

研究終了報告書

「光駆動型抗体を基盤とする革新的光操作技術の開発」

研究期間：2017 年 10 月～2021 年 3 月

研究者：河野 風雲

1. 研究のねらい

本研究は、細胞内外に存在する様々な生体分子に対して、光で自由自在にその機能をコントロールすることを容易にそして簡便に実現することができる、汎用性と実用性に極めて優れた革新的な光操作技術の創生を目標とした。これまで報告されてきた光操作技術では、植物や菌類由来の光受容体を基に、標的とする蛋白質に直接融合することでその蛋白質を制御する方法が用いられてきた。そのため分子設計や開発した技術の評価に多くの時間を費やす必要があり、その応用が限定的であった。また、標的とする蛋白質に直接融合することは、生きた細胞の中に元々存在する内在性の生体分子に対しては光操作することができないという技術的な限界があった。そこで本研究では、機能性抗体と呼ばれる抗原に結合するとその抗原の機能を阻害もしくは活性化させることが可能な抗体の一種に着目し、抗原抗体反応を光で制御することが可能な光駆動型の抗体を開発することで、標的とする生体分子を間接的に光操作する技術の創生を目指した。免疫グロブリン系抗体は可変領域フラグメントである重鎖可変領域(VH)ドメインと軽鎖可変領域(VL)ドメインから構成されているが、通常 VH ドメインと VL ドメインはアミノ酸残基側鎖間の非共有結合的な相互作用でヘテロ二量体を形成する。この VH ドメインと VL ドメイン間の相互作用を制御することによって抗体の抗原結合能を変化させる原理を創案した。光受容体とその結合パートナー蛋白質を VH ドメインと VL ドメインに遺伝子工学的に融合させ、光依存的に VH-VL ドメイン相互作用を誘導することによって、抗原結合能を変化させることが可能な光駆動型の抗体開発を行った。当該抗体を使い、内在性の蛋白質の活性を光で制御する概念実証実験を遂行することによって、本研究の目標とする革新的な光操作技術の創製を目指した。

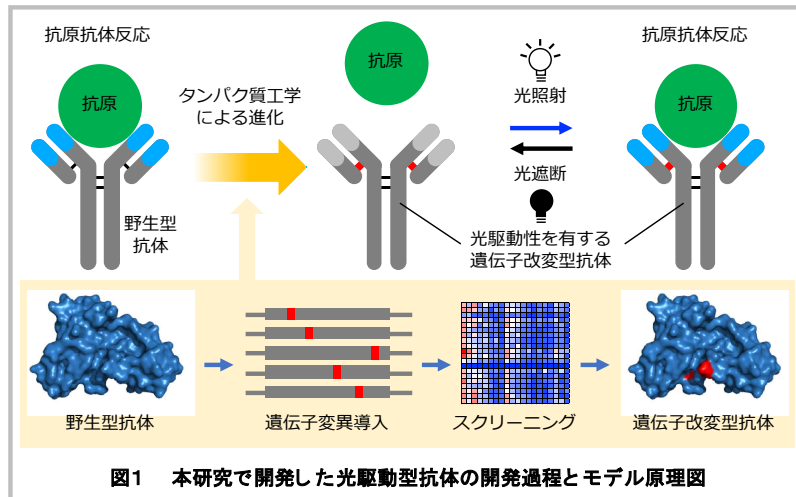
本研究では主に、光駆動型抗体の概念を実現するモデル探索研究、他抗体への応用可能性を示す汎用性実証研究、そして機能性抗体を使って内在性蛋白質の活性を光制御可能かどうか検証する概念実証研究の三段階に分けて遂行した。

