

## 研究課題別評価書

### 1. 研究課題名

計算機による特異的抗体設計法の確立

### 2. 氏名

星野 忠次

### 3. 研究のねらい

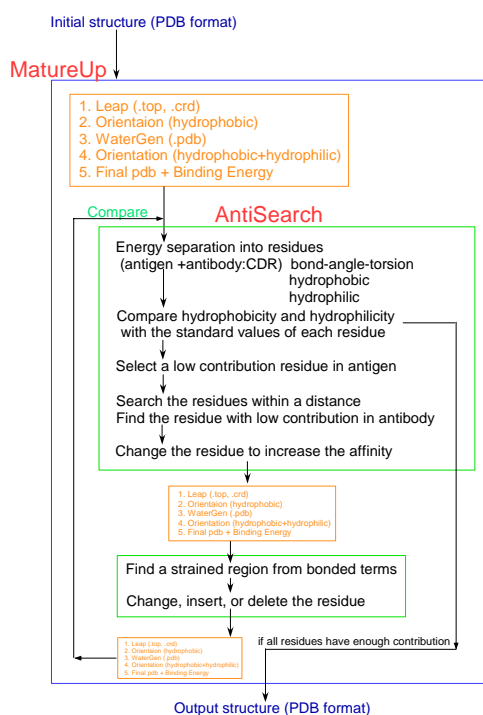
免疫は、生体が自身の恒常性を維持するため、自己と非自己を識別し、非自己を排除する機構として定義される。免疫機構の根幹である「自己と非自己を識別する」という過程は、生体内では抗原抗体認識により実現され、免疫グロブリンというタンパク質が深く関与している。グロブリン分子のみで、1000 万種以上の抗原を認識識別することができる。免疫機能は、本来、ヒトに備わっている働きであり、免疫を応用した治療法には、大きな期待が寄せられている。例えば、多くの抗がん剤は、重篤な副作用を持つ場合が多い。ところが免疫グロブリン（抗体分子）をがん治療へ応用すれば、がん細胞の抗原に結合する抗体を作成して、がん細胞を攻撃したり、その抗体に抗がん剤をつけて、がん細胞だけを集中的に攻撃することが可能である。抗体医薬では、特異的にがん細胞のみを見分けることのできる抗体が作成できるか否かが、成功の鍵を握っている。通常、医療用の抗体は、ヒト以外の生物の体内で、抗原抗体反応を利用して作成されている。しかし、用いた生物が、有効な抗体を産生できる保証は無い。そこで抗体として適合する分子を、コンピューターを駆使して人為的に設計作成することができれば、免疫療法の飛躍的な発展につながる。本研究では、生体分子の分子間相互作用を算出できるプログラムを構築し、これに立脚して抗体設計ができるソフトウェアを開発する。

### 4. 研究成果①

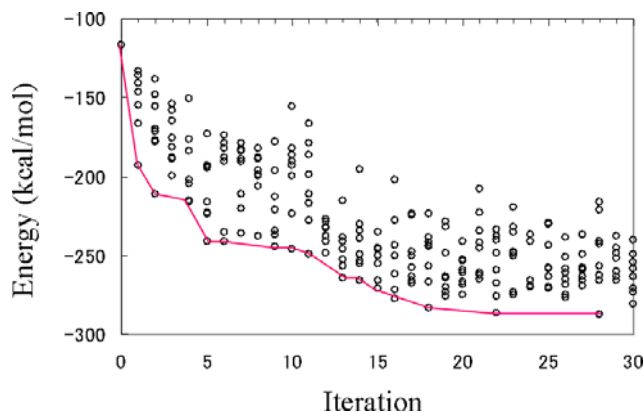
生体内では、非自己タンパク質（抗原）の部分構造に対し、これに適合し結合する抗体分子が選択され、増幅・産生されて免疫機能が発揮される。従って、多量の抗体候補と抗原とのマッチングを試みて、適合する抗体分子を選び出す仕組みが、生体には存在している。本研究の目的は、抗体機能の本質を理解し、適合分子の決定を、マウスなどの生物体に頼らず、コンピューターを駆使して人為的に行うことである。本研究では、ある抗原に関して遺伝子配列などの情報が提示されたならば、この抗原を認識するための最適な抗体の形状とそれを構築するアミノ酸配列情報を与える計算技術の開発を行った。この技術により、特定の疾患を抗体作用により治療する場合に、適切な抗体が確実に設計できる。本研究においては3つの研究項目を設定し、研究を遂行した。

