

Middle angle X-ray scattering: MAXS を活用した ヒト抗体のコンフォメーション変化の3次元分子可視化

松本 崇*, 山野 昭人*, 佐藤 孝**

X線小角散乱 (Small angle X-ray scattering: SAXS) は、溶液中の蛋白質のサイズや形状を分析するための手法として知られている。標準的な SAXS では、 $q=0.25 \text{ \AA}^{-1}$ 程のデータを使用する。このため、SAXS では、対象分子のサイズの変化、凝集、およそその分子の外形といった情報しか得ることができない。一方、 $q=0.30\sim 0.65 \text{ \AA}^{-1}$ 程の中角領域の X 線散乱は、分子内のドメイン間距離や二次構造間距離といった溶液中の分子構造及びコンフォメーション変化を解析するための重要な情報を含んでいる。この中角領域のデータを用いることで、より詳細な分子の挙動やコンフォメーション変化を可視化できると考えられる。この重要な中角領域の情報を含む溶液散乱を“middle angle X-ray scattering: MAXS”と名付けた。本ジャーナルでは、MAXS を用いた 3 次元分子可視化法により捉えられた、溶液中の抗体の柔軟なコンフォメーション変化について紹介する。

1. はじめに

バイオ医薬品は、遺伝子組み換え技術や細胞培養技術を用いて製造された、酵素、抗体、ホルモン等を有効成分とする医薬品であり、その市場は年々拡大を続けている。バイオ医薬品、中でも抗体医薬品は標的分子への特異性が高く、これまで有効な治療方法がなく治療が困難であったガン、自己免疫疾患、血液疾患等に対し、少ない副作用で高い治療効果を発揮してきている事から、抗体医薬品の開発はますます活発に進められている。このように注目される有用性がある反面、低分子医薬品のように化学合成での生産ではなく動物培養細胞を用いて生産するため、抗体医薬品は開発・生産コストが高く、さらに、高分子量で糖鎖が付加した複雑な構造であるため、製造時の生産物の品質を維持することが困難という欠点がある。

一般に、医薬品開発において、薬剤の設計及び最適化には立体構造情報が大きな役割を果たしている。さらに、バイオ医薬品の品質や信頼性を確保するため、製造工程における糖鎖の有無や凝集体の存在などの異質性を確認することが必要と考えられている。しかし、抗体医薬品は、抗体自体が高い柔軟性を持っているうえに、結合している糖鎖の運動性も高いため結晶化には不都合であり、単結晶 X 線構造解析を用いて構造情報を得ることは非常に困難である。そのため、Protein Data Bank (PDB) に登録されている抗体のほぼ

すべての構造は、各領域に切断された断片であり、全長構造は数えるほどしかない。たとえ結晶構造が得られたとしても、その結晶構造は結晶のパッキング力の影響を受けており、溶液中の分子構造と異なっている場合が多くみられる。その結果、本当に知りたいコンフォメーション変化等の構造情報が得られないことがある。

もし、抗体のような柔軟な分子の溶液中の構造及びコンフォメーション変化を直接可視化することができれば、抗体医薬品の機能、品質、安定性を向上させながら、それにかかる時間や経済的コストを大幅に削減できる可能性がある。この溶液中の柔軟な分子をそのまま可視化することのできる技術が、溶液散乱である。溶液散乱は、結晶のパッキング力から解放された本来の溶液中の分子構造を分析できる強力かつ数少ない技術である。しかしながら、溶液散乱は X 線小角散乱: small angle X-ray scattering (SAXS) の一分野であり、分子サイズの変化や凝集の存在、及びおよそその分子形状の情報を与える事ができるが、詳細な分子の挙動やコンフォメーション変化を議論するまでの情報を導き出すことは困難といえる。そこで、我々は中角領域 [$q=0.30\sim 0.65 \text{ \AA}^{-1}$] に注目した。中角領域からの散乱には、分子内のドメイン間距離や二次構造間距離などの重要な情報が含まれている。この情報により、より詳細な分子の挙動やコンフォメーション変化の可視化が可能となる。この重要な中角領域の情報を含む溶液散乱のことを、X 線中角散乱: middle angle

