

称号及び氏名 博士(理学) 宮本 尚樹

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 31 日

論 文 名 “遷移状態安定化”を触媒因子とする人工酵素の分子設計

論文審査委員 主査 藤井 郁雄
副査 佐藤 孝哉
副査 円谷 健
副査 乾 隆

“遷移状態安定化”を触媒因子とする人工酵素の分子設計

宮本 尚樹 (生命化学研究室)

第1章 序論

天然酵素は、さまざまな触媒機構を駆使し化学反応を促進する (1. 酸塩基触媒, 2. 共有結合触媒, 3. 金属イオン触媒, 4. 近接効果と配向効果, 5. 遷移状態安定化)。中でも遷移状態安定化 (遷移状態優先結合) は、酵素触媒に特有の機構であり、化学触媒では達成できない触媒機構である。酵素は化学反応の基底状態 (Ground State) より遷移状態 (Transition State) に優先的に結合し、遷移状態を安定化する。このことにより、遷移状態の高い活性化自由エネルギーを低下させ、反応を促進する。つまり、化学反応の遷移状態に特異的に強く結合する分子を創出することができれば、目的の化学反応を触媒することが期待される。そこで、免疫システムを利用して、遷移状態に結合する抗体の作製が行われている。遷移状態を立体的・電子的に模倣した安定な分子である遷移状態アナログ (Transition-state Analogue: TSA) を設計・合成し、マウス等の哺乳動物に免疫し、抗体を作製する。このような酵素機能を示す抗体を「抗体酵素」と呼ぶ。第2章では、ベンジルエステルの加水分解活性をもつ抗体酵素 7B9 について、X 線構造解析および部位特異的変異に機能解析を行い、“遷移状態安定化”の触媒メカニズムを明らかにした。第3章では、“遷移状態安定化”を触媒因子とする抗体酵素 6D9 について、新しい分子工学的手法を考案し機能改良を行った。この抗体酵素は、クロラムフェニコールのプロドラッグ医薬品を特異的に活性化する。本抗体のファージ表面提示ライブラリーを構築し、新しいスクリーニング法により、遷移状態アナログへの結合を最適化することに成功した。さらに、第4章では、この抗体酵素の設計コンセプトを抗体以外のタンパク質 (リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素:L-PGDS) へ展開し、人工酵素の創出に挑戦した。抗体酵素の開発当時 (1980年代後半)、免疫系に備わる抗体ライブラリーが、標的分子に対して結合する人工タンパク質を作製するための唯一のタンパク質ライブラリーであった。近年の進化分子工学の発展にともない、抗体にこだわらず、様々なタンパク質ライブラリーの構築が可能となってきた。そこで、L-PGDS を土台分子としてファージ表面提示ライブラリーを作製し、人工酵素の創出に取り組んだ。

第2章 抗体酵素 7B9 の構造解析および機能解析

抗体酵素 7B9 は、*p*-ニトロベンジルエステルの加水分解反応 (図1) を触媒する。また、基質のアルキル鎖リンカー部位に様々な置換基を導入した基質に対しても触媒作用を示すといった、広い基質選択性をもつことが明らかとなっていた (Kurihara *et al. Chem. Eur. J.*, 2000)。一般に抗体は、抗原に対して非常に厳密な基質選択性を示すため、単一の抗原のみに特異的に結合する。

つまり、抗体酵素においても基質として認識される分子は、基本的には単一である。しかし、幅広い化合物を基質として許容し、かつ特定の官能基の反応のみを触媒することが要求される有機合成化学においては、この厳密な基質選択性は汎用性に欠ける原因である。そのため、上記のように幅広い基質選択性を示す抗体 7B9 は、有機合成化学において理想的な抗体酵素である。本研究では、抗体 7B9 が示す広い基質選択性および遷移状態安定化による触媒メカニズムを解明するため、抗体 7B9 Fab 断片-TSA 複合体の結晶構造解析および構造情報に基づいた変異実験に取り組んだ。