2. 研究成果

(1) 概要

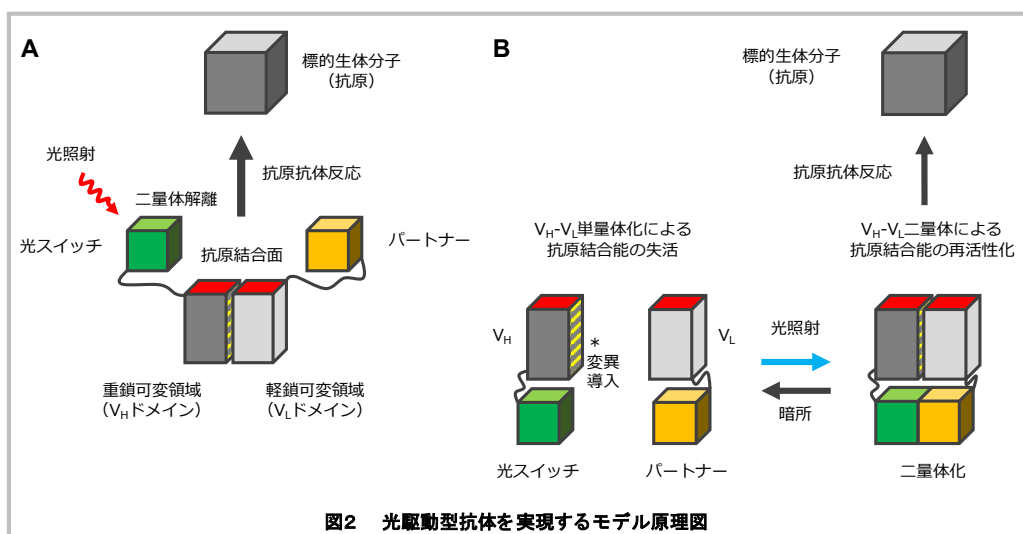
本研究では、生きた細胞の内外に存在する蛋白質や核酸、脂質などの生体分子を抗原と捉え、それら抗原の機能を阻害・活性化させることができる機能性抗体の抗原結合能を制御することで、生体分子の機能を光で自由自在に操作することが可能な技術の創生を目指した。そのためにまず、可変領域フラグメントである重鎖可変領域(VH)ドメインと軽鎖可変領域(VL)ドメインから構成される免疫グロブリン系抗体に着目した。通常 VH ドメインと VL ドメインはアミノ酸残基側鎖間の非共有結合的な相互作用でヘテロ二量体を形成する。抗体の結晶構造情報およびアミノ酸一次配列相同性を基にした検討によって、VH ドメインと VL ドメインの二量体界面に位置し、且つ多くの抗体間で高く保存されているアミノ酸残基部位を発見した(図 1)。このアミノ酸残基部位に変異を導入し、独自に構築した生物発光スクリーニング評価

システムと化合物二量体化システムを用いた機能性アミノ酸残基探索の結果、数百通りの組み合わせの中から、近接誘導依存的な抗原結合能の再回復が可能なアミノ酸残基対を発見した。そして、光受容体およびその結合パートナー蛋白質を様々検討し、当該改変型抗体の近接誘導に応用することで、光駆動性を有する光駆動型抗体の開発に成功した。さらに、独自に開発した新規光受容体システムを導入した結果、これまで数倍程度であった光誘導効率が、劇的に向上し数百倍の極めて高い誘導効率を有する光駆動型抗体の開発に成功した。本研究の成果は今後、他の抗体にも導入することで、細胞内外のあらゆる生体分子、特に細胞内の内在性蛋白質を光操作できる革新的光操作技術としての応用が期待される。



(2) 詳細

本研究は、細胞内外に存在する生体分子に対して、光で自由自在にその機能を制御することを容易に実現する、汎用性と実用性に極めて優れた革新的な光操作技術の創生を目標とした。具体的には、光受容体とその結合パートナー蛋白質の光依存的な二量体化・二量体乖離による抗体の抗原結合面を構造的に阻害する原理(モデル A) (図2A)、もしくは抗体の重鎖・軽鎖ドメインの相互作用を制御することによる抗原結合能の変化させる原理(モデルB) (図2B)に基づいて、抗体の抗原結合に対する結合活性を光で自由自在に制御することが可



能な光駆動型抗体を開発し、さらに当該ツールの汎用性と実用性の概念実証実験を行うことで、本研究の目標とする革新的な光操作技術の創製を目指した。したがって、本研究では主に、光駆動型抗体の概念を実現するモデル探索研究、他抗体への応用可能性を示す汎用性実証研究、そして機能性蛋白質を光操作可能かの実証研究の三段階に分けて遂行した。

