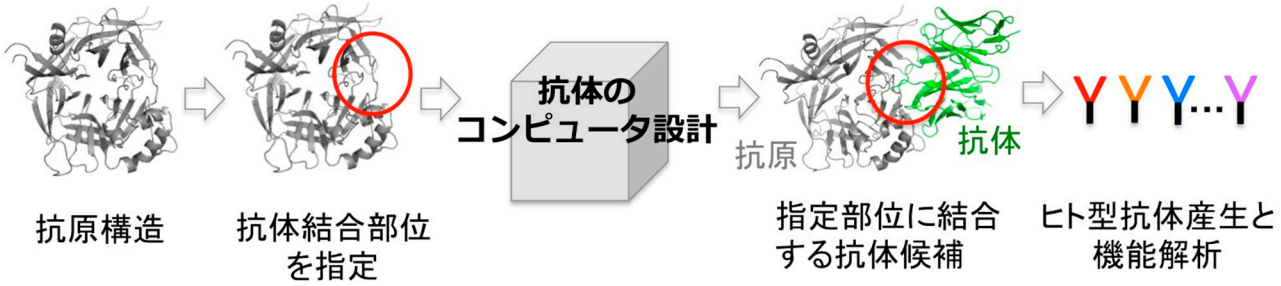
59　構造情報を活用した抗ウイルス人工抗体設計法の開発	橋口　隆生

【目的】本研究では新規抗体作製法として、ウイルス学・構造生物学・コンピュータ計算科学的手法を組み合わせ、抗原の立体構造情報に基づき、ウイルス抗原上の標的部位へ自由自在に抗体をコンピュータ上で理論的に設計し、人工創成することを目的とした。

【方法】抗体の人工設計の標的構造として、我々が自ら構造決定を行った麻疹ウイルス受容体結合蛋白質を用いた。受容体結合蛋白質の機能部位である受容体結合部位を標的として、抗体の人工設計をスーパーコンピュータ上で行い、抗原と抗体の相互作用を結合エネルギーの安定性により評価した。評価スクリーニングで上位に順位付けられた候補配列を実際に人工遺伝子として合成し、HKE293 細胞に導入することで、培養上清中に人工設計抗体を発現させた。この抗体を用いて、EGFP 組み換え麻疹ウイルスによる培養細胞への感染を阻害できるかどうかを評価した。

【結果】人工合成した新規設計抗体は、全体の 3 分の 1 程度の候補において、実際に培養上清中に蛋白質として発現させることに成功した。これらの候補中に、実際に麻疹ウイルス感染を阻害する中和能を持つ抗体が存在することが期待されたが、中和能を発揮する抗体は確認されなかった。しかし、一部の抗体は実際にウイルス抗原への結合が確認できたことから、設計システムをさらに改良することで、有用な抗体作製手段と成り得ることを示した。

抗体のコンピュータ設計の手順



59. 構造情報を活用した抗ウイルス人工抗体設計法の開発

橋口　隆生

九州大学 大学院医学研究院 ウイルス学分野

Key words：抗体，ウイルス，立体構造，人工設計

緒　言

抗体は感染防御機構としての役割のみならず、細胞／分子の単離・標識など生命現象を解明するための研究ツールや、疾患の診断・治療薬として非常に有用である。しかし、標的分子に対して望んだ機能を持つ機能性抗体を取得することは容易ではない。従って、抗体作製のための新たな選択肢（技術）が求められている。さらに、抗体は生命科学分野における研究ツールや、医療分野における医薬品としての利用増加が見込まれている。

そこで、本研究では新規抗体作製法として、抗原の立体構造情報に基づいて、抗原上の目的の部位へ自由自在に抗体をコンピュータ上で理論的に設計し、人工創成する手法の開発を目的とする。モデルとする疾患対象として、抗体に機能性（中和能）があるかどうかを迅速に評価できる麻疹ウイルス感染症を用いる。麻疹（はしか）を起こす麻疹ウイルスは高い伝播力と一過性の強い免疫抑制を特徴とする急性呼吸器感染症である［1］。未だに世界全体で多くの感染者と約 14 万人の死者を毎年出しており（WHO 2018 年度推計）、特異的治療法が存在しないため一旦発症すると対症療法しかない。麻疹ウイルスを含む全てのエンベロープウイルスは粒子表面に存在する糖蛋白質を介して受容体と結合し、細胞内へと侵入する［2〜4］。すなわち、糖蛋白質は病原体の宿主域決定や病原性発現において非常に重要な役割を果たす一方で、同じ糖蛋白質が抗体の主要な標的ともなる。

抗体はその有用性から人工的に設計しようという試みは世界中で行われている。しかし、既存抗体の抗原結合能の増強や 2 種類の抗原に結合できるように改変するなど［5，6］、現在は既存抗体の機能増強・拡張が主で、理論的な抗体の人工設計法の開発はどの研究者も模索中の段階である。将来的に幅広い生命科学領域への応用・貢献を目指すため、本研究では、機能性（中和）抗体取得の迅速化・効率化につながる新規手法を開発することを目的とした。

