蛋白質研究基盤の確立とその薬学分野への応用

井本 泰治

Foundation of the Bases for Protein Research and Its Application
to the Pharmaceutical Science Field

Taiji IMOTO

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Maidashi 3-1-1
Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

(Received April 18, 2002)

This paper reviews the results of basic research conducted by the author's group to determine appropriate methods to develop protein-based drugs. These include production strategies, elucidation of physiologic function, improving existing pharmaceuticals, de novo design, and protein reconstruction. The antigenicity of modified proteins and methods to induce antigenic protein tolerance are also described.

Key words——antigenicity; fluctuation; folding; lysozyme; protein; stability; tolerance

はじめに

著者の研究室で長年行ってきた、蛋白質工学と構造生物学を中心とした蛋白質研究の基盤確立と、より良い蛋白質医薬品を創り出すための基礎を築くための努力について紹介する。我々は独自に分子グラフィックス、X線解析、NMR測定ができる恵まれた環境でこの研究を推し進めてきた。

特に断らない限り、ニワトリリゾチームを研究材料に用いた。

1. 蛋白質の大量生産

まずは大量に蛋白質を生産する事が、蛋白質を研究するためにも、また利用するためにも重要である。大量生産系としては大腸菌の系が最も適している。我々は1985年から遺伝子工学をスタートした。それまではプライマーを1本合成してもらうのに50万円もかかっていた。この頃からやっとDNA合成機が市販され始め、我々でも遺伝子工学を研究に取り込むことができるようになった。当時pKK223-3が市販されている唯一の発現ベクターで、これではリゾチームはほとんど発現できなかった。

そこで発現ベクターの開発から行った。pUC9系のプラスミドが温度感受的にプラスミドコピー数を格段に増加させる事を利用して、これの複製起点oriをpKK223-3に導入してpKP1500という高度発現ベクターを構築し1987年に報告した。¹⁾発現量は抜群で、これは世界中に100ヵ所以上発送した。

大腸菌の系は取り扱いが簡単な事、培養時間が短い事、発現量が多い事など、メリットは多いが、大きなデメリットとして外来性蛋白質はほとんどが変性蛋白質の封入体として発現され、これを活性な形に巻き戻すのが至難の技である。この点をクリアしないと大腸菌の系を大量発現系として利用する事ができない。

我々が開発した変性蛋白質を効率的にフォールドさせる方法を紹介する。変性蛋白質は疎水残基が外に出ており、アグリゲーションを起こしやすく、そこで蛋白質の巻き戻しはアグリゲーションとの戦いである。一般に用いられる方法が無限大希釈巻き戻し法である。ある場合にはこれで効率よく巻き戻せるが、大量には処理はできない。そこで、高濃度での巻き戻し法を開発すべく努力した。

アグリゲーションを防ぐために、可溶化剤を検討し、尿素が有効な事にたどり着いた。尿素は優秀な疎水性物質溶解剤であり、また濃度により蛋白質変

九州大学大学院薬学研究院 (〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1)

*本総説は、平成14年度日本薬学会学術貢献賞の受賞を記念して記述したものである。

Fig. 1. Native-Denatured Equilibrium of Lysozyme under Red-ox Condition²⁾

性をコントロールできる。巻き戻し条件下でのネイティブ(N)と変性(D)の平衡曲線を Fig. 1 に示した。²⁾ 尿素濃度を低下させる事で平衡を未変性側へずらして行くことができる。ある程度未変性蛋白質が生成する点で多少の尿素が存在するのでアグリゲーションは抑えられる。このカーブの上を滑り降りて行かせればアグリゲーションを抑えながら巻き戻しが完成する。

この現象を簡便に実現する方法として、透析法を開発した (Fig. 2)。蛋白質を 8M 尿素中で還元後 8M 尿素酸化還元系とし、透析バッグに入れて、8M 尿素酸化還元液に対して透析を開始する。透析外液を尿素を含まない酸化還元液で徐々に薄めていく。かくして 5 mg/ml という高濃度で 80% 以上の高収率で巻き戻せた。²⁾ ちなみに無限大希釈法では 1/250 の濃度でもこれに及ばない。