#### A. 計算技術と薬効評価理論の構築

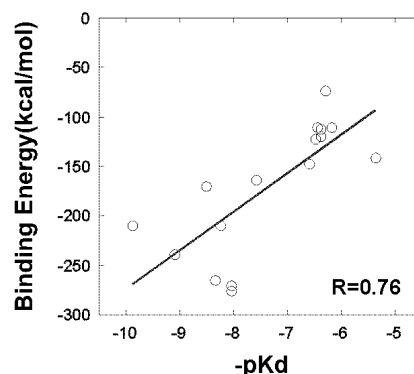
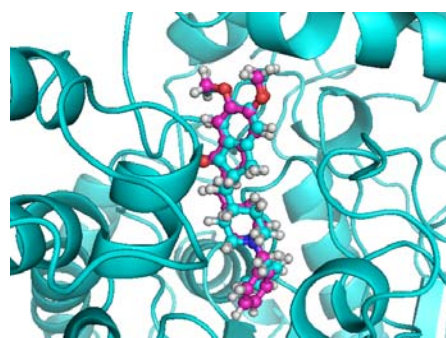
本項目では、計算機を活用して、高親和性抗体を信頼性高く設計できる技術を開発した。具体的には、抗原分子の標的部位が与えられた時に、試行的な抗体分子から出発して、順次アミノ酸変異を加えて行き、各段階での抗体作用の優劣を数値として評価する。右図に高親和性抗体設計ソフトウェアのアルゴリズムを示す。MatureUp というPythonプログラムにより、全体の動作を管理する。初めに標的抗原と適当な初期配列を持つ抗体の構造を PDB データ形式で与える。AMBER のユーティリティプログラムである Leap プログラムで、



力場パラメーターファイルを発生する。汎用性を保つため、力場パラメーターファイルは分子動力学計算プログラム AMBER で使用されるものと同一とする。Leap プログラム以外は全て、本研究で開発されたものである。本研究開発の中心となる Orientation プログラムで、抗原と抗体間の疎水性相互作用による構造最適化を行う。これで得た構造に対して、WaterGen プログラムで抗原と抗体の界面やそれらの周辺に水分子を発生させる。再度、Orientation プログラムで親水性相互作用も含めて構造最適化を行い、最終的なエネルギー安定構造と結合エネルギーを得る。次に AntiSearch プログラムで抗原と抗体間の各アミノ酸残基について、疎水性相互作用や親水性相互作用の強さを調べる。この AntiSearch は、C 言語でプログラミングされている。AntiSearch プログラムでは抗原の中のアミノ酸残基から、エネルギー的に抗原-抗体結合に貢献の低い残基を見つけ出す。貢献の低いと判断された抗原側のアミノ酸残基の結合エネルギーを上げるように抗体側のアミノ酸に置換や挿入、削除の操作を行う。アミノ酸に置換を行った抗体候補を、複数（計算機の並列プロセス数だけ）用意する。再度、Leap, Orientation, WaterGen, Orientation の各プログラムを実行し、抗原と抗体間の結合エネルギーを算出する。抗体候補の中で、最もエネルギーの低いものを選び出す。アミノ酸置換に伴う歪みを算出して、基準より大きい場合にはこれを低減するように歪み部分のアミノ酸の、置換や挿入、削除を行う。上記の手続きで得られた抗体が、初期試行抗体よりも、抗原との結合エネルギーの観点から有望であれば、これを次のサイクルの初期試行抗体とする。一連のループを繰り返して、抗体の成熟を行う。得られた抗体は、少なくとも計算上、初期の抗体よりも、抗原と強い結合親和性を持つ。右図は、癌細胞の表面に多く露出している Mucin-1 とその抗体の1つである SM3 を初期構造にして、MatureUp プログラムにより抗体の成熟を行った例である。各ステップで8個のプロセスを発生させて、その中で最も低いエネルギーを示す抗体を次の入力とする。最初の数ステップではアミノ酸変異により、著しくエネルギーが下がるが、20 ステップを過ぎると、エネルギーの低い構造は、容易には出現し難くなる。

