

解 説

断片抗体アフィニティー精製用
リガンド・プロテインGの機能および
安定性に対する変異の影響に係る熱力学的分析

吉田 慎一^{a, b}

^a株式会社カネカ

Pharma & Supplemental Nutrition Solutions Vehicle
バイオテクノロジー研究所

^b次世代バイオ医薬品製造技術研究組合

(受取日：2019年10月25日，受理日：2019年11月28日)

**Calorimetric Analysis of the Effects of Mutations
on the Function and Stability of Streptococcal Protein G
as an Affinity Ligand for Antibody Fragments**

Shinichi Yoshida^{a, b}

^a Biotechnology Research Laboratories,
Pharma & Supplemental Nutrition Solutions Vehicle,
KANEKA Corporation

^b Manufacturing Technology Association of Biologics

(Received Oct. 25, 2019; Accepted Nov. 28, 2019)

Streptococcal protein G (SpG) is a bacterial surface protein, binding mainly to the Fc (high affinity) and Fab (low affinity) regions of immunoglobulins. The SpG-immobilized affinity chromatography resin is useful for the purification of antibodies. Improvement of the affinity of SpG to Fab enhances its application to the purification of Fab-based antibody fragments. We found four important mutations of SpG, improving its affinity for Fab through affinity maturation using a ribosomal display system. In this article, we overview the calorimetric analyses of these mutations on the function and stability of SpG as an affinity ligand. Isothermal titration calorimetry analysis elucidated the quantitative enthalpic/entropic contributions of these individual mutations on the interaction of SpG with Fab. Differential scanning calorimetry analysis revealed the destabilizing effects of these mutations on the thermodynamic stability of SpG. These calorimetric analyses may contribute to the current understanding of the mechanism of action of such mutations and further refinement of affinity ligands through protein engineering. Additionally, we discuss key features of our new SpG-immobilized affinity chromatography resin such as binding ability and purity profile of target molecules.

Keywords: protein G, affinity ligand, immunoglobulin, protein engineering

1. はじめに

社会に役立つ蛋白質を創り出す「蛋白質工学」という技術分野において、変異が蛋白質の物性・機能に与える効果を解析する上で、DSCやITCによる熱分析は精緻な情報をもたらす、更なる改良に有効な指標となり得る。¹⁾ 本解説では、代表的なバイオ医薬である抗体医薬のアフィニティー精製用クロマトグラフィー担体を研究開発対象として、カラム充填剤にリガンド分子として固定化される蛋白質の標的分子結合力および安定性の蛋白質工学的改変に、DSCやITCによる熱分析を活用した例を示す。

ある種のグラム陽性菌は、感染宿主の血液蛋白質、特にイムノグロブリン類 (IgG など) に結合する蛋白質を細胞表面に発現する。^{2,3)} それらの細菌由来蛋白質の一種であるレンサ球菌 (*Streptococcus*) 由来蛋白質 G (SpG) は、IgG の Fc 領域に強く結合し、さらに親和性は低いが Fab 領域に対しても結合活性を示す。⁴⁾ SpG はアミノ酸 50 残基程度からなる IgG 結合ドメインを複数有している。SpG の IgG 結合ドメインは、1 本の α ヘリックスと 4 本の β ストランドからなる立体構造を取る。SpG 以外にも、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) 由来蛋白質 A (SpA) やペプトストレプトコッカス (*Peptostreptococcus*) 由来蛋白質 L (PpL) が知られている (Fig.1)。

アフィニティー精製において、SpG は IgG を精製するためのリガンド分子として有用である。SpG は、Fc および Fab のいずれに対する結合についても、SpA や PpL よりも様々な動物種由来 IgG に結合できるため、特にラボユースを目的とした IgG 精製において、SpG をリガンドとしたアフィニティー精製担体 (SpG 固定化担体) はよく利用される。^{3,5)} SpG 固定化担体は、IgG を断片化して Fc 部分を欠失した Fab 分子の精製に利用されることがあるが、Fab に対する結合力が弱いため、不純物を洗浄するステップにおいて Fab の担体への吸着を維持することが難しい。したがって、Fab 結合力を強化した SpG 固定化担体は、Fab のアフィニティー精製用担体として有用な新規ツールとなり得る。

