

工学系で蛋白質研究を模索して

熊谷 泉（くまがい いずみ）

ニワトリリゾチームから抗体へ

1983年の7月、東京大学工学部工業化学科の三浦謹一郎教授の研究室に助手として着任し、工学系への思いがけ無い遭遇となりました。三浦先生は国立遺伝学研究所から転任され、工学部で遺伝子工学の研究室を立ち上げる時であり、国際的にも高い評価を受けていた核酸（主にRNA）研究を中心に据えながらも、新天地で新しい研究分野として、当時、黎明期を迎えていた「蛋白質工学」を取り上げられました。私は大学院・博士研究員時代の蛋白質・核酸研究と組換えDNA実験の経験を生かして蛋白質工学研究に参画するように申し渡されましたが、技術的には未熟であり、手探り状態から研究を始めたため、3年間関連論文は1つも発表できませんでした。三浦先生は数種類の蛋白質を研究対象として取り上げられましたが、中心は放線菌スブチリシンインヒビター（SSI）であり、三井幸雄先生を中心とするSSIグループに加わり、反応部位のアミノ酸

置換による特異性の人工変換にも成功しました。また、三浦先生は本学会創立の流れの中でも、三井先生とは連携を深めておられました(写真1)。

私はニワトリリゾチームの研究に惹かれました。やはり蛋白質研究の基本であり、多くの知見に恵まれていることが研究の進展に有利だと思ったからです。ヒトリゾチームを含め、国内外で複数の研究グループが研究対象として取り上げており、そのような競争が激しい研究状況に参入することに、三浦先生は少し難色を示されましたが、最終的には研究テーマとしてお認め頂きました。

主に研究対象としたのは、基質結合に関与している側鎖（特に Trp62(1)）であります。これら側鎖は、本学会の母体の1つである「蛋白質構造討論会」では、九州大学農学部・薬学部、大阪大学蛋白質研究所のグループが主に化学修飾による構造変換の対象にしており、学生時代から見聞きし興味を持っておりました。類縁



写真1 三井幸雄先生を囲む会（三井先生が長岡に赴任された1989年頃）

主な方々、前列中央：三井先生、右横：宮沢辰雄先生、右端：西村善文先生、2列目4番目から：大島泰郎先生、稲垣冬彦先生、荒田洋二先生、三浦先生、甲斐荘正恒先生、最後列大島先生の左奥：筆者

リゾチームとの構造・機能相関も考慮して、アミノ酸置換を行った結果、人工的な高機能化を達成することができました(1, 2)。

文献1のニワトリリゾチームのアミノ酸置換研究は私の蛋白質工学研究の最初の論文でしたが、この論文を基に、1988年の6月、米国NIHの国立がん研究所で開催されたワークショップに招待されました(3)。ニワトリリゾチームを抗原とした免疫学のワークショップで、酵素学研究は少数派でした。抗原・抗体複合体のX線結晶解析による立体構造研究が大きな話題であったと思います。エピトープやパラトープの構造が原子レベルで議論されていることが、特に印象的でした。このワークショップの要旨集の表紙の図は抗原ニワトリリゾチームに結合する3種の抗体(その1つは後述するHyHEL10)のパラトープとエピトープの関係を表したものであり、現在ではいくつかの代表的な生化学の教科書に掲載されています。何故、ニワトリリゾチームを抗原とした免疫学が大きく展開したかについて、ワークショップのオーガナイザーに伺ったところ「1960年代に立体構造が解明された単純蛋白質は唯一ニワトリリゾチームだけだったから」と教えて頂きました。NIHを中心にニワトリリゾチームを抗原とするハイブリドーマは100種にのぼると言われております。ニワトリリゾチームは酵素蛋白質としてだけでなく、抗原蛋白質としても基本的なものとして位置づけられていたこととなります。