リゾチームだからうまく行ったという非難があってはならない。そこで、4 本のペプチド鎖からなり、分子間・分子内に SS 結合を持ち、分子シャペロンの助けなしには試験管内では巻き戻せないといわれている IgG の巻き戻しに挑戦した (Fig. 3)。ここでは抗リゾチームモノクローナル抗体を用いて完全に還元し、無限大希釈法で巻き戻したがたしかに巻き戻らなかった (Fig. 3 三角)。分子シャペロンの Protein disulfide isomerase (PDI) を用いてもほとんど巻き戻らなかった。しかしながら先の透析法では能率良く巻き戻り、驚いた事に高濃度程よく巻き戻った (Fig. 3 丸)。³⁾ このことは、これらの会合体蛋白質では安定な蛋白分子の形成には会合する

Fig. 2. Equipment for the Slow Dialysis Folding Method²⁾

Fig. 3. Folding of IgG (Anti-Lysozyme Monoclonal Antibody)³⁾

事が必要で、そのためにはより高濃度が要求される事を示している。一方アグリゲーションを抑えるためには低濃度が要求される。このディレンマのために従来の巻き戻し法では巻き戻しは不可能であった。ところが本法では高濃度で巻き戻す事ができるのでこの問題が解決されたのである。本法は高濃度蛋白質の巻き戻しを可能とし、会合体蛋白質の巻き戻しでは特に効果を示す事がわかった。³⁾

当然本法は大腸菌に作らせた封入体の巻き戻しにも効果を示した。最近動物細胞を用いる系はバイオハザードの問題で大腸菌の系が見直されており、尿素は安価な試薬で、本法は工業的な利用にも応用でき、大腸菌の発現系をぐんと有用なものとした。

酵母は活性蛋白質を分泌してくれるので非常に効果的である。我々もいろいろと発現系を工夫したが、収率の点で必ずしも満足に行くものではない。せいぜい 5 mg/l 止まりであった。

最近 *Pichia* 酵母を用いた大量発現系が開発され、効果を示している。これについても我々は種々の検討を行った。*Pichia* の場合は染色体 DNA への

相同組み込みであり、他の発現系のようなプラスミドへの組み込みと異なって複数の組み替え産物ができる。そこで *Pichia* で最も大切な事は、多くの組換え体の中から最も発現量の多いものを選択する事である。溶菌班を利用したスクリーニングで我々は 100 mg/l 以上のリゾチームを発現する変換体を得た。このような変換体は NMR 測定のための重原子置換をするための最小培地で培養しても 20 mg/l のリゾチームを発現し、これは NMR 測定に十分な量である。⁴⁾ この結果 NMR の研究を強力に推し進める事ができるようになった。最近ではカナマイシンでスクリーニングする簡便な方法が開発されている。

2. 生理機能の詳細な解析

蛋白質が得られるとつぎはその生理機能の詳細な検討ができる。そこで私のライフワークの 1 つであるリゾチームの反応機構の詳細な解析に取り掛った。リゾチームの反応機構については既に 1966 年に Sir D.C. Phillips により基質複合体の X 線解析の結果から次のようなものが提案された。⁵⁾ 触媒基は Glu35 と Asp52 であり、まず、基質 N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) の 6 量体が活性クレフト A-F にぴったりと結合する。切断部位である D と E の糖が触媒基の近傍に固定され、その際に D 糖に歪みがある。Glu35 はそのプロトンで切断を受けるグリコシドボンドの酸素に水素結合を作る。このプロトンがこの酸素に渡される事で、切断が起こり、D 糖にカルボニウムイオン中間体が生成する。このプラスイオンの生成はそばにある Asp52 のマイナスイオンにより安定化される。一方、先ほどの歪みはここで生成するカルボニウムイオンを安定化する。C1 が sp³ から sp² になるためにここが平面構造をとる必要がある。このように遷移状態が安定化される事によりスムーズに反応が進行する。ここで水がはいって加水分解が完了する。これをカルボニウムイオン中間体機構と呼ぶ。最近 Nature に Asp52 がグリコシル結合を作る、グリコシル中間体を経る機構が提案されたが、⁶⁾ 私は以下に述べる理由からリゾチームの反応機構はやはりカルボニウムイオン中間体機構が主体であると考えている。

Glu35 の方はプロトンドナーのクリティカル残基なので Ala に変えることでほぼ完全に失活する。⁷⁾ 一方、Asp52 のほうは生成するプラスチャージをそばで安定化するだけならこの残基を修飾して