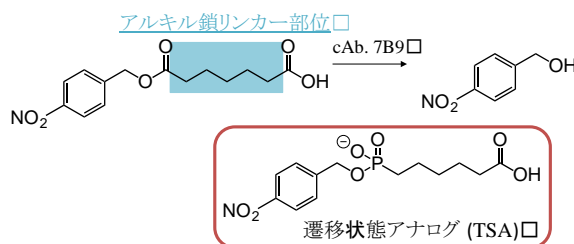


図1. 抗体7B9が触媒する*p*-ニトロベンジルエステルの加水分解反応および遷移状態アナログ (TSA) □

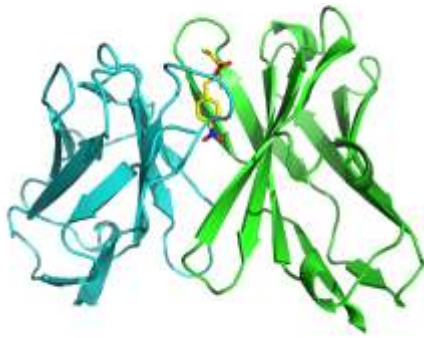


図2. 抗体7B9 Fab断片-TSA複合体の結晶構造 (緑色:重鎖、水色:軽鎖、黄色:TSA) □

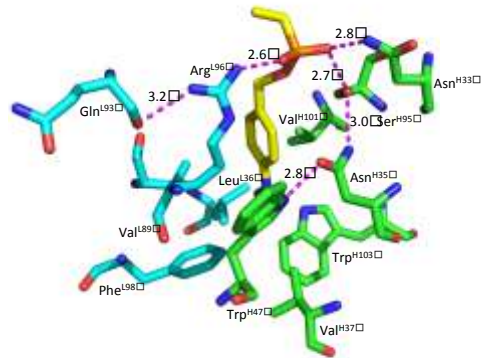


図3. 抗体7B9の抗原結合部位に位置する、TSAの結合に重要なアミノ酸残基 (緑色:重鎖、水色:軽鎖、黄色:TSA、桃色:水素結合) □

抗体 7B9 Fab 断片-TSA 複合体の X 線結晶構造解析により得られた構造情報から、7B9 の抗原結合ポケットは比較的浅い構造であり、TSA のアルキル鎖リンカー部位は、抗原結合部位の外側に位置していることが明らかとなった (図 2)。つまり、基質のアルキル鎖リンカー部位は、抗体 7B9 との相互作用に関与していないため、様々な置換基の導入が可能であり、抗体 7B9 の広い基質選択性の原因となっていることが明らかとなった。また、複合体の構造情報から、Asn^{H33}・Ser^{H95}・Arg^{L96} が、TSA のリン酸基の酸素原子と水素結合を形成していることが示唆された (図 3)。つまり、これら 3 残基が、遷移状態安定化に寄与していると考え、各々をアラニンに置換し、組換え Fab 断片を作製した。作製した Fab 断片を用いて、TSA に対する結合活性および *p*-ニトロベンジルエステルの加水分解反応の触媒活性を測定したところ、全ての変異体が、野生型抗体 7B9 と比較して、100 倍以上の結合活性の低下 (7B9: $K_D = 1.6$ nM, Asn-H33-Ala: $K_D = 167$ nM, Ser-H95-Ala: $K_D = 125$ nM, Arg-L96-Ala: $K_D = 283$ nM) および触媒活性の不活化が観測された。従って、抗体酵素 7B9 において、Asn^{H33}・Ser^{H95}・Arg^{L96} のいずれの残基も、*p*-ニトロベンジルエステル誘導体を基質とした加水分解反応における遷移状態の安定化に重要であり、これら 3 残基による遷移状態安定化の触媒メカニズムによって触媒活性が発現されていることが明らかとなった。 (Miyamoto *et al. Bioorgan. Med. Chem.*, 2017)

