Antigen claspによる抗ヒストン翻訳後修飾抗体の高特異性創出機構

服部峰充 東北大学大学院工学研究科

1. はじめに

抗体は、その高い分子認識能から、医薬や診断薬、研究試薬などに利用されている。抗体構造中において、抗原結合断片 (Fab) が抗原認識を担う領域であり (図 1a)¹⁾, Fab は抗原結合部位を介して抗原と 1:1 で結合することが、抗体-抗原相互作用の基本原則として広く理解されている。

我々は、エピジェネティクス分野で問題となっている市販抗体の低特異性・低再現性を根本的に解決するため、ヒストンの翻訳後修飾部位に特異的な**組換え抗体**の作製に取り組み、それに成功した^{2), 3)}。驚くべきことに、単離した抗体は、2つの抗原結合部位で1つの抗原を認識していた³⁾。本稿では、我々が「antigen clasp」と名付けた抗体の新しい抗原認識機構について紹介する。

2. ヒストン翻訳後修飾部位に特異的な組換え抗体の作製

ヒストンタンパク質は、多くのアミノ酸残基が翻訳後修飾を受け、その一つ一つが、遺伝子の転写等をエピジェネティックに制御している。ヒストン翻訳後修飾部位に特異的な抗体は、クロマチン免疫沈降 (ChIP) や免疫染色などに用いられるが、市販抗体の多くがポリクローナル抗体であり、その特異性や親和性の低さ、ロット間での結合特性の違いが大きな問題となっている²⁾⁻⁶⁾。ヒストン翻訳後修飾部位が抗体にとって困難な標的である原因として以下の3つが考えられる。1) 翻訳後修飾基の類似性 (例: リジン残基のトリメチル化とジメチル化)、2) 修飾箇所周囲の配列類似性 (例: ヒストン H3 の Lys9 周辺配列 (-ARKST-) と Lys27 周辺配列 (-ARKSA-))、そして3) 翻訳後修飾領域の柔軟性に起因する**結合時の配座エントロピーの減少**である。

これら抗体の問題を本質的に解決するため、我々は、ヒストン翻訳後修飾部位特異的な**組換え抗体**を作製する手法を開発した²⁾。進化分子工学を駆使する本

図 1 抗原結合部位の二量体化による抗原認識。(a) 抗体の模式図。(b) 抗 H3K9me3 抗体 (309M3-B) のペプチド免疫沈降アッセイによる結合評価。(c) 309M3-B Fab と H3K9me3 ペプチドの複合体結晶構造 (左) と模式図 (右)。模式図では、2つの結合ポケットがペプチドの N 末端とトリメチル化リジンを認識している様子を示す。図は文献 3 より改変して転載。

手法では、動物免疫法では困難な抗体の結合機能向上が可能であり、高特異性・高親和性を持つ抗体を作製できる。さらに作製した抗体は組換え抗体であるため、ロット間で結合特性がほぼ変わらない。

我々は、ヒストン H3 のトリメチル化 Lys9 (H3K9me3) 及びトリメチル化 Lys4 (H3K4me3) それぞれに対する抗体を新たに単離した。これらの抗体は、メチル基の違いや配列類似性を区別する高い特異性と平衡解離定数 (K_D 値) が約 2-11 nM という高い親和性を示した (図 1b)。さらに ChIP-シーケンシング法やウエスタンブロット法において、作製した抗体を用いることで高い感度で標的抗原を検出することができ、これらの抗体の有用性が証明された。

3. Head-to-head 型ホモ二量体形成による抗原認識

ヒストン翻訳後修飾部位は抗体にとって困難な標的であるにもかかわらず、作製した抗体は如何にして優

れた抗原認識能を生み出しているのだろうか？我々は、X線結晶構造解析と物理化学的解析により抗体の分子認識機構の解明を試みた。X線結晶構造解析の結果、予期せぬことに、抗H3K9me3抗体及び抗H3K4me3抗体の両方において、2つのFabの抗原結合部位がペプチドを両側から挟み込んでhead-to-head型ホモ二量体を形成していた³⁾ (図1c)。サイズ排除クロマトグラフィーや動的光散乱法による分子量解析、及びペプチド免疫沈降アッセイ⁵⁾による結合解析の結果、これらの抗体は、抗原ペプチド存在下でのみ二量体を形成し、2つの抗原結合部位が協同的に作用してペプチドを認識していた。