モデル抗体としてのHyHEL10

複数の蛋白質を対象にして、蛋白質工学研究と格闘していましたが、研究の方向性では悩んでおりました。工学系では「設計」「合成」「評価」が重要とされると教えられましたが、蛋白質研究は「設計」には馴染みません。「蛋白質」を「工学」するには対象分子を限定することが現実的であると思い始めました。抗体は共通の枠組み構造からなるドメインの積木細工と見ることができ、抗原結合部位のCDRはモジュール構造に対応しているとされます。ドメインとモジュールを基盤として「設計」に対応できそうな数少ない蛋白質分子だと考えました。

ニワトリリゾチーム研究の実績を生かし、思い切っ

て研究を開始しました。当時は、抗体可変領域断片(Fv)(4)、一本鎖抗体(scFv)、Fabの大腸菌での発現系の報告が相次いで行われた時期でした。

まずHyHEL10Fvの遺伝子約750塩基対を化学合成し、SSI研究の関連で放線菌の発現系を保有していましたので、独自性をだそうと放線菌で発現させました。抗体の放線菌での発現は未だにこの一例だけかと思えます(5)。しかしながら生産性は高くなく、効率的な研究のために大腸菌での分泌発現系を立ち上げることにしました。丁度、博士前期課程に進学した津本浩平さん(現・東京大学・院工・医科研教授)がこのテーマに参入しました。生産効率は極めて高く(~30mg/L)、研究の進展に大いに役立ったと思います。生産系が確立しましたので、結合定数を正確に測定したいと思い、当時、大阪大学蛋白質研究所にいらした油谷克英先生にご相談すると、等温滴定型熱量測定の利用を推薦して頂きました。直ぐに、津本さんが油谷先生から、ご指導・ご薫陶頂き良い成果をあげることができました(6)。

東北大学に赴任後も研究室のスタッフになって頂いた津本さんが自家薬籠中のものとして、相互作用解析を推進しました。抗原ニワトリリゾチームとの複合体との構造解析にも成功し(7)、構造を基盤とした精密な抗原認識機構を議論できるようになったと思っております(8, 9, 10)。また、独自に整備したフェージ提示系を利用して、抗原認識能の人工変換を達成することも出来ました(11)。

1970年代後半から始まる遺伝子からの蛋白質の発現系の開発は、蛋白質研究を一変させました。抗体の構造は皆ほとんど同じですので、Fv程度ならどんな抗体も大腸菌で分泌発現できるはずだと単純に考え、東北大学では大腸菌の発現系しか利用しない、と決めていました。HyHEL10の発現効率の高さに幻惑されていたでしょう。しかしながら、色々な抗体を取り扱う内に、抗体でさえも発現性に強い個性があることに気づき始め、汎用性のある発現系開発の必要性を強く感じました。

大腸菌における異種蛋白質の細胞内発現系における封入体形成は未だに対処が難しい大きな問題です。利用するには、一旦、変性剤で可溶化して、活性型に巻き戻す必要があり、その条件検討が煩雑です。一方、大量に生成する、安定である、封入体自身はある程度精製度が高い、精製が容易である、などの優位な点もあります。

HyHEL10はFvでは大腸菌で効率的に分泌発現しますが、一本鎖抗体(scFv:VHとVLをリンカーで繋いだ分子種)の分泌発現量は大幅に低下します。そこで、HyHEL10scFvの封入体の作製と巻き戻し条件の検討を行いました。HyHEL10scFvの封入体は大量に発現しました(μg/L)。蛋白質の巻き戻しで問題になるのは、巻き戻し途中での凝集体の生成です。津本さんを中心に、凝集体生成を抑制するため、変性剤濃度を段階的に下げた行き、添加剤等の工夫を行い、HyHEL10scFvは封入体から90%以上の効率で再生させることができました(12)。

しかしながら、HyHEL10scFvの巻き戻し効率に匹敵するまたは凌駕する効率を示す蛋白質は無かったように思います。その後は、動物細胞の発現系も研究室に導入し、その有用性を認識することになります。

二重特異性抗体とがん免疫治療

私は基礎的な研究対象として抗体を取り上げましたが、研究を始めてみると、はからずも医学系の先生方から共同研究の提案を頂くようになりました。大きく発展したものは、東北大学加齢医学研究所の工藤俊雄先生(現・東北大学名誉教授)との共同研究です。がん免疫治療への適用を目的とした二重特異性抗体の開発を目指す研究内容でした。

