

抗体の NMR 分析

加藤晃一^{1, 2, 3}、西村真美子¹、長野真弓¹、山口芳樹^{1, 3}、高橋禮子^{1, 2, 3}

¹名古屋市立大学大学院薬学研究科生命分子構造学分野、²グライエンス、³CREST/JST
052-836-3447、kkato@phar.nagoya-cu.ac.jp

1. 緒言

創薬ターゲットとしてのタンパク質の立体構造データは、薬物の合理的設計の基盤となり、またバイオリグクスとしてのタンパク質の機能を向上させる指針を与えるものと期待されている。それゆえ、免疫グロブリンの構造生物学の研究成果は抗体医薬を開発し利用するうえでも極めて有用な情報となる。

演者は、大学院在学中より核磁気共鳴 (NMR) 法を利用した免疫グロブリン G (IgG) の構造生物学研究に取り組み、現在に至っている。これまでに、NMR を用いて、IgG による様々な抗原認識のメカニズム、IgG と種々の病原性細菌由来のタンパク質 (プロテイン A、プロテイン G など) およびリウマトイド因子との相互作用様式を研究してきた (図 1)。

本シンポジウムでは IgG の Fc 領域に結合している糖鎖に着目して、それらの構造とエフェクター機能の相関について構造生物学の観点から研究を展開してきた成果を報告するとともに、ポスト構造ゲノム科学の時代における NMR の可能性を議論したい。

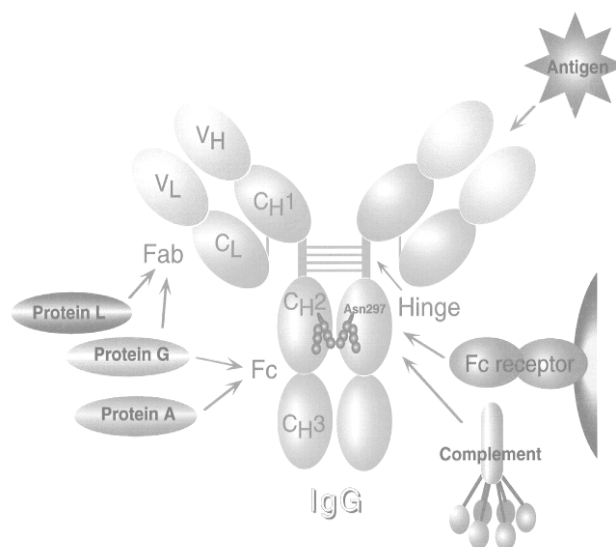


図 1. IgG の分子構造とそれを舞台とする分子間相互作用の模式図

2. IgG の糖鎖構造解析

IgG の Fc 領域には 2 本鎖複合型糖鎖 (図 2) が結合しているアスパラギン残基 (Asn297) が一対保存されている。これらの糖鎖は IgG と Fc γ レセプター (Fc γ R) や補体などのエフェクター分子との相互作用に大きな影響を与える。実際、Fc 結合糖鎖のフコース残基を取り除いただけで IgG による抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性が約

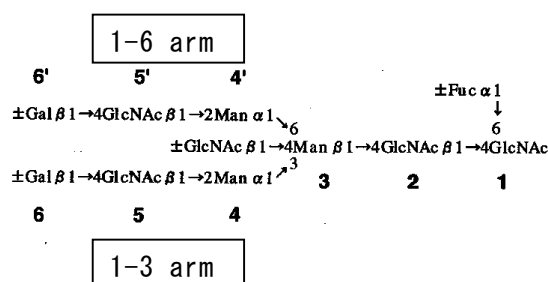


図 2. IgG の Fc に結合している糖鎖の構造

100 倍増強されることが報告されている。したがって、IgG の機能発現における糖鎖の役割を構造生物学の観点から解明することは、抗体医薬の開発においても重要である。しかしながら、一般に糖タンパク質は構造生物学研究の対象としては好まれない。それは主として以下の理由による。

①高次構造解析を行うためには、糖残基の配列・結合様式をあらかじめ決定しておく必要があるが、DNA やタンパク質に比べて糖鎖のシーケンスを決定することは簡便ではない。このことは、糖タンパク質医薬の開発や品質管理においても克服すべき課題となる。

②糖タンパク質に結合している糖鎖は完成度の異なる様々な構造が混在することによる微視的不均一性を示す。そのために糖タンパク質は結晶化が困難であり、仮に結晶が得られたとしても、その電子密度像の解釈には注意を要する。

私たちのグループが開発している多次元 HPLC 法（図 3）を用いれば異性体の識別も含めた糖鎖プロファイリングを簡便かつ定量的に容易に行うことが可能であり、①の問題は解決される。既に 500 種類に及ぶ N 型糖鎖の多次元 HPLC データベースを構築しており、WEB アプリケーション “GALAXY”（<http://www.glycoanalysis.info/>）として公開している。