一般的にペプチドや低分子に結合する抗体は、抗原結合部位が溝を形成し、その溝を利用して低分子と結合する。一方、我々の抗体は溝を持たず、抗原結合部位1つあたりの抗原接触表面積は小さいが、2つ利用することでそれを倍増させ、見かけ上、高い親和性を生み出していた。

4. | Antigen claspungによる特異性創出メカニズム

抗体-ペプチド間の相互作用に注目すると、単離した抗H3K9me3抗体及び抗H3K4me3抗体の両方において、共通する2つの結合ポケットが見つかった。一つは、トリメチル化リジンを取り囲む芳香族アミノ酸残基より形成されるアロマティックケージ、もう一つは、ペプチドのN末端配列(NH₂-Ala-Arg)を認識するA1R2結合ポケットであった。興味深いことに、これら2つの相互作用は、別々の抗体(Fab1及びFab2)により形成され、ペプチドが2つのFabを架橋する形になっていた(図1c)。

さらに抗体-ペプチド間の相互作用の他に、抗体間でも相互作用していることが判明した。抗体のみでは二量体を形成しないことから、抗体間の相互作用は強くはないが、変異体解析よりペプチドを介した二量体形成に必須であることがわかった。特筆すべきことに、抗体間の相互作用に関与しているアミノ酸残基は、抗H3K9me3抗体と抗H3K4me3抗体の間で異なっており、抗体間相互作用がFab1とFab2の配置を調節していた(図2a)。以上のことから、作製した抗体は、H3K9me3とH3K4me3各ペプチドにおけるN末端とトリメチル化リジンの距離の違いを利用し、それぞれに対応する結合ポケットの配置を二量体化により調整することで、高い特異性を創出していた(図2b)。以上のように、作製した抗体は、抗原であるペプチドを新しいメカニズムで高特異的に認識することが明らかとなった。我々はこの新しい機構を、2つの抗原結合

図2

抗H3K9me3抗体(309M3-B, 紫色)と抗H3K4me3抗体(304M3-B, 灰色)のFab1を基点とした重ね合わせ(a)とアロマティックケージを基点とした重ね合わせ(b)。マゼンタで示した枠は、A1R2結合ポケットを示す。H3K4me3ペプチドにおけるAla1, Arg2, トリメチル化リジンを橙色, H3K9me3ペプチドにおけるそれぞれを黄色で示す。図は文献3より改変して転載。

部位で抗原を挟み込むことから「antigen claspung」と名付けた³⁾。

5. | おわりに

我々は、抗体の抗原結合部位が、従来の1:1ではなく2:1で抗原を認識する新しい抗原認識機構を発見した。Antigen claspungは、これまでの抗体-抗原相互作用の概念を拡張するのみならず、ペプチドや低分子化合物など難しい標的に対して高い特異性を示す抗体を設計するうえで役立つと期待される。

謝 辞

本研究は、シカゴ大学にて小出昌平教授と共同で行われたものです。この場を借りて深く感謝します。

文 献

- Porter, R. R. (1958) *Nature* **182**, 670-671. DOI: 10.1038/182670a0.
- Hattori, T. *et al.* (2013) *Nat. Methods* **10**, 992-995. DOI: 10.1038/nmeth.2605.
- Hattori, T. *et al.* (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **113**, 2092-2097. DOI: 10.1073/pnas.1522691113.
- Egelhofer, T. A. *et al.* (2011) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 91-93. DOI: 10.1038/nsmb.1972.
- Nishikori, S. *et al.* (2012) *J. Mol. Biol.* **424**, 391-399. DOI: 10.1016/j.jmb.2012.09.022.
- Rothbart, S. B. *et al.* (2015) *Mol. Cell* **59**, 502-511. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.06.022.

服部峰充

服部峰充 (はっとり たかみつ)

東北大学大学院工学研究科特任助教
2010年東北大学にて博士号(工学)を取得後、シカゴ大学博士研究員を経て、15年より現職。
研究内容: 抗体を中心としたタンパク質工学
連絡先: 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字
青葉 6-6-11-608

E-mail: thattori@prn.che.tohoku.ac.jp