

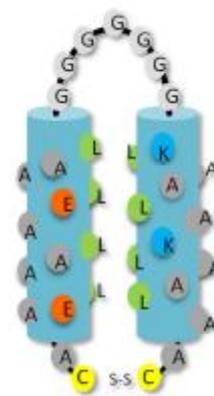
称号及び氏名	博士（理学） 川端 久美子
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 31 日
論文名	ヘリックス-ループヘリックス構造を土台とした分子標的ペプチドのデザイン：IgG 結合性ペプチドの創出と免疫吸着療法への応用
論文審査委員	主査 藤井 郁雄 副査 多田 俊治 副査 徳富 哲

## 論文要旨

### 第 1 章 序論

体内の免疫システムで活躍する抗体は数億種類の結合多様性をもっており、様々な生体分子と特異的に結合する。この性質から、生体分子の相互作用を制御するプローブとして利用され、近年では研究目的のツールとしてのみならず、体内の疾患関連分子を標的とする抗体を開発し、抗体医薬品として利用されるようになった。しかし、抗体には致命的な欠点がある。それは、抗体そのものが持つイムノグロブリン構造に起因するものである。抗体は分子量が **150 kDa** の巨大タンパク質であり、多数のジスルフィド結合を持った複雑な立体構造を有している。そのため、合成が難しく、生産コストが高い。また、免疫原性があるために治療目的で抗体を使う場合はヒト化する必要がある。このように抗体を治療目的に使用するには問題が多い。

そこで、当研究室では抗体様分子として強固な立体構造を保持した最小のペプチドであるヘリックス-ループ-ヘリックス (**HLH**) ペプチドを *de novo* デザインした (**Fig. 1**)。このペプチドは **14** 残基からなる **2** つの  $\alpha$ -ヘリックスとそれらをつなぐ **7** 残基のグリシンループから構成されている。 $\alpha$ -ヘリックス内側の **8** 残基のロイシンが疎水効果によって会合し、**N** 末端および **C** 末端のシステインによる分子内ジスルフィド結合によって立体構造が安定化されている。**HLH** ペプチドは分子量が約 **5 kDa** の低分子であるため、化学合成が可能で、生産が比較的容易である。さらに、抗体のように天然タンパク質の機能を付加させることが可能である。その一方で、体内で抗原性を示さないことから拒絶反応を起こす危険性が無い。この **HLH** ペプチドに標的タンパク質に対する結合能を獲得させることで抗体様分子として開発する研究を進めている。



**Fig. 1** ヘリックス-ループ-ヘリックスペプチド (YT1-S)

これまでに、C 末端側の $\alpha$ -ヘリックスの外側領域もしくはグリシンループ部分を用いて標的タンパク質に対して結合活性を有したペプチドの獲得に成功している。本研究では、HLH ペプチドの 2 本の $\alpha$ -ヘリックスを用いて標的タンパク質に対する結合機能をデザインすることを試みている。デザインするにあたり、黄色ブドウ球菌由来のプロテイン A の B ドメイン（以下、プロテイン A）をモデルとした。プロテイン A は 3 本の $\alpha$ -ヘリックスから構成され、HLH ペプチドと立体構造が類似している。また、ヒト免疫グロブリン G の Fc 領域（ヒト IgG-Fc）と 2 本の $\alpha$ -ヘリックスを介して高い親和性 ( $K_d=20$  nM) で結合することから、プロテイン A のヒト IgG-Fc への結合機能を HLH ペプチドに付与することによって、ヒト IgG 結合性ペプチドを獲得できる。