研究テーマ1「光駆動型抗体モデル A の開発」

まず本研究では、GCN4蛋白質由来のエピトープに結合する GCN4抗体をモデルに、光受容体とその結合パートナー蛋白質の光依存的な二量体化・二量体乖離による抗体の抗原結合面を構造的に阻害する原理に基づくモデル A の開発を遂行した。結晶構造情報を基にした分子設計を行った結果、光受容体 AsLOV2 とその結合パートナー蛋白質である Zdk3 を使ったモデル A の開発を遂行した(図3)。本研究では、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の発現制御を用いた評価系を構築し、抗原抗体反応が起こると生物発光の多寡で評価を行った(図4A)。その結果、青色光照射を行った細胞群からは、暗所に維持された細胞群と比較して数倍高い生物発光値が検出され、光依存的に抗原抗体反応を制御することが可能な光駆動型抗体のプロトタイプの開発に成功した(図4B)。しかしながら、その差(ダイナミックレンジ)が小さいことや、暗所に維持した細胞群からもある程度の生物発光値が検出されたことから、AsLOV2 と Zdk3 の光依存的な乖離や暗所での相互作用をさらに強化する必要性が課題として残された。

モデル A は AsLOV2 と GCN4VH ドメインで構成される分子とパートナー蛋白質 Zdk3 と GCN4VL ドメインで構成される分子の二つの構成要素から成る。したがって、1)リンカーの長さの最適化、2)リンカーの種類の最適化、3)シングルコンポーネント、4)AsLOV2 のフォールディングを強化する変異導入等の観点から、モデル A の改良研究を遂行した。結果として、それぞれの観点から独立に行った改良研究では一定の改善効果を示したものの、全ての組み合わせによる評価では有効な効果を得ることができなかった。