*株式会社リガク 応用技術センター

**株式会社リガク X線機器事業部 SBU-ROD

X-ray scattering (MAXS)と呼ぶこととした。本稿では、このMAXSを用いることで、柔軟な抗体の溶液中の3次元構造やコンフォメーション変化を捉えることができるかを検証した。

2. 実験方法

2.1. ヒト血清IgG

柔軟な分子の溶液構造解析の検証用のサンプルとして、ヒト血清IgGを用いた。さらに、糖鎖の有無による抗体への構造への影響を調べるために、ヒト血清IgGをPeptide-N-Glycosidase F (PNGase F)で脱グルコシル化処理を行い、脱グルコシル化後のサンプルでのMAXS測定・解析を実施し、糖鎖除去型抗体の柔軟性及びコンフォメーション変化を評価した。

2.2. 測定及び溶液解析

本実験でのすべての測定は、X線源に超高輝度X線発生装置FR-X、検出器にフォトンカウンティング型X線検出器を搭載したBioSAXSで実施した。各散乱イメージは、BioSAXS制御及び処理ソフトであるSAXSLabを用いて円周平均し、1次元化した散乱曲線を得た。以後のデータ処理は、ATSAS⁽¹⁾を使用した。Ab-initio電子密度計算は、DENSS⁽²⁾を使用し、図はPyMol⁽³⁾で作成した。

3. MAXS解析結果

3.1. ヒト血清IgGの溶液中構造

抗体は2つのFab領域と1つのFc領域から構成される、おおよそY字型の分子であることが知られているが、溶液中でのコンフォメーション変化についてはあ

まり研究が進んでいない。その理由は、抗体は非常に柔軟であるため、抗体の全体構造を1種類の構造だけで表現するのは、そもそも難しいからである。そのため、数例の全長抗体の結晶構造が得られているが、本当に知りたい溶液中の構造は反映できていないと考えられる。

そこで、最初にヒト血清IgGのDENSSを用いた溶液構造解析を実施した。その結果、図1に示すように、溶液構造はヒトIgGの結晶構造(PDB ID=1hzh)と大きく異なっていることが示された。抗体は、溶液中では結晶構造と比較して、両方のFabをより大きく広げた構造であり、結晶構造の示すコンパクトさは、結晶のパッキング力により本来の構造からゆがめられた構造であることが明らかとなった。分子のコンフォメーション変化を評価するために、複数の結晶構造を重ね合わせて分子のコンフォメーション変化や動作範囲を推測する手法がある。図2に、3種類の抗体の結晶構造(PDB ID=1hzh: 赤, 1igt: 青, 1igy: 緑)を重ね合わせた図を示す。しかし、パッキング力による影響を受けているためか、おおよその構造は似通っており、細かなFabやFcの揺らぎといったコンフォメーション変化があることを見ることはできるが、溶液構造のような2つのFabが大きく広がったようなコンフォメーションを持つ可能性を推測することは困難といえる。したがって、抗体のような高い柔軟性を持つ分子構造の解析や評価には、結晶構造解析だけでなく、MAXSによる溶液構造解析が必須であるといえる。次に、溶液中の抗体がどのようなコンフォメーションであるかを理解しやすくするために、結晶構造の各FabとFcを得ら