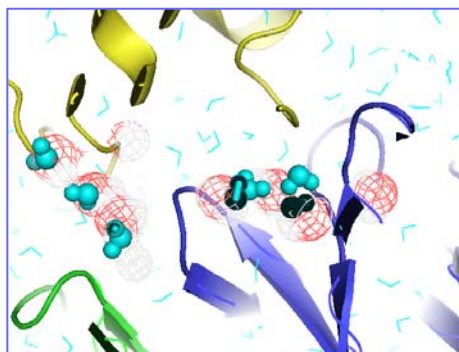


構造最適化を行い、抗原と抗体の結合エネルギーを算出するプログラムである Orientation は、本ソフトウェア開発の中核技術である。計算速度が要求されるため、Fortran で記述されている。医薬品設計や抗体設計において、薬物あるいは抗体の薬効を精度良く評価することは、最も重要な要素技術である。右図上は、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) という酵素に、抗アルツハイマー薬の塩化ドネペジルという薬物が結合した場合の構造最適化を実行した例を示す。青色の部分が X 線結晶解析からの構造を、赤色が Orientation プログラムによる最適化構造を示している。計算での予測構造は、実験での結晶構造にかなり類似している。AChE に作用する低分子化合物は幾つか知られており、AChE とそれら化合物の複合体構造も X 線結晶解析から得られている。右下図は、横軸に実験で測定された AChE と化合物の結合定数の対数値を、縦軸に計算より算出されたエネルギー値をプロットし、両者を比較したものである。計算値と実測値の間には正の相関が確認され、相関値は 0.76 となった。同様の計算を、市



販のドッキングソフトウェアである Gold(ケンブリッジ結晶学データセンター)で行うと 0.74 であり、Glide(シュレディンガー社)で行うと 0.54 であった。従って、計算精度としては、欧米の市販のソフトウェアと勝るとも劣らないレベルにある。

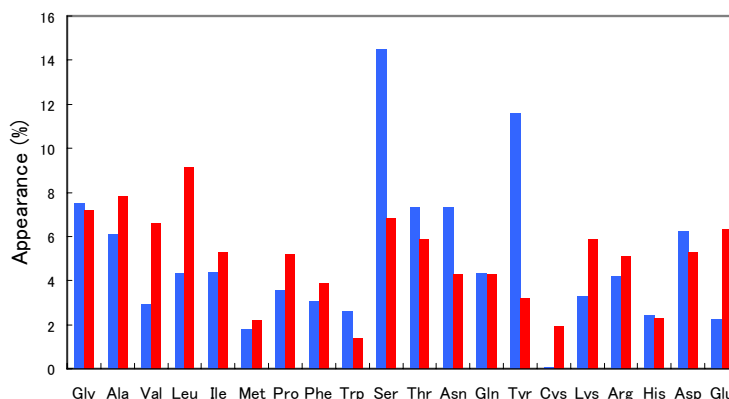
抗体と抗原の結合では、両者の間に水分子が挟まり、結合を強固にする例がしばしば見られる。現在の多くのドッキングシミュレーターでは、この水分子を予測することは行っていない。抗体と抗原の結合を仲立ちする水分子は、抗体の抗原認識の要となっている。本研究では、自動的に結合領域に水分子を発生させるプログラム(WaterGen)を作成した。発生した水分子は、先に述べた構造予測プログラム(Orientation)を実行することで、疎水領域に発生されたものも親水性相互作用の強い領域へ移行する。これによって適切な水の配置を実現できることになった。右図は、Lysozyme という抗原に結合する HyHel-10 抗体について、抗原(黄色リボン表示)と抗体(緑と青のリボン表示)の間に介在する水分子を表している。網掛けは、結晶構造を初期構造にして分子動力学計算を実行した結果、水分子が存在しやすいと算出された場所を示している。一方で、水色の球は、WaterGen プログラムにより発生した水分子であり、抗原と抗体の結合を介在する水分子が適切に発生できていることを示している。