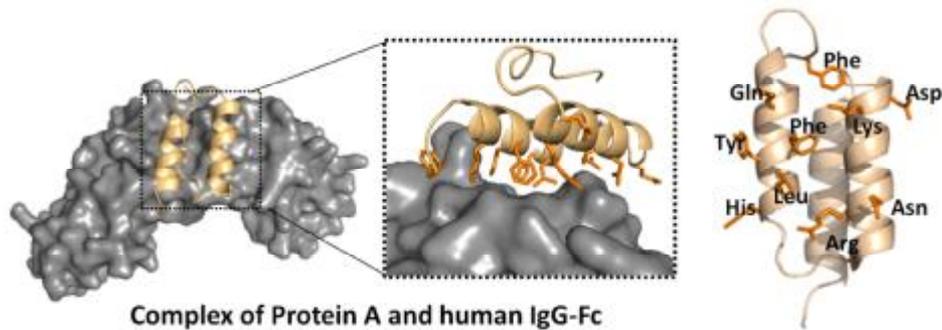


Fig. 2 プロテイン A

ヒト IgG 結合性ペプチドは免疫吸着療法への応用が期待される。IgG は自己免疫疾患の原因として知られており、血液中から免疫吸着材によって特異的に IgG を除去する治療が行われる。従来は、担体にトリプトファンのような低分子を固定した吸着材、あるいはプロテイン A などの生物由来のタンパク質を固定化した吸着材が用いられる。しかし、低分子は高い抗体結合量が得られず、さらに選択的吸着性が低いという欠点がある。プロテイン A を用いた吸着材はリガンドが溶出した場合に重大な副作用を生じる危険性がある。そこで、デザインされたプロテイン A 模倣ペプチドを用いることで、両者の欠点を解決した新たな免疫吸着材が開発できると考えられる。ここでは、プロテイン A 模倣ペプチドのデザインから免疫吸着材としての抗体除去力評価の結果を発表する。

## 第 2 章 プロテイングラフティングによるヒト IgG-Fc 結合に関与するアミノ酸のデザイン

プロテイン A とヒト IgG-Fc との複合体の結晶構造 (PDB : 1FC2) から、結合に関与するアミノ酸 10 残基を決定した。この 10 残基の適切な移植位置を検討するために、プロテイン A のヘリックス 1 およびヘリックス 2 ドメインの全てのアミノ酸を土台分子 YT-1S に移植した (ペプチド G7A5)。このペプチドの機能解析をしたところ、CD スペクトル測定では、緩くではあるが $\alpha$ -ヘリックス構造を形成していることが判明し、SPR 法による結合活性測定では解離定数  $K_d=19$   $\mu$ M でヒト IgG-Fc に結合することが明らかになった。

そこで、ペプチド G7A5 の 10 個のアミノ酸配置を保存させてそれ以外を YT-1S に戻したペプチド G7A5L をデザインしたところ、このペプチドは強固な $\alpha$ -ヘリックスを保持していることは確認できたが、ヒト IgG-Fc に対して結合しないことが明らかとなった。これは、HLH ペプチドの形成する強固な立体構造の影響で移植したアミノ酸がヒト IgG-Fc 結合部位に適切に位置できていないことが原因であると考えられた (Fig. 3)。

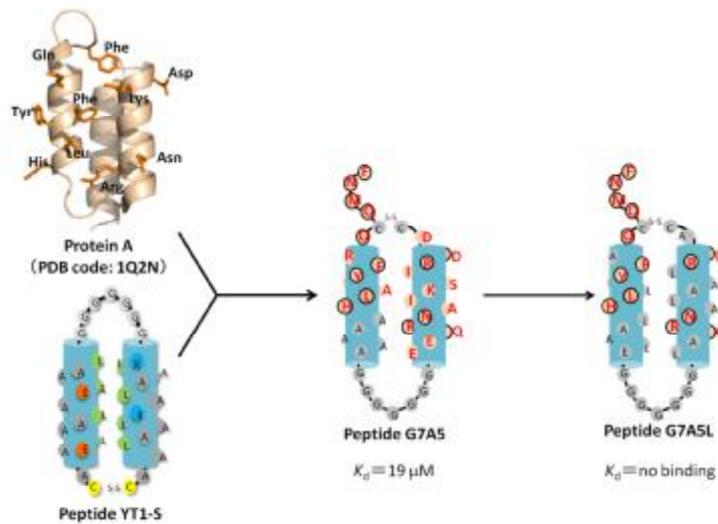


Fig. 3 プロテイングラフティングを用いたプロテイン A 模倣ペプチドのデザイン

### 第 3 章 分子進化学による立体構造の改変

立体構造形成に関与するアミノ酸に変異を加えることでヒト **IgG-Fc** に結合可能な立体構造を有するペプチドをデザインすることを試みた。2 本の $\alpha$ -ヘリックス内側の 6 個のロイシンをランダム化した酵母表層 **L-random** ペプチドライブラリーを構築した。磁気ビーズを用いてビオチン化ヒト **IgG-Fc** (**bio-ヒト IgG-Fc**) に結合する酵母を濃縮した後、**FACS (Fluorescence activated cell sorter)** で **bio-ヒト IgG-Fc** 結合性酵母のみを単離した。

96 クローンの結合活性を蛍光プレートリーダーにより確認し、強い蛍光強度を示した 16 クローンの DNA 配列を解析することで、**bio-ヒト IgG-Fc** 結合性ペプチドのアミノ酸配列を決定した。そのうち 2 つのペプチド (32, 60) を化学合成し、機能解析をしたところ、ヒト **IgG-Fc** に対する結合活性は 32 :  $K_d=16 \mu\text{M}$ , 60 :  $K_d=23 \mu\text{M}$  であった。また、これらのペプチドは $\alpha$ -ヘリックス構造を保持していることが確認されたが、ペプチド **G7A5L** ほど強固ではないことが明らかになった (Fig. 4)。

