADC の作製には、1）ADC に適した標的抗原分子の選択、2）標的細胞の抗原分子に対して高い親和性で結合する抗体の取得、3）抗体上の薬剤結合部位の選択と抗体一分子あたりの薬剤分子数の均一性、等が重要である。本研究では、ADC 作製の新たな技術の確立を目指し、膜タンパク質（GPCR 等）を抗原として設定し、無細胞タンパク質合成法による調製を行うこと、作製したモノクローナル抗体への非天然型アミノ酸の部位特異的導入とクリックケミストリーによって、リンカー・ペイロードを最適な部位特異的で定量的に結合することという 2 つの新規の戦略を組み合わせ、要素となる技術の開発と実証を行った。

我々は、標的抗原分子として、創薬ターゲットとして重要であり、かつ、試料調製が高難度である GPCR 等の膜タンパク質を想定した。GPCR は、Brian Kobilka らによる先駆的な研究から結晶構造解析が可能になってきたとはいえ、極めて高難度な標的であって、細胞で発現した状態に近い膜タンパク質試料を調製して免疫原として用いるモノクローナル抗体作製は、容易ではない。現在は、標的タンパク質発現細胞をそのまま用いる免疫や DNA 免疫等が多用されている。GPCR の結晶構造解析には、モノクローナル抗体を利用する方法がしばしば用いられている。他方、我々は、特にタンパク質複合体などの高難度なタンパク質試料の調製に適した方法として、大腸菌無細胞タンパク質合成法を開発し、数多くの結晶構造解析に成功してきた¹⁻³⁾。さらに、我々は、2005 年、世界に先駆けて、GPCR の無細胞タンパク質合成の成功を報告した⁴⁾。引き続き、それまで困難であると報告されてきた真核生物由来膜タンパク質について、分子機能を有する試料の大量調製と結晶構造解析に成功した⁵⁾。本研究では、この無細胞タンパク質合成法をヒト由来の多数回膜貫通型タンパク質の調製に広範囲に応用するための数々の基本的技術の開発を進め、GPCR 等の立体構造を認識するモノクローナル抗体を取得する技術の確立することを目指した。

既に実用化された ADC では、抗体表面に複数存在する反応性残基（システイン、リシン等）を低分子化合物の薬剤結合部位にしてきた。しかし、天然型のアミノ酸配列によって規定される結合部位が、抗体の立体構造から見て最適な位置にあるとは限らない。また、抗体分子あたりの薬剤分子の数を均一にするには、微妙な反応条件の制御や精製を繰り返す必要があり、コスト高を招き工業製品として製品化を難しくしている。これに対して、本研究では、我々がこれまで 30 年近くにわたって開発してきた非天然型アミノ酸の部位特異的導入法を活用して、ADC を作製する新規技術の確立することを目指した。我々は、タンパク質生合成においてアミノ酸と tRNA とを認識して結合するアミノアシル tRNA 合成酵素（aaRS）の構造生物学的な研究を進めてきた実績に基づいて、aaRS および tRNA の改変を行い、有用な非天然型アミノ酸をタンパク質に部位特異的に導入する技術の開発を進めた。2002 年、改変した細菌由来のチロシン特異的 aaRS と tRNA とを哺乳類培養細胞において発現することにより、非天然型チロシン誘導体を UAG コドン特異的に導入する技術を世界に先駆けて開発した⁶⁾。

さらに、2008 年には、古細菌のピロリシン特異的 aaRS（PyIRS）の立体構造を解明し、非天然型アミノ酸のレバートリーを、チロシン誘導体より側鎖が長いリンカーをもつリシン誘導体へと拡大することに成功した⁷⁾。既に、タンパク質に導入したリシン誘導体が、それまで用いてきたチロシン誘導体よりも高い効率で、蛍光標識物質と結合できるこ

とを実験的に確認しており、蛍光物質の代わりにペイロードを結合しても、同様の効果が得られると期待される。本技術の最大の優位性は、抗体の最適な箇所へ最適な数の抗癌剤を結合した ADC デザインを行うことを可能とする点が挙げられるが、これに留まらない。リシン誘導体は、側鎖、すなわち化合物と結合するリンカー部分が長く、タンパク質の内側に埋もれないため、他の非天然型アミノ酸導入技術と比較して化合物の結合効率が高い。本研究では、Barry Sharpless により提唱された簡便かつ高収率に目的物質を結合できる手法であるクリックケミストリーを用いることにより、非天然型アミノ酸導入技術を最大限に活用することを計画した。

本研究では、このような独創的なプランにより、様々な要素技術を開発して、それらを組み合わせて活用し、実際にヒト GPCR 等の膜タンパク質を標的とする ADC の作製までを行うことにより、次世代 ADC 技術を確立した。

方 法

1. 免疫原・抗原とする膜タンパク質試料の無細胞タンパク質合成法による調製

抗原とする複数回膜貫通型の膜タンパク質（主としてヒト GPCR）について、無細胞タンパク質合成法による発現を行った。無細胞タンパク質合成は、我々が世界に先駆けてリガンド結合能のある GPCR の調製に成功した「界面活性剤法」に加えて⁴⁾、我々が開発し、微生物型ロドプシンに対して既に威力を発揮することが判明している「P-MF 法」⁸⁾、さらに、新規に開発した「S-MF 法」⁹⁾ を実施した。図 1 に、これらの無細胞タンパク質合成法の概略を示す。

