

実施課題名 抗体医薬の高機能化に向けたNMRによる抗体の構造解析

【背景】(実施課題の背景・目的を簡潔に具体的に記載してください。)

モノクローナル抗体のヒト化、小型化をはじめとするタンパク質工学的な改変技術は新たな発想の抗体医薬の開発を促し、さらには修飾糖鎖の構造最適化も視野に入れた高機能化が進んでいる。さらなる抗体の構造研究を通じて、新規な機能を実装した抗体医薬の開発が加速されることが期待される。そこで本申請では、先端計測・計算的手法を駆使して、水溶液中におかれた抗体分子を対象にその3次元構造動態と相互作用の連関の仕組みを明らかにすることを旨とする。

【実施内容】(別紙の利用報告書に記載してある実施内容を簡潔に具体的に記載してください。)

申請者はこれまで、動物細胞をはじめとする真核生物発現系を用いることにより、糖鎖修飾を受けた抗体に安定同位体標識を施す技術を開発してきた。この技術を応用して、これまでにヒトおよびマウス抗体のFc領域(50kDa)について、主鎖に由来するNMRシグナルの帰属を達成している。こうした成果に基づいて、様々な摂動に対する抗体の高次構造の変化を追跡することが可能となっている。NMR研究の対象をさらに高分子量のIgG(150kDa)に拡張するにあたっては、側鎖のメチル基をプローブとすることが極めて有効である。

その目的に向けて、本研究では900MHz超高磁場NMR装置を利用してFc領域の信号帰属を側鎖信号に拡張することに取り組んだ。メチオニン、イソロイシン、ロイシン、バリン、アラニン残基に選択的に安定同位体標識を施した試料を調製し、超高磁場NMR計測に供した。メチオニン残基とアラニン残基についてメチル基に由来する信号をすべて観測し、帰属を確定した。バリン残基およびロイシン残基についてはメチル基を立体選択的に標識した試料を用いることで、帰属を効率的に進めることができた。