Fig. 4. pH-Dependences of Activity of Lysozyme Derivatives

もそれほどクリティカルに活性が落ちないはずである。(GlcNAc)₆を用いた正確な活性の測定で、確かに、Asp52 は Ala や Ser に変換しても 1/400 くらい活性が残った。⁸⁾ グリコシル中間体機構では Asp52 はクリティカルなニュクレオフィルで活性が残るはずはない。このように活性がかなり変動した場合には構造を確認することがぜひ必要であり、この場合いずれにおいても構造はほとんど変化がないことを確認した。我々はほとんどの変異体について X 線解析による構造確認を行っている。

Figure 4 に示すように、活性の pH 依存性で見ても、ネイティブではプロトンを持った形で関与する Glu35 の pK と負電荷で関与する Asp52 の pK が見えている。一方、Asp52 を Ser に変えたものでは活性が 1/400 に落ちるとともに、Glu35 の pK は見えているが Asp52 の pK は見えなくなっている。そばで生成する正電荷を安定化するだけなら近くにありさえすれば位置はそれほど問題にならないはずである。そこで Asp52 を Ser に変えて負電荷をつぶし、近くにある Asn46 を Asp に変えて負電荷の位置を変換した。すると、Asp46 による pK がちゃんと現れ、ネイティブの 1/50 の活性が現れた (Fig. 4) (投稿準備中)。活性が多少低下したのは負電荷の位置が Asp52 に比べて多少遠くなることによる。このように、Asp52 はマイナスの雰囲気を与えることで反応に寄与していることが証明された。Asp46 では Asp52 とは、かなり攻撃位置も変化しており、ヌクレオフィリックな攻撃は無理と思われる。かくしてカルボニウムイオン中間体機構が再確認された。

Fig. 5. Fluctuation of Main-Chain Nitrogens in Lysozyme Determined by ^{15}N Relaxation⁹⁾

Fluctuation is increased (yellow) or decreased (blue) by forming $(\text{GluNAc})_3$ -complex. A: Native lysozyme, B: Residues 14,15 deleted lysozyme.

そのほかに、生理機能の詳細な解析結果として、基質の結合で蛋白質構造の揺らぎがむしろ増加するという驚くべき結果を見出した。これは一様 ^{15}N 標識蛋白質の NMR による緩和解析結果から得られた。⁹⁾ Figure 5A で青は複合体の形成で揺らぎが減少した領域で、黄色がそれが増加した領域である。複合体形成で遊離酵素より揺らぎが増加した領域が多くなっている。後ほど述べるように、この現象は活性が増加した変異体でより顕著であり、活性発現と関連していることが伺える。ニワトリリゾチームに限らずヒトリゾチーム、¹⁰⁾ マウスリゾチームさらにはリボヌクレアーゼ類でもこの現象を確認した。これは複合体形成による不利なエントロピーロスを補うために蛋白質の構造の一部の揺らぎを激しくするのではないと思われる。蛋白質の生理現象の発現にはある種の揺らぎが重要である事を実験的に示した結果である。

今1つ、蛋白質の生理機能の発現に揺らぎが大切であることを示す結果が得られた。研究の発端は、生育温度の異なる菌からの酵素、ここでは 3-phosphoglycerate kinase がそれぞれの生育温度に最適温度を示すが、それぞれがほぼ同等の比活性を示すという報告を見たことである (Fig. 6).¹¹⁾ 一般に酵素の活性の温度依存性の立ち上がりは、触媒基の活性化エネルギーの温度依存性、一方高温側の減少は変性によると考えられている。もしそうであるなら、これらの酵素は似た活性基を触媒に使ってお

Fig. 6. Temperature-Activity Profiles for Enzymes with Different Stabilities

り、活性化エネルギーに依存する立ち上がりは等しく、酵素の安定性に応じて Fig. 6 の点線のような温度依存性を示すはずである。しかし実情はそうではない。そこで私はこの活性の立ち上がりは触媒基の活性化エネルギーのみによるのではなく、むしろ酵素がその機能を発揮するために必要な揺らぎが実現できるための温度依存性を示していると考えた。安定になった酵素は活性を示すに十分な揺らぎを実現するためには高い温度が必要で、高い温度で立ち上がり、高温で変性する。そのバランスとして比活性は適当に保たれる。このことは大切なことで、あまり高い比活性は生命現象維持にむしろ好ましくな

