## 解 説

# 抗体の親和性成熟に関する熱力学的解析

佐藤 優穂<sup>a</sup>,織田 昌幸<sup>b</sup>

<sup>a</sup>株式会社堀場製作所 アプリケーション開発部 <sup>b</sup>京都府立大学大学院 生命環境科学研究科

(受取日: 2020年4月25日, 受理日: 2020年6月8日)

## Thermodynamic Analysis of Antibody Affinity Maturation

Yusui Sato<sup>a</sup> and Masayuki Oda<sup>b</sup>

(Received Apr. 25, 2020; Accepted June 8, 2020)

<sup>a</sup> Application R&D Dept., HORIBA, Ltd.
<sup>b</sup> Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University

Antibody affinity maturation plays an essential role during an immune response, resulting in the generation of highly matured antibodies. It is well known that the antigen-binding mechanism varies during the maturation process. The well-shaped form for antigen-binding is often favored in matured antibodies and enables them to bind to antigens with high affinity. However, molecular insight into the correlation between antigen-binding and affinity maturation is limited. This information could be useful for the elucidation of an immunological response. It has been previously shown that at least two antibody types are secreted after immunization with (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP). One of the antibody types appeared during an early stage of the immune response, while the second type appeared at a late stage of immunization. A key residue of these antibodies is located at position 95 on the heavy chain; the former type has Tyr (Tyr<sup>H95</sup>-type) and the latter type has Gly (Gly<sup>H95</sup>-type). Although Fv domains of these antibodies were encoded by the same genes present on variable heavy and light chains, Gly<sup>H95</sup>-type antibodies have ~10-100 fold higher binding affinity to NP than those of Tyr<sup>H95</sup>-type antibodies. We examined the biophysical properties of single-chain Fvs (scFvs) of Tyr<sup>H95</sup>-and Gly<sup>H95</sup>-type antibodies. Antigen-binding and thermal stabilities of scFvs were evaluated using isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry, respectively. Thermodynamic analysis enabled us to discuss affinity maturation and adaptive dynamic nature of the immune response.

Keywords: Antigen binding, Affinity maturation, Thermodynamics, Thermal stability

## 1. はじめに

抗体は、免疫応答・生体防御にかかわる重要なタンパク 質である。リンパ球の一種である B 細胞上に、B 細胞受容 体として発現し、B 細胞が抗原刺激を受けて形質細胞へと 分化した時に細胞質中へ分泌される。 抗体は、標的分子に 対して高い結合親和性と特異性を示すことが知られ,故に, 医薬品をはじめ, 臨床・診断薬, バイオセンサーなどへ応 用するための研究開発が盛んである。当該分野では、機能 的に抗体の結合力や安定性を向上させることが求められる。 一方、生物学的・免疫学的に抗体が結合能を向上させる機 序や意義に対する理解は、未だ十分とはいえない。我々は、 抗体の親和性成熟に対する理解を深めることを念頭に置き, 熱力学的な手法を用いた測定を実施した。抗体をはじめと するタンパク質の熱力学的測定は,基礎研究のみならず, 創薬現場でも活用されており、得られるパラメーターは重 要な指標となっている。本稿では、抗体の抗原結合能と安 定性の両側面において我々が行った熱力学的解析結果を中 心に、抗体が分子進化を遂げる機構について議論したい。

#### 2. 抗体の親和性成熟

## 2.1 親和性成熟の機構

抗体の結合多様性を司る因子は複数あり、それらの緻密 な組み合わせにより成立している。まず, germline の抗体 遺伝子, V-D-J 遺伝子セグメントの再構成機構により, 抗体 は多様な抗原結合部位を形成することが可能である。1)ま た, T 細胞依存性の免疫応答では, 体細胞突然変異やクラ ススイッチの恩恵を受け, 抗原に対して高次の親和性を有 する抗体が効率的に産生される。この一連の過程は、抗体 の親和性成熟 (affinity maturation) と呼ばれ, 生体防御機能 を高める優れた機構といえる。2-7) 免疫とは、端的に述べる と「自己」と「非自己」の識別であり、例えば外来ウイル スに対する防御機構の役割を抗体が担う。外来ウイルス侵 入初期には、親和性成熟前の germline 型抗体が、抗原結合 力は弱いながらも生体防御に貢献する。その後、生体内で 親和性成熟が起こり、特定のウイルスに対して、より結合 力, 特異性ともに高い抗体が産生され, 効率的な生体防御 が可能となるといった仕組みである。