方　法

1.　抗体の人工設計

抗体設計部位は相補性決定領域（CDR：Complementarity-determining region）と呼ばれる配列変化に富む 6 つのループ領域（CDR-L1、L2、L3、H1、H2、H3）のみに絞って行った。まず、蛋白質構造データベース PDB から抽出した抗体構造ライブラリー（約 800 種類）を用いて、抗体と抗原の複合体の安定性と“かたちの相補性”に基づき、ウイルス抗原構造とのドッキングシミュレーションによるスクリーニングで順位付けを行った（利用プログラム：PatchDock・Rosetta）。次に、抗体と抗原の相互作用面の物理化学的性質も考慮するため、熱力学安定性を構造予測計算で最適化し、CDR 領域のアミノ酸配列の最終決定を行った（利用プログラム：Rosetta・GROMACS）。

2. 抗体の作製

コンピュータ設計した抗体配列の可変領域を人工遺伝子として合成し、ヒト化抗体作製用ベクターを利用して抗体発現プラスミドを作製した。作製したプラスミドを H 鎖と L 鎖で 1：1、2：3、1：3 と比率を変えながら HEK293 細胞へトランスフェクトし、抗体を培養上清中へと蛋白質発現させた。培養上清中の発現抗体は Protein G で精製した。

3. 機能（中和能）解析

EGFP 組み換え麻疹ウイルスと人工設計抗体を含む培養上清を混合して 30 分静置した後、麻疹ウイルスの受容体を発現している培養細胞（Vero-SALM、Vero-Nectin4、Vero-CD46）に感染させ、人工設計抗体による麻疹ウイルス感染阻害能を評価した。抗原に対する人工設計抗体の結合能を評価するために精製蛋白質を用いた ELISA による評価も行った。

結果および考察

1. 抗体の人工設計システムの構築

蛋白質構造データベース PDB から抽出した約 800 種類の高分解能の抗体構造を基にして、抗原との相互作用面に存在するアミノ酸残基を変異させ、約 800,000 種類の異なる配列を持つ抗体の立体構造モデルをコンピュータ上で作製した。次に、ウイルス抗原構造と設計抗体とのドッキングシミュレーションにより、抗原–抗体の複合体の相互作用面積を計算し、1,000 Å 以上の結合面積をもつ抗体のみへと絞り込んだ（この時点で約 600,000 候補）。また、抗原–抗体間の結合エネルギー（ΔG）も計算し、ΔG と“かたちの相補性”に基づき、スクリーニングで順位付けを行った。順位付けを行った設計抗体の上位 1%について、元になった機能性抗体と比較したところ、抗原–抗体の複合体の相互作用面積や結合エネルギーはほぼ同等であることが確認できた（図 1）。従って、コンピュータ設計戦略として、極端な外れ値（理論的に異常な抗体）を生み出すことなく、自然界の選択圧により生まれた抗体と似た物理化学的性質を持つ抗体を設計することが出来る手順であったと考えられる。

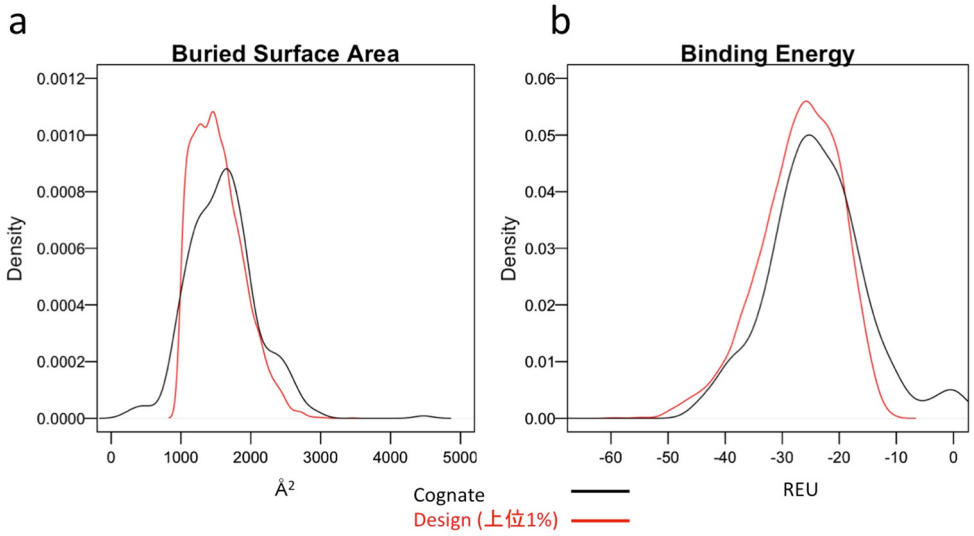


図 1. 人工設計抗体および既存抗体の抗原–抗体相互作用面積と結合エネルギーの比較

a）ウイルス抗原–抗体の立体構造における相互作用面積の比較。

b）ウイルス抗原–抗体の立体構造における結合エネルギーの比較。

2. 人工設計抗体の産生

Top100 スコア中に順位付けられた人工設計した抗体のうち、目視で抗原-抗体の立体構造の相互作用を確認し、機能性抗体として可能性が高いと期待される約 40 候補の配列の可変領域を人工遺伝子として合成した（図 2）。合成した遺伝子をヒト化抗体作製用ベクターへとクローニングし、抗体発現プラスミドを作製した。作製したプラスミドを H 鎖と L 鎖で 1：1、2：3、1：3 と比率を変えながら HEK293 細胞へ共発現させ、抗体を培養上清中へと蛋白質発現させた。Western blotting で抗体の蛋白質発現が確認できた候補について、さらに、大量培養系で蛋白質発現を行い、培養上清中の発現抗体は Protein G で精製した。今回の実験においては、全体の 3 分の 1 程度の候補において、実際に培養上清中に蛋白質として発現させることに成功し、人工設計した人工的な抗体を実際に蛋白質として産生できることを示すことができた。

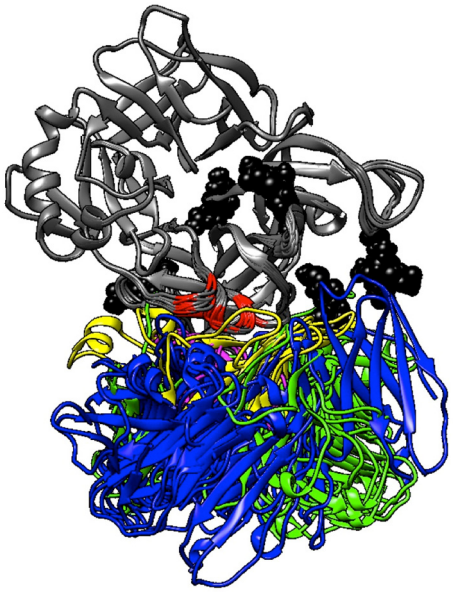


図 2. 上位に順位付けられた抗体と抗原の結合構造
上位 10 候補の抗体構造と麻疹ウイルス受容体結合蛋白質（灰色）の結合モデルを示している。
抗体は受容体結合部位を特異的に認識するように設計されている。

3. 人工設計抗体による機能（中和能）解析

EGFP 組み換え麻疹ウイルスと人工設計抗体を用いて、麻疹ウイルスの受容体を発現している培養細胞（Vero-SALM、Vero-Nectin4、Vero-CD46）に感染させ、人工設計抗体による麻疹ウイルス感染阻害能を評価した。その結果、感染を大きく阻害する機能を発揮する抗体は確認できなかった。そこで、抗原に対する人工設計抗体の結合能を評価するために精製蛋白質を用いた ELISA による評価も行った。その結果、2 種類の抗体については、麻疹ウイルス受容体結合蛋白質への結合が確認できた。

人工設計抗体の約 3 分の 1 程度の候補においては、蛋白質発現に成功したが、約 3 分の 2 程度の候補においては、蛋白質発現そのものが確認できなかったため、抗原抗体の安定性評価に加えて、今後、抗体単独での安定性の評価や分子動力学計算などの導入によるスクリーニングの評価系の改良が必要であると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行に関しまして、東京大学大学院工学系研究科の黒田大祐講師に深くお礼申し上げます。

文　献

1) Griffin DE. Measles virus. In: Knipe DM, Howley PM, J.I. C, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, et al., editors. Fields Virology 6 ed I. Philadelphia.: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 1042-69.

2) Hashiguchi T, Kajikawa M, Maita N, Takeda M, Kuroki K, Sasaki K, et al. Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(49):19535-40. Epub 2007/11/16. doi: 10.1073/pnas.0707830104.

3) Hashiguchi T, Ose T, Kubota M, Maita N, Kamishikiryo J, Maenaka K, et al. Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. Nat Struct Mol Biol. 2011;18(2):135-41. Epub 2011/01/11. doi: 10.1038/nsmb.1969.

4) Hashiguchi T, Fukuda Y, Matsuoka R, Kuroda D, Kubota M, Shirogane Y, et al. Structures of the prefusion form of measles virus fusion protein in complex with inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(10):2496-501. doi: 10.1073/pnas.1718957115.

5) Kuroda D, Shirai H, Jacobson MP, Nakamura H. Computer-aided antibody design. Protein engineering, design & selection : PEDS. 2012;25(10):507-21. doi: 10.1093/protein/gzs024.

6) Tiller KE, Tessier PM. Advances in Antibody Design. Annual review of biomedical engineering. 2015;17:191-216. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071114-040733.