い。進化の課程でこれくらいの比活性に保つためにも、安定性と活性発現にこのような相関があることは必要なことである。低温酵素の場合は逆に、酵素は不安定で、低い温度で機能発現に必要な揺らぎが実現でき、低い温度で立ち上がり、早く失活する。このような活性の平行移動が実現するのは活性に関係ある方向での安定化・不安定化が起こった場合である。活性に関係の無い方向での安定化が起こったときは、活性発現に必要な揺らぎは影響されないの、立ち上がりは変わらず、変性のみが遅くなって、平行移動は起こらず点線のようなになる。一方、活性に関係ない方向で不安定化されると、立ち上がりは変わらず変性が早く起こる。

この考えを証明するために、種々に安定性を変動させたリゾチームの活性の温度依存性を測定した (Fig. 7).¹²⁾ 1—15 の間に架橋を入れて安定化した場合と、His15 をカルボキシメチル化して静電相互作用の増加で安定化した場合には活性に関係ない方向での安定化が起こった。一方、Gly104 でニックを入れた場合は不安定化し、これは活性に関係ない方向での不安定化が起こった。唯一、活性に関係ある方向での不安定化が起こった例として、Arg14 と His15 を欠失させた変異体で多少活性の平行移動が起こった。これはリゾチームによく似た構造をもつ α ラクトアルブミンに似せて作った変異体である。この変異体では多少不安定化し、そのため活性に必要な揺らぎが低温で実現でき、不安定化のためにはやく変性する。Figure 7 の挿入図に示すように 40 °C での活性の増減がこのシフトの指標になる。

Figure 8 にこの変異体の X 線解析結果を黄色で示し、ワイルドのブルーと重ねあわせた。ほとんど構造変化は起こっていない。欠失の起こった 14, 15 部位は活性クレフトの後ろ側にあたり、ここに空間ができることが、より低温で活性に必要な揺らぎを実現するのに役立っているものと思われる。ちなみに、残基 15 を種々に変換すると、そのサイズを小さくして隙間を作るに従って 40 °C での活性が上昇し、低温側に活性の発現がシフトすることが分かった (Fig. 9)。14, 15 欠失はマイナスのサイズに一致する。¹²⁾

次いでこの変異体では揺らぎがこの温度領域で増加したことを示す。条件をできるだけ合わせて結晶化し、1.75 Å の高分解で X 線解析したネイティブ

Fig. 7. Temperature - Activity Profiles for Lysozyme Derivatives¹²⁾

Native (closed circle), 1—15 cross-linked (open square), His15 carboxymethyl (open triangle), 104 nicked (closed triangle) and residue 14, 15 deleted (closed square).

と 14,15 欠失変異体の温度因子 B ファクターが欠失体のほうが大きく遊離酵素で欠失体の方が揺らぎが大きいことを示している (Fig. 10).¹³⁾

トリプトファンインドール窒素の H-D 交換速度も測定可能であった 4 つの側鎖で比較したところ、多少欠失体で大きくなり、特に活性部位にある Trp63 はネイティブに比べてかなり速いことも分かった。¹²⁾

さらに先ほどの ¹⁵N 緩和測定の結果、基質複合体で遊離酵素より揺らぎが大きくなる部分も、ネイティブより欠失体でより広範に及ぶことも分かった (Fig. 5B).⁹⁾

かくして、蛋白質の生理機能の発現には揺らぎが大切なこと、複合体の形成で揺らぎが増大することなど、蛋白質の生理機能発現と蛋白質構造の揺らぎに関する重要な知見が得られた。このように蛋白質が得られると蛋白質の生理機能の詳細な解析ができる。これは蛋白質を薬として用いるためにも、また蛋白質を基盤に薬を開発するためにも重要な研究である。

3. 蛋白質の性質の向上

いっそ蛋白質工学的に蛋白質を作るなら、より性質が向上した蛋白質を作るべきである。より結合力や活性の上ったものなどいろいろな性質の向上が

Fig. 8. 3D Structure of Wild Type and Residue 14, 15 Deleted Lysozyme
Residue 14, 15 deleted lysozyme (yellow) was superimposed on wild type lysozyme (blue).