「界面活性剤法」（図 1 上段）では、無細胞タンパク質合成反応液中で多数回膜貫通型の膜タンパク質が合成されると、脂溶性の高い膜貫通領域に界面活性剤が結合し、目的膜タンパク質と界面活性剤の混合ミセル（プロテオミセル）が生成される。タンパク質合成量を高めるため、無細胞タンパク質合成反応液をアミノ酸等の基質を含む外液に対して透析するが（透析法）、このとき、プロテオミセルが維持されるように条件を設定する。アフィニティータグ（N 末端 His タグや FLAG タグ）等による精製により、高純度の膜タンパク質を大量調製した。さらに、このプロテオミセルを用いてプロテオリポソームを再構成することにより、膜タンパク質の立体構造の均一性や比活性を高めた。このプロテオミセルを免疫原・抗原として用いることができる。

「P-MF 法」（図 1 中段）では、無細胞タンパク質合成反応液に、脂質（卵黄レシチン）と界面活性剤の混合物（混合ミセル）を加えて、多数回膜貫通型の膜タンパク質を合成した。合成されたポリペプチドの膜貫通領域には、界面活性剤や脂質が結合して、沈殿を防ぐ。膜タンパク質がフォールディングするのにもなって、徐々に脂質二重膜構造が形成される。このため、フォールドした膜タンパク質が脂質二重膜のフラグメントに組み込まれたかたちとなる。さらに、無細胞タンパク質合成反応液をアミノ酸等の基質を含む外液に対して透析するため、透析膜を通して界面活性剤が反応液外に排出され、反応液中の脂質の界面活性剤に対する比率が上昇することにより、無細胞タンパク質合成反応液中で、膜タンパク質を組み込んだ脂質二重膜フラグメントが融合して沈殿性の大きな膜フラグメントが形成され、最終的には、プロテオリポソームが構成される。この大きな膜フラグメントやプロテオリポソームは、超遠心法によって沈殿として回収される（沈殿性膜フラグメント：P-MF）。この「P-MF 法」によって調製した膜タンパク質は、「界面活性剤法」と比較して、立体構造の均一性や比活性が高く、ヒト GPCR 等の不安定な膜タンパク質に適すると期待された。膜タンパク質のリガンド結合性等のチェックは、プロテオリポソームのままで行うことが可能であった。膜タンパク質の精製試料の調製は、プロテオリポソームから、マイルドな界面活性剤を用いて可溶化した後、アフィニティータグによる精製等によって行った。精製前あるいは精製後に再構成したプロテオリポソームは免疫原となる。

「S-MF 法」（図 1 下段）では、「P-MF 法」と類似して、無細胞タンパク質合成反応液に脂質と界面活性剤の混合物（混合ミセル）を加えて膜タンパク質を合成し、フォールドした膜タンパク質を脂質二重膜のフラグメントに組み込む。「P-MF 法」との違いは、脂質と界面活性剤の量比を保って、脂質二重膜フラグメントを可溶性な状態に維持し、プロテオリポソームまで成長しないようにすることである。これによって、超遠心では沈殿せず、可溶性画分に回収される。このため、「S-MF 法」では、「P-MF 法」と異なり、精製のために界面活性剤による可溶化を行うことなくカラム精製を行うことができ、可溶化による立体構造の損傷や回収率の低下を避けられると期待された。精製後にリポソームを再構成し、純度と均一性の高いプロテオリポソームを大量に調製でき、良好な免疫原として用いることもできる。また、界面活性剤による可溶化を経ること無く、脂質メソフェーズ法（LCP 法を含む）によって、脂質二重膜環境での結晶化に進むこともできる。このように「S-MF 法」では、3つの無細胞タンパク質合成法の中で、質的および量的な優位性があり、「界面活性剤法」と「P-MF 法」の利点を合わせたことになる。

「P-MF 法」と「S-MF 法」では、界面活性剤に加えて、脂質を混合ミセルのかたちで無細胞タンパク質合成反応液に加える。膜タンパク質を含む脂質二重膜フラグメントやプロテオリポソームの中で、脂質分子は、脂質二重膜環境の形成を担い、膜タンパク質の正しいフォールディングの「場」を与えることに加えて、特定の脂質分子が特異的に膜タン

パク質と相互作用し、重要な役割を果たす可能性もある。そこで、脂質として、卵黄レシチンの代わりに、哺乳動物組織由来の脂質混合物を用いて、「P-MF法」と「S-MF法」を実施した。ヒト由来の多数回膜貫通型タンパク質の調製には、いずれの方法でも、動物脂質の効果は大きく、立体構造の均一性、安定性、比活性等、大幅な向上がみられた。「P-MF法」で調製した膜タンパク質の可溶化の過程において、マイルドな界面活性剤では可溶化できなくなる（界面活性剤抵抗性を獲得する）場合があり、動物細胞の界面活性剤抵抗性膜ドメインとの類似性を想起させた。このとき、強い界面活性剤で無理に可溶化すると、含まれていた脂質分子が失われたり、変性する場合もあった。また、従来の膜タンパク質の調製法である動物細胞で膜タンパク質を発現させた場合には、界面活性剤がマイルド過ぎると可溶化率が低く（場合によっては全く可溶化されず）、逆に強すぎると、可溶化率は高くても立体構造や活性が失われるというジレンマが発生する。このため、細胞での膜タンパク質発現では界面活性剤の選択は極めて重要で、多種類の界面活性剤をスクリーニングする必要があるとされ、最適な界面活性剤でも、低い可溶化率に留まることがしばしばある。これに対し、我々の開発した「S-MF法」では、無細胞タンパク質合成法の優位性を最大限に引き出し、細胞での発現を大きく上回る優れた方法であると期待された。