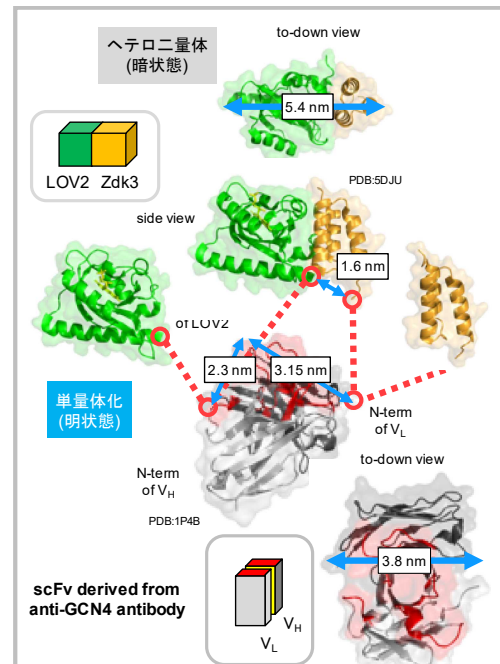


図3 光駆動型抗体モデルA開発のための光受容体とモデル抗体

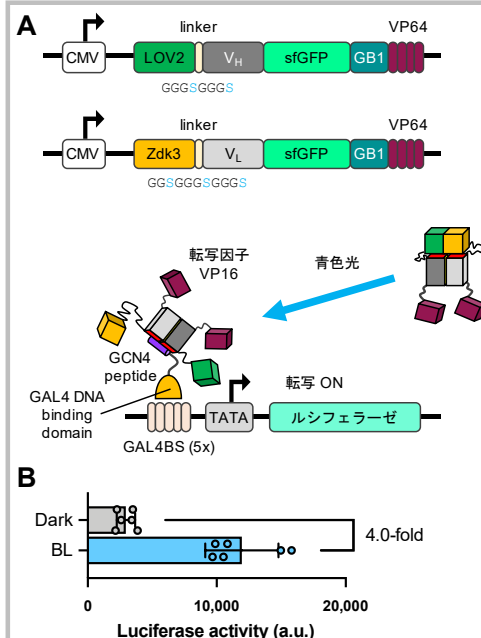


図4 生物発光を基にした抗原抗体反応評価系とモデルA開発の結果

本モデルは原理がシンプルであるが故に高い汎用性が期待される。今後、より機能が向上した光受容体を用いることで本モデルの実現を開発する予定である。

研究テーマ2「光駆動型抗体モデル B の開発」

本研究では次に、抗体の重鎖・軽鎖ドメインの相互作用を制御することによって抗原結合能を変化させる原理(モデル B)に基づいた光駆動型抗体の開発研究を遂行した。抗体の構造情報と一次配列情報から機能性部位の探索を行い(図5)、網羅的な変異導入による変異体探索を、生物発光システムを基にスクリーニングを行った結果、(1)抗体の重鎖ドメインと軽鎖ドメインの自己会合の機能を損失した変異体(アミノ酸残基)の発見と、その変異体の中から、(2)化合物二量体化システムを用いて、重鎖ドメインと軽鎖ドメインを近接させると抗原結合能を回復する変異体(アミノ酸残基)の組み合わせの発見をした(図6)。さらに、化合物二量体化システムを独自に開発した新規光受容体システムに置き換えた場合において、600 倍以上の光誘導効率を有することが明らかとなった(図7)。