第 3 章 新規ファージディスプレイ法による抗体酵素 6D9 の機能向上

進化分子工学の発展により、抗体の結合活性を向上させる手法として、ファージディスプレイ法が開発され、利用されてきた。しかし、従来のファージディスプレイ法には致命的な問題点がある。それは、一定以上の強い結合活性 ($K_D < 10^{-8}$ M) 以上になると、全てのファージ粒子が同等にスクリーニングプレートに結合するようになり、その中でより強い結合性ファージ粒子の選抜が困難であるという点である。生体から得られた野生型抗体は一般に、抗原に対して $K_D < 10^{-8}$ M の非常に強い結合活性を免疫システムにより付与されているため、従来のファージディスプレイ法を用いた活性向上は困難である。そこで、本研究では、この問題点を解決した新規ファージディスプレイ法の開発を目指した。この新手法は、①抗原と相互作用している抗体のアミノ酸残基 (活性残基) へのアラニン変異の導入 (低結合活性変異体の作製)、②活性残基が存在しない領域へのファージライブラリーの構築、③ファージディスプレイ法による選別 (結合活性回復変異体の獲得)、④最初に導入したアラニン変異を元のアミノ酸残基に戻す (バックミュテーション) の 4 段階を経る (図 4)。この 4 段階を経ることで、抗原と相互作用する抗体の活性残基が増加するため、抗原に対する結合活性が向上することを期待した。本研究では、クロラムフェニコールプロドラッグの活性化 (図 5) を触媒する抗体酵素 6D9 をモデル抗体として、この新手法を検証した。

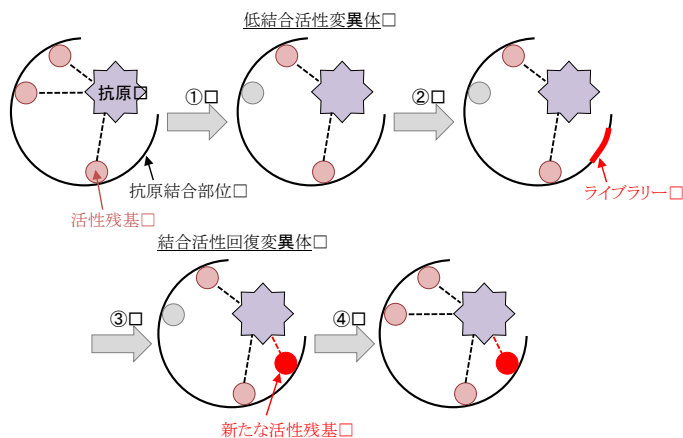


図4. 新規ファージディスプレイ法の概要

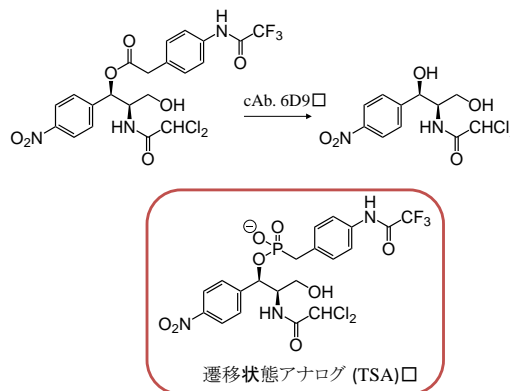


図5. 抗体6D9が触媒するクロラムフェニコールプロドラッグの活性化反応および遷移状態アナログ(TSA)

野生型抗体 6D9 が TSA に対して解離定数 $K_D=49.6$ nM を示すのに対し、V-H95-A&F-L89-A の二重変異体が $K_D=196$ nM を示し、約 4 倍の結合活性の低下が観測された。そこで、この二重変異体を低結合活性変異体として、L 鎖 CDR1 領域 (CDRL1) にファージライブラリーを構築した。次に、このライブラリーを TSA に対して選別したところ、 $K_D=127$ nM と約 2 倍結合活性が回復した変異体が得られた。最後に、バックミューテーションしたところ、 $K_D=15.4$ nM を示し、野生型 6D9 よりも約 4 倍強い結合活性を示す変異体の獲得に成功した。更に、触媒活性についても同じく約 4 倍の向上が認められた (6D9: $k_{cat}=0.113\text{min}^{-1}$, 変異体: $k_{cat}=0.529\text{min}^{-1}$)。

以上より、本研究で開発した新手法は、従来のファージディスプレイ法では困難な、生体から得られた野生型抗体の結合活性の向上が可能であることを示した。また、結合活性と同様に触媒活性の向上も認められた。つまり、本手法による抗体 6D9 の TSA に対する結合活性の向上は、遷移状態理論に従い、TSA への結合がより最適化されたことを示唆している。(Miyamoto et al. in preparation)