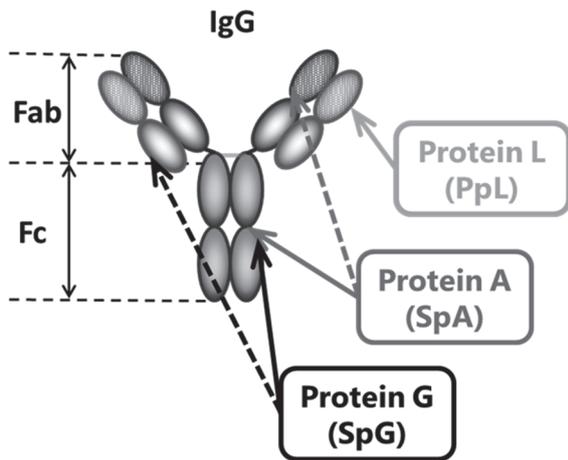


Fig.1 The binding region of bacterial surface proteins to immunoglobulin G (IgG).

蛋白質 A (SpA) は、Fc に対して SpG と似た領域を認識して結合する。SpA は Fab 領域に対しても抗原結合部位に近い部位で結合する。蛋白質 L (PpL) は Fab 領域の中で軽鎖に結合する。Fab 領域の結合について、SpA は VH3, PpL は κ 鎖 (2 種ある軽鎖の 1 種) と呼ばれるサブタイプに限定される。

Fab に対する結合力をより強化した IgG 結合ドメイン (SpG-B1) は、リボソーム・ディスプレイ法を利用したアフィニティー成熟を通して創出した。本研究の詳細に関しては別途報告予定であるが、本誌読者にとってあまり馴染みの無い領域かもしれないので、本手法の概略について簡潔に述べる。リボソーム・ディスプレイ法とは、 10^{10} 種類程度の大きな遺伝子ライブラリから、遺伝子産物である蛋白質を標的分子に結合出来るよう提示した系を構築し、標的分子に強く結合する蛋白質をコードする遺伝子を選択的に回収する *in vitro* ディスプレイ法の 1 つである (Fig.2)。

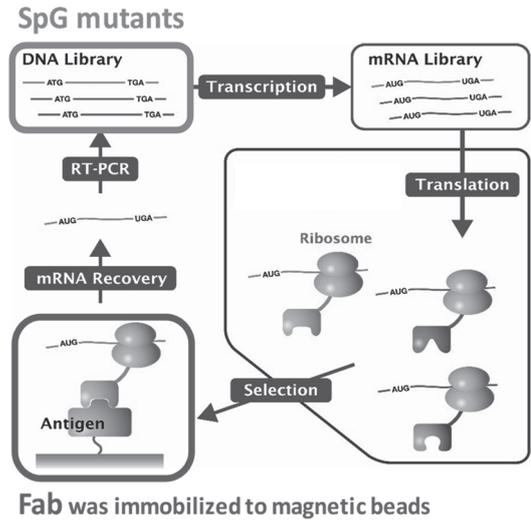


Fig.2 Schematic representation of *in vitro* affinity maturation of SpG to Fab.

本手法に利用する無細胞合成系キット PUREfrex を販売するジーンフロンティア株式会社の許可を得て HP 掲載の図を一部改変して作成した。

リボソーム・ディスプレイ法では、生細胞を使用せずに、細胞内の翻訳プロセスに関わる因子を添加して、リボソーム上で翻訳反応を行う。翻訳反応を一時中断させることにより、mRNA/リボソーム/蛋白質からなる三者複合体を形成できることが本手法の鍵であり、Fab を固定化した粒子に結合する三者複合体だけを選択する工程を経ることによって、そして、図に示すサイクルを繰り返すことによって、効率的に Fab に強く結合する SpG 変異体を濃縮することが可能となる。

本手法を SpG-B1 に適用することで、Fab に対する結合力の向上に寄与すると期待される 4 種類の変異 (K13T, E19I, F30L, Y33F) を見出すことに成功した。筆者らは、これら 4 種類の変異を含む複数変異を有する SpG をリガンドとする改変型 SpG 固定化担体を開発し、不純物の洗浄が容易となる新規断片抗体 (Fab) アフィニティー精製用クロマトグラフィー担体を開発した。