抗体の可変領域断片(Fv)を構成するVHとVLを短いリンカーで繋げると、二量体化して、2価の低分子抗体断片が作製できることは知られており、diabodyと呼ばれていました。この時、抗原結合能の異なった2種のFvを繋げると、2種類の抗原結合能を有する、二重特異性diabodyを作製することが出来ます(図1)。がん治療を目的とした二重特異性抗体の利用コンセプトは単純で、

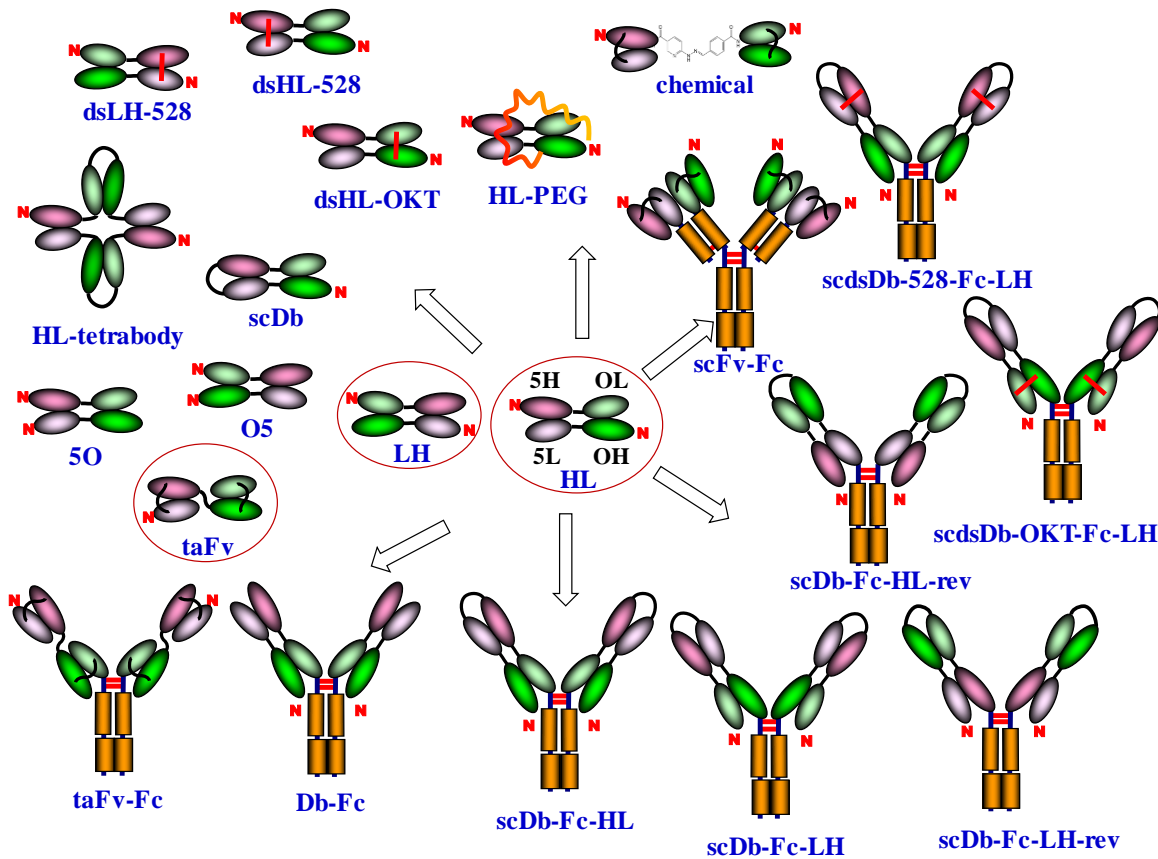


図1 二重特異性抗体 Ex3 を基盤として構築した構造フォーマット

円形で囲んだものは、典型的構造フォーマット。5H: 抗EGFR抗体528 H鎖可変領域、5L: 同528抗体L鎖可変領域、OH: 抗CD3抗体OKT3 H鎖可変領域、OL: 同OKT3 L鎖可変領域。