#### 2.2 in vitroでの展開

抗体に限らず、分子進化という観点では、従来から in vitro で標的分子に対する親和性を向上させる技術の研究・開発 が行われている。ファージディスプレイやリボソームディ スプレイがその代表例であり、標的分子に対する相互作用 解析を実施し、ライブラリーの中から高い親和性を有する 結合分子を選抜することができる。また、これら手法では、 提示された分子の配列情報を同時に獲得できることも利点 である。こうした技術はモノクローナル抗体にも適応され ており、最近では次世代シーケンサーを組み合わせた運用 が進んでいる。8)シークエンシングの低コスト化、高速化 により、従来法と比較しておよそ 10,000 倍のライブラリー を参照することができ、親和性を向上させるために鍵とな るアミノ酸残基やエピトープの情報を網羅的に洗い出せる。 その他、様々な改良型の in vitro ディスプレイ技術が開発さ れており、Houlihanらは、分子タグを用いた手法を考案し、 受容体型チロシンキナーゼ HER2 に対して, サブ nM で結 合する分子の選抜に成功している。9 また, 1 ラウンドに 要する時間が1時間程度で、計4ラウンドで上述の親和性 を有する結合分子を獲得している。HER2 それ自体は、分 子標的薬の対象にもなることから, 創薬分野などへの応用 が期待される技術と考えられる。

#### 2.3 親和性成熟と分子認識機構

タンパク質の分子認識という観点からも抗体の親和性成熟を捉える研究が進められている。X線結晶構造解析は、抗原-抗体複合体形成時の作用機序を明らかにし、リガンド認識機構に関する様々な知見をもたらしている。<sup>10)</sup>

低分子化合物を抗原とする抗体の結合機序についていくつか報告があり、Wedemayer らは、9 残基のアミノ酸変異が30,000 倍の親和性向上もたらした事例を示している。<sup>11)</sup> 親和性成熟前後の抗体について複合体の結晶構造を比較すると、抗原結合に直接関与する相補鎖決定領域(CDR; Complementarity Determining Region)のアミノ酸残基に加えて、CDR を支持するフレームワーク領域(FR; Framework Region)のアミノ酸残基にも変異導入されることが明らかとなっている。

結合前後の結晶構造を比較した事例として, germline 型抗体では, 結合時に CDR ループが抗原に向かってシフトするのに対し, 成熟型抗体ではその動きが最小限になることが示されている。<sup>12)</sup> このことは, 親和性成熟が単に抗原に対する結合力を高めるだけでなく, その結合様式をも変化させることを示唆している。

また、成熟前の germline 型抗体は、免疫原の分子以外の類縁体にも結合性を示すが、成熟型抗体は免疫原にのみ強く結合するという結果が報告されている。<sup>13)</sup> さらに結晶構造解析により、成熟型抗体における CDR ループの構造が、免疫原の抗原に対する結合を最適化するように変化しており、結合特異性を高めることが明らかにされている。実際の免疫応答を考慮すると、初期の段階では、親和性と選択性が低くても、多様な抗原に対応できる germline 型が機能し、応答後期になると、特定の抗原を速やかに排除する成熟型抗体が威力を発揮することが想定され、抗原結合様式との間に密接な関係があると考えられる。

以上のように、親和性成熟前の germline 型抗体と成熟型 抗体とでは、その抗原結合様式が異なり、免疫応答の経過 に伴い、抗原結合部位に動的な構造変化が誘起されること が示唆されている。

#### 2.4 親和性成熟における熱力学的解析

結晶構造解析に加え、カロリメトリーを用いた親和性成熟の研究が展開されている。特に、等温滴定型熱量計 (ITC; Isothermal Titration Calorimetry) は、抗原一抗体反応に関わる熱力学量を網羅的に解析できるため、広く用いられている

同一の抗原であるが、異なる germline 型を起源とする抗体について、その結合様式の比較が行われている。 $^{14}$ ) また、続く研究では、同一の germline 型を起源とする抗体の結合様式について詳細に議論されており、抗体の進化の方向性が多様で、一筋には決まらないことを例証している。 $^{15}$ ) 当該研究では、単に結合・解離定数  $(K_a\cdot K_d)$  を求めるに留まらず、エンタルピー変化  $(\Delta H)$  やエントロピー変化  $(\Delta S)$  といったパラメーターを参照することで、抗原結合様式と親和性成熟との関連性に有益な情報をもたらしている。

親和性成熟については、抗原結合能のみならず、熱安定 性という視点からも議論がなされている。前述の通り、親 和性成熟の過程では、部位特異的なアミノ酸変異が無作為 に導入される。時に, 導入された変異は親和性の向上をも たらすだけでなく, 構造の不安定化という負の影響を及ぼ す場合がある。Wang, Sun らは、抗原結合と安定性に寄与す るアミノ酸残基を選別し、それらを単独で導入した際の効 果を検証した。16,17)個々のアミノ残基は抗原結合が安定性 かのいずれか一方に寄与し、親和性を向上させる残基だけ を導入すると,安定性が低下することを報告している。ま た, 高度に成熟した抗体には, 安定性を向上させる変異が 導入されることから, 抗体が高次の結合親和性を獲得する ためには, 同時に安定性を確保しなければならないことを 示唆している。これらの結果より、抗体の熱安定性という 尺度が、親和性成熟機構の解明に無視できない要素である ことがわかる。

#### 2.5 抗 NP 抗体を対象とした研究

上述の通り、様々な観点から親和性成熟に関する知見が得られているが、抗(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP)抗体を対象とした研究もその代表例である。 $^{18-21}$ )抗 NP 抗体は、C57BL/6 マウスに T 細胞依存性 NP 誘導体を免疫して得られ、可変領域のカノニカル遺伝子として、 $V_H$  186.2、DFL 16.1、 $J_H$  2、 $V_{\lambda}$  1、 $J_{\lambda}$  1 を有する。NP はハプテンと呼ばれる低分子化合物であり、種々のキャリア物質と結合させることで初めて免疫原性を帯びる。本抗体についても、類縁体に対して結合性を示すことがわかっているが、免疫原のNP に対して特異的な成熟を遂げることが、一連のモノクローナル抗体を用いて実証されている。 $^{22}$ 

網羅的な抗 NP モノクローナル抗体の解析で,重鎖の 33 (H33) および 95 (H95) 番目のアミノ酸残基が,親和性成熟において重要な役割を果たすことが明らかにされている(アミノ酸残基番号は Kabat の番号付けシステムに従う)。  $^{23-27}$  特に H95 が Tyr となる抗体( $^{14}$  Tyr  $^{14}$  H95 が Gly に変化する( $^{14}$  Gly に変化する( $^{14}$  Gly に変化する( $^{14}$  Fire  $^{15}$  タイプに比べておよそ  $^{10}$  NP に対する結合定数は、 $^{15}$  Tyr  $^{195}$  タイプに比べておよそ  $^{10}$  NP に上昇する。  $^{15}$  この先行研究においても,熱力学的な解析が重要な役割を果たしており,抗原結合様式と親和性成熟の方向性について重要な知見をもたらしている。

同様に ITC を用いて親和性成熟前後の抗 NP 抗体について評価した事例では、成熟前後で抗原結合様式が変化することを示唆している。 $^{23}$ )これは、先に述べた通説を支持する結果であり、"induced-fit"と"lock-and-key"という 2 つの抗原結合モデルと相関付けて解釈することができる (Fig.1)。

なお特に"induced-fit"モデルについては、"population-shift" モデルなど、構造分布の多様性に起因するという考え方もある。 $^{28,29)}$ 

以上の結果から、抗 NP 抗体は、親和性成熟と抗原結合 様式との相関性を解明する上で優れた対象と考えられる。

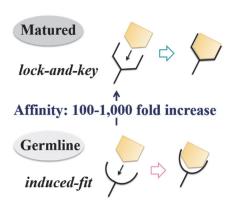
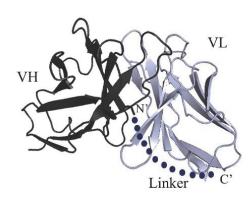


Fig.1 Schematic model of antigen binding of germline and matured antibodies.

我々が用いた抗体は、N1G9 (TrpH33/TyrH95), C6(TrpH33/ Gly<sup>H95</sup>) という成熟段階の異なるモノクローナル抗体であ る。<sup>22, 23, 25)</sup> これら抗体について一本鎖 Fv 抗体 (scFv) を 作製した (Fig.2)。30) scFv とすることで、全長抗体やFab フラグメントと同様の抗原結合能を有しながらも,31)大腸 菌を用いた大量発現系で比較的容易に調製することが可能 となる。さらに、部位特異的変異の導入も可能となり、モ ノクローナル抗体として取得されない抗体、すなわち各ア ミノ酸の親和性成熟における役割などの解析が可能となる。 本実験では、親和性成熟の鍵となる残基に着目し、N1G9の TrpH33 を Leu に置換した N1G9-W33L(LeuH33/TyrH95), C6 の TrpH33 を Leu に置換した C6-W33L(LeuH33/GlyH95) を合わせ て作製した。発現、精製した4種類のscFvについて、ITC を用いた抗原との相互作用解析を行った。上述の通り, ITC を用いることで、親和性成熟について重要な情報の獲得が 期待できる。<sup>14, 15, 23-25)</sup> また、示差走査型熱量計 (DSC; Differential Scanning Calorimetry) および円二色性 (CD; Circular Dichroism) 分散計を用いた熱安定性解析を実施し た。scFv にすることで、全長抗体の定常領域の寄与を排除 し、抗原結合ドメインの安定性解析を正確に行うことがで き,さらに本系のように親和性成熟と関連して,極めて重 要な知見の獲得が期待できる。



**Fig.2** Design of C6 scFv. Fv domains of anti-NP antibody N1G9 (PDB code, 1NGP) are shown schematically as an scFv. C terminus of VL (gray) and N terminus of VH (black) domains were connected with a (G4S)<sub>3</sub> linker (dotted line).