Fig. 9. Volume Dependence on Activity for the His15 Mutants¹²⁾

各々の蛋白質について考えられる。この分野ではランダム変異や、シャッフリングなどおおいに進展がある。

普遍的な性質の向上法として安定化がある。蛋白質の安定化は重要な問題で蛋白質工学の格好の研究テーマであり、我々もかなり幅広く研究を進めてき

Fig. 10. Plots of B Factor for Main-Chain Atoms of Each Residue in Free Enzymes¹³⁾

たが、紙面の都合であり詳しくは紹介できない。安定化の研究成果については蛋白質の安定化に関する筆者の総説¹⁴⁾を参照ください。

一般に平衡論的（熱力学的）安定化がなされる。安定化すると、蛋白質は使いやすくなり、特に高温で使えるようになると高い活性を取り出すことができる。一般に蛋白質は非常に不安定に作られており、容易に安定化できる。多くの研究がなされており、我々も種々の検討を行ってきた。

一例だけ、化学修飾により架橋を施して安定化した珍しい例で説明する。2 価性の架橋剤で Lys1 と His15 の間を架橋すると変性転移温度が 5 度上がる。一方、ヨードによる酸化反応で、Glu35 と Trp108 の間にエステル結合架橋を施すことができる。この結果リゾチームは 14 度も安定になる。この架橋を同時に入れると、20 度も安定なリゾチームが得られた。¹⁵⁾ このように安定化はある場合には加算的に重ね合わせることができ、いくらでも安定にできる。

我々はこのような平衡的すなわち、熱力学的安定化と共に、速度論的安定化の重要性について強調してきた。プロテアーゼ消化などの変性状態に共役した不可逆変性の場合には、プロテアーゼ濃度がある程度高くなると、変性蛋白質は直ちに分解され、変性蛋白質が生成してくる速度が律速となる。このような場合、平衡的な安定化より、変性蛋白質が生成し難いように速度論的に安定化する事が必要となる。すなわち、変性速度を小さくするような安定化が必要となる。この安定化は特に薬学領域での薬としての蛋白質の利用で大切である。我々はこの速度論的な安定化の方法論についても種々検討した。その方法論は先の総説に述べたが、¹⁴⁾ プロテアーゼ消化に対して安定になるようにチェックしながら安定化することが簡便な速度論的な安定化法である。

一方、得体の知れない変性として、長期使用、長期保存中に起こる蛋白質の劣化に対する安定化について研究した。これは薬としての蛋白質の保存に対して重要である。100 度に保つことで長期保存を短時間でシミュレートできる。蛋白質の劣化は、デアミデーション、アミノ酸残基のラセミ化や異性化、ペプチド結合の切断、SS 結合の切断や掛け違いなどの、種々の化学反応が蓄積してその蛋白質が活性構造を保てなくなり、変性するために失活する事で起こることを突き止めた。¹⁶⁾

これに対する対応策についても種々検討した。化学反応が起こらないように、緩衝液を選択する。広く使われているリン酸緩衝液もあまりよくない。pH を微酸性に保つことも大切である。¹⁷⁾ 今 1 つは、蛋白質を安定化することで劣化を抑えることができる。SS 結合を 1 本切って不安定化すると劣化は早くなり、架橋を入れて安定化すると劣化は抑えられる。化学反応は一般に変性状態で起こり、安定

化で変性状態の確率が減ることで化学反応が抑えられる。一方、より多くの化学反応を受けても蛋白質は安定化により活性構造を保つことができる。かくして安定化は二重に劣化を抑えることになる。

このように、同じ安定化と言ってもそれぞれの目的に応じた方策を施す必要がある。

4. 新規機能性蛋白質の創製

蛋白質工学の最終目標は目的の機能性蛋白質をデザインして創製する事である。我々は今や最終構造をもくろんで一次構造をデザインする事は可能となった。しかしながら、現実には、その蛋白質をフォールドさせる事ができずアグリゲーションしてしまう。これはいつに我々がフォルディングの情報を持ち合わせていないからである。この情報の収集なしに蛋白質の *de novo* デザインはありえない。天然の蛋白質はひとりでに巻き上がり、そのように進化してきた。そこで天然の蛋白質はフォルディングの情報を持っている。我々はこれを読み出すべくリゾチームで種々の研究を推し進めている。

ランダム変異体からフォルディングできないものを選び出し検討したり、リゾチームの 59 から 105 のフラグメントがそれ自体でフォールドできることを見出し、¹⁸⁾ このフラグメントでフォルディングを検討している。理由は、小さい方が研究しやすいこと。蛋白質は頑強にできていて別のルートで強引に巻き上がるのでフォルディングのファインな情報を取り出すのはフラグメントのほうが都合がよいからである。これらの研究の行程で、Trp62 がフォルディングに大きな影響を持つことが浮き彫りになってきた。Trp62 酸化リゾチームが還元再生でネイティブとは多少異なる構造に帰結する。¹⁹⁾ Trp62Gly 変異リゾチームの再生にネイティブにないタイムラグが生じる (投稿準備中)。さらにペプチドフラグメントの実験で Trp62 を切り取ることでそれまでうまくいっていた SS 結合の生成に掛け違いが起こるようになる。¹⁸⁾ ネイティブ構造では外に飛び出している Trp62 がどうしてこれほどフォルディングにクリティカルであるのか理解できなかった。