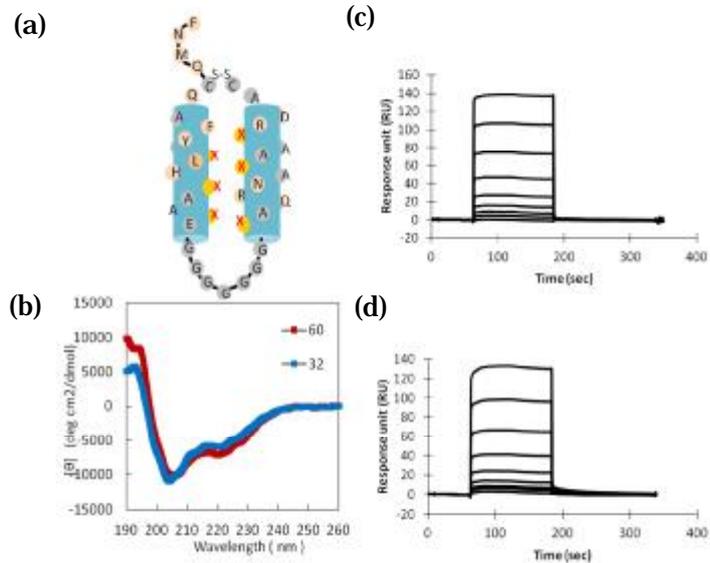


Fig. 4 酵母表層提示法を用いたヒト **IgG-Fc** 結合性ペプチドの獲得. (a) L-Random ペプチドライブラリー, (b)ヒト **IgG-Fc** 結合性ペプチド 32 および 60 の CD スペクトル, (c)ペプチド 32 の結合活性測定, (d)ペプチド 60 の結合活性測定

#### 第4章 プロテイン A 模倣ペプチドを用いた免疫吸着療法への応用

デザインしたプロテイン A 模倣ペプチドを免疫吸着療法用のヒト IgG 吸着材へ応用するために、ペプチド G7A5 を用いて吸着材としての性能を評価した。ペプチド G7A5 を樹脂に固定するために、直鎖状ペプチド (lin-G7A5) および、環状型ペプチド (G7A5-C) の 2 種類をデザインし、それぞれを約 50 mg 化学合成した。lin-G7A5 および G7A5-C の結合活性を SPR 法によって測定したところ、それぞれ  $K_a = 150 \mu\text{M}$ ,  $K_a = 19 \mu\text{M}$  であった。さらに、G7A5-C のヒト IgG-Fc およびヒト IgG に対する結合特異性を SPR 法により検討したところ、ヒト IgG-Fc およびヒト IgG に特異的に結合し、その他のタンパク質 (HSA およびヒト VEGF, ヒト Fbg, BSA) には結合しないことがわかった。それぞれのペプチドを樹脂担体のマレイミド基とチオエーテル結合を形成させることによって lin-G7A5 は  $4.1 \mu\text{mol/mL gel}$  および G7A5-C は  $3.8 \mu\text{mol/mL gel}$  を固定した。ペプチド固定化担体に健常人ヒト血漿を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 17.5 分浸透させた。浸透後、遠心分離にてペプチド固定化担体を除き、上澄み血漿中に含まれる血漿タンパク質量 (IgG, Fbg) を測定することで、ペプチド固定化担体への吸着率を算出した。その結果、lin-G7A5 の IgG 吸着率は 18% と既製品であるトリプトファン固定担体 IM-TR の約 0.8 倍であり、Fbg 吸着率は 12% と IgG/Fbg 選択性は 4 倍であった。一方、G7A5-C のヒト IgG 吸着率は 22% と既製品である IM-TR の約 1.2 倍であり、Fbg 吸着率は 3% であったため IgG/Fbg 選択性は 40 倍であった。このように、ペプチド吸着材は IM-TR 以上の選択的な抗体吸着力を示した。(Fig. 5)