最終製品に採用された変異の中で主要な 4 種類の変異が SpG の Fab 結合力 (機能) と熱安定性に与える影響について、本誌 45 号 (No.4) にて報告した。4 種類の変異の網羅的な組合せからなる計 16 種の SpG-B1 変異体 (野生型を含む) を調製し、表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による各種 SpG-B1 変異体と Fab の結合力解析、等温滴定型カロリメトリー (ITC) を用いた各種 SpG-B1 変異体と Fab の熱的な相互作用解析、および、示差走査型カロリメトリー (DSC) を用いた各種 SpG-B1 変異体の熱安定性解析を行った。本稿では、改めてポイントを整理し、さらに誌面に記載できなかった詳細について解説を加える。

2. SPR による各種変異の分析

SPR 法は生体分子間相互作用の代表的な測定法であり、センサー表面上の一方の生体分子にもう一方の生体分子が結合することに伴う重量変化をリアルタイムに観測することが可能である。^{7,8)} 本実験では、Fab をセンサー表面に固定化し、各種 SpG-B1 変異体を流路よりセンサー上を通過する形で添加する系で測定を実施し、各種 SpG-B1 変異体の Fab に対する結合定数 (K_A) を算出した。野生型 SpG-B1 の 6 種類のモノクローナル Fab に対する K_A は $0.6\text{--}1.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ の範囲となり、この値は過去に報告された SPR 実験による SpG と Fab の結合定数の値に概ね合致する。⁹⁾ 次に、各種 SpG-B1 変異体の 6 種類のモノクローナル Fab に対する結合定数の値を平均し、さらに野生型に対する結合定数の比を常用対数で図示したグラフを以下に示す (Fig.3)。

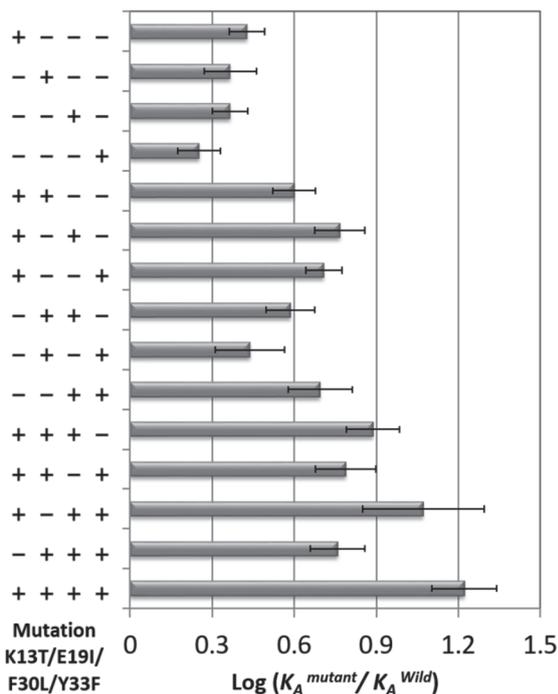


Fig.3 The average value of the ratio of the K_A of each SpG-B1 mutant to wild-type for every Fab region.

測定条件：センサー側は Sensor Chip CM5 に 6 種類のモノクローナル抗体由来 Fab (パパインで IgG を酵素切断して得られた Fab 断片) を固定化。流路側は各種 SpG-B1 変異体を 10, 100, 1000, 10000 nM の濃度で添加。測定温度は 25 °C。結合定数算出に用いた解析モデルは 1:1 Langmuir model。測定装置は BIACORE® 3000 (GE Healthcare)。

SpG-B1 に導入した変異の Fab 結合力に与えた影響について述べる。K13T, E19I, F30L および Y33F を個別に導入した単残基変異体は、野生型に比べておよそ 2 倍の結合定数を示すことが確認された。次に、これら 4 種の変異を複数導入すると、概ね相加的に結合定数が向上する傾向が確認され、結果として、全ての変異を導入した SpG-B1 変異体が最も高い結合定数を示した。SPR 法による網羅的な分析は、変異が与える影響を詳細に渡って定量的に明確化出来たが、一方で、明確化出来たのはあくまで結合に対する影響が“正”か“負”かであり、その質にまで迫るのは難しかった。詳細な影響が見えることによって、結合に影響を与えたメカニズム解明へのニーズが高まったとも言える。