Ex3 HLはドメインの連結順がVH-リンカー-VL、Ex3 LHは連結順がVL-リンカー-VH。tandem scFvはscFv-リンカー-scFv。

がん細胞とリンパ球を直接架橋することです。副次的には多様な細胞生物学的なイベントの相乗効果であることは想像に難くありませんが、証明する実験は見当たりません。数種類のがん関連抗原特異抗体とリンパ球表面抗原特異抗体のFvを作製し、それらの組合せによる二重特異性 diabody を数種類構築して、活性を調べましたが、特に顕著な細胞傷害性を示した分子種は、抗 EGFR 抗体 528 と、抗 CD3 抗体 OKT3 との二重特異性 diabody (Ex3) でした(13)。この研究には浅野竜太郎さん(現・東京農工大・院工・准教授)が卒業研究時から参画し、その後 Ex3 のヒト型化(hEx3)にも成功しました(14)。また、Ex3、hEx3 ともマウスを用いた *in vivo* 治療モデルでも強い抗腫瘍活性を示すことが明らかになりました(13, 14)。良く見られる現象ですが、528 Fv をヒト型化すると、抗原親和性が大きく低下しました。マウス、ヒト型化 528 Fv の結晶構造を解析し、それらの構造に基づき、ヒト型化 528 Fv に無作為変異を導入したライブラリーから、ファージ提示系を利用して、高親和性ヒト型化 528 Fv の取得に成功しました(15)。これらの変異導入を含め、Fc 領域との融合、二重特異性 tandem-scFv (2種類の scFv をリンカーで繋げた分子種で、diabody とは異なる構造) など極めて多数の構造フォーマットを作製し、抗腫瘍活性を測定して、医薬品としての最適化研究も展開しました(図 1)。重要なことは、これら構造フォーマットの改変により、抗腫瘍活性が大幅に変化することを見出したことです。Ex3 は、元々は VH-VL の順でドメインを連結していましたが、これを VL-VH (Ex3 LH 型) に並べ変えるだけで、活性が3桁近く上昇しました(16)。低分子二重特異性抗体で、唯一 FDA で認可されている blinatumomab は、抗 CD19 と抗 CD3 抗体の一本鎖抗体をリンカーで繋いだ二重特異性 tandem-scFv であり、悪性リンパ腫の治療薬として開発されました。標準治療薬の一つである IgG 型キメラ抗体のリツキササンと比較して 10^5 倍活性が高いと報告されており(17)、現在国内製薬企業にて臨床研究が進められております。固形がんを治療対象と想定している Ex3 とは単純な比較はできませんが、Ex3 LH 型は blinatumomab に匹敵、または凌駕する活性を有していると考えています。

このような実績を背景として、2011 年から2年間、国内大手製薬企業に評価して頂く機会を得ました。そ

れまでの製造・活性評価は十分な再現性が得られ、アカデミアでの研究活動に十分な手応えと自信を得ることが出来ましたが、開発継続までには至っておりません。残念ですが、巨額な投資判断において、大きな壁があるように感じております。

インターフェイス分子への展開

がん免疫治療を目的とした二重特異性抗体の役割は、がん細胞と活性化リンパ球を架橋することであり、細胞間に人工的なインターフェイスを構築していることとなります。この考えを、多岐にわたる物質間に適用することを思いつきました。東京大学・工学部時代の一時期は超電導フィーバーの時代であり、隣の研究室では、ペロブスカイト型化合物を絨毯爆撃的に合成し、連日のように新たな物性を見出し、注目を浴びていました。一般社会では、何とも地味な蛋白質の世界を拡張できないか、と現実離れた考えが浮かんだり、消えたりしていました。

2000 年頃に半導体の結晶面を認識するペプチドを、ファージ提示系を利用して取得し、このようなペプチドの融合で、2種類の材料を集合・組織化する提案も成されました(18)。このような断片を、抗体のフレームワークに入れ込むことにより、より結合定数の高い分子の構築が可能になると、発想しました。このような材料表面認識抗体の取得はファージ提示系のような生体外選択系を適用するしか方法はありません。研究室で長年培って来た技術が生かせる点も魅力的でした。梅津光央さん(現・東北大学・院工・教授)がスタッフとして着任された際、ご相談させて頂きこのような方向性の研究を開始しました。梅津さんは、生物系以外での研究経験も豊富な守備範囲の広い研究者です。