最近ドイツの Schwalbe 博士との共同研究でこの答えが見つかった。²⁰⁾ NMR の緩和実験からリゾチームは SS 結合を切断した変性状態でいくつかの領域でクラスターを作っているように見えていた (Fig. 11B)。ところが Trp62 たった 1 残基を Gly に

Fig. 11. Comparison of ^{15}N Transverse Relaxation Rates R_2 in Hen Lysozyme²⁰⁾
S-Methylated lysozymes at pH 2. Wild type lysozyme in 8M urea (A) and 0M urea (B). Trp62Gly mutant in 0M urea (C).

変換した変異体でこのクラスターが一気に消失する
という驚くべき事実を見出した (Fig. 11C). この
ことはこれらのクラスターがいくつかの領域ででき
ているのではなく実は1つの大きなクラスターを形
成しており, Trp62 がそのコア残基として変性構
造形成に関与していたことがわかった. このように
フォルディングの研究で変性構造を知ることの重要
性が明確になった. それと共に変性構造は最近と
みに問題となっているコンフォーメーションアル
ディーズの解明にも必要な情報である.

5. 蛋白質の機能変換

フォルディング情報の解読にはいまだ少し時間がか
かりそうな事, 次に述べる抗原性の問題等を考慮し
て, 既存の蛋白質, 特にヒト型蛋白質を土台に改変
により目的の機能を持つ蛋白質を創り出す事も現
段階では, 必要な逃げ道かと思われる. 既存の蛋白質
には巻き戻しの情報が組み込まれていること. ヒト
型の蛋白質であれば抗原性が軽減されることが期待
されるからである. そこで, 既存蛋白質の再構築の
基盤を築くことが必要となる.

その手始めとして, リゾチームの反応機構をカル
ボニウムイオン中間体機構からグリコシル結合中
間体機構へと反応機構の変換を試みた. 生成するカル
ボニウムイオンの近傍で負電荷を提供して安定化し
ている Asp52 を Glu に変換して, カルボキシル基
をもっと反応点に近づけるとグリコシル中間体が生
成することが期待される. 確かに安定なグリコシル
中間体が生成し, X 線で検出することができた.²¹⁾
しかしこれは安定過ぎてターンオーバーが非常に悪
いことがわかった. このことからリゾチームには

グリコシル中間体を能率的にターンオーバーする機
構は組み込まれていない. これを分解する触媒基と
して近傍の Asn46 を Asp に変換すると, ある程度
ターンオーバーするようになる.²²⁾ Asp52 を Ser に
変換した後, Asn46 を Glu として基質に近づけると,
確かにグリコシル中間体は生成するがこれは無
理な構造のためそれほど安定でなく, 適当にター
ンオーバーする. このようにすることで, ネイティブ
リゾチームの正常な反応の 1/10 位の活性が出る.
かくしてリゾチームの反応機構をカルボニウムイ
オン中間体機構から, グリコシル中間体機構へと変
換する事ができた.

6. 抗原性と免疫寛容

蛋白質工学的手法による蛋白質修飾の方法を述べ
てきた. ヒトの蛋白質を土台とすれば抗原性も多少
軽減されるのではないかなという便法の話もして
きたが, やはり薬として蛋白質を使う場合は抗原
性の問題は気になるところである. そこで自己蛋白質
にどれほどの変異を入れれば抗原となるのかを検
討した.