IgG の糖鎖構造は生理的条件や病態に依存して変動することが知られている。例えば、慢性関節リウマチやウェゲナー肉芽腫症などの自己免疫疾患においては非還元末端にガラクトース残基（Gal）をもたない糖鎖の割合が有意に増大するが、多次元 HPLC 法を用いることにより、このような病態における IgG の糖鎖プロファイリングを容易に行うことができる（図 4）。この方法を用いて、これまでに様々な細胞を宿主として発現した抗体の糖鎖構造データが蓄積しており、抗体医薬の糖鎖プロファイリングにおいて有用性を発揮するものと期待される。さらに、私たちはエレクトロスプレーイオン化質量スペクトルにより、Fc に結合している一対の糖鎖の組み合わせに関する定量的情報を得ることに成功している。

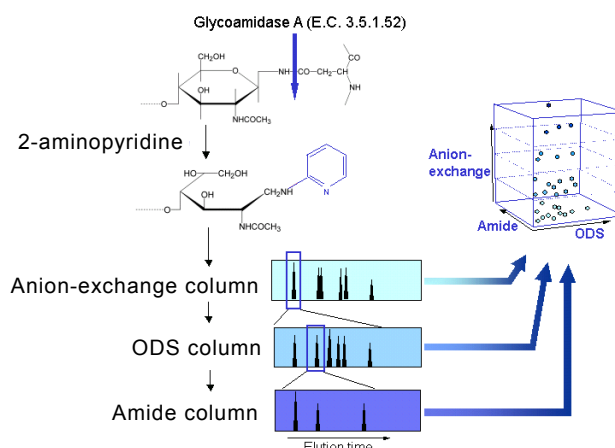


図 3. 多次元 HPLC 法による糖鎖プロファイリングのスキーム

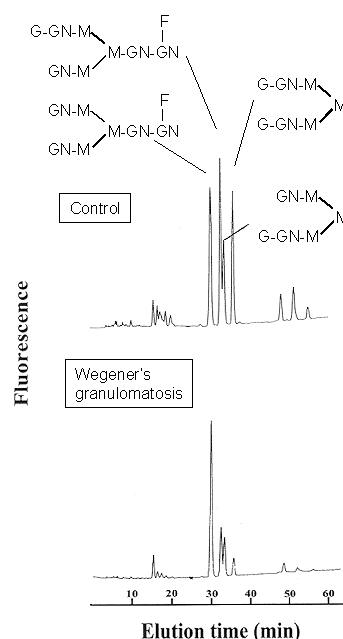


図 4. 健常人（上）およびウェゲナー肉芽腫症患者（下）の血清 IgG の糖鎖プロファイル

3. Fc の NMR 構造生物学

NMR は結晶化の必要が無く、溶液状態においてタンパク質の高次構造とその動態に関する情報を原子レベルの分解能で提供することができる。この方法は糖タンパク質溶液のような不均一系にも応用可能であるが、NMR の有用性を十分に引き出すためには ^{13}C や ^{15}N などの安定同位体で標識した試料を利用して計測を行う必要がある。私たちは動物細胞の糖鎖合成経路を利用する代謝標識法と、*in vitro* における糖転移酵素反応を利用する安定同位体標識法を組み合わせ、Fc の糖鎖に安定同位体を導入する方法論を確立した (図 5)。

In vitro の酵素反応を利用してアノメリック炭素を ^{13}C 標識したガラクトースを糖鎖の非還元末端に導入した Fc の ^{13}C NMR スペクトルを図 6 に示す。このスペクトル中には 2 本のアームの各末端に結合している Gal のアノメリック位に由来するシグナルが観測されているが、興味深いことに 1-6 アームの Gal のシグナルは 1-3 アームのそれと比べて線幅が著しく広幅化している。このことは 1-6 アームの Gal は 1-3 アームの Gal よりも運動性が低いことを意味する。1-6 アームの Gal は CH_2 ドメインの内壁と密なコンタクトをしており、このために運動性が抑えられていると考えられる。Dwek らはこの点に着目し、Gal を欠落した糖鎖はポリペプチド鎖との相互作用が弱まるために分子の表面に露出し、これがマンナン結合レクチンと相互作用することによって慢性関節リウマチにおける炎症が引き起こされるというモデルを提唱している。しかしながら、代謝標識によって糖鎖の GlcNAc、Fuc、Man の各残基のアノメリック炭素に ^{13}C を標識した Fc を用いて観測された ^1H - ^{13}C HSQC スペクトルは、Gal の欠落によって大きな変化を示すことはなく (図 7)、このことから Dwek らが提唱したような Gal の欠落に伴う糖鎖のフリップアウトは起こっていないことが明らかとなった。したがって、自己免疫疾患における IgG のグリコフォームの変動の意義については今後慎重に検討する必要がある。