第4章 天然酵素を土台分子とした人工酵素の分子設計

これまでの抗体酵素の研究を通じ、抗体の本来の機能は「抗原への結合」であるため、本来の機能が「触媒」である酵素タンパク質は、人工酵素の作製により適した基質結合ポケットをもっている可能性を考えた。そこで、酵素タンパク質を進化分子工学的に改変し、抗体酵素と同じ“遷移状態安定化”を触媒因子とした新たな酵素活性を付与した人工酵素の創出に取り組んだ。本研究では、リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素 (L-PGDS : 図6) を土台分子として選択した。L-PGDS は、リポカリンファミリーと称するタンパク質群に属している。リポカリンファミリーは、属する各々のタンパク質の配列相同性が 20% 以下であるにも関わらず、全て同様の構造を示し、その構造は、頑強な β -バレル構造と、上部に存在する複数のループおよび α -ヘリックスで構成されている。このように、配列が大きく異なるにも関わらず、構造は全て同一であることから、リポカリンファミリーは大規模な配列変化を許容できると考え、合成ライブラリーの導入に最適な土台分子であると考えた。また、リポカリンファミリーの中でも L-PGDS は酵素機能を示す唯一のタンパク質であるため、天然酵素の土台分子として選択した。

まず、L-PGDS の β -バレル上部に、ヘリックスライブラリー (1 本のループと α -ヘリックスをランダム化) とループライブラリー (3 本のループをランダム化) の 2 種類のファージライブラリーを構築した (図7)。

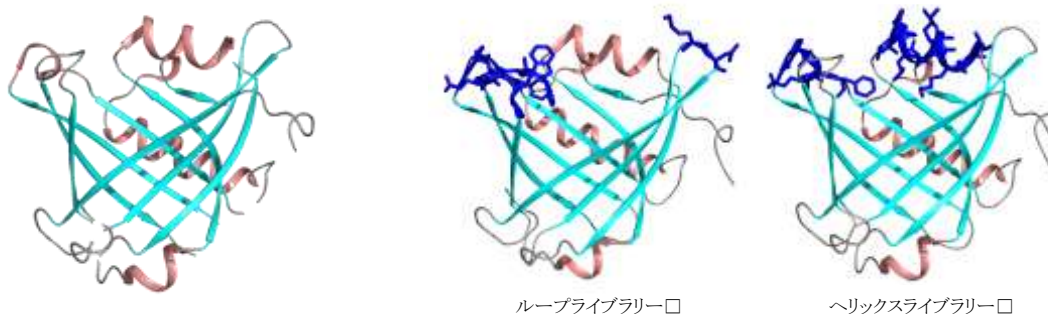


図6. L-PGDSの構造(PDB ID: 3O2Y) □ 図7. L-PGDSのb-バレル上部に構築した2種のファージライブラリー □

この2種類のライブラリーを用いて、*p*-ニトロベンジルエステルの加水分解反応の TSA (図1) に対してファージディスプレイ法により選別したところ、両ライブラリーから TSA を特異的に認識する複数の変異体を獲得した。そこで、得られた変異体の GST 融合タンパク質を作製し、TSA に対する解離定数を、表面プラズモン共鳴法により測定したところ、強い結合活性を示す4種類の変異体を獲得した (GST-H03: $K_D = 27$ nM, GST-H06: $K_D = 24$ nM, GST-H07: $K_D = 15$ nM, GST-H09: $K_D = 8.8$ nM)。これらの変異体が示した結合活性は、哺乳類の免疫システムにより作られる野生型抗体に匹敵するものである。次に、各々の変異体を用いて *p*-ニトロベンジルエステルの加水分解活性を測定したところ、いずれの変異体においても触媒活性が検出されなかった。従って、得られた4種類の変異体は、TSA をリガンドとして強く・特異的に認識しているが、遷移状態模倣部位であるリン酸エステル部位以外の部分を主に認識しており、遷移状態安定化が不十分であると考えられる。

以上より、本研究で土台分子として用いた L-PGDS は、反応点が少ない低分子化合物のような分子を、強く・特異的に認識する人工タンパク質の作製が可能であり、その結合活性は抗体に匹敵することから、次世代抗体の候補として有望であることを示唆している。今後は、TSA のリン酸エステル部位を選択的に認識する変異体を獲得するため、選別時の条件の最適化等を検討する。