大腸菌無細胞タンパク質合成法による膜タンパク質の調製

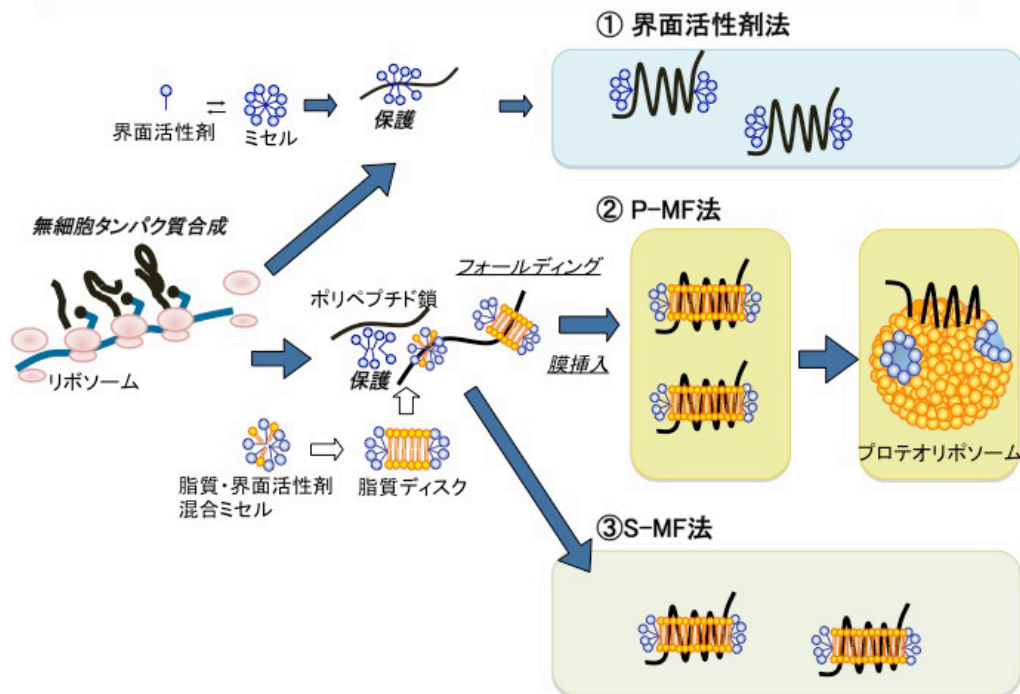


図1. 無細胞タンパク質合成法による膜タンパク質の調製

膜タンパク質の無細胞タンパク質合成において、リボソームによって合成されたポリペプチド鎖は、翻訳と同時に脂質／界面活性剤と相互作用し、膜タンパク質としてのフォールディングを行う。この膜タンパク質は、①～③の3種類の方法で疎水性環境に埋め込まれた形で回収されるが、② P-MF法および③ S-MF法は、脂質二重膜環境にフォールディングする点で優れており、さらに、③ S-MF法は、精製等の処理のために界面活性剤で可溶化する必要がない点で、質的にも量的にも優れている。

2. モノクローナル抗体の作製およびキャラクタリゼーション

無細胞タンパク質合成法により調製し、精製したヒト GPCR 等の膜タンパク質を、phosphatidylcholine (PC) および lipid A (アジュバンド) を含むプロテオリポソームに再構成し、モノクローナル抗体作製の免疫原として用いた。クローンのスクリーニングは、膜タンパク質抗原をプロテオリポソームに再構成して安定化した試料を用いる ELISA と、HEK293 細胞に膜タンパク質を発現して用いる FACS とを組み合わせて行った。界面活性剤で可溶化した膜タンパク質試料を用いて、FSEC の溶出位置の変化から抗体との安定な複合体形成を確認し、また、変性ドットプロットで

認識されないことによって抗体による認識の立体構造依存性を確認した。立体構造認識モノクローナル抗体について、プロテオリポソームを固定化した表面プラズモン共鳴法によって、結合親和性を解析した。

精製抗体のパパイン処理等により Fab を調製した。さらに、可変領域 (V 領域) を含む cDNA をクローニングして、Fv や Fab を、無細胞タンパク質合成法によって調製した (グラム陽性菌での分泌発現と比較して量的・質的に良好)。上市されている抗体医薬であるトラスツズマブ (trastuzumab: 抗 HER2 モノクローナル抗体) のアミノ酸配列に基づいて、無細胞タンパク質合成用のコンストラクト (大腸菌のコドン使用頻度に合わせる等の設計を行ったもの) を作製し、また、抗膜タンパク質抗体の可変領域と trastuzumab の定常領域を連結したキメラ抗体や、CDR をヒト抗体に移植したヒト化抗体を作製した。Fv、Fab、全長抗体を、ジスルフィド結合形成条件での無細胞タンパク質合成法により調製した。抗原との結合は、抗原タンパク質試料を用いた ELISA によって確認した。Fv または Fab について、単独または抗原タンパク質との複合体として結晶化し、SPRING-8 のビームラインを用いて、立体構造を決定した。

3. 非天然型アミノ酸の部位特異的導入およびクリックケミストリー反応

ADC 作製には、我々が開発してきた非天然型アミノ酸のタンパク質への部位特異的導入技術を用いた。翻訳で導入される「22 番目のアミノ酸」として知られるピロリシン (pyrrolysine, Pyl, 図 2) に対応するメタン生成古細菌由来のピロリシン特異的 tRNA (tRNA^{Pyl}, コドン UAG を認識する) およびピロリシル tRNA 合成酵素 (PylRS) を活用した。PylRS は、アミノ酸特異性が広く、本来の基質である Pyl に加えて、BocLys 等の非天然型リシン誘導体を基質としてアミノアシル tRNA を合成するが、より嵩高い Z リシン (Nε-(o-benzyloxycarbonyl)-L-lysine, ZLys, 図 2) を基質として効率よく認識させるためには、PylRS のアミノ酸結合部位等の Y306A/Y384F 二重変異が必要であった。この Z リシンを元に、クリックケミストリーのための反応基 (アジド、アルキン、図 3) をもつ Z リシン誘導体として、アジド Z リシン [o-azido-Z-lysine, Nε-(o-azidobenzyloxycarbonyl)-L-lysine, AzZLys]、エチニル Z リシン (EtZLys) 等を調製し、PylRS の Y306A/Y384F 二重変異体との相互作用を X 線結晶構造解析等によって解析した。加えて、銅 (I) イオン触媒を用いないクリックケミストリーのための非天然型アミノ酸である bicyclo[6.1.0]nonyne-L-lysine (BCN リシン)、trans-cyclooct-2-ene-L-lysine (TCO リシン) も検討した (図 2)。