幾つかの有機・無機材料表面特異抗体断片の取得に挑戦し報告しましたが、ここでは金表面特異抗体に関連する成果を紹介します。まず、ヒト抗体ライブラリーより、蒸着金表面に選択的な抗体断片を取得できました(19)。金属や半導体化合物に特異的に結合するペプチドの報告がなされていましたが、その解離定数は $10^{-5\sim-6}$ M 程度でありインターフェイス分子として十分な結合性を有していません。しかし、私どもが選択した金表面特異的抗体の解離定数は 10^{-10} M 程度と格段に強い結

合性を示し、高い特異性も確認することができました。

また、より簡便な材料特異的抗体の取得方法の試みとして、材料認識ペプチドを CDR 移植することによる機能発現を行いました。具体的には、様々な金属酸化物に結合するペプチドをファージ提示法より独自に選択した結果、多機能セラミックスである酸化亜鉛を用いて選択されたペプチドの結合活性は既に報告されているペプチドに比べて結合定数が 10^{-7} 程度と非常に強く、明瞭な材料選択性も示しました(20)。続いて、マウス抗体やラクダ抗体の可変領域断片中にある CDR 領域の一つのループ構造に、選択された酸化亜鉛認識ペプチドの移植を行いました。結果、酸化亜鉛への結合と材料選択性の両機能が発現され、材料認識ペプチドを用いた抗体への材料表面結合抗体の作製は可能であることが確認されました(21, 22)。特に、ラクダ抗体へ移植したものは、移植に用いなかった CDR 領域をランダム化しファージ提示法により解離定数が 10^{-9} M 程度の抗体を取

得することができ、材料特異的抗体の網羅的、かつ簡便な取得法として、新規性が高く、独創的な手法であると言えます。

ナノ工学材料に関しては、金と酸化亜鉛に特異的機能を持つ抗体断片を構成単位とした二重特異性抗体分子を創ることによって、抗体断片間の架橋構造によっては金ナノ粒子のプラズモン機能を損なわない状態で、金・酸化亜鉛ナノ粒子を会合させることだけで、また、酸化亜鉛結晶表面に金ナノ粒子を接着させることも行いました(22, 図2)。

最近では、この二重特異性抗体を利用して、金微粒子と酸化亜鉛ナノ粒子を会合させ、高温にて金を溶融(蛋白質分子は焼失)し、内部の酸化亜鉛ナノ粒子を希硫酸で溶解することにより、ナノレベルの細孔を有する金属材料を創成し、その表面による効率的な酸化反応を観測しております(投稿中)。

終わりに

蛋白質として基本的な分子に素朴な興味を抱き、模索する中、抗体研究に辿り着き、はからずも、抗体医薬の進展を背景に、各種の公的資金のご支援を頂きました。現役最終年度(2012年度)には、科学研究費補助金特別推進研究「ナノインターフェイス構築のバイオデザイン」に採択され、2017年3月に終了致しました。この成果の学術発信はまだ途上にありますが、進捗もあります(23)。

工学系の伝統的分野の研究者の方から、「社会が我々の研究の道場である」と聞かされたことがあります。また、研究者も晩年となると「人から感謝される研究」に心を動かされることも聞きます。抗体研究を通じて、一瞬ですが、このような方向性を垣間見る体験は、研究生活を豊かにしてくれました。基礎から応用まで、分野横断的な知見・視点を包含した蛋白質研究の発展を期待しております。