本研究の成果は、抗体医薬の高機能化に向けたNMRアプローチの基盤を与えるものである。

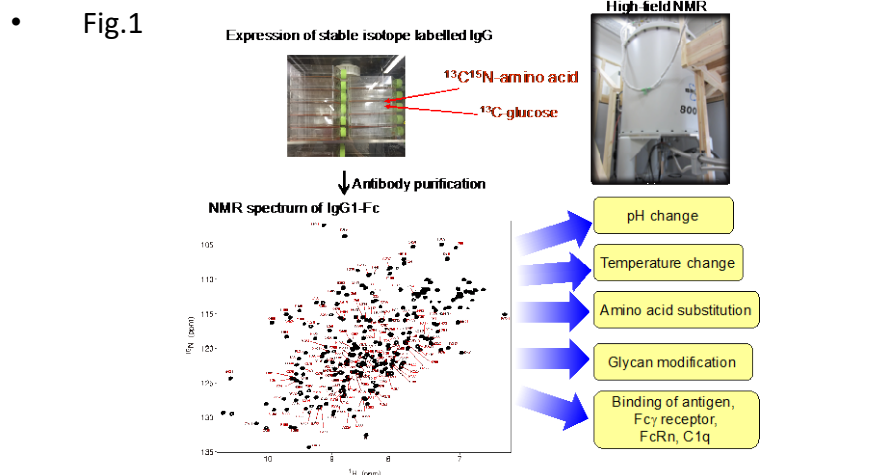


Fig.1 抗体のNMR帰属を活用した高次構造変化の追跡

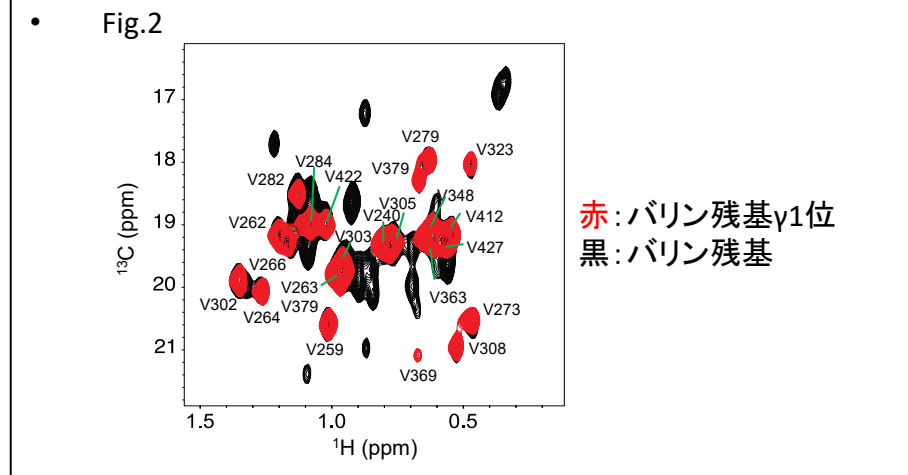


Fig.2 抗体のFc領域のバリン残基メチル基に由来するNMR信号の帰属

NMR 共用プラットフォーム 最先端利用開発課題
利用報告書

(課題実施者の方へ)

課題選定委員会にて、実施内容のフィードバックを行うため、ご記入下さい。本報告書については、必要な編集・加工を行った上で NMR 共用プラットフォームのホームページにて公開を致します。また、別途開催予定の成果報告会・シンポジウムや委託事業報告書作成時において、本報告書の内容についての発表や資料作成等のご協力をお願いする場合があります。

課題受付番号	PF19-01-R-022		
利用課題名	抗体医薬の高機能化に向けた NMR による抗体の構造解析		
実施機関名	自然科学研究機構		
実施部署名	生命創成探究センター		
実施責任者管理職名・氏名	職名	教授	氏名 加藤 晃一
実施部署所在地	愛知県岡崎市明大寺町字東山 5-1		
本課題の概要・目的 (字数制限はありませんが 400 字～600 字以内(程度)で お書きください。)	<p>モノクローナル抗体のヒト化、小型化をはじめとするタンパク質工学的な改変技術は新たな発想の抗体医薬の開発を促し、さらには修飾糖鎖の構造最適化も視野に入れた高機能化が進んでいる。さらなる抗体の構造研究を通じて、新規な機能を実装した抗体医薬の開発が加速されることが期待される。そこで本申請では、先端計測・計算的手法を駆使して、水溶液中におかれた抗体分子を対象にその 3 次元構造動態と相互作用の連関の仕組みを明らかにすることを旨とする。</p> <p>抗体分子の立体構造データの多くは、Fab あるいは Fc といったフラグメントを対象とするものである。それゆえ、分子内の遠位の部位の間の機能相関に関する構造情報は失われている。しかも、それらの構造データの大部分は結晶構造解析によってもたらされたものであるため、抗体分子の柔構造についての情報は極めて限定的である。これに対して申請者は、水溶液中における生体高分子の動的構造を原子レベルでもたらす核磁気共鳴(NMR)分光法を応用して、抗体の高次構造研究に長年にわたって取り組んできている。特に超高磁場 NMR を活用することによって Fc のフラグメントについて主鎖に由来する信号の帰属を達成し、これらをプローブとして構造研究を行う研究基盤を整えてきた。さらには、量子ビーム溶液散乱などの計測手法や分子動力学計算を基軸とする理論的アプローチを抗体の動的構造解析に応用した研究を展開している。こうした先端計測・計算的手法を駆使し、水溶液中におかれた抗体分子の 3 次元構造動態と相互作用の連関の仕組みを明らかにすることを旨とする。</p>		
利用実施時期、及び期間	2019 年 4 月 1 日～2021 年 3 月 31 日		
	総利用日数：27 日		
	<input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)		