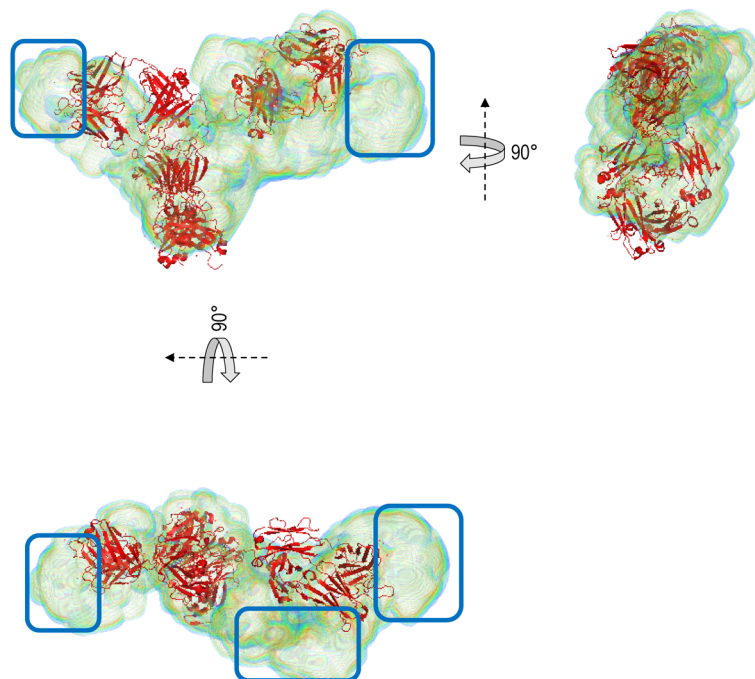


図1. 結晶構造(PDB ID=1hzh)とヒト血清IgGの3D電子密度解析による溶液構造の比較。

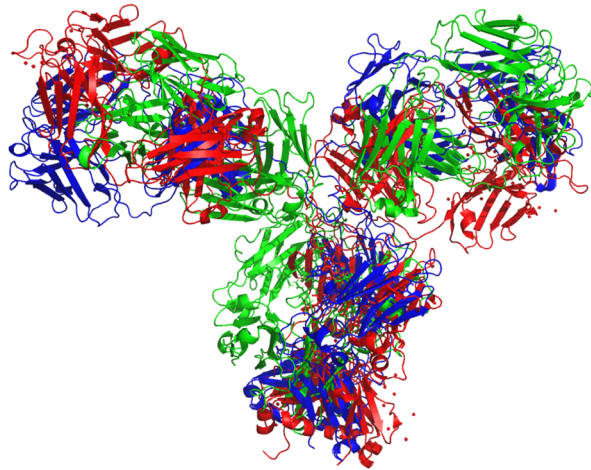


図2. 3種類の抗体の結晶構造 (PDB ID=1hzh: 赤, ligt: 青, ligy: 緑)を重ね合わせ図.

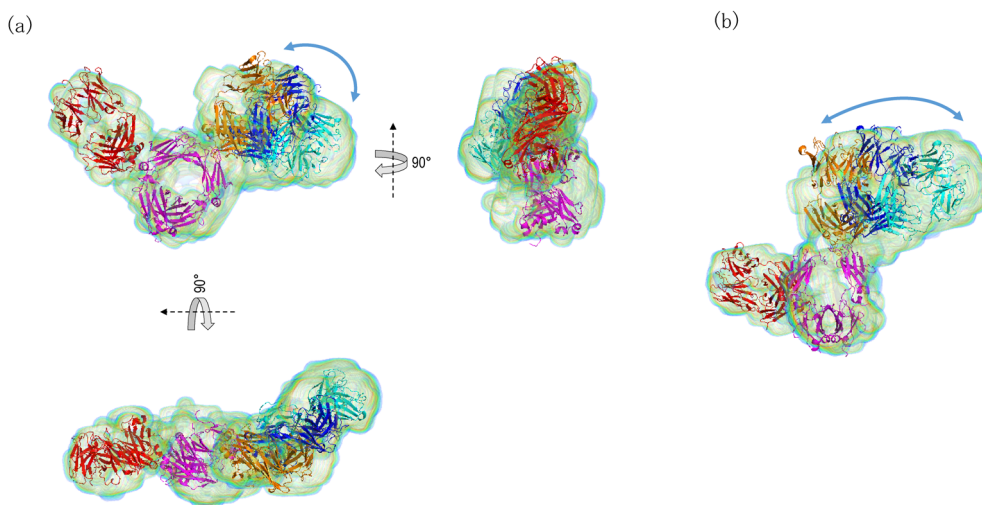


図3. (a) 結晶構造の各FabとFcと3D電子密度との重ね合わせ. (b) Fabの大きく揺らいだコンフォメーション変化.