### 3. scFv の熱力学的解析

#### 3.1 ITC を用いた NP 抗原との相互作用解析

調製した scFvs に NP 抗原を滴定した結果,すべての 測定で発熱反応を観測した(Fig.3)。測定により得られた 熱力学量を Table 1 に示す。 $^{32}$ )N1G9-W33L では,1 残基の アミノ酸変異に伴って, $\Delta H$  依存的に NP に対するアフィニティーが上昇した。ただし, $\Delta H$  が増大する一方で,エントロピーロスが大きくなっている。成熟型の C6 では,N1G9-W33L より $\Delta H$  が小さいものの,エントロピーロスが 抑制され,最も結合に優位な $\Delta G$  値を示した。C6-W33L については,N1G9-W33L と同じアミノ酸の変異体でありな がら, $\Delta H$  の減少と $\Delta S$  における損失の寄与が影響し,NP に 対するアフィニティーの低下が見られた。

#### 3.2 scFvs の熱安定性解析

DSC を用いて、scFvs の熱安定性解析を行った。ITC 測定と同様、測定はすべて中性溶液条件で行った。いずれの scFvs においても、吸熱性の変性ピークが観測され、反応は不可逆であった(Fig.4)。測定した変性曲線に基づき、二状態変性モデルを用いて、変性中点( $T_d$ )およびエンタルピー変化( $\Delta H_{cal}$ )を算出した。これらパラメーターを Table 2 に示す。 $^{30}$  成熟型 C6 の熱安定性は、germline 型の NIG9 よりも 17.7  $^{\circ}$ C 低かった。W33L 変異導入により、NIG9 と C6 の両者において、わずかな  $T_d$  の低下が見られた。また、抗原結合に付随する  $T_d$  の上昇がすべての抗体で見られ、それぞれ NIG9:2.6  $^{\circ}$ C、NIG9-W33L:5.8  $^{\circ}$ C、C6・W33L:12.8  $^{\circ}$ C 上昇した。CD を用いて同様に熱安定性解析を行い、転移温度( $T_m$ )を求めた(Fig.5)。 $^{33}$ CD 測定により求めた  $T_m$ は、DSC 測定の  $T_d$ と同様であり、両結果で相関が見られた。

#### 4. 熱力学的解析と抗体の分子進化に対する解釈

ITC 測定の結果,成熟型 C6 の方が germline 型 N1G9 より NP に対して 31 倍高いアフィニティーを示し,今回作製した scFv が全長抗体と同様の結合活性を有することを示した。 $^{22)}$  W33L 変異の導入により,C6 では 4.1 倍アフィニティーが低下し,N1G9 では 4.5 倍上昇した。これら W33L 導入における正反対の効果は, $Tyr^{H95}$  および  $Gly^{H95}$  両タイプの NP 抗体を用いた実験で報告されており,scFvs において同じ現象が再現されたといえる。 $^{26)}$ 

W33L 変異は,NIG9 においてアフィニティーの上昇をもたらしたが,熱安定性解析の結果,NIG9-W33L の安定性は,NIG9 より低下した。H33 は,抗体の CDR に位置しており,分子内相互作用を弱めたことが要因と考えられる。<sup>34)</sup> 一方,成熟型の C6 に W33L 変異を導入すると,アフィニティーの低下に加え,熱安定性の低下も見られた。これは,体細胞突然変異によって抗体の安定性に与える負の効果が,アフィニティーにもたらす効果とは相関しないことを示唆している。

抗体の成熟という観点では、安定性に与える負の影響を最小限にし、アフィニティーにもたらす正の効果を最大にすることが望ましい。Germline 型 NIG9 において、W33L変異はアフィニティーの上昇をもたらし、安定性に与える影響は限定的である。故に、 $Tyr^{H95}$ タイプのB 細胞受容体を発現するB 細胞が、記憶性細胞として支配的になることが予想される。実際、一次免疫応答における親和性成熟では、W33L変異した $Tyr^{H95}$ タイプのNP 抗体が出現する。 $^{35}$ 