<p>利用施設 理化学研究所</p>	<p>NMR装置 (該当部分に ○)</p>	<p>利用装置①</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、() 溶液 800MHz、 (○) 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz <p>利用期間 1 : 2020 年 9 月 23 日～2020 年 9 月 27 日 (5 日間) 利用期間 2 : 2021 年 3 月 8 日～2021 年 3 月 14 日 (7 日間)</p> <hr/> <p>利用装置②</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ () 溶液 600MHz、() 溶液 700MHz、(○) 溶液 800MHz、 () 溶液 900MHz、() 固体 700MHz、() 固体 900MHz <p>利用期間 1 : 2019 年 12 月 23 日～2020 年 1 月 6 日 (15 日間)</p>
<p>その他の 利用施設</p>	<p>※4 NMR 施設以外の装置、支援などを利用した場合は記載してください 大阪大学蛋白質研究所拠点事業 超高磁場 NMR 共同利用研究課題</p>	
<p>成果の 概要</p>	<p>実施内容 (字数制限はありませんが 400 字～800 字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>※申請書との整合性にご配慮ください。</p> <p>申請者はこれまで、動物細胞をはじめとする真核生物発現系を用いることにより、糖鎖修飾を受けた抗体に安定同位体標識を施す技術を開発してきた。この技術を応用して、これまでにヒトおよびマウス抗体の Fc 領域 (50kDa) について、主鎖に由来する NMR シグナルの帰属を達成している。こうした成果に基づいて、様々な摂動に対する抗体の高次構造の変化を追跡することが可能となっている。NMR 研究の対象をさらに高分子量の IgG (150kDa) に拡張するにあたっては、側鎖のメチル基をプローブとすることが極めて有効である。</p> <p>その目的に向けて、本研究では 900MHz 超高磁場 NMR 装置を利用して Fc 領域の信号帰属を側鎖信号に拡張することに取り組んだ。メチオニン、イソロイシン、ロイシン、バリン、アラニン残基に選択的に安定同位体標識を施した試料を調製し、超高磁場 NMR 計測に供した。メチオニン残基とアラニン残基についてメチル基に由来する信号をすべて観測し、帰属を確定した。バリン残基およびロイシン残基についてはメチル基を立体選択的に標識した試料を用いることで、帰属を効率的に進めることができた。</p> <p>本研究の成果は、抗体医薬の高機能化に向けた NMR アプローチの基盤を与えるものである。</p>

<p>本課題により得られた成果と当初目標との比較</p> <p>(字数制限はありませんが400字～800字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>アミノ酸選択的な安定同位体標識、とりわけ立体選択的なメチル基の¹³C標識と超高磁場NMR計測を組み合わせることにより、抗体をはじめとする高分子量糖タンパク質の溶液中における構造・動態・相互作用研究の新たな可能性を示すことができたことが本研究の大きな成果である。さらに、本研究の遂行の過程で、培養動物細胞に加えて昆虫等の生産基材を利用した抗体の安定同位体標識を開発することができた。これにより、血清等の生理的夾雑環境におかれた抗体のNMR研究も可能となった。また、量子ビーム溶液散乱、分子動力学シミュレーション、高速原子間力顕微鏡など、NMR分光法と相互補完的な抗体の構造研究法を開拓することもできた。こうした成果は、抗体のみならずバイオ医薬品として可能性を秘めた糖タンパク質一般に応用可能な技術基盤をもたらすものである。</p> <p>以上の点に鑑みて、研究は当初目標を越えた広がりをもって進展しているものと判断している。</p>
<p>成果発表</p>	<p>※本課題利用による論文・学会発表・特許(出願中含む)等で本事業に関連する謝辞を記載頂いた成果について、可能な範囲で記載して下さい。</p> <p>Hirokazu Yagi, Saeko Yanaka, Rina Yogo, Akari Ikeda, Masayoshi Onitsuka, Toshio Yamazaki, Tatsuya Kato, Enoch Y Park, Jun Yokoyama, and Koichi Kato Silkworm pupae function as efficient producers of recombinant glycoproteins with stable - isotope labeling Biomolecules 10, 1482 (2020).</p> <p>谷中冴子【物理系薬学部会奨励賞受賞】 抗体の3次元構造と相互作用のダイナミクスを解明する方法の開発と抗体の高機能化への展開 日本薬学会 第141年会 2021年3月27日【オンライン開催】; S06-2.</p> <p>與語理那, 谷中冴子, 矢木宏和, 加藤晃一 血清環境における抗体の分子間相互作用と機能の解明 日本薬学会 第141年会 2021年3月27日【オンライン開催】; 27V04-am11S.</p> <p>Saeko Yanaka, Rina Yogo, Hirokazu Yagi, and Koichi Kato Impacts of the N-glycan variation of antibodies on their dynamic structures of functional relevance 第58回 日本生物物理学会年会 2020年9月18日(オンライン開催); 3S-4-4.</p> <p>谷中冴子, 與語理那, 山崎俊夫, 宮ノ入洋平, 矢木宏和, 加藤晃一 抗体のNMR解析のための安定同位体標識法の開発と応用 第58回 NMR 討論会 2019年11月7日(川崎); P19.</p> <p>Saeko Yanaka, Rina Yogo, Hirokazu Yagi, and Koichi Kato Dynamic structures and interactions of antibodies under physiologically relevant conditions 第57回 日本生物物理学会年会 2019年9月24日(宮崎); 1SDP-5.</p> <p>谷中冴子, 與語理那, 矢木宏和, 伊藤暁, 奥村久士, 加藤晃一 Fcの構造ダイナミクスがFcγ受容体との相互作用に及ぼす影響の解明 日本薬学会第139年会 2019年3月23日(千葉); 23R-pm10.</p>

