

解 説

抗体の親和性成熟に関する熱力学的解析

佐藤 優穂^a, 織田 昌幸^b

^a株式会社堀場製作所 アプリケーション開発部

^b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^a and Masayuki Oda^b

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

^aApplication R&D Dept., HORIBA, Ltd.

^bGraduate 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^{H95}-type) and the latter type has Gly (Gly^{H95}-type). Although Fv domains of these antibodies were encoded by the same genes present on variable heavy and light chains, Gly^{H95}-type antibodies have ~10-100 fold higher binding affinity to NP than those of Tyr^{H95}-type antibodies. We examined the biophysical properties of single-chain Fvs (scFvs) of Tyr^{H95}- and Gly^{H95}-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す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。¹⁰⁾

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 倍の親和性向上をもたらした事例を示している。¹¹⁾ 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。¹²⁾ 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。¹³⁾ 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-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 (ΔH) やエントロピー変化 (ΔS) 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、構造的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、 $V_H 186.2$, $D_{FL} 16.1$, $J_H 2$, $V_{\lambda} 1$, $J_{\lambda} 1$ 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 (Tyr^{H95}) は、免疫応答の初期のみ出現し、免疫応答後期になると、例外なく H95 が Gly に変化する (Gly^{H95})。また、Gly^{H95} タイプの NP に対する結合定数は、Tyr^{H95} タイプに比べておよそ 10-100 倍上昇する。²⁵⁾ 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。

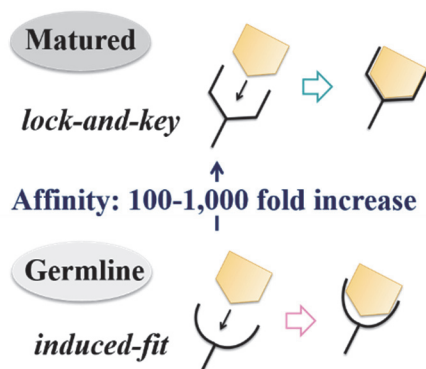


Fig.1 Schematic model of antigen binding of germline and matured antibodies.

我々が用いた抗体は、N1G9 (Trp^{H33}/Tyr^{H95})、C6(Trp^{H33}/Gly^{H95}) という成熟段階の異なるモノクローナル抗体である。^{22, 23, 25)} 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 Trp^{H33} を Leu に置換した N1G9-W33L (Leu^{H33}/Tyr^{H95})、C6 の Trp^{H33} を Leu に置換した C6-W33L (Leu^{H33}/Gly^{H95}) 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。^{14, 15, 23-25)} 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。

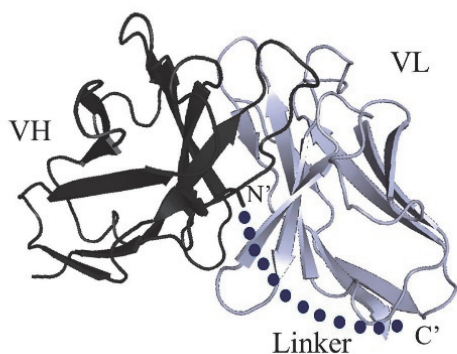


Fig.2 Design of C6 scFv. Fv domains of anti-NP antibody N1G9 (PDB code, 1NGP) are shown schematically as an scFv. C terminus of VL (gray) and N terminus of VH (black) domains were connected with a (G4S)₃ linker (dotted line).

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、 ΔH 依存的に NP に対するアフィニティーが上昇した。ただし、 ΔH 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 ΔH 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 ΔG 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、 ΔH の減少と ΔS 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 (ΔH_{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 N1G9 よりも 17.7 °C 低かった。W33L 変異導入により、N1G9 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 N1G9 : 2.6 °C、N1G9-W33L : 5.8 °C、C6 : 18.5 °C、C6-W33L : 12.8 °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、N1G9 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、N1G9-W33L の安定性は、N1G9 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。³⁴⁾ 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影響が、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 N1G9 において、W33L 変異はアフィニティーの上昇をもたらす、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 Thermodynamic parameters of interactions of anti-NP scFv antibodies to NP-Cap.

| | K_a | ΔG | ΔH | $T\Delta S$ |
|-----------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | (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 ± 2.6 | -10.6 |
| N1G9-W33L | $8.31 (\pm 1.29) \times 10^6$ | -39.4 | -69.2 ± 3.7 | -29.8 |
| C6 | $5.68 (\pm 1.60) \times 10^7$ | -44.2 | -52.1 ± 0.8 | -7.9 |
| C6-W33L | $1.40 (\pm 0.59) \times 10^7$ | -40.7 | -46.0 ± 3.5 | -5.3 |