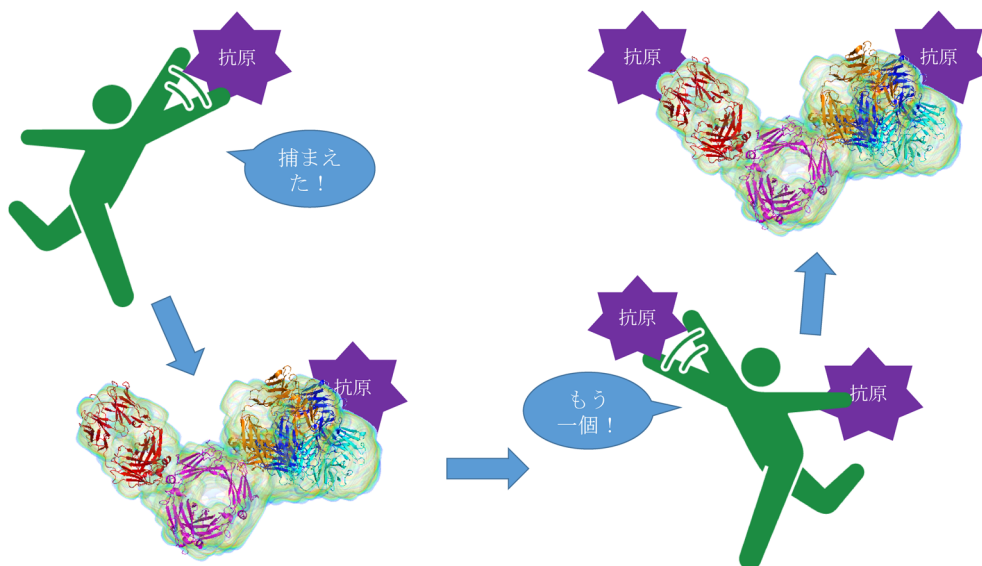


図4. 3D分子可視化から導かれる抗体の抗原探索機構.

れた電子密度へCoot⁽⁴⁾を用いたモデルフィッティングを実施した(図3a, b). 図3より, 片方のFabはほとんど動きがなく, もう一方のFabは大きく揺らいだコンフォ

メーション変化を起こしていることがわかる. 溶液中では抗体の2つのFabは等価に揺らぐのではなく, 片方のFabのみが優先的にコンフォメーション変化をし

ていると考えられる。これらの結果より、抗体は闇雲に両方のFabを動かして非効率的な抗原探索を行うのではなく、下記のようなFabに優先順位を持たせた効率的な抗原探索を行うと考えられる(図4)。

最初に、狙ったターゲット抗原を探すために、片手を振り回しながら走り回り抗原を捕獲する。つぎに片手で抗原を抱えたまま、もう片方の手にも捕獲しようと再び走り回り別の抗原を捕獲する、という動的な姿を想像することができる。

3.2. ヒト血清IgGの糖鎖除去によるコンフォメーション変化

抗体はY字型をした糖タンパク質であり、重鎖のFcの C_{H2} ドメインのAsn残基にN-結合型糖鎖が結合している。このN-結合型糖鎖はタンパク質のフォールディング、輸送、分解、相互作用といったタンパク質の品質管理、安定性及び機能の制御など生命現象において重要な役割を果たしている。バイオ医薬品である抗体の安定性に大きくかわるN-結合型糖鎖は、Fc領域の内部に埋もれた状態で存在していることがX線結晶構造解析から明らかにされている。この重要な糖鎖を取り除いた糖鎖非付加型抗体(糖鎖非付加型には、脱グルコシル化処理した抗体も含む。以後、“無糖鎖”と略す。)は、抗原及びProteinAとの結合能力にはほぼ影響を受けないが、Fc受容体との結合能力が著しく減少することが知られている。これは、N-結合型糖鎖の有無によるコンフォメーション変化があると考えられる。これまでFcのみの結晶構造は複数解析されていることから、Borrokらは糖鎖付加型Fc(以後“有糖鎖”と略す。)と無糖鎖Fcの結晶構造を比較してコンフォメーション変化があるかを確認した(図5, PDB ID=3ave: 灰, 3s7g: 赤, 3dnk: 青, 3hkf: 緑)⁽⁵⁾。その結果、 C_{H2} ドメインの C_{α} 間の距離が、有糖鎖Fc: 3aveと比較して、無糖鎖Fc: 3s7g, 3hkfでは短い

closedコンフォメーションであることを示したが、別の無糖鎖Fc: 3dnkでは逆に広がったopenコンフォメーションのようであり、結晶構造ごとに異なる結果を示した。これは、結晶構造はパッキング力の影響で容易にドメインのシフトやねじれが起こり、溶液中の構造を反映できていない証拠といえる。そこで、BorrokらはSAXSを用いて有糖鎖Fcと無糖鎖Fcの慣性半径を利用して、溶液中Fcの糖鎖による影響の推測を行った。その結果、有糖鎖Fcの慣性半径は27.4 Å、無糖鎖Fcの慣性半径は28.3 Åと、無糖鎖Fcの慣性半径の方が大きくなっていったことから、無糖鎖Fcはopenコンフォメーションであることを示した⁽⁵⁾。しかし、SAXSによる慣性半径での比較では、実際にFcがどのようなopenコンフォメーションであるのかは想像することは困難である。さらに、この結果はFc領域だけのSAXSの結果であり、本来の抗体が持つFabの影響は無視されているため、実際の無糖鎖抗体の挙動を反映しているとは言えない。そこで我々は、ヒト血清IgGの脱グルコシル化処理による無糖鎖抗体のMAXSを用いた3D分子可視化によるコンフォメーション変化を評価した。その結果、無糖鎖抗体のFcはopenコンフォメーションであるというだけでなく、どの無糖鎖Fcの結晶構造の C_{H2} ドメインよりも大きく開けたopenコンフォメーションであることが明らかとなった。これはSAXSによるFcだけの慣性半径から考えられるよりもより大きいコンフォメーション変化であるといえる。このことは、糖鎖の有無の比較を行うためには、1つの領域であるFcだけを切り出して評価するのでは、本当に知りたいコンフォメーション変化を捉えることは困難であることを示している。やはり、分子全体を用いた3D分子可視化が必須であるといえる。さらに、無糖鎖抗体のFabに注目したところ、糖鎖除去前の抗体と同様に片方のFabはほ

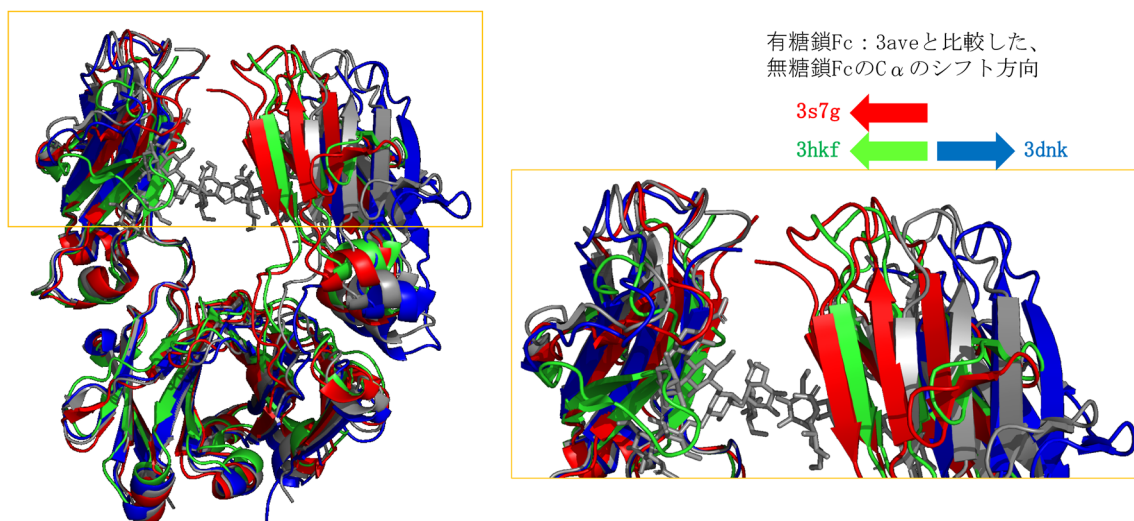


図5. 有糖鎖Fcと無糖鎖Fcの結晶構造の重ね合わせ。

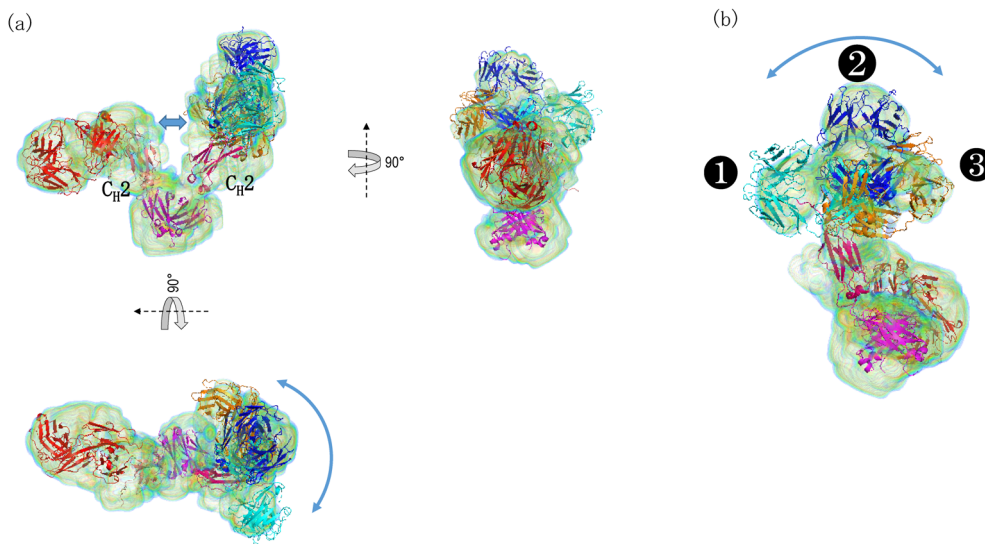


図6. (a) 無糖鎖抗体の3D電子密度. (b) Fabの大きく揺らいだコンフォメーション変化.

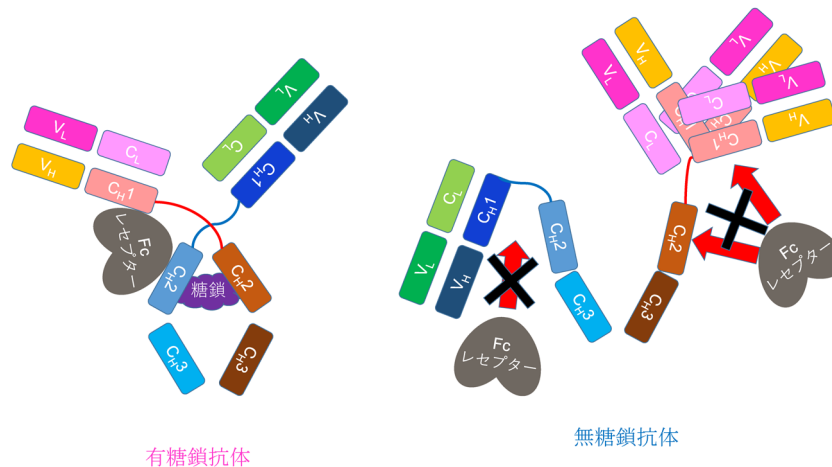


図7. 抗体とFcレセプターの結合模式図.

とんど動きがなく、もう一方のFabのみ大きく揺らいだコンフォメーション変化を起こしていることが示された(図6-a, b). Fabのコンフォメーション変化は、糖鎖を除去することで、有糖鎖抗体のFabよりもより大きく、よりはっきりと3か所にとどまっている様子が可視化された。これはFabが①-②間、②-③間及び①-③間の3種類の運動性を持っていることを示唆している可能性がある(図6-b)。この無糖鎖抗体の柔軟な運動性は、糖鎖が除去されたことでC_H2ドメインの自由度が増したことが要因として考えられる。

次に、得られた無糖鎖抗体の運動性とコンフォメーション変化から、抗体とFc受容体との結合能力の低下について考察した。Fc受容体はFcのC_H2ドメインとFabのC_H1ドメインの両方と相互作用していることが知られている⁽⁶⁾。このため、抗体とFc受容体が結合するためにはFcのC_H2ドメインとFabのC_H1ドメインが一定の距離内に位置している必要がある。しか

し、無糖鎖抗体では、図6で示しているようにC_H2ドメイン及びFabの自由度が増し、その結果さらにFabの柔軟性が増している。そのため、FcのC_H2ドメインとFabのC_H1ドメインの距離が、有糖鎖抗体と比べてより近接したりより離れたりする結果、Fc受容体との結合性に適している状態ではなくなっている。反対側のFcのC_H2ドメインとFabのC_H1ドメインでは、C_H2ドメインとC_H1ドメインが近接しており、Fc受容体が入り込む隙間が存在していないことが示唆されている(図7)。その結果、無糖鎖抗体では、どちらのFab側においても、Fc受容体との結合能力を大きく損なう事になったと考えられる(図7)。Fc受容体の結合性低下の原因は、3Dで分子が可視化されることにより得られたFcのC_H2ドメインと、FabのC_H1ドメインの距離の不均一性及び運動性の増加の情報が得られて初めて明らかにできたといえる。

4. おわりに

柔軟性を持つ抗体は、結晶構造のみでは溶液中のコンフォメーションの状態を正しく理解することは困難であるといえる。MAXSを用いた溶液構造解析を実施することで、溶液中の全体構造及び特徴のあるコンフォメーション変化を明らかにでき、初めて新たな抗体の効率的な抗原探索機構を推測することができる。我々はこの抗体のように溶液中で揺らぎが大きい分子であっても、立体構造及びコンフォメーション変化を的確にとらえる手法を、“3D分子可視化法”と名付けた。

これまで、抗体の糖鎖有無の評価は、Fcのみの結晶構造解析のC α 間距離の比較やFcのみのSAXSの慣性半径の比較により行われてきた。その結果、openかclosedコンフォメーションのどちらであるかははっきりしなかったり、openであってもどのようなコンフォメーション変化であるかは不明であったりした。さらに、Fabを持たないFcのみで評価しているため、Fabによる影響は考慮していなかった。3D分子可視化法による無糖鎖抗体のコンフォメーション変化の評価の結果、Fcだけの評価では想像できないようなダイナミックなコンフォメーション変化があることを初めて明らかにした。さらに、抗体とFc受容体の結合性低下の原因についても言及することができたといえる。

抗体のように柔軟性の高い分子の状態評価には、溶液中でかつ全長の分子を用いる事が必須であるといえる。これらの理由より、MAXSを用いた3D分子可視化法は、抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品の機能向上、品質評価、安定性評価に対して効果的に貢献できる可能性を秘めている。

参考文献

- (1) M. V. Petoukhov, D. Franke, A. V. Shkumatov, G. Tria, A. G. Kikhney, M. Gajda, C. Gorba, H. D. T. Mertens, P. V. Konarev and D. I. Svergun: New developments in the *ATSAS* program package for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, **45** (2012) 342–350. <https://doi.org/10.1107/S0021889812007662>
- (2) T. D. Grant: Ab initio electron density determination directly from solution scattering data. *Nature Methods.*, **15** (2018) 191–193. <https://www.nature.com/articles/nmeth.4581>
- (3) The PyMOL Molecular Graphics System: Version 2.3 Schrödinger, LLC.
- (4) P. Emsley and K. Cowtan: Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.*, **D60** (2004) 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>
- (5) M. J. Borrok, S. T. Jung, T. H. Kang, A. F. Monzingo and G. Georgiou: Revisiting the Role of Glycosylation in the Structure of Human IgG Fc: *ACS Chem Biol.*, **21** (2012) 1596–1602. <https://doi.org/10.1021/cb300130k>
- (6) R. Yogo, Y. Yamaguchi, H. Watanabe, H. Yagi, T. Satoh, M. Nakanishi, M. Onitsuka, T. Omasa, M. Shimada, T. Maruno, T. Torisu, S. Watanabe, D. Higo, T. Uchihashi, S. Yanaka, S. Uchiyama and K. Kato: The Fab portion of immunoglobulin G contributes to its binding to Fc γ receptor III. *Sci. Rep.*, **9**, Article number: 11957 (2019), <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48323-w>