外来抗原であるニワトリリゾチームと自己蛋白質
であるマウスリゾチームの間のホモロジーは 57%
とかなり差が有る. BALB/c マウスを用いた場合,
当然外来性抗原であるニワトリリゾチームに対して
は抗体ができる. 自己蛋白質のマウスリゾチームに
対しては抗体は生産されないが, マウスリゾチーム
にたった 3 残基の変異 (Ala114Asn/His115Arg/
Gln117Lys) を入れてニワトリリゾチームに近づけ
た場合, 自己蛋白質が抗原となることがわかつた.
²³⁾ さらに, B10.A マウスでは Phe57Leu の 1 残

基変異でマウスリゾチームに対する抗体が生産された。²⁴⁾ かくして例えば1残基変異であっても自己蛋白質が抗原となり得ることが証明された。新規にデザインした蛋白質は当然抗原であり、例えばマイナーな修飾でも抗原となり得る可能性が示された。さらに、ヒトそのものの蛋白質でも医薬として処方すると抗原性が出ることも見出されている。このような状況で、蛋白質に抗原性を失わせること、すなわち免疫寛容を与える方策を見出すことはとてつもなく重要なことである。

そこで最後に免疫寛容の話に入る。ここからは抗原としてニワトリリゾチームを用いる。まずは、蛋白質を安定にすることで試験管内T細胞刺激を抑制できることを証明した。²⁵⁾ リゾチーム特異的なモノクローナルT細胞ハイブリドーマの刺激がリゾチーム誘導体の安定性と相関している。不安定な誘導体ほどT細胞刺激を容易に行い、安定なものは刺激能が低い。

ついで、安定化の方法として、ポリエチレングリコール修飾を用いた (Fig. 12)。未修飾リゾチームでは十分に抗体が生産される処理で、PEG修飾リゾチームでは全く抗体生産が起こらなかった。その上、引き続き未修飾リゾチームを投与しても全く抗体生産は見られなかった。PEG修飾リゾチームがリゾチームに対する免疫寛容を引き起こしたことになる。²⁶⁾

以後用いた免疫寛容の程度を見るプロトコールは次のようなものである。寛容源で処理後寛容誘導7日間、ついで、ネイティブニワトリリゾチームとフロイントの完全アジュバントで強く免疫し9日間免疫惹起した後、T細胞応答と血清抗体応答を測定した。PEG修飾リゾチーム処理した場合は、ニワトリリゾチームで強く免疫をかけたにもかかわらず、ニワトリリゾチームで刺激されるT細胞の増殖も少なく、ニワトリリゾチームに対する抗体もほとんど生産されない。免疫寛容を引き起こすための最適PEG修飾率を調べたところ大体蛋白分子量の1.5—2倍量のPEG修飾が最適であることがわかった。²⁷⁾

ついで、免疫寛容が起こる原因について検討した。抗原の血中残存量が関係することがわかった。²⁸⁾ 未修飾リゾチームが1日で検出限界以下に低下するのに比べて、PEG修飾リゾチームでは、28日間も残存する (Fig. 13A)。7日目に、それぞれ

Fig. 12. Inhibition of Anti-Lysozyme Antibody Production by Pretreatment with PEG-Lysozyme
Injection: 100 micro gram/mouse.

Fig. 13. Blood Clearance Profiles for Lysozyme Derivatives²⁸⁾

A: Native lysozyme (closed triangle) and PEG-lysozyme (closed circle); 1mg/mouse. B: Native lysozyme 10 mg/mouse/day (closed triangle).

のT細胞増殖と抗体価を測定した。未修飾リゾチームに比べPEG修飾リゾチームではほぼ完全に免疫反応は抑えられている。PEG修飾リゾチームの場合も、その血中濃度が低下する28日以降には免疫寛容現象がとかれてくる。しかもこの後、再度PEG修飾リゾチームで刺激すると寛容が誘導される。かくして、抗原の血中残存が免疫寛容の原因になっていることが伺えた。

それなら、未修飾リゾチームでも血中に残存するように大量に打ち続けると寛容が起こるのかを調べた (Fig. 13B)。10 mg/dayも打ち続けると血中濃度は維持され、7日目で測定すると免疫寛容現象が明らかに成立していた。

蛋白質を安定にして、血中濃度を長期間あるレベルに保たせるとその蛋白質に対して免疫寛容が成立する可能性を示すことができた。このことは蛋白質

の医薬としての利用に対して無限の可能性を示すものである。

おわりに

以上が、我々が蛋白質研究の基盤を築き、よりよい蛋白質医薬品を創製するために行ってきた努力の概要である。

謝辞 この研究を遂行するに当たり多くの方々のご尽力を得ました。厚くお礼申し上げます。東大の嶋田一夫先生にはNMRのご指導はもとより、多くの局面で大変お世話になりました。九大の三木健良先生には遺伝子工学の導入に関して、またX線解析の導入に関しては、名大の山根隆先生、京大の畑安雄先生にお世話になりました。NMRに関しては富山医薬大の河野敬一先生、生物工学研究所の桶真一先生、九大の神田大輔先生にご指導を受けました。この研究は九大免疫薬品学研究室のスタッフ、学生の絶え間ない努力の賜物であると深く感謝いたします。