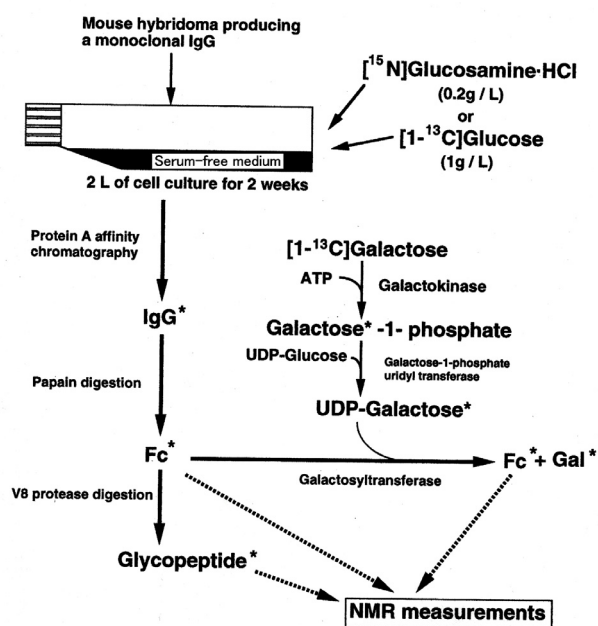


図 5. Fc 結合糖鎖の安定同位体標識のスキーム

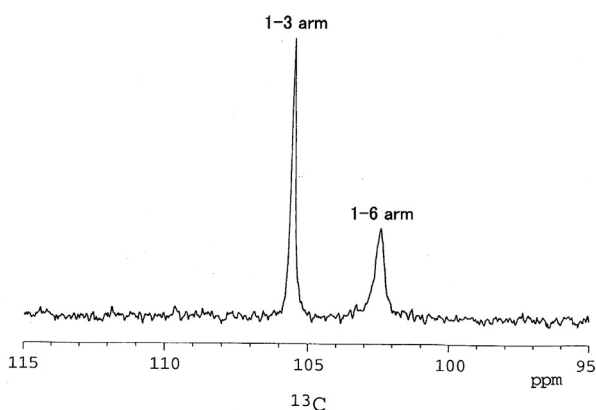


図 6. Gal のアノメリック炭素を ^{13}C 標識した Fc の ^{13}C NMR スペクトル

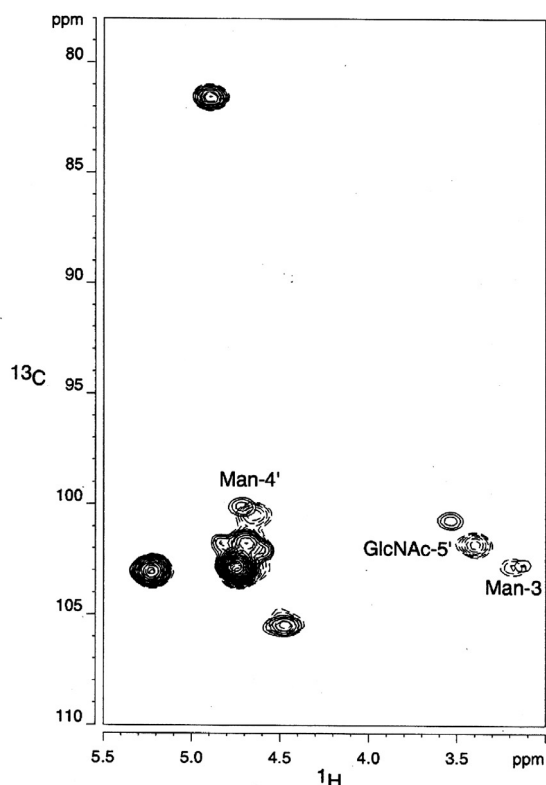


図7. 糖残基のアノメリック炭素を ^{13}C 標識したFcの ^1H - ^{13}C HSQC スペクトル。実線はGalが付加したFc、点線はGalが欠落したFcのスペクトルを表す。

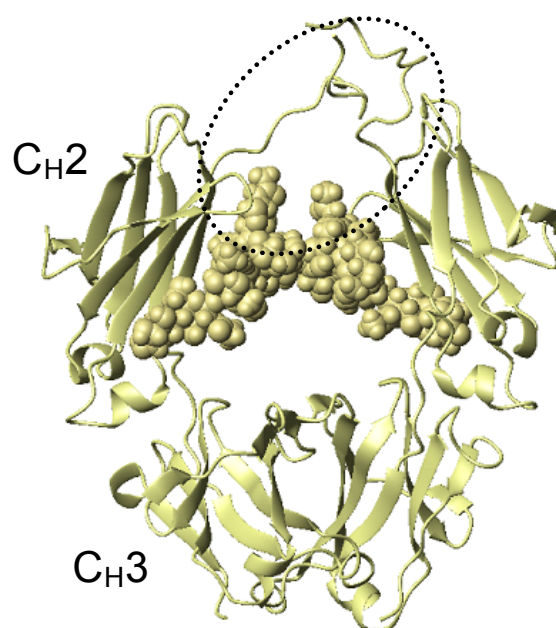


図8. NMRを用いて同定したFc上のFcγR結合部位（点線の楕円内）

私たちはFcの糖鎖の短鎖化がFcγR結合に及ぼす影響を高次構造の観点から明らかにするために、アミノ酸残基に安定同位体標識を施したFcに各種のグリコシダーゼ処理を施してNMR測定を行い、糖鎖を非還元末端側から逐次除去していった際のFcの高次構造変化を原子レベルで追跡した。その結果、非還元末端側のGalおよびGlcNAcを除去した段階ではFcの高次構造変化は除去した糖残基周辺の局所にとどまるが、エンドグリコシダーゼDを用いて糖鎖を還元末端側の2糖（Fuc-GlcNAc）にまで短鎖化すると、糖鎖から遠位のFcγR結合部位（図8）にまで高次構造変化が伝播することが明らかとなった。特に、FcγR結合サイトを構成しているヒンジ下流領域は、少なくとも2通りのコンフォメーションをとっているが、エンドグリコシダーゼD処理に伴ってこうしたコンフォメーションの多形性は消失し、それに伴ってFcγRに対する親和性が顕著に低下することが判明した。すなわち、Fcに結合している糖鎖は、FcγR結合サイトの多形性をも含めた適切な動的な高次構造の構築に寄与していることが示された。

4. 結語

NMR構造生物学がもたらす原子レベルの構造情報に基づいて、糖鎖工学・タンパク質工学的な抗体分子の改変を施すことにより、テーラーメイド医療を視野に入れたより高機能性の抗体医薬の開発が期待される。また、多次元HPLC法や糖鎖ライブラリーを技術基盤とする大学発ベンチャー企業も既に活動を開始している。抗体医薬が一層の成長を遂げていくためには、産官学の緊密な連携が今後ますます要求されるであろう。

謝辞

本シンポジウムで発表する研究成果の一部は協和発酵工業（株）東京研究所の内田和久博士、設楽研也博士との共同研究を通じて得られたものです。

関連文献

1. K.Kato *et al.*: Structural basis of the interaction between IgG and Fcγ receptors
J. Mol. Biol. **295**, 213-224 (2000)
2. K.Kato *et al.*: A conformational change in the Fc precludes the binding of two Fcγ receptor molecules to one IgG
Immunology Today, **21**, 310-312 (2000)
3. K.Masuda *et al.*: Pairing of oligosaccharides in the Fc region of immunoglobulin G
FEBS Lett. **473**, 349-357 (2000)
4. 加藤晃一: NMR法による免疫グロブリンとFcレセプターの相互作用の構造生物学的研究
薬学雑誌, **121**, 345-354 (2001)
- 5 M.Holland *et al.*: Hypogalactosylation of serum IgG in patients with ANCA-associated systemic vasculitis
Clin. Exp. Immunol. **129**, 183-190 (2002)
6. 山口芳樹、加藤晃一: 免疫系糖タンパク質の構造生物学
生化学, **74**, 43-46 (2002)
- 7.N.Takahashi: N-Glycosylation profile of recombinant human soluble Fcγ receptor III
Glycobiology **12**, 507-515 (2002)
8. 山口芳樹、加藤晃一: 安定同位体利用NMRによる糖鎖構造解析
蛋白質 核酸 酵素, **48**, 1184-1189 (2003)
9. N.Takahashi and K.Kato: GALAXY (Glycoanalysis by the three axes of MS and chromatography): a Web application that assists structural analyses of N-glycans
Trends Glycosci. Glycotech., **15**, 235-251 (2003)
10. 高橋禮子、栗本英治、山口芳樹、加藤晃一: 多次元HPLC法のグライコミクス解析への展開
蛋白質 核酸 酵素, **48**, 1412-1418 (2003)
11. 加藤晃一、山口芳樹: 免疫系レセプターの分子認識の構造的基盤
臨床免疫, **40**, 472-476 (2003)
12. Yagi *et al.*: Temperature-dependent isologous Fab-Fab interaction that mediates cryocrystallization of a monoclonal immunoglobulin G
Mol. Immunol. **41**, 1211-1215 (2004)
13. Kato *et al.*: Discrimination of isomeric fragment ions observed in tandem mass spectra of biantennary oligosaccharides by use of selective isotope labeling
J. Mass Spectrom. Soc. Japan **52**, 284-288 (2004)