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

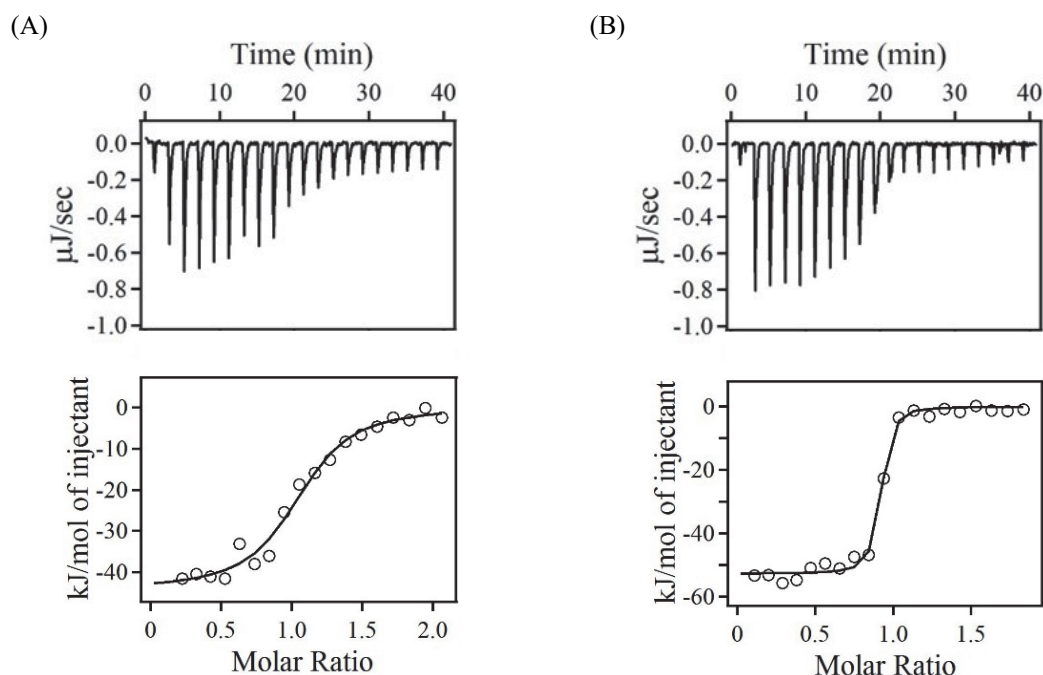


Fig.3 ITC profiles and diagram representing interactions between NP and anti-NP scFv antibodies; N1G9 (A) and C6 (B). 100 μM antigen solution was titrated 20 times in 2 μl increments into the 10 μM scFv solution (upper). The data points were obtained by integration of the peaks in titration profiles (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^{H95}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^{H95}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。^{35,36)}

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(ΔG)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伴って $\Delta T_{d,NP}$ は小さくなった。この結果は、NP結合時の ΔG 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。

一次免疫応答の際、W33L変異したTyr^{H95}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^{H95}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($T_d = 48.5$ °C)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、Gly^{H95}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Tyr^{H95}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、Gly^{H95}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 | ΔH_{cal} (kJ·mol ⁻¹ ·K ⁻¹) |
|----------------|-------------------------|-------------------------|---|
| | T_m (°C) ^a | T_d (°C) | |
| 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 |
| C6 | 49.1 | 48.5 ± 0.1 ^b | 384 ± 20 ^b |
| C6 + NP | 66.8 | 67.0 ± 0.4 ^b | 585 ± 105 ^b |
| C6-W33L | 48.2 | 47.4 ± 0 ^b | 405 ± 11 ^b |
| C6-W33L + NP | 61.1 | 60.2 ± 0.1 ^b | 459 ± 43 ^b |

^a The analysis of the transition curve to determine the transition temperature (T_m) was performed on the basis of two-state transition model.

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

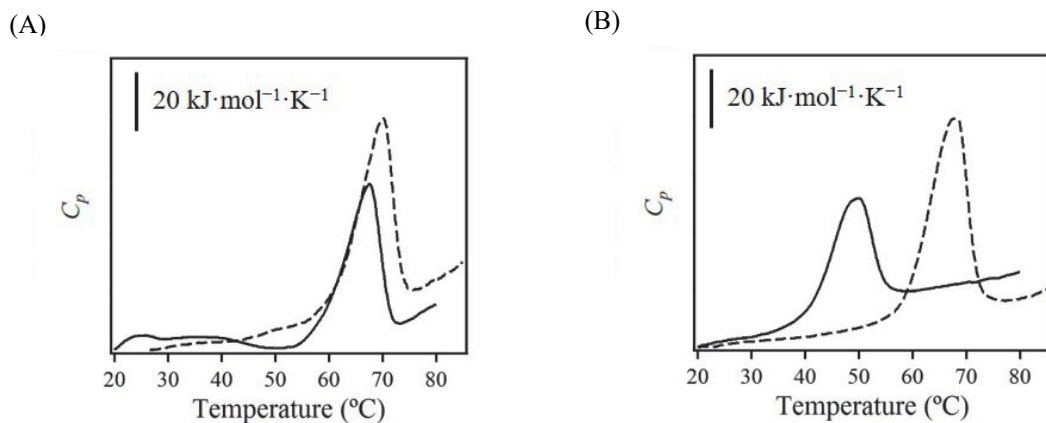


Fig.4 DSC analyses of scFv antibodies N1G9 (A) and C6 (B) in the absence (solid line) or presence of NP (broken line) at a molar ratio of 1:10.