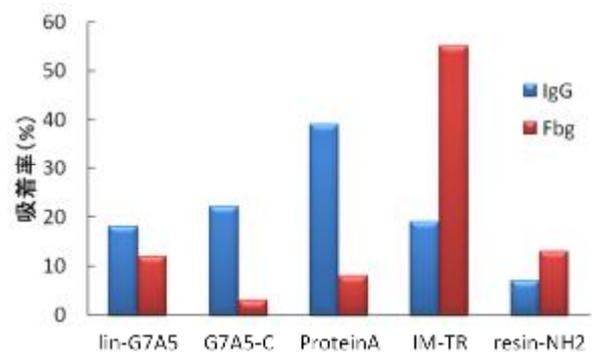


Fig. 5 プロテイン A 模倣ペプチドの血漿抗体吸着試験

#### 第5章 総括

ヒト IgG-Fc の結合に関与するアミノ酸の移植と立体構造形成に関与するアミノ酸の改変により、ヒト IgG-Fc に対する結合活性を保持するペプチドを獲得した。さらに、強固な立体構造を保持させるためには今回変異を加えた 6 残基に加えて、その他の因子が必要であると示唆される。今後は、獲得したプロテイン A 模倣ペプチドをより強固な立体構造を保持させるようデザインするとともに、得られたペプチドの立体構造の形成様式をペプチド G7A5L と比較しながら明らかにする。

ペプチド G7A5 固定化担体を用いた血漿中からの抗体吸着除去試験において、デザインしたプロテイン A 模倣ペプチドは既製品よりも高い選択性で抗体を吸着除去した。これにより、ペプチドを用いた新たな免疫吸着材として十分に発揮することが明らかになった。

論文

**Peptide-based immunoabsorbents: molecular grafting of IgG-Fc binding epitopes in Protein A to a *de novo* designed helix-loop-helix peptide.**, Kumiko Kawabata, Hirokazu, Nagai, Nao Konishi, Daisuke Fujiwara, Ryo Sasaki, Takafumi Ichikawa, and Ikuo Fujii\*, *Bioorg. Med. Chem*, 2013, in print

## 審査結果要旨

近年、分子標的医薬として抗体医薬が注目されているが、その限界も明らかにされてきている。抗体医薬には、以下のような問題点が指摘されている。1) ヒト化等が必要である。2) 細胞内のタンパク質をターゲットとすることができない。3) 生産に膨大なコストを必要とする。さらに、4) 特許の制限が複雑に絡み合っている。これらの問題点は、抗体の基本構造に起因するものである。そこで、藤井研究室では、イムノグロブリン構造 (**IgG**) を利用せず、目的の標的タンパク質に対して特異的に結合する抗体様物質の研究を行っている。抗体様物質として、強固なヘリックス・ループ・ヘリックス構造 (**HLH**) をもつペプチドを考案し、ファージ表層提示法を組み合わすことにより独自の立体構造規制ペプチド・ライブラリーを開発した。本ライブラリーをスクリーニングすることにより、疾患関連タンパク質 (**VEGF, G-CSF** など) を分子標的としたペプチドの開発に成功している。本研究では、これまでのファージ表層提示ライブラリー法ではなく、プロテイン・グラフティング法による分子標的 **HLH** ペプチドの分子設計を検討した。

プロテイン・グラフティング法による分子設計にあたり、黄色ブドウ球菌由来のプロテイン **A** の **B** ドメイン (以下、プロテイン **A**) をモデルとして、ヒト **IgG** 結合性 **HLH** ペプチドの作製を行った。プロテイン **A** とヒト **IgG-Fc** との複合体の結晶構造から、結合に関与するアミノ酸 **10** 残基を決定した。この **10** 残基の適切な移植位置を検討するために、プロテイン **A** のヘリックス **1** およびヘリックス **2** ドメインの全てのアミノ酸を土台分子 **HLH** ペプチドに移植した。得られたペプチドの機能解析し、 $\alpha$ -ヘリックス構造の形成とヒト **IgG-Fc** に対する結合活性を明らかにした ( $K_d=19 \mu M$ )。

デザインしたヒト **IgG** 結合性 **HLH** ペプチドを免疫吸着療法のヒト **IgG** 吸着材へ応用するために、ペプチドを樹脂担体に固定化し吸着材としての性能を評価した。ペプチド固定化担体に健康人ヒト血漿を加え、上澄み血漿中に含まれる血漿タンパク質 (**IgG, フィブリノーゲン Fbg**) を測定することで、ペプチド固定化担体への吸着率を評価した。**HLH** ペプチドは **18 %** の **IgG** 吸着率し、高い **IgG** 選択性 (**IgG/Fbg = 40**) を持つことを明らかにした。

以上のように、申請者は、抗体に代わる新しい分子標的物質として、**HLH** ペプチドの可能性を示すことに成功した。また、本ペプチドが新たな免疫吸着材として十分に機能することを明らかにした。顕著な新規性と独創性があり、また、本人自身が酵母表層提示ペプチドライブラリーの構築、ペプチド合成、結合実験、吸着試験まで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。