3. ITC による各種変異の分析

変異が相互作用に及ぼす影響のさらなる質的解析を進めるべく、熱力学測定がそのニーズを充足すると期待し、追加の解析として ITC を選択した。¹⁰⁾ ITC は分子間相互作用に係る熱力学的パラメータを決定できるユニークな測定法である。SPR と同様に全ての SpG-B1 変異体について測定を実施したが、ハイスループット性は高くないので本実験で用いる Fab は 1 種類に限定した。全ての測定において、SpG を Fab に添加した後に発熱反応を示すパルスが観測された (Fig.4)。

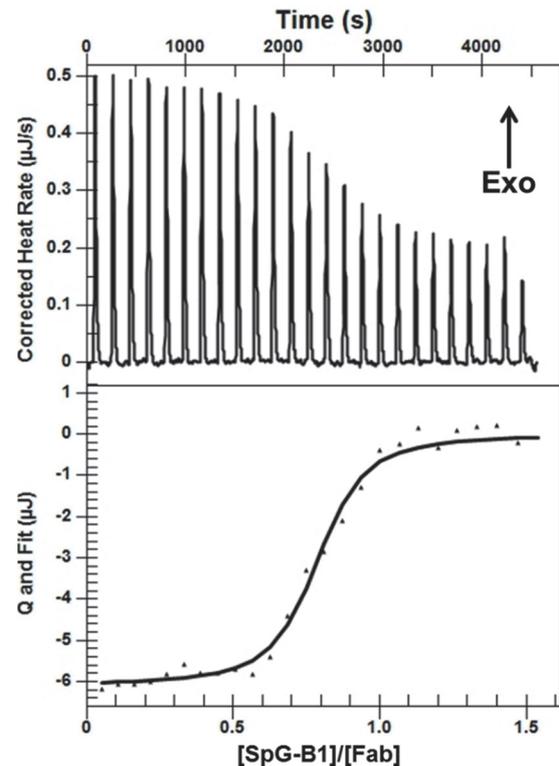


Fig.4 ITC thermogram and binding isotherm for the interaction between Fab and SpG-B1 mutant (K13T/E19I/F30L/Y33F).

測定条件：各種 SpG-B1 変異体 100 μM (滴定シリンジ側)、Fab (セル側) 20 μM 、滴下量は 2 μL 、測定温度 25 °C、測定装置 Nano ITC LV (TA instruments)。

野生型 SpG-B1 の Fab に対する K_A は $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であり、SPR 実験で当該 Fab に関して算出された K_A 値 $1.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ とほぼ一致する結果となった。変異の導入によって結合定数が向上する傾向についても、SPR 実験で見られた傾向を概ね踏襲する結果となった。野生型 SpG-B1 の Fab 結合に関する熱力学的パラメータは、エンタルピー変化が $\Delta H = -25.5 \text{ kJ mol}^{-1}$ であり、結合自由エネルギー変化が $\Delta G = -35.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ であり、エントロピー変化が $-\Delta S = -9.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ となった。各種 SpG-B1 変異体の熱力学的パラメータに関しては、野生型の場合との差異をグラフ化して示す (Fig.5)。このグラフでは熱力学的に好ましい方向の数値変化は全て負の値で表記される。全ての SpG-B1 変異体について、SPR 実験で見られた結合定数が向上する傾向が再現しており、結果として ΔG の値に関する野生型との差異は負の値となっている。^{11,12)} 結合比は $N=1$ となるべきところが 0.7-0.8 付近の値となった。Fab の調製の過程で一部が変性や凝集を起こし、SpG との結合活性を示す Fab の有効濃度が低下したのではないかと推定している。

各種 SpG-B1 変異体の Fab 結合は、野生型と比較して概ねよりエンタルピー駆動型となっている。しかしながら、変異 E19I のみエンタルピー変化項でなくエントロピー変化項で Fab 結合強化に貢献している。変異 K13T, F30L および Y33F の Fab 結合にエンタルピー駆動的にプラスに働く効果は、変異 E19I を含まない場合にはその効果が相加的に向上する。一方で、変異 E19I の Fab 結合にエントロピー駆動的にプラスに働く効果は、他の変異と組み合わせた際にはほとんど見られず、野生型に比べるとエントロピー的には損失の方向に作用する。しかし興味深いことに、全ての変異が導入された場合のみ、そのエントロピー的な損失がほとんど無くなる。このように、変異が Fab との相互作用にもたらすエンタルピー/エントロピー的な寄与は複雑であるが、変異の組合せを網羅的に熱分析することによって相互作用の熱力学的な理解はより明確になると言える。