#### B. 抗体による抗原の形状認識の理解と抗体設計

抗原が特定の抗体に認識・識別されるための必要十分条件を明確にして、抗体設計を行う際に必要なデータを取得した。具体的には Protein Data Bank に登録されている全ての抗体分子(免疫グロブリン)のうち、抗原と抗体の構造がしっかり捉えられており、かつ特定の種類の抗体に偏らないという観点より、21種類の構造を選び出した。これらについて分子動力学法によるシミュレーションを遂行した。データを精査し、抗体が抗原を認識する際の抗原認識部位の揺らぎや抗原抗体間の水素結合ならびに疎水結合の様式などを調査した。特に結合領域において抗体の抗原認識に与る各アミノ酸残基の平均的な疎水性相互作用の強さや親水性相互作用の強さを求めた。さらに結合認識に与る水分子の役割を詳しく調べた。右図は、抗体の抗原認識部位の各種アミノ酸の存在割合(青)を示している。約 30,000 種類のタンパク質について統計的に調べられたアミノ酸の出現割合を、比較のために赤で示す。抗原認識部位では、Ser や Tyr

などの水酸基を持つアミノ酸が有意に多いことが判る。これは水素結合が、抗原-抗体結合に大きく寄与していることを示している。その分、Val や Ile などの、側鎖がアルキル基で構成され疎水的な性質を持つ分子量の小さなアミノ酸の割合が減っている。同じ疎水性アミノ酸残基でも、Phe や Trp などの芳香族環を持つアミノ酸は減っていない。親水性相互作用の寄与が強くなっているにも関わらず、Lys や Glu などの正または負の電荷を帯びたアミノ酸の割合は増えず、むしろ減少している。これらの情報(各アミノ酸の存在割合や疎水性相互作用ならびに親水性相互作用のエネルギー評価値)は、抗体設計ソフトウェア(AntiSearch)の中で利用され、抗原-抗体結合に貢献の低い残基を見つけ出す際のエネルギー基準値や確率的に変異を起こさせる際の重み因子として用いられている。



### C. 実験的検証

設計した抗体が、本当に抗原に作用するかどうか、その実験的裏付けをとることが、本項目の目的である。設計した抗体を得るための実験的手法を確立するために、抗体をコードするDNAから抗体タンパクを発現させる実験を行った。具体的には抗体のFv領域を相補性決定領域(CDR)を含むように、抗体分子を5つの部分に分けて、それぞれのアミノ酸配列をコードするように核酸配列を設定する。この核酸配列を持つ核酸オリゴを合成し、これを制限酵素反応を利用してベクターDNAに組み込む。DNAを抗体発現ベクターに移し換えて、大腸菌により抗体分子を発現させ、カラムで生成する。この一連の実験プロトコルを確立し、抗体タンパク質分子を発現精製することができた。実際に発現された抗体が、抗原と親和性を持っていることを、等温滴定熱量計を用いて、抗原抗体結合自由エネルギーの測定を行うことで確認した。等温滴定熱量計は、抗体と抗原の結合親和性を実験的に測定する標準的な装置である。さらにゲルろ過液体クロマトグラフィーにおける分子量分布からも、抗体と抗原の結合を確認した。

## 5. 自己評価

本研究の目的は、抗体機能の本質を理解し、抗体の成熟や適合抗体の決定を、マウスなどの生物体に頼らず、コンピューターを駆使して人為的に行うことであった。これを実現するために、ソフトウェアの開発を中心に研究を進めた。その結果、ソフトウェア自体は、当初の目的に合うものを構築することができた。また抗体だけではなく、医薬品化合物設計にも有用なプログラムが作成できた。さらに論文等の業績も確保することができた。実験研究者も含めて、シミュレーション技術の有用性を納得してもらうためには、シミュレーションの結果に基づいて実験を遂行し、有効性を例を持って示すことが必要である。この目的のために本研究では、生化学実験を並行して遂行した。設計抗体作成の実験技術は習得できたが、抗体医薬品として成り立つ抗体は、未だ完成していない。今後、生化学実験を推進して、抗体医薬の創製を行う必要がある。

## 6. 研究総括の見解

星野研究者は、免疫療法において抗体として適合する分子を人為的に設計作成するシミュレーションシステムを構築した。研究開始時に計画していた計算技術と薬効評価理論の構築、実際の抗体設計、実験検証を計画通りに進め、抗体設計ソフトウェアとして完成させたことを高く評価する。本研究により、特定の疾患を抗体作用により治療する場合に、マウスなどの生物体に頼らずに適切な抗体を確実に設計し産生できるようになった。特に癌治療に有効な極めて特異性の高い抗体の創製に役立つ技術として期待できる。