一方,成熟型の C6 は,N1G9 や N1G9-W33L よりも著し

Table 1	Thermodyn	amic paramet	ters of interaction	is of anti-NP scFv	antibodies to NP-Cap.
---------	-----------	--------------	---------------------	--------------------	-----------------------

	$K_{\mathrm{a}}$	$\Delta G$	$\Delta H$	TΔ <b>S</b>
	$(M^{-1})$	$(kJ \cdot mol^{-1})$	$(kJ \cdot mol^{-1})$	$(kJ \cdot mol^{-1})$
N1G9	$1.85 (\pm 1.32) \times 10^6$	-35.4	$-46.0\pm2.6$	-10.6
N1G9-W33L	$8.31 (\pm 1.29) \times 10^6$	-39.4	$-69.2 \pm 3.7$	-29.8
С6	$5.68 (\pm 1.60) \times 10^7$	-44.2	$-52.1\pm0.8$	-7.9
C6-W33L	$1.40~(\pm~0.59)\times10^{7}$	-40.7	$-46.0\pm3.5$	-5.3

The averaged values of two independent measurements with S.D.

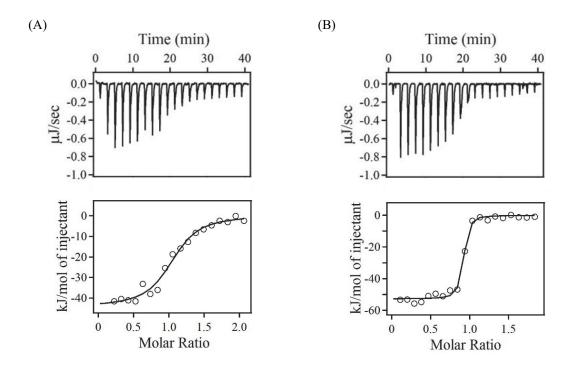


Fig.3 ITC profiles and diagram representing interactions between NP and anti-NP scFv antibodies; N1G9 (A) and C6 (B). 100  $\mu$ M antigen solution was titrated 20 times in 2  $\mu$ l increments into the 10  $\mu$ M scFv solution (upper). The data points were obtained by integration of the peaks in titration profiles (lower), corrected for the dilution heat, and plotted against the molar ratio. The data were fitted using non-linear least-squares method.

く低い熱安定性を示した。これは、親和性成熟に伴う複数のアミノ酸残基の変異が、アフィニティーを上昇させる補償的な効果として、抗原結合部位の不安定化が原因と推察できる。先行研究では、Gly<sup>H95</sup> タイプの記憶性 B 細胞が一次免疫応答時に出現しないことが判明しており、このことは、Gly<sup>H95</sup> タイプの B 細胞受容体の安定性が低いことに起因すると考えられる。<sup>35,36)</sup>

抗原結合状態での熱安定性を評価すると,今回測定したすべての scFvs において  $T_d$ の上昇が見られた。scFv 単独時と NP 結合状態での安定性の差( $\Delta T_{d,NP}$ )を算出すると,各抗体で異なる値を示した(N1G9: $\Delta T_{d,NP}$  = 2.6 °C,N1G9-W33L: $\Delta T_{d,NP}$  = 5.8 °C,C6: $\Delta T_{d,NP}$  = 18.5 °C,C6-W33L: $\Delta T_{d,NP}$  = 12.8 °C)。 また,これらの値と NP 結合時の自由エネルギー変化( $\Delta G$ )との関係性を Fig.6 に示した。Germline型 N1G9 が最も小さい  $\Delta T_{d,NP}$  を示し,W33L 変異に伴ってその値が上昇した。一方,NP に対するアフィニティーが最も高い C6 では, $\Delta T_{d,NP}$  が最も大きくなり,C6-W33L では,アフィニティーの低下に付随して $\Delta T_{d,NP}$  は小さくなった。この結果は,NP 結合時の $\Delta G$  と $\Delta T_{d,NP}$  との間の相関を示唆している。すなわち,NP 結合時に形成される,水素結合,ファンデルワールス力,疎水性相互作用といった非共有結