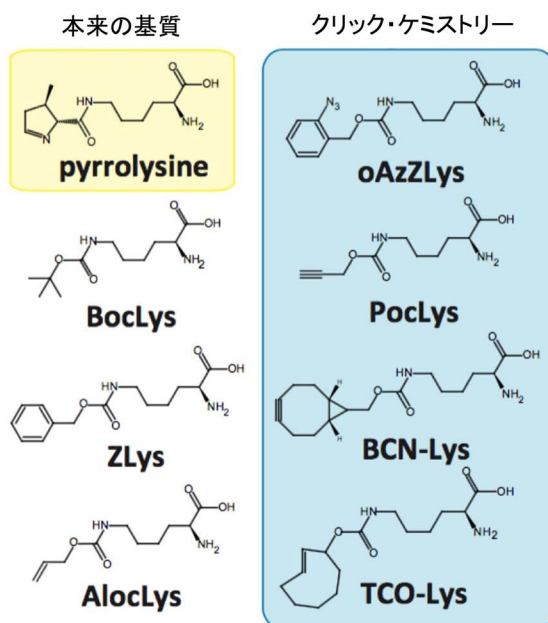


図 2. PylRS 変異体を用いてタンパク質への部位特異的導入に用いる非天然型アミノ酸 (ピロリシン・アナログ)

PylRS は、本来の基質 (pyrrolysine) に加えて、BocLys や AlocLys を基質とすることができる。さらに、PylRS に複数の変異を導入し、アミノ酸結合ポケットを拡張することにより、ZLys およびその誘導体を基質として用いることができる。oAzZLys、PocLys、BCN-Lys、TCO-Lys 等を、クリックケミストリーに用い、リンカー・ペイロードを抗体に部位特異的導入して、ADC を作製することができる。

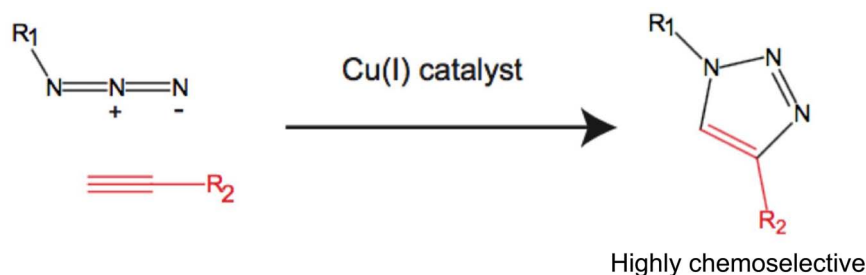


図3. クリックケミストリーの例

アジドとアルキンの反応を銅(I)イオン触媒を用いて反応させ、トリアゾールを形成する。

モノクローナル抗体のアミノ酸配列中で非天然型アミノ酸を導入する位置は、対応するコドンにUAGに置換することによって指定した。そのようなUAG置換コンストラクトを用意し、無細胞タンパク質合成法により、非天然型アミノ酸を位置特異的に含む抗体分子（Fv、Fab、または全長抗体）を調製した。ここで、通常は無細胞タンパク質合成系を用いると、系に含まれる翻訳終結因子RF1がコドンUAGの認識でtRNA^{Pyl}と競合するため、非天然型アミノ酸の導入効率は20~30%に留まり、残りは翻訳が終結してしまう。この点に対し、非天然型アミノ酸導入効率をほぼ100%に上げるために、RF1の遺伝子を大腸菌のゲノム工学により破壊した株¹⁰⁾を用いて、無細胞タンパク質合成系を調製して用いた。モノクローナル抗体分子の複数の導入位置を設定して無細胞タンパク質合成法による非天然型アミノ酸導入を実施し、タンパク質合成効率、非天然型アミノ酸の導入効率（天然型アミノ酸が誤って取り込まれないか）、精製タンパク質の純度・均一度・熱安定性等の観点で、比較を行った。一部については、大腸菌のRF1の遺伝子破壊株を用いて、細胞系での分泌発現による非天然型アミノ酸導入も行った。

非天然型アミノ酸を組み込んだ抗体分子について、クリックケミストリーで反応する蛍光試薬を用いて、反応効率を検討した。アジドZリシンを導入した抗体分子については、銅(I)イオンを触媒として、アルキンをもつ試薬と反応させた。同じく銅(I)イオン触媒を用いて、エチニルZリシン導入抗体分子とアジドをもつ試薬との反応を行った。アジドZリシン導入抗体分子については、DBCO（Dibenzylcyclooctyne）試薬との銅(I)イオンを用いない反応を行った。BCNリシン導入抗体分子およびTCOリシン導入抗体分子については、テトラジン試薬と反応させた（銅(I)イオンを用いない）。これらの反応の効率を蛍光によって比較した。

ADC作製については、図4の試薬（リンカーおよびペイロード）を用いて検討を行った。リンカーとペイロードの間の結合は、スクシンイミド基とアミノ基との反応で行い、リンカーと抗体分子の間の結合は、クリックケミストリーで行った。ここで、まず、抗体とリンカー試薬を反応し、その後、抗体に結合したリンカーとペイロード試薬を反応させる場合と、リンカー試薬とペイロード試薬を反応して連結分子を調製し、それを用いて抗体分子とのクリックケミストリーを行う場合を検討した。

以上の、非天然型アミノアシル tRNA の合成、リボソームによる UAG コドンの非天然型アミノ酸への翻訳、非天然型アミノ酸を含む抗体分子の性状、非天然型アミノ酸側鎖の反応基のクリックケミストリーという異なるステップの評価を総合して、全体としての最適な条件を選択した。

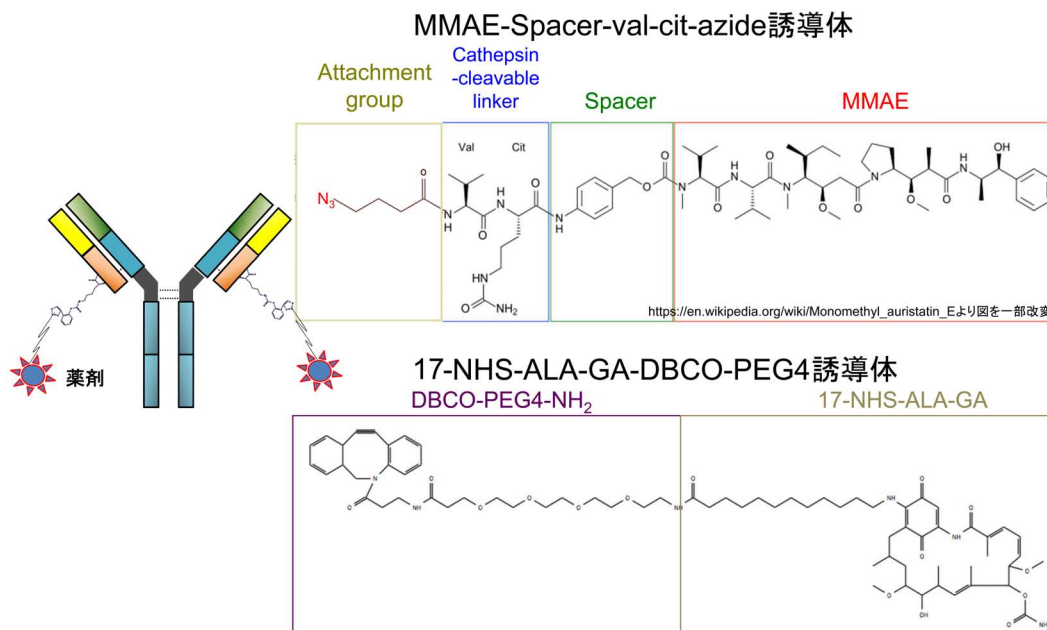


図4. 抗体薬物複合体（ADC）作製に用いるリンカー・ペイロード（クリックケミストリー）の例
 MMAE-Spacer-val-cit-azide 誘導体は、そのアジド基で、抗体に部位特異的導入した PocLys、BCN-Lys、TCO-Lys 等の非天然型アミノ酸と、クリックケミストリーにより結合する。17-NHS-ALA-GA-DBCO-PEG4 誘導体は、その DBCO 基で oAzZLys 等と結合する。

結 果

1. 免疫原・抗原とする膜タンパク質試料の無細胞タンパク質合成法による調製

本研究では、ADC の標的として、膜タンパク質（1回～複数回膜貫通型）を想定した。モノクローナル抗体作製に用いるための膜タンパク質試料の調製は、技術的に高難度である。特に試料調製が難しいものの一つとして、7回膜貫通型膜タンパク質 GPCR があるので、複数の GPCR を選定して検討を行った。

ケモカイン受容体（クラス A の GPCR）のひとつ（GPCR-A）について、モノクローナル抗体作製のための免疫原としての利用を想定して無細胞タンパク質合成を「界面活性剤法」により行った。大腸菌無細胞タンパク質合成系を用い、界面活性剤 Brij 78 の存在下で、His タグと FLAG タグを付加した GPCR-A を合成し、His タグ・アフィニティー精製を行い、TEV プロテアーゼ配列でタグを切断した。GPCR-A は、ゲルろ過カラムクロマトグラフィーで鋭いピークとして溶出され、高純度に精製された。精製 GPCR-A 試料を、脂質として PC およびビオチン化 phosphatidylethanolamine を含むプロテオリポソームに再構成した。表面プラズモン共鳴により、GPCR-A 再構成プロテオリポソームについて、無細胞タンパク質合成法で調製したリガンドタンパク質（ケモカイン）との解離定数は 590 ± 160 nM と見積もられた。この 10^7 M オーダーの解離定数は、GPCR-A 発現細胞を用いて測定された値に近く、リガンド結合活性をもつ割合がかなり高いことがわかった。この精製 GPCR-A 試料を、脂質として PC および lipid A（アジュバンド）を含むプロテオリポソームに再構成し、モノクローナル抗体作製の免疫原として用いた。

さらに、GPCR-A に加えて 3 種類のケモカイン受容体を含む 10 種類以上の GPCR について、上述の P-MF 法での無細胞タンパク質合成を行い、PC プロテオリポソームの状態での試料を、1 ml の無細胞タンパク質合成反応液（大腸菌の培養液として約 50 ml に相等する）あたり 0.2~0.3 mg の GPCR を調製することができた。これらの中からケモカイン受容体を中心にして、その後開発した新規方法である S-MF 法での無細胞タンパク質合成、精製を行った。この S-MF 法の特徴は、上述したように、無細胞タンパク質合成反応液に、界面活性剤とともに動物脂質混合物を加え、タンパク質合成と並行して、可溶性の脂質二重膜フラグメント（S-MF）に組み込まれた膜タンパク質を合成することである。実際、ケモカイン受容体について、界面活性剤を用いる可溶化ステップを経ること無く、一貫して脂質二重膜環境に維持し、高純度精製から脂質メソフェーズ法による結晶化までを行うことに成功した。また、GPCR の S-MF 試料