今回設計のソフトウェアについては今後改良を続けていくことになるが、メンテナンスそして広報等着実にやってほしい。

## 7. 主な論文等

### A さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

#### (1) 論文(原著論文)発表

1. K. Mori, M. Hata, S. Neya, T. Hoshino "Common semi-open conformations of Mg<sup>2+</sup>-free Ras, Rho, Rab, Arf, and Ran proteins combined with GDP and their similarity with GEF-bound forms", *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15127-15137 (2005).
2. H. Ode, S. Neya, M. Hata, W. Sugiura, T. Hoshino "Computational simulations of HIV-1 proteases - Multi-drug resistance due to non-active site mutation L90M - ", *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 7887-7895 (2006).
3. H. Ode, S. Matsuyama, M. Hata, S. Neya, J. Kakizawa, W. Sugiura, T. Hoshino "Computational Characterization of Structural Role of the Non-active Site Mutation M36I of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease", *J. Mol. Biol.* **370**, 598-607 (2007).
4. T. Hoshino, K. Iwamoto, H. Ode, I. Ohdomari "Accurate evaluation method of molecular binding affinity from fluctuation frequency", *Jpn. J. Appl. Phys.* in press (2008)



(2)特許出願

なし。

(3)受賞

1. 星野忠次 “生体分子計算向けソフトウェア開発”、オープン・リサーチ2006学長賞(千葉大学)(2006/11/8)

(4)学会発表

1. Iwamoto, K., Neya, S., Hoshino, T. “Evaluation of the Binding Affinity of Antibodies from Antigen Binding Energy and  $V_H$ - $V_L$  Interaction Energy Calculated by the MM-GBSA Method.”,2006 Annual Meeting of CBI Society, Tokyo (2006/7/10)
2. 岩本光司, 根矢三郎, 星野忠次 “分子動力学計算による抗体親和性評価.”、日本薬学会第127年会, 富山(2007/3/29)

B その他の主な成果

(1)論文(原著論文)発表

1. H. Yuki, Y. Tanaka, M. Hata, H. Ishikawa, S. Neya, T. Hoshino “Implementation of  $\pi$ - $\pi$  Interactions in Molecular Dynamics Simulation”,J. Comput. Chem. **28**, 1091-1099 (2007).

(2)特許出願

研究期間累積件数:1 件

発 明 者:杉山 肇、安達統衛、塩原紀行、田村 裕、星野忠次、藤 秀義

発明の名称:分子設計装置、分子設計方法及びプログラム

出 願 人:富士通株式会社、国立大学法人千葉大学

出 願 日:2007/3/8

(3)受賞

1. 星野忠次 “薬剤耐性変異株に有効な抗エイズ薬の創製”、なのはなコンペ2007(教員版:自然科学先端研究部門)(千葉大学ベンチャービジネスラボラトリー)(2007/4/16)

(4)招待講演

1. 星野忠次, 森 健一 “糖鎖生体膜シミュレーションモデルによる膜タンパク質の挙動解析”、第 26 回表面科学講演大会, 大阪(2006/11/6)
2. T. Hoshino, K. Mori “Investigation on the binding of amyloid peptides to a GM1 cluster through the molecular dynamics simulations of GM1-containing membranes”,1st International Symposium on Nanomedicine -from Basic to Applications- (ISNM2007) & 2nd Molecule-Based Information Transmission and Reception (MB-ITR2007), Okazaki, Japan (2007/4/20)
3. T. Hoshino “Computational design, organic chemical synthesis, and biological assay of an inhibitor against HIV-1 protease”,2nd Workshop on Biological Applications of Plasma/Photon Processing, Osaka, Japan (2007/9/28)
4. 星野忠次、杉浦互、駒野淳 “エイズ治療に向けた計算機シミュレーションと医薬品開発”、2008 年春季第 55 回応用物理学関係連合講演会, 船橋(2008/3/29)

(5)学会発表

1. 藤 秀義, 星野忠次 “疎水性相互作用による結合様式の予測.”、日本薬学会第 127 年会, 富山(2007/3/29)
2. Hisatomi, H., Katagiri, D., Neya, S., Hoshino, T. “Novel ab initio Secondary Structure Prediction Method.”,2007 Annual Meeting of CBI Society, Hiroshima (2007/12/20)

3. 藤 秀義, 星野忠次“疎水性相互作用と水素結合性相互作用を用いたリガンド結合親和性予測プログラムの開発.”日本薬学会第 128 年会, 横浜(2008/3/28)