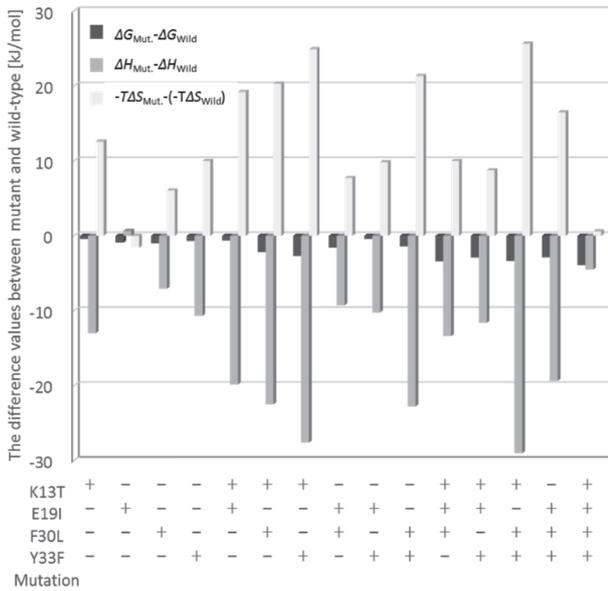


Fig.5 Difference values of thermodynamic parameters of binding for each SpG-B1 mutant to Fab versus that of the wild-type.

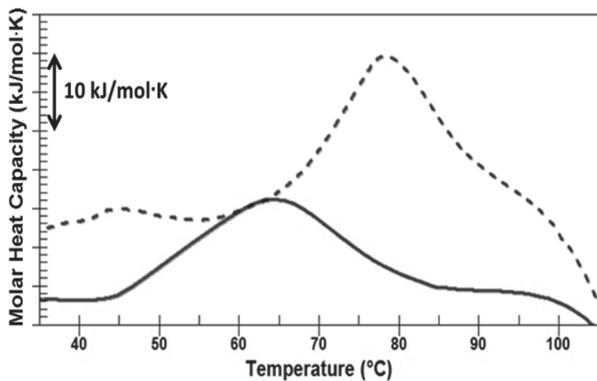


Fig.6 Differential scanning calorimetry heating curves for the thermal denaturation of the wild-type of SpG-B1 (broken line) and its mutant (K13T/E19I/F30L/Y33F, solid line).
測定条件：各種 SpG-B1 変異体 0.25 mg mL⁻¹, スキャン温度範囲 20-120 °C, スキャン速度 1 °C min⁻¹, 測定装置 Nano DSC (TA instruments).

4. DSC による各種変異の分析

各種変異について SpG-B1 自身の熱力学的安定性に対する影響も DSC を用いて網羅的に分析した。¹³⁾ DSC は蛋白質の熱力学的安定性を調べる主要な手段である。抗体アフィニティー精製用担体の蛋白質リガンドは、特に抗体医薬製造プロセスに用いる場面を想定した際に室温で長期に使用/放置することがあるため、熱力学的に安定であることは重要である。⁴⁾ 過去の報告には、殺菌・再利用の際に行うアルカリ洗浄に対する安定性にも熱力学的安定性が関係しているとの報告もある。^{14,15)}

熱的変性遷移は野生型を含む全ての SpG-B1 変異体で観測された。残念なことに、90 °C 以上での SpG-B1 の凝集を回避することが困難であったため、熱変性に伴うカロリック・エンタルピー (ΔH) と熱容量変化 (ΔC_p) は算出できなかった。しかしながら、各種 SpG-B1 変異体の熱変性中点温度 (T_m) は比較的良かったこともあり、90 °C までのわずかなベースラインが観察できたので、熱変性遷移状態の対称性から T_m 値の算出は可能であった (Fig.6)。野生型 SpG-B1 の熱変性中点温度は $T_m = 78.5$ °C で、この値は円二色性 (CD) 実験から求められた値と類似していた。^{16,17)} 個々の変異体の T_m についても、野生型との差異をグラフとして表示する (Fig.7)。