合に依存して scFv の構造が安定化され、それらの結合が強力になるほど、 $\Delta T_{d,NP}$  が大きくなると考えられる。

-次免疫応答の際,W33L 変異した Tyr<sup>H95</sup> タイプの B 細 胞が支配的になる理由は, 単一のアミノ酸変異でアフィニ ティーを数倍上昇させる効率性と, それに付随して起こる 構造の不安定化が限定的であることに起因すると推察でき る。また, Gly<sup>H95</sup> タイプの記憶性 B 細胞が同じタイミング で出現しないのは、抗体単独の状態では C6 が不安定 ( $T_d =$ 48.5℃)であることが原因とも考えられる。一次免疫応答 の後,免疫された抗原は1週間以内に体内から除去され, 体内に残された抗原の量はわずかとなり, B 細胞が抗原に 遭遇・結合する頻度が低下する。この時、GlyH95タイプのB 細胞受容体は不安定であるため, 一次免疫応答の終盤には 安定性の高い TvrH95 タイプの B 細胞が支配的になる。二次 免疫応答の場合には、記憶性 B 細胞が大量の抗原に暴露さ れることになり、増殖と形質細胞への分化が誘導される。 このように抗原が過剰に存在する条件下では、GlyH95 タイ プの B 細胞受容体を発現する B 細胞が抗原結合により安 定化され、高次のアフィニティーを示す抗体を分泌する形 質細胞に分化する。35) したがって、単独では安定性の低い C6 のような抗体であっても, クローン選択によって生き残

Table 2 Thermodynamic parameters for thermal denaturation of anti-NP scFv antibodies in the absence or presence of antigen.

	CD	DSC	
_	T <sub>m</sub> (°C) <sup>a</sup>	T <sub>d</sub> (°C)	$\Delta H_{\text{cal}} (kJ \cdot \text{mol}^{-1} \cdot K^{-1})$
N1G9	69.3	66.2	395
N1G9 + NP	71.3	68.8	452
N1G9-W33L	64.7	64.0	418
N1G9-W33L + NP	68.9	69.8	493
С6	49.1	48.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	$384\pm20^{b}$
C6 + NP	66.8	$67.0\pm0.4^{b}$	$585\pm105^{b}$
C6-W33L	48.2	$47.4\pm0^{b}$	405 ± 11 <sup>b</sup>
C6-W33L + NP	61.1	60.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	$459 \pm 43$ b

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> The analysis of the transition curve to determine the transition temperature (*T*<sub>m</sub>) was performed on the basis of two-state transition model.

<sup>&</sup>lt;sup>b</sup> The averaged values of two independent measurements with S.D.

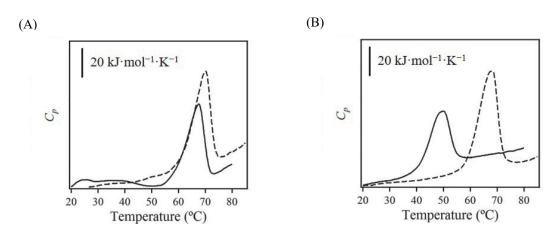
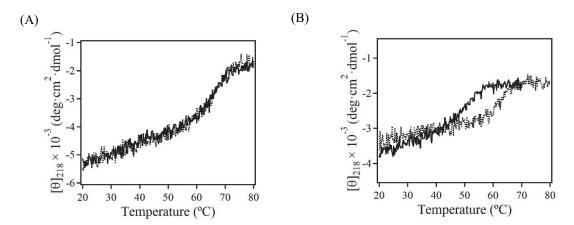


Fig.4 DSC analyses of scFv antibodies N1G9 (A) and C6 (B)in the absence (solid line) or presence of NP (broken line) at a molar ratio of 1:10.

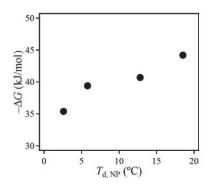


**Fig.5** Thermal denaturation curves of scFv antibodies N1G9 (A) and C6 (B) in the absence (solid line) or presence of NP (dotted line) at a molar ratio of 1:10.

ることが可能となる。親和性成熟抗体の抗原結合前の不安 定化,および抗原結合後の安定化は、生体内での現象を説 明できるが、その一般性の証明は、今後の研究成果が待た れる。

本研究では、ITC や DSC を用いた熱力学的解析を行い、アフィニティーと $\Delta T_{
m d,NP}$  との相関関係を示した。一般的に

は、高次のアフィニティーを獲得するために複数の体細胞突然変異が必須となり、 $^{23}$ )それが抗体の不安定化につながると解釈されている。前述の通り、抗体の分子進化に関するモデルケースの検証では、抗体は抗原結合能と安定性の両側面から選択されることが示されている。 $^{16,17}$ 今回評価した  $^{C6}$  の場合、アフィニティーの観点では優位に選択



**Fig.6** Plots of  $-\Delta G$  values vs  $\Delta T_{\rm d}$ . The  $\Delta G$  values obtained from ITC measurements are plotted against  $\Delta T_{\rm d}$ , the difference of  $T_{\rm d}$  between free scFv and that in the presence of NP at a molar ratio of 1:10.