をプロテオリポソームに再構成することで、安定性を高め、長期保存を可能にし、また、免疫原としても利用することができた。この無細胞タンパク質合成法では、同じ膜タンパク質を昆虫またはヒト培養細胞で発現し、その膜面分から可溶化・精製を経て調製した試料の場合と比較して、数 mg レベルの調製が、より容易で、純度と均一度が、より高いという点で、優位性を示した。

2. モノクローナル抗体の作製およびキャラクタリゼーション

免疫原として、無細胞タンパク質合成し、プロテオリポソームに再構成した GPCR 試料（上記 1.）を用いて、マウス・モノクローナル抗体の作製を行った。ケモカイン受容体ヒト GPCR-A について、モノクローナル抗体の作製を行った。プロテオリポソームを用いる ELISA と、GPCR-A を発現した HEK293 細胞を用いる FACS によってクローンのスクリーニングを行った。その結果から、ELISA 陽性のクローンの内、FACS 陽性クローンは GPCR-A の細胞外領域を認識し、FACS 陰性クローンは、細胞内領域を認識すると推定した。選択したクローンについて、FSEC と変性ドットプロットを行い、GPCR-A の立体構造を認識し、安定な複合体を形成するものを選んだ。SPR により解離定数を測定し、 10^{-10} ~ 10^{-9} M 程度の高い親和性を示すクローンを得た。以上により、無細胞タンパク質合成法により、ネイティブな立体構造をとる GPCR-A を合成できていたことも確認できた。細胞外認識抗体 3 系統、細胞内認識抗体 1 系統の抗体について、cDNA をクローニングし、アミノ酸配列を決定した。さらに、無細胞タンパク質合成法により、H 鎖と L 鎖を共発現し、Fab フラグメントを調製し、結晶構造解析を行った。これらの Fab フラグメントを用いて、S-MF 法によって調製した GPCR-A との共結晶化を行っている。さらに、細胞外認識抗体を、後述する ADC の作製に用いた。

GPCR 等のヒト膜タンパク質を再構成したプロテオリポソームを免疫原とするモノクローナル抗体作製として、膜タンパク質試料の調製を、3 種類の無細胞タンパク質合成法（界面活性剤法、P-MF 法、S-MF 法）および 2 種類の細胞系発現法（昆虫細胞、HEK293 細胞）で行った場合のいずれでも、条件の探索の結果、立体構造認識抗体を取得することができた。結果を総合すると、免疫原調製には、S-MF 法によって合成し、プロテオリポソームに再構成する方法が、質的、量的に優れていた。S-MF 法により調製した膜タンパク質は、純度が高く、また、脂質等の条件も整えられるため、立体構造の均一度が高く、安定性も高い。さらに、脂質メソフェーズ法による結晶化も可能であり、これらの特性が、免疫原として優れている理由であると考えられる。

抗体医薬の開発には、マウス・モノクローナル抗体をヒト抗体に近づける必要がある。そこで、ヒト・モノクローナル抗体 trastuzumab の重鎖および軽鎖について、化学合成により発現コンストラクトを作製し、無細胞タンパク質合成の共発現により、合成を確認した。trastuzumab の定常領域（C 領域）と、抗癌剤開発の目的で調製されたマウス・モノクローナル抗体の可変領域（V 領域）とを接続して、キメラ抗体を作製した。さらに、このキメラ抗体の Fab フラグメントを作製し、抗原タンパク質（1 回膜貫通型）の細胞外ドメイン試料との共結晶構造を決定し、認識部位（エピトープ）の認識を確認した。

3. 非天然型アミノ酸の部位特異的導入およびクリックケミストリー反応

PyIRS の触媒ドメインの Y306A/Y384F 二重変異体について、アジド Z リシンとエチニル Z リシンを含む十数種類の非天然型アミノ酸との複合体の結晶構造を決定した（図 5）。

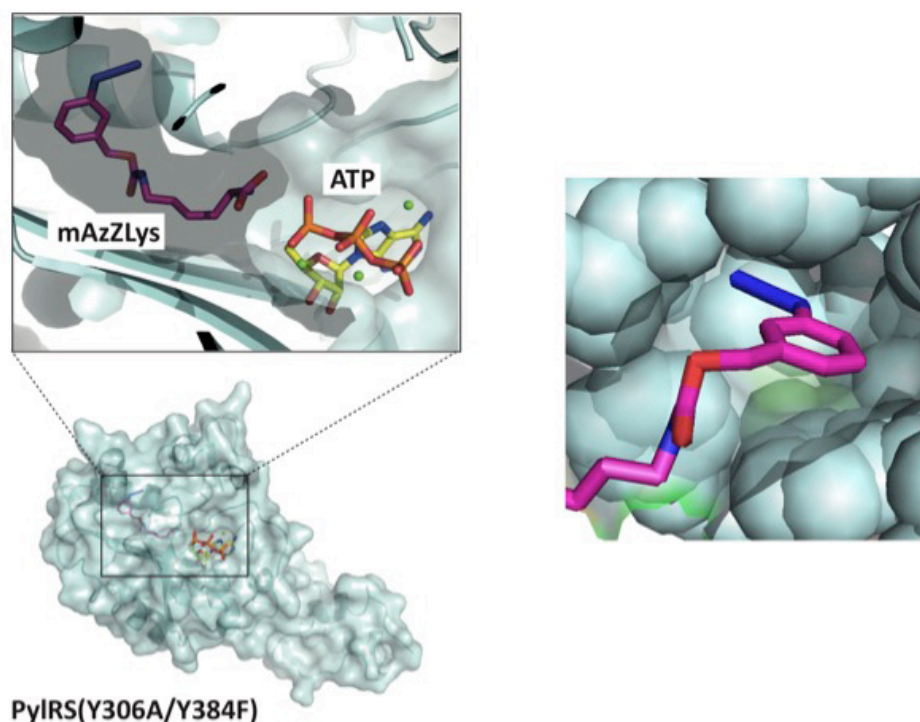


図5. PyIRSのY306A/Y384F二重変異体による非天然型アミノ酸（メタアジドZリシン、mAzZLys）の認識様式
 本酵素は、mAzZLysとATPを反応して、タンパク質合成に必要なアミノ酸活性化を行い、そのアミノアシル基を専用のtRNAに結合する。PyIRS(Y306A/Y384F)・mAzZLys・ATP複合体の結晶構造解析により、Y306A変異によって拡張されたポケットに、アジドZ基が認識されている様式が明らかになった。

これらのZリシン誘導体のうち、PyIRSに結合した状態で、単一のコンフォメーションに固定されるものと、複数のコンフォメーションの共存となるものに分かれた。Zリシン誘導体の芳香環領域は、いずれも、Y306A変異によって拡張された疎水性ポケットに結合し、アジド基等の置換基と酵素との立体障害を避けるようにコンフォメーションを適合させていることがわかった。この認識様式に基づいて検討した結果、Y306A/Y384F変異体は、アジドZリシンやエチニルZリシンの導入に適していることがわかった。

この変異体PyIRSを用いて、抗ケモカイン受容体モノクローナル抗体やtrastuzumab等のFabフラグメントの定常領域の複数の部位を指定して、アジドZリシン等の部位特異的導入を行った。大腸菌RF1破壊株を活用することにより、非天然型アミノ酸導入タンパク質の合成量は、通常のタンパク質と同程度に高いことを確認できた。アジドZリシンの導入部位によっては、タンパク質の性質が悪化等の不具合（可溶性の低下、精製純度の低下、アジド基の副反応等）を生じることがわかった。そのような不具合が生じない部位を選択し、ほぼ百パーセントの効率で導入されていることを質量分析により確認した。それらの部位の中から、アジドZリシンを導入したタンパク質試料の結晶構造解析を行ったところ、アジドZリシン側鎖の電子密度が観測されない（ディスオーダーしている）場合と、観測される（コンフォメーションが固定化される）場合とがあった。以上のような検討を総合して、抗体へのアジドZリシン導入に適した部位を選択することができた（一部について特許出願済）。これに加えて、BCNリシンおよびTCOリシンの部位特異的導入も行い、アジドZリシンよりは効率が悪いが、十分量のタンパク質を得られることを確認した。

アジドZリシン、エチニルZリシン、BCNリシンまたはTCOリシンを部位特異的に導入したtrastuzumab、抗ケモカイン受容体モノクローナル抗体等のFabフラグメントについて、蛍光基を有する化合物との間でのクリックケミストリーの反応を行った。アジドZリシンについては、アルキン基との銅(I)イオンを触媒とする反応、あるいはDBC O基との銅を用いない反応を行い、特に後者では、90%以上の効率で蛍光標識できた。エチニルZリシンについては、

アジド基を有する試薬との銅(I)イオンを用いる反応、BCN リシンと TCO リシンについては、テトラジン基を有する試薬との銅を用いない反応を行い、いずれもタンパク質の蛍光標識が確認されたが、TCO リシンでの効率が高かった。

これらの条件検討に基づき、実際の ADC 試薬（リンカーおよびペイロード）の結合を実施した。リンカーと Fab 分子の間のクリックケミストリーによる結合は、アジド Z リシンと DBCO 基との銅を用いない反応、または、エチニル Z リシンとアジド基との銅(I)イオンを用いる反応で行った。これらの Fab 分子の薬物複合体のいずれの場合も、抗原を発現した培養細胞に対する殺傷作用が確認された。

考 察

膜タンパク質の無細胞タンパク質合成から、それを抗原とするモノクローナル抗体の作製と結晶構造解析、モノクローナル抗体への非天然型アミノ酸の部位特異的導入とクリックケミストリーによる薬剤との結合までを実施した。その過程で、これらの独自性の高い要素技術群について、様々な条件検討を行い、それらを駆使する一貫した ADC 作製技術としての有用性を示すことができた。無細胞タンパク質合成法と非天然型アミノ酸部位特異的導入法は、共に、我々が 30 年近くにわたって開発してきたものであり、その組み合わせによる次世代 ADC 技術の開発は、国際的にも全く類をみない独創的な成果で、従来の ADC 技術に対して大きな優位性が期待されるものである。今後、本研究で確立した技術を適用し、実際の創薬ターゲット GPCR 等に対して、優れた ADC を開発することができると期待する。

我々が確立した無細胞タンパク質合成法によるヒト GPCR 等の調製法は、機能をもった状態での試料を大量かつ均一に調製することが可能で、結晶構造解析の試料作製法としても、極めて有望である。実際、本研究で用いた GPCR については、脂質メソフェーズ法によって既に結晶が得られている。さらに、無細胞タンパク質合成した免疫原を用いて、GPCR の立体構造を認識するモノクローナル抗体の取得と大量調製も可能になっており、不安定なことで悪名の高い GPCR を、多数の変異を導入すること無く安定化し、結晶化の成功率を高め、分解能を向上させる効果も大いに期待できる。

ここで開発して用いた、動物組織由来の脂質混合物と界面活性剤を組み合わせる方法は、膜タンパク質の機能的な立体構造の形成に必須な脂質分子種を組み込んだフォールディングを達成する貴重な方法になるであろう。そのような適切な特異的脂質を含む脂質二重膜に組み込まれた状態の受容体等の膜タンパク質は、本来の発現場所である動物細胞の界面活性剤抵抗性膜ドメインと類似して、強い界面活性剤でないと可溶化されなくなり、無理に可溶化することで結合脂質の一部が失われたり、本来の立体構造が損なわれることがあった。すなわち、膜タンパク質を細胞に発現して可溶化するという伝統的な戦略には重大な限界が存在するのである。本研究の S-MF 法では、膜タンパク質を、必要な脂質分子種を結合した状態で脂質二重膜環境にフォールディングさせ、単離精製後、脂質二重膜環境から一度も可溶化することなく、リボソームとして再構成することで免疫原として用い、脂質メソフェーズ法の結晶化用試料としても用いることができる。すなわち、膜タンパク質を界面活性剤で可溶化しないと調製できず、可溶化すると機能・構造が損傷を受けるという、従来の膜タンパク質の生化学的手法が抱えてきた深刻なジレンマを解決することができ、膜タンパク質の研究にパラダイムシフトともいえる大きな貢献をすると期待される。また、GPCR 等の膜タンパク質は、抗体医薬の標的のみでなく、低分子医薬の標的としても、極めて重要である。したがって、本研究で確立した戦略をとることで、結晶構造解析が容易になれば、低分子薬開発にも大きく貢献することが期待される。

抗体分子への部位特異的な非天然型アミノ酸の導入は、タンパク質工学での成功にとどまらず、医薬品開発に革新をもたらすと考えられる。抗体はもちろん、抗体以外のタンパク質やペプチドの医薬品にも同様に非天然型アミノ酸は導入できる。今回は、抗体分子に低分子化合物を結合させるが、低分子化合物だけではなく、ポリエチレングリコールなどの薬剤の代謝を遅らせる高分子についても、決まった部位に、適切なリンカー長で結合させることができる。高分子を結合した例は既に上市されている医薬品であるペゲーインターフェロンや、セルトリズムマブペゴルがあるが、非天然型アミノ酸導入技術によって、さらに的確で厳密に制御された修飾および抗体分子のフラグメントなどが短期間でできるようになると考えられる。これまでの医薬品開発において、薬効はあるが、副作用も強かったために実用化できなかった化合物があまたある。抗体にそれらを結合することによって、疾患部位のみに薬剤を送り届け、副作用を抑制できると思われる。非天然型アミノ酸残基の導入による抗体工学技術の向上により、薬剤量の厳密なコントロールが可能になり、ADMET を意識した投与が可能になると期待している。

文 献

- 1) Terada T, Murata T, Shirouzu M, Yokoyama S. : Cell-free expression of protein complexes for structural biology, *Methods in Molecular Biology*, ed. by Chen Y., Humana Press, New York, pp 151-159, 2014
- 2) Terada T, Kusano S, Matsuda T, Shirouzu M, Yokoyama S. : Cell-Free Protein Production for Structural Biology, *Advanced Methods in Structural Biology*, ed. by Senda T. & Maenaka K., Springer, Tokyo, pp 83-102, 2016
- 3) Arai S, Saijo S, Suzuki K, Mizutani K, Kakinuma Y, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, Terada T, Shirouzu M, Yokoyama S, Iwata S, Yamato I, Murata T. Rotation mechanism of *Enterococcus hirae* V1-ATPase based on asymmetric crystal structures. *Nature*. 2013 Jan 31;493(7434):703-7. PubMed PMID: 23334411, doi: 10.1038/nature11778.
- 4) Ishihara G, Goto M, Saeki M, Ito K, Hori T, Kigawa T, Shirouzu M, Yokoyama S. Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expr Purif*. 2005 May;41(1):27-37. PubMed PMID:15802218, doi: 10.1016/j.pep.2005.01.013
- 5) Wada T, Shimono, K, Kikukawa T, Hato M., Shinya N, Youngkim S, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Tamogami J, Miyauchi S, Jung KH, Kamo N, and Yokoyama, S. Crystal structure of the eukaryotic light-driven proton-pumping rhodopsin, *Acetabularia* rhodopsin II, from marine alga. *J Mol Biol*. 2011 Sep 2;411(5):986-98. PubMed PMID:21726566, doi: 10.1016/j.jmb.2011.06.028.
- 6) Sakamoto K, Hayashi A, Sakamoto A, Kiga D, Nakayama H, Soma A, Kobayashi T, Kitabatake M, Takio K, Saito K, Shirouzu M, Hirao I, Yokoyama S. Site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2002 Nov 1;30(21):4692-9. PubMed PMID: 12409460
- 7) Mukai T, Kobayashi T, Hino N, Yanagisawa T, Sakamoto K, Yokoyama S. Adding l-lysine derivatives to the genetic code of mammalian cells with engineered pyrrolysyl-tRNA synthetases. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Jul 11;371(4):818-22. Epub 2008 May 8. PubMed PMID: 18471995, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.04.164
- 8) Shimono K, Goto M, Kikukawa T, Miyauchi S, Shirouzu M, Kamo N, and Yokoyama S. Production of Functional Bacteriorhodopsin by an *Escherichia coli* Cell-free Protein Synthesis System Supplemented with Steroid Detergent and Lipid. *Protein Sci*. 2009 Oct;18(10):2160-71. PubMed PMID: 19746358, doi: 10.1002/pro.230
- 9) Shinoda T, Shinya N, Ito K, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, Terada T, Hirata K, Kawano Y, Yamamoto M, Tomita T, Ishibashi Y, Hirabayashi Y, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Yokoyama S. *Sci Rep*. 2016 Jul 28;6:30442. PubMed PMID: 27465719, doi: 10.1038/srep30442.
- 10) Mukai T, Hayashi A, Iraha F, Sato A, Ohtake K, Yokoyama S, Sakamoto K. Codon reassignment in the *Escherichia coli* genetic code. *Nucleic Acids Res*. 2010 38(22): 8188-8195. PubMed PMID: 20702426, doi: 10.1093/nar/gkq707.