本研究では、モデル A で実現できなかった高い光誘導効率を有する光駆動型抗体モデル B の開発に成功した。本モデルは、研究立案の段階で高い汎

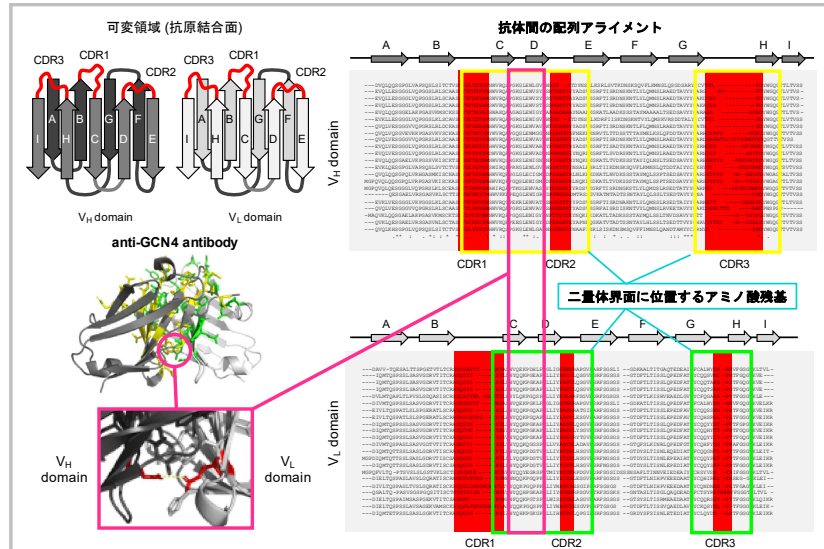


図5 VH-VLドメイン二量体界面に位置する変異導入箇所探索

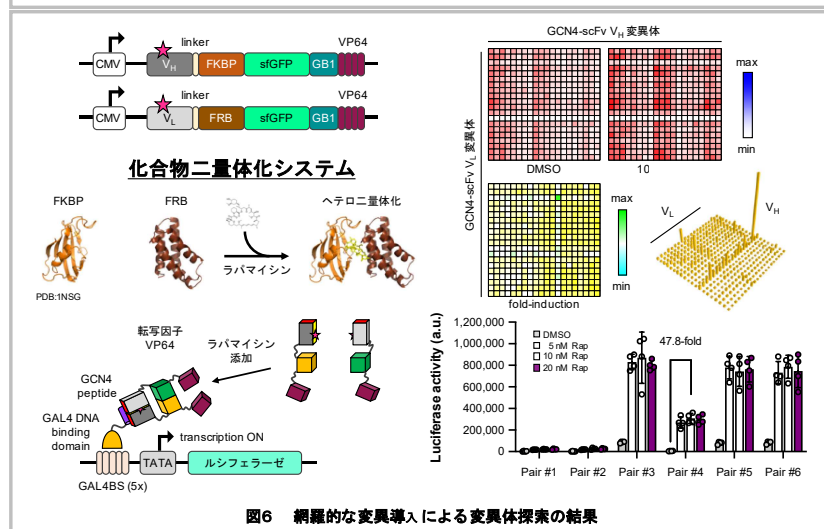


図6 網羅的な変異導入による変異体探索の結果

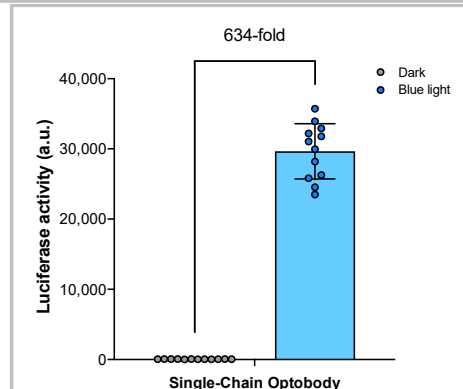


図7 高い誘導効率を有する光駆動型抗体モデルBの結果

用性の実現を見据えて、他の多くの抗体に応用できるように、抗体間で高く保存されたアミノ酸残基対を基に開発された。したがって、本研究の成果は、今後多くの抗体に応用され、従来の光操作技術で困難であった内在性分子を標的とする光操作の実現に大きく貢献することが期待される。

3. 今後の展開

本研究では免疫グロブリン系抗体を基にして VH ドメインと VL ドメイン間の二量体親和性を変化させる変異体探索と近接相補化再構成を実現する変異体対の発見によって、高い光誘導効率を実現する光駆動型抗体モデル B の開発に成功した。今後の研究展開として、本さきがけ研究期間中に完了できなかったいくつかの点において、引き続き研究を遂行する予定である。1) 発見した変異体対の一般性の検証。本研究では酵母由来の蛋白質である GCN4 のエピトープに結合する抗体を基に開発を遂行した。本技術の重要な点として、他の抗体に応用することが可能であるという一般性の実証である。そのため、HA 抗体や GFP 抗体、HisTag 抗体などを用いて一般性の検証を引き続き行う。2) 内在性蛋白質の機能制御。本研究では、抗原も同時に過剰発現させる評価系にて光駆動型抗体の機能性評価を行ってきた。本技術が高い光操作の効果を持つか否かを内在性蛋白質の発現レベルにおいて評価を行うことが、光操作技術の発展のために重要である。そのために、ヒト H-Ras に対する阻害抗体 Y13-259 を基に、内在性 H-Ras の活性制御を行い、内在性蛋白質での技術実証ならびに光遺伝学的がん治療法開発へと研究を展開する。3) 細胞内での安定的な発現。抗体は一般的に疎水的なアミノ酸残基が蛋白質表面に位置しているため、凝集体を形成しやすい傾向がある。近年、親水的なアミノ酸残基ペプチドをタグすることによって、抗体の凝集体形成を抑制する研究が報告されている。本研究で開発した光駆動型抗体においてもそうした親水性ペプチドをタグしているにも関わらず、細胞内で凝集しやすい傾向が確認された。恐らく、菌類に由来する光受容体の温度依存的な凝集体形成の性質に依存すると思われる。どの抗体においても細胞内で正しく機能する光駆動型抗体の基盤技術のために、光受容体のさらなる改変が必要である。

4. 自己評価

本研究は光駆動型抗体を基盤とする革新的光操作技術の開発である。抗体工学を光遺伝学と組み合わせた未知の研究領域において、研究者の河野は二量体界面に変異を導入することで抗原結合能を失活させ、近接誘導に伴って抗原結合能を再回復させるという独自のアイデアを創案し、独自に構築した評価系を基に開発を進めた結果、極めて高い効率を有する光駆動型抗体の基盤開発を実際に達成した点は高い評価に値すると考える。また、開発段階で得られた新しい光受容体システムの研究や、抗体を用いない光操作技術など、本研究で開発できた多くの技術は、光遺伝学研究領域への貢献のみならず、将来的に社会実装につながる萌芽的基盤技術であり、その点において高い評価に値すると考える。一方で、開発した光駆動型抗体の一般性の実証や、内在性蛋白質の光操作の実証の研究は研究期間内に遂行完了まで至らなかったことは、研究体制や研究の進め方、研究の見通しに反省すべき点があることを真摯に受け止め、次の研究に生かしたいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(学会発表) Fuun Kawano, Optogenetic control of intracellularly expressed functional antibodies, The 58th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, 17th September, 2020 (Zoom meeting, Online)