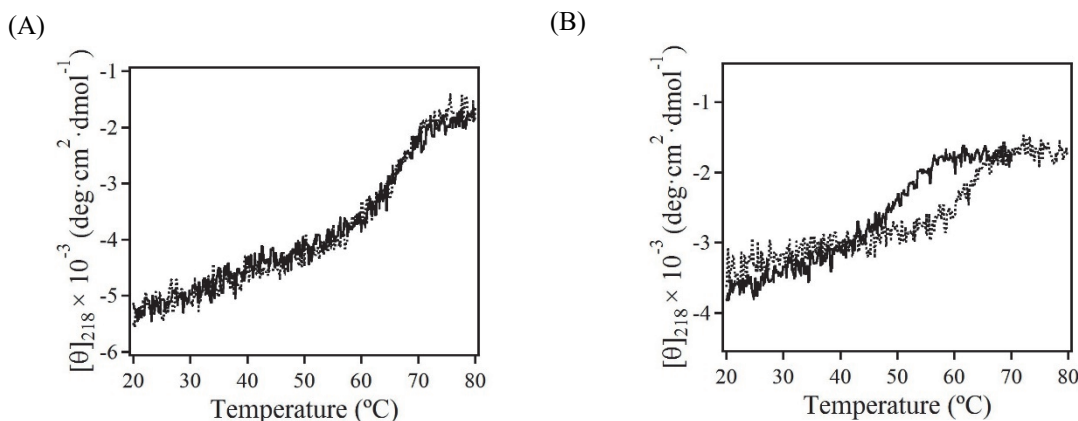


Fig.5 Thermal denaturation curves of scFv antibodies N1G9 (A) and C6 (B) in the absence (solid line) or presence of NP (dotted line) at a molar ratio of 1:10.

ることが可能となる。親和性成熟抗体の特異性発現前の不安定化、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 $\Delta T_{d,NP}$ 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⁾ それが高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

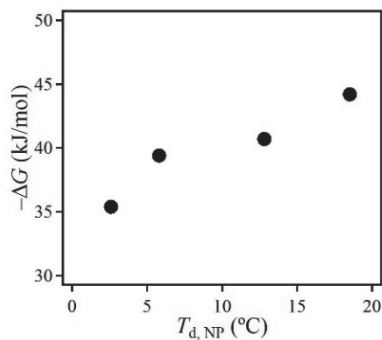


Fig.6 Plots of $-\Delta G$ values vs ΔT_d . The ΔG values obtained from ITC measurements are plotted against ΔT_d , the difference of T_d between free scFv and that in the presence of NP at a molar ratio of 1:10.

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 (抗体単独の T_d にして 17.7°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。³⁷⁾ また、既に Fab-N1G9 の結晶構造も解かれており、³⁴⁾ 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 ΔH 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わずらに増やしても、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 献

- 1) S. Tonegawa, *Nature* **302**, 575-581 (1983).
- 2) H. N. Eisen and G. W. Siskind, *Biochemistry* **3**, 996-1008 (1964).
- 3) A. L. M. Bothwell, M. Paskind, M. Reth, T. Imanishi-Kari, K. Rajewsky, and D. Baltimore, *Cell* **24**, 625-637 (1981).
- 4) P. J. Gearhart, N. D. Johnson, R. Douglas, and L. Hood, *Nature* **291**, 29-34 (1981).
- 5) M. Kaartinnen, G. M. Griffiths, A. F. Markham, and C. Milstein, *Nature* **304**, 320-324 (1983).
- 6) D. L. French, R. Laskov, and M. D. Scharff, *Science* **244**, 1152-1157 (1989).
- 7) 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).
- 10) A. Cauerhff, F. A. Goldbaum, and B. C. Braden, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3539-3544 (2004).
- 11) G. J. Wedemayer, P. A. Patten, L. H. Wang, P. G. Schultz, and R. C. Stevens, *Science* **276**, 1665-1669 (1997).
- 12) 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).
- 13) 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).
- 15) 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).
- 16) 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).
- 17) 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).
- 18) A. Cumano and K. Rajewsky, *Eur. J. Immunol.* **15**, 512-520 (1985).
- 19) D. Allen, T. Simon, F. Sablitzky, K. Rajewsky, and A. Cumano, *EMBO J.* **7**, 1995-2001 (1988).
- 20) 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).
- 23) 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).
- 25) K. Furukawa, A. Furukawa, H. Shirai, H. Nakamura, and T. Azuma, *Immunity* **11**, 329-338 (1998).
- 26) 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).
- 37) 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