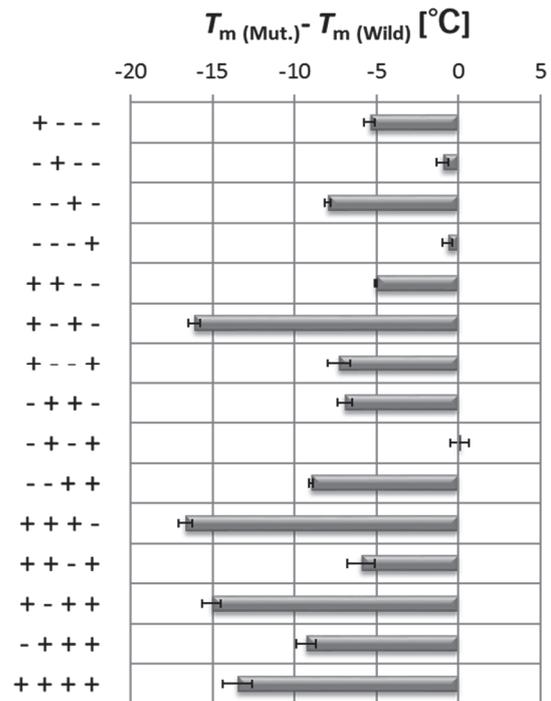


Fig.7 Difference values of T_m for each of the SpG-B1 mutants.

今回評価した変異の中に SpG-B1 の熱安定性を高める効果を示す変異はなく、約 4 分の 3 の変異体の T_m 値が野生型よりも 5 °C 以上低くなった。網羅的な分析の結果、変異 K13T と F30L が SpG-B1 の熱安定性を低下させる影響があり、一方で変異 E19I と Y33F は熱安定性にほとんど影響を与えないことが分かった。変異 K13T と F30L の熱安定性不安定化効果は、他の変異の組合せとは関係なく影響を与えていると推察される。アフィニティー精製用担体のリガンドとして高い熱安定性は必須では無いが、この分析による結果は弱点の更なる改良に向けては重要な情報と言える。

5. 導入した変異が製品性能に及ぼした効果

このような研究を経て、先述 4 種類の変異を主要な変異として採用した変異型 SpG をアフィニティー・リガンドとする最終製品 KANEKA KanCap™ G を開発した。変異を導入する前の SpG をリガンドとしたアフィニティー精製担体では、Fab を担体に吸着させた後の中間洗浄工程において、吸着した Fab が漏出してしまいう現象が見られる。しかし、Fab に対する結合力を強化した変異型 SpG をリガンドとした場合、そのような漏出は抑制され、高い回収率で Fab を酸溶出できる (Fig.8)。

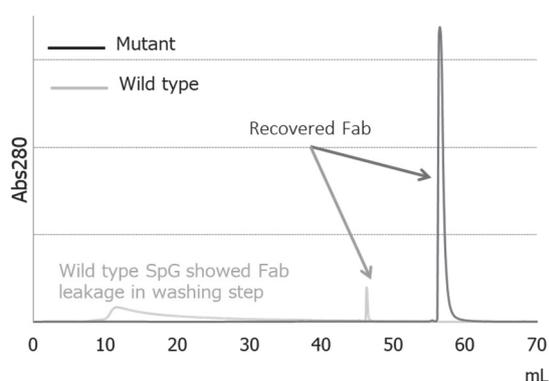


Fig.8 Chromatographic analysis of wild-type or mutant SpG by immobilizing to agarose media.

Fab 添加量 : 5 mg (Wild type), 14 mg (Mutant)

中間洗浄: 20 mM Na-Pi, 150 mM NaCl, pH 7.4

Fab 回収 (酸溶出) : 50 mM Citrate pH 2.5

次に、Fab の生産時に不純物としてその除去が課題となる軽鎖モノマー/ダイマー (LC monomer/dimer) の除去性能について示す。Fab を組換え生産した酵母培養上清中には Fab の他に不純物となる軽鎖モノマー/ダイマーが存在し、¹⁸⁾ 例えば PpL をリガンドとしたアフィニティー精製担体では軽鎖モノマー/ダイマーが吸着してしまう。しかし、変異型 SpG をリガンドとしたアフィニティー精製担体には軽鎖モノマー/ダイマーは吸着しないため、これらの不純物は担体添加時や中間洗浄時に非吸着画分として除去され、それに続く溶出ステップで高純度での Fab の回収が可能であった (Fig.9)。