されると予想できる。しかし,germline 型抗体よりも安定性が低いため(抗体単独の  $T_d$  にして 17.7  $^{\circ}$ C の減少),安定性を指標とした場合に,抗原からの選択を受ける可能性は低いと推測される。一連の結果より,記憶性 B 細胞は,抗体単独の安定性ではなく,抗原結合の親和性を指標として選択され,生存するというモデルが成り立つと考えられる。Fig.6 に示す通り, $-\Delta G$  値の増加に付随して $\Delta T_{d,NP}$  が大きくなる。これは,体細胞突然変異に起因する安定性の低下が,抗原結合時に獲得する自由エネルギーの転換によって補償され,構造安定性が維持されるためであろう。

#### 5. おわり**に**

最近の研究では、scFv-C6 について NP 複合体の結晶構造解析が行われた。<sup>37)</sup> また、既に Fab-N1G9 の結晶構造も解かれており、<sup>34)</sup> 親和性成熟前後の構造比較が可能となっている。C6 には、N1G9 と比較すると、17 のアミノ酸変異(CDR に 9、FR に 8)が導入されているが、その中で NPとの結合に直接関与するのは、わずか 1 残基であるという。これは、親和性成熟によって入れ替わるアミノ酸残基が、必ずしも結合の数を増やしたり、結合エネルギーを上昇させたりする方向に寄与するのではなく、その周囲の残基の配向や電荷状態を改善し、結合部位全体の環境を最適化することを示唆している。結晶構造の比較だけでは、抗原結合力や安定性の定量的予測が現状では困難で、そうした観点からも熱力学量の意義は極めて高いと言える。

本抗体については、C6より高次のアフィニティーを有し、より成熟が進んだ抗体の存在が示されている。 $^{23,25)}$  これら抗体では、遺伝子セグメントの選択やアミノ酸変異のパターンが C6とは異なっている。ITC 測定の結果を参照すると、抗体の成熟に伴って $\Delta H$  を向上させるように熱力学的パラメーターが最適化されているわけではなく、むしろエントロピーの損失を抑制するような傾向が見られる。 $^{23,25)}$  エンタルピー・エントロピー補償則により、複合体形成時の水素結合などの数をいたずらに増やしても、結合定数は頭打ちしてしまう。これら結果は、前述の結晶構造解析の結果を支持するものであり、抗原結合部位全体を最適化するように成熟することが、抗体の分子進化における一つの戦略であると推測される。

本稿では、熱力学的解析を用いた抗体の解析事例を示した。結合パラメーターと安定性のデータを組み合わせることで、抗体の親和性成熟を分子論的のみならず、免疫学的な側面から解釈することが可能であることを実証した。結晶構造解析などを用いて複合的に議論することで、抗体の分子進化に対する理解を、今後より一層深めることが期待される。

## 謝 辞

抗 NP scFv 抗体を用いた研究を行うにあたり,以下の皆様のご協力,ご尽力を賜りました。研究の遂行から論文執筆に渡るまでご助言いただきました東隆親先生(抗体工学研究センター),ITC 測定でお世話になりました小林祐次先生(大阪大学),丸野孝浩様(大阪大学),DSC 測定にご協力いただきました深田はるみ先生(大阪府立大学)に対し,この場を借りて厚く御礼申し上げます。