REFERENCES

- Miki T., Yasukochi T., Nagatani H., Furuno M., Orita T., Yamada H., Imoto T., Horiuchi T., *Protein Eng.*, **1**, 327–332 (1987).
- Maeda Y., Koga H., Yamada H., Ueda T., Imoto T., *Protein Eng.*, **8**, 201–205 (1995).
- Maeda Y., Ueda T., Imoto T., *Protein Eng.*, **9**, 95–100 (1996).
- Mine S., Ueda T., Hashimoto Y., Tanaka Y., Imoto T., *FEBS Lett.*, **488**, 33–37 (1999).
- Phillips D. C., *Sci. Amer.*, **215**, 78–90 (1966).
- Vocadlo D. J., Davies G. J., Laine R., Withers S. G., *Nature.*, **412**, 835–838 (2001).
- Inoue M., Yamada H., Hashimoto Y., Yasukochi T., Hamaguchi K., Miki T., Horiuchi T., Imoto T., *Biochemistry*, **31**, 8816–8821 (1992).
- Hashimoto Y., Yamada K., Motoshima H., Omura T., Yamada H., Yasukochi T., Miki T., Ueda T., Imoto T., *J. Biochem.*, **119**, 145–150 (1996).
- Mine S., Tate S., Ueda T., Kainosho M., Imoto T., *J. Mol. Biol.*, **286**, 1547–1565 (1999).
- Mine S., Ueda T., Hashimoto Y., Imoto T., *Protein Science*, **9**, 1669–1684 (2000).
- Varley P. G., Pain R. H., *J. Mol. Biol.*, **220**, 531–538 (1991).
- Imoto T., Ueda T., Tamura T., Isakari Y., Abe Y., Inoue M., Miki T., Kawano K., Yamada H., *Protein Eng.*, **7**, 743–748 (1994).
- Ohmura T., Motoshima H., Ueda T., Imoto T., *J. Biochem.* in press (2002).
- Imoto T., *Cell. Mol. Life Sci. (Experientia)*, **53**, 215–223 (1997).
- Ueda T., Masumoto K., Ishibashi R., So T., Imoto T., *Protein Eng.*, **13**, 193–196 (2000).
- Tomizawa H., Yamada H., Imoto T., *Biochemistry*, **33**, 13032–13037 (1994).
- Tomizawa H., Yamada H., Wada K., Imoto T., *J. Biochem.*, **117**, 635–640 (1995).
- Ueda T., Ohkuri T., Imoto T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **228**, 203–208 (1996).
- Ueda T., Abe Y., Ohkuri T., Kawano K., Terada Y., Imoto T., *Biochemistry*, **34**, 16178–16185 (1995).
- Kline-Seetharaman J., Oikawa M., Grimshaw S. B., Wirmer J., Duchardt E., Ueda T., Imoto T., Smith L. J., Dobson C. M., Schwalbe H., *Science*, **295**, 1719–1722 (2002).
- Kuroki R., Ito Y., Kato Y., Imoto T., *J. Biol. Chem.*, **272**, 19976–19981 (1997).
- Ito Y., Kuroki R., Ogata Y., Hashimoto Y., Sugimura K., Imoto T., *Protein Eng.*, **12**, 327–331 (1999).
- Tsujihata Y., So T., Chijiwa Y., Hashimoto Y., Hirata M., Ueda T., Imoto T., *J. Immunol.*, **165**, 3605–3611 (2000).
- Tsujihata Y., So T., Hashimoto Y., Ueda T., Imoto T., *Mol. Immunol.*, **38**, 375–381 (2001).
- So T., Ito H.-O., Koga T., Watanabe S., Ueda T., Imoto T., *J. Biol. Chem.*, **272**, 32136–32140 (1997).
- Ito H.-O., So T., Hirata M., Koga T., Ueda T., Imoto T., *Immunology*, **93**, 200–207 (1998).
- So T., Ito H.-O., Tsujihata Y., Hirata M., Ueda T., Imoto T., *Protein Eng.*, **12**, 701–705 (1999).
- So T., Ito H.-O., Hirata T., Ueda T., Imoto T., *Cell. Mol. Life Sci. (Experientia)*, **55**, 1187–1194 (1999).