謝辞

抗体 7B9-TSA 複合体の結晶化および構造解析について、東京医科歯科大学・伊藤暢聡 教授に実施していただきました。厚く御礼申し上げます。また、L-PGDS C-65-A 遺伝子を供与していただきました、本学生命環境科学研究科・乾隆 教授に厚く御礼申し上げます。

論文

1. Miyamoto, N., Yoshimura, M., Okubo, Y., Suzuki-Nagata, K., Tsumuraya, T., Ito, N., Fujii, I., Structural basis of the broad substrate tolerance of the antibody 7B9-catalyzed hydrolysis of *p*-nitrobenzyl esters. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2017**, DOI: 10.1016/j.bmc.2017.07.050
2. Miyamoto, N., Tahara, T., Yoshimura, M., Takeda, Y., Tsumuraya, T., Fujii, I., Novel Approach Based on Phage-displayed Technology for Affinity Maturation of Antibodies with High Affinity against the Antigens. *in preparation*.

学位論文審査結果の要旨

平成 30 年 2 月 28 日

学位論文草稿提出者氏名：宮本 尚樹（理学系研究科生物科学専攻）

学位論文草稿題目：“遷移状態安定化”を触媒因子とする人工酵素の分子設計

天然酵素は、さまざまな触媒機構を駆使し化学反応を促進する（1. 酸塩基触媒, 2. 共有結合触媒, 3. 金属イオン触媒, 4. 近接効果と配向効果, 5. 遷移状態安定化）。中でも遷移状態安定化（遷移状態優先結合）は、酵素触媒に特有の機構であり、化学触媒では達成できない機構である。酵素は化学反応の基底状態（Ground State）より遷移状態（Transition State）に優先的に結合し、遷移状態を安定化する。このことにより、遷移状態の高い活性化自由エネルギーを低下させ、反応を促進する。つまり、化学反応の遷移状態に特異的に強く結合する分子を創出することができれば、目的の化学反応を触媒することが期待される。そこで、免疫システムを利用して、遷移状態に結合する抗体の作製が行われている。遷移状態を立体的・電子的に模倣した安定な分子である遷移状態アナログ（Transition-state Analogue: TSA）を設計・合成し、マウス等の哺乳動物に免疫する。このような酵素機能を示す抗体を「抗体酵素」と呼ぶ。第2章では、ベンジルエステルの加水分解活性をもつ抗体酵素 7B9 について、X 線構造解析および部位特異的変異に機能解析を行い、“遷移状態安定化”の触媒メカニズムを明らかにした。第3章では、“遷移状態安定化”を触媒因子とする抗体酵素 6D9 について、新しい分子工学的手法を考案し機能改良を行った。この抗体酵素は、クロラムフェニコールのプロドラッグ医薬品を特異的に活性化する。本抗体のファージ表層提示ライブラリーを構築し、新しいスクリーニング法により、遷移状態アナログへの結合を最適化することに成功した。さらに、第4章では、この抗体酵素の設計コンセプトを抗体以外のタンパク質（リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素：L-PGDS）へ展開し、人工酵素の創出に挑戦した。抗体酵素の開発当時（1980年代後半）、免疫系に備わる抗体ライブラリーが、標的分子に対して結合する人工タンパク質を作製するための唯一のタンパク質ライブラリーであった。近年の進化分子工学の発展にともない、抗体にこだわらず、様々なタンパク質ライブラリーの構築が可能となってきた。そこで、L-PGDS を土台分子としてファージ表層提示ライブラリーを作製し、人工酵素の創出に取り組んだ。その結果、遷移状態アナログに結合活性をもつ L-PGDS 変異体の獲得に成功した。

以上のように、申請者は、抗体酵素をモデルとして、“遷移状態安定化”の触媒メカニズムを明らかにするとともに、進化分子工学を駆使して、人工酵素の研究に新しい扉を開いた。この新しい設計法により、さまざまなタンパク質を人工酵素の土台分子として利用することが可能となり、人工酵素の開発や天然酵素の分子メカニズムの解明に大きく貢献することが期待できる。本学位論文には顕著な新規性と独創性あり、また、本人自身が TSA の合成、ファージ表層提示法による変異タンパク質の作製、物理化学的解析（結合活性・反応速度）のすべてを手がけており、申請者を博士（理学）の学位に値する能力をもつものと判断する。