### 文 前

- 1) S. Tonegawa, Nature 302, 575-581 (1983).
- H. N. Eisen and G. W. Siskind, *Biochemistry* 3, 996-1008 (1964).
- A. L. M. Bothwell, M. Paskind, M. Reth, T. Imanishi-Kari, K. Rajewsky, and D. Baltimore, Cell 24, 625-637 (1981).
- P. J. Gearhart, N. D. Johnson, R. Douglas, and L. Hood, Nature 291, 29-34 (1981).
- M. Kaartinnen, G. M. Griffiths, A. F. Markham, and C. Milstein, *Nature* 304, 320-324 (1983).
- D. L. French, R. Laskov, and M. D. Scharff, Science 244, 1152-1157 (1989).
- C. Milstein and C. Rada, Immunoglobulin Genes, second edition, Academic Press 57-81 (1995).
- 8) R. Rouet, K. J. L. Jackson, D. B. Langley, and D. Christ, *Protein Front. Immunol.* **9**, doi:10.3389 (2018).
- 9) G. Houlihan, P. G. Lafranconi, D. Lowe, and F. Hollfelder, *Protein Eng. Des. Sel.* **28**, 269-279 (2015).
- A. Cauerhff, F. A. Goldbaum, and B. C. Braden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 3539-3544 (2004).
- G. J. Wedemayer, P. A. Patten, L. H. Wang, P. G. Schultz, and R. C. Stevens, *Science* 276, 1665-1669 (1997).
- J. Yin, E. C. Mundoff, P. L. Yang, K. U. Wendt, D. Hanway, R. C. Stevens, and P. G. Schultz, *Biochemistry* 40, 10764-10773 (2001).
- J. Yin, A. E. Beuscher IV, S. E. Andryski, R. C. Stevens, and P. G. Schultz, *J. Mol. Biol.* 330, 651-656 (2003).
- 14) R. Adhikary, W. Yu, M. Oda, J. Zimmermann, and F. E. Romesberg, J. Biol. Chem. 287, 27139-27147 (2012).
- R. Adhikary, W. Yu, M. Oda, R. C. Walker, T. Chen, R. L. Stanfield, I. A. Wilson, J. Zimmermann, and F. E. Romesberg, *Biochemistry* 454, 2085-2093 (2015).
- F. Wang, S. Sen, Y. Zhang, I. Ahmad, X. Zhu, I. A. Wilson, V. V. Smider, T. J. Magliery, and P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 4261-4266 (2013).
- S. B. Sun, S. Sen, N. J. Kim, T. J. Magliery, P. G. Schultz, and F. Wang, J. Am. Chem. Soc. 135, 9980-9983 (2013).
- A. Cumano and K. Rajewsky, Eur. J. Immunol. 15, 512-520 (1985).
- D. Allen, T. Simon, F. Sablitzky, K. Rajewsky, and A. Cumano, *EMBO J.* 7, 1995-2001 (1988).
- M. Taketani, A. Naitoh, N. Motoyama, and T. Azuma, *Mol. Immunol.* 32, 983-990 (1995).
- 21) T. Azuma, Immunol. Rev. 162, 97-105 (1998).
- 22) M. Oda and T. Azuma, Mol. Immunol. 70, 8-12 (2016).
- T. Sagawa, M. Oda, M. Ishimura, K. Furukawa, and T. Azuma, Mol. Immunol. 39, 801-808 (2003).
- 24) H. Torigoe, T. Nakayama, M. Imazato, I. Shimada, Y. Arata, and A. Sarai, *J. Biol. Chem.* 270, 22218-22222 (1995).
- K. Furukawa, A. Furukawa, H. Shirai, H. Nakamura, and T. Azuma, *Immunity* 11, 329-338 (1998).
- A. Murakami, Y. Takahashi, M. Nishimura, T. Shimizu, and T. Azuma, Mol. Immunol. 48, 48-58 (2010).
- 27) E. A. Kabat, M. Reed-Miller, H. M. Perry, and K. S. Gottesman, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991).

- 28) M. Oda, A. Kitai, A. Murakami, M. Nishimura, T. Ohkuri, Y. Abe, T. Ueda, H. Nakamura, and T. Azuma, Evaluation of the conformational equilibrium of reduced hen egg lysozyme by antibodies to the native form, *Arch. Biochem. Biophys.* 494, 145-150 (2010).
- 29) Y. O. Kamatari, S. Ohta, Y. Inoshima, M. Oda, T. Maruno, Y. Kobayashi, and N. Ishiguro, Identification and characterization of a multispecific monoclonal antibody G2 directed against chicken prion protein, *Protein Sci.* 23, 1050-1059 (2014).
- 30) Y. Sato, Y. Tanaka, S. Inaba, H. Sekiguchi, T. Maruno, Y. C. Sasaki, H. Fukada, Y. Kobayashi, T. Azuma, and M. Oda, *Int. J. Biol. Macromol.* **91**, 151-157 (2016).
- 31) W. D. Mallender, J. Carrero, and E.W. Voss, Jr., *J. Biol. Chem.* **271**, 5338-5346 (1996).
- 32) Y. Sato, S. Inaba, H. Fukada, T. Azuma, and M. Oda, *Mol. Immunol.* 85, 130-136 (2017).
- 33) S. Inaba, H. Fukada, T. Ikegami, and M. Oda, *Arch. Biochem. Biophys.* **537**, 225-232 (2013).
- 34) R. Mizutani, K. Miura, T. Nakayama, I. Shimada, Y. Arata, and Y. Satow, J. Mol. Biol. 254, 208-222 (1995).
- 35) Y. Tashiro, A. Murakami, R. Goizuka, T. Shimizu, H. Kishimoto, and T. Azuma, *Int. Immunol.* **27**, 609-620 (2015).
- 36) M. Nishimura, A. Murakami, Y. Hara, and T. Azuma, *Int. Immunol.* **23**, 271-285 (2011).
- A. Nishigudhi, N. Numoto, N. Ito, and T. Azuma, M. Oda, *Mol. Immunol.* 114, 545-552 (2019).



佐藤 優穂 Yusui Sato E-mail: yusui.sato@horiba.com



織田 昌幸 Masayuki Oda E-mail: oda@kpu.ac.jp