<p>今後の展開 (字数制限はありませんが300字～600字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>※特に、本課題により得られた NMR 技術を用いた応用について</p> <p>本研究を通じて、抗体のエフェクター機能の中核を担う Fc 領域を中心に NMR 信号の帰属を充実させることができた。今後は、本研究で確立した方法論を拡張し、糖鎖を含めて抗体の4次構造全域に動的構造解析のためのプローブを張り巡らせるとともに、帰属の確立したシグナルをプローブとして抗体の構造・ダイナミクス・相互作用の探査を推進する。特に、糖鎖の構造多形性を考慮した NMR 解析を系統的に推進する。さらに NMR 情報に基づいた計算科学・情報科学の統合的なアプローチを打ち立て、糖鎖とポリペプチドが一体となって抗体分子内に張り巡らされたアロステリックネットワークの全体像を把握する。また、次世代バイオ医薬品の品質評価などを視野に入れ、抗体の NMR 計測を汎用的に実施するための技術基盤と環境整備にも力を注ぐとともに、抗体以外の糖タンパク質にも研究対象を広げる。</p>
<p>社会・経済への波及効果の見通し (字数制限はありません 300字～600字以内(程度)でお書きください。)</p>	<p>抗体はバイオ医薬品の中核であり、その開発過程や製造工程において高次構造を評価することは極めて重要である。本研究の成果は、糖タンパク質としての抗体の溶液内における高次構造を原子レベルで評価する基盤を与えるものである。今後、糖タンパク質の安定同位体標識技術を高度化・低コスト化することにより、抗体以外の糖タンパク質バイオ医薬品の高次構造評価を溶液中あるいは血清などの生理的夾雑環境中において実施する道を切り開くことができる。一方、本研究を通じて開拓している抗体のメチル基の信号をプローブとするアプローチは、非標識の抗体を対象とした高次構造評価にも活かせるものと期待される。このように、本研究の成果は、糖鎖修飾の生物学的意義を探究する学理の深化をもたらすばかりでなく、抗体医薬をはじめ糖鎖修飾を伴う多くのバイオ医薬品の設計・創成・品質評価に資するものである。</p>
<p>利用における感想 (改善要望等を含む) 利用周辺環境に関する希望</p>	<p>※本施設を利用して良かった点、改善してほしい点、提案事項など、施設利用の感想を記載してください。なお複数機関の利用の場合は、どの施設に対する感想かも明記して下さい。</p> <p>理化学研究所の計測、解析における密な情報提供・支援体制により、研究の展開が加速され、効率的に成果発表まで至ることができ、大変感謝している。</p>
<p>今後の NMR 共用プラットフォームに対する期待</p>	
<p>成果公開延期の希望の有無</p>	<p>※特許取得等の理由により公開の延期を希望する場合は必ず事前に利用機関先の課題担当者にご相談ください。</p> <p>() あり : (O) なし</p> <p>「あり」の場合理由 :</p>
<p>その他</p>	<p>(上記の項目以外でご意見等お願いします。)</p>