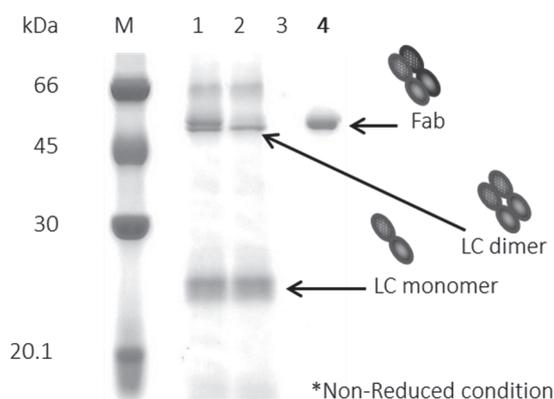


Fig.9 SDS-PAGE analysis of improved recovery and productivity for Fabs with affinity chromatography using KanCap G.

M : マーカー, 1 : 培養液, 2 : 添加時素通り画分,

3 : 洗浄画分, 4 : 溶出画分 (全て非還元条件)

重要なポイントとして、このような高い選択性を実現するには、変異導入によって疎水的な非特異結合が強くなることは避けるべきである。前頁に示した通り、変異による Fab 結合力向上は、相互作用時に新たな水素結合形成が期待されるエンタルピー的寄与が主要であると、ITC 測定で確認できた。そして、SDS-PAGE の結果が示すように、精製後の Fab の純度に問題は無かった。これは研究を進める上での ITC の有用性を示す一例と言える。

6. まとめ

抗体精製用アフィニティー担体の抗体結合リガンド SpG において、Fab 結合力強化に重要な役割を担うと推定された 4 種類の変異に関し、機能と熱安定性に与える影響について網羅的な解析を行った。熱力学的測定による蛋白質変異の分析は、変異の効果をより質的に推定することを可能とする。要因についてある程度明解に推定できるケースもあれば、異なる事象の原因を深く掘り下げるケースもあるが、いずれも研究において重要な示唆となり得る。蛋白質の更なる工学的改良の際に、熱力学的解析が今後ますます活用されることが期待される。

謝 辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成 25 年度産業技術実用化開発事業費補助金 (個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発 (国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術))」及び平成 26 年度産業技術実用化開発事業費補助金 (次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術))、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (課題番号 JP18ac0101057)」の支援によって行われた。

文 献

- 1) 三浦謹一郎, 大島泰郎, 渡辺公綱 編・著, 「タンパク質工学—新しい物質生産の礎を築く—」, 啓学出版 (1988).
- 2) R. Nezlín and V. Ghetie, *Adv. Immunol.* **82**, 155-215 (2004).
- 3) T. Bostrom, *et al.*, *Protein Purification (Chapter 5)*, In Tech (2012).
- 4) A. Achari, *et al.*, *Biochemistry* **31**, 10449-10457 (1992).
- 5) S. Arora, *et al.*, *Methods* **116**, 84-94 (2017).
- 6) A. Olsson, *et al.*, *Eur. J. Biochem.* **168**, 319-324 (1987).
- 7) H. N. Daghestani, *et al.*, *Sensors* **10**, 9630-9646 (2010).
- 8) H. H. Nguyen, *et al.*, *Sensors* **15**, 10481-10510 (2015).
- 9) T. Sagawa, *et al.*, *Mol. Immunol.* **42**, 9-18 (2005).
- 10) M. S. Atri, *et al.*, *Phy. Chem. Res.* **3**, 319-330 (2015).
- 11) L. N. Lund *et al.*, *J. Mol. Recognit.* **24**, 945-952 (2011).
- 12) A. I. Dragan, *et al.*, *Eur. Biophys. J.* **46**, 301-308 (2017).
- 13) G. Bruylants, *et al.*, *Curr. Med. Chem.* **12**, 2011-2020 (2005).
- 14) S. Gulich, *et al.*, *Protein Eng.* **15**, 835-842 (2002).
- 15) B. Palmer, *et al.*, *J. Biotechnol.* **134**, 222-230 (2008).
- 16) P. Alexander, *et al.*, *Biochemistry* **31**, 3597-3603 (1992).
- 17) S. Honda, *et al.*, *Biochemistry* **38**, 1203-1213 (1999).
- 18) 小林和男ら, *生物学* **86**, 390 (2008).



吉田 慎一
Shinichi Yoshida
E-mail: Shinichi.Yoshida@kaneka.co.jp