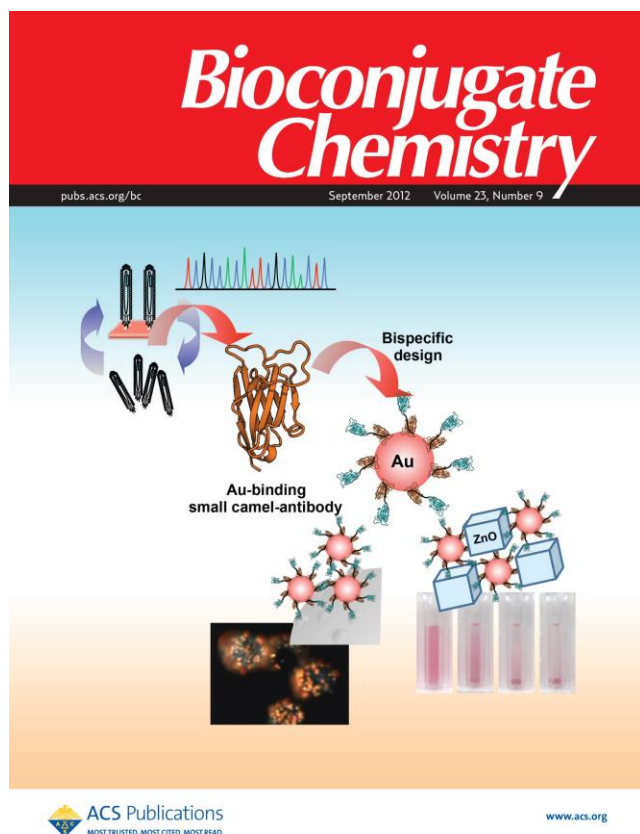


図2 (2012) Bioconjugate Chemistry Vol 23 の表紙

文 献

- 1) Kumagai,I., Kojima,S., Tamaki,E. & Miura,K., (1987) *J. Biochem. (Tokyo)* **102**, 733–740
- 2) Kumagai,I., Sunada,F., Takeda,S., & Miura.K., (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 4608–4612
- 3) Smith-Gill,S., & Sercarz,E., ed. (1989) *The Immune Response to Structurally Defined Proteins: The Lysozyme Model*, Adenine Press
- 4) Skerra,A., & Pluckthun,A. (1989) *Science* **240**, 1038–1041
- 5) Ueda,Y., Tsumoto,K., Watanabe,K., & Kumagai,I.,(1993) *Gene* **129**, 129–134
- 6) Tsumoto,K., Ueda,Y., Maenaka,K., Watanabe,K., Ogasahara,K., Yutani,K., & Kumagai,I., (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 28777–28782
- 7) Kondo,H, Shiroishi,M., Matsushima,M., Tsumoto,K., & Kumagai,I., (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 27623–27631
- 8) Yokota,A., Tsumoto,K., Shiroishi,M., Kondo,H., & Kumagai,I., (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 5410–5418
- 9) Shiroishi,M., Tsumoto,K., Tanaka,Y., Yokota,A., Nakanishi,T., Kondo,H., & Kumagai,I., (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 6783–6791
- 10) Yokota,A., Tsumoto,K., Shiroishi,M., Nakanishi,T., Kondo,H., & Kumagai,I., (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 7686–7696
- 11) Nishimiya,Y., Tsumoto,K., Shiroishi,M., Yutani,K., & Kumagai,I., (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 12813–12820
- 12) Tsumoto,K., Shinoki,K., Kondo,H., Uchikawa,M., Juji,T., & Kumagai,I., (1998) *J. Immunol. Methods.* **219**, 119–129
- 13) Hayashi,H., Asano,R., Tsumoto,K., Katayose,Y., Suzuki,M., Unno,M., Kodama,H., Takemura,S., Yoshida,H., Makabe,K., Imai,K., Matsuno,S., Kumagai,I. & Kudo,T., (2004) *Cancer. Immunol. Immunother.* **53**, 497–509
- 14) Asano,R., Sone,Y., Makabe,K., Tsumoto,K., Hayashi,H., Katayose,Y., Unno,M., Kudo,T., & Kumagai,I., (2006) *Clin. Cancer. Res.* **12**, 4036–4042
- 15) Nakanishi,T., Maru,T., Tahara,K., Sanada,H., Umetsu,M., Asano,R., & Kumagai,I., (2013) *Protein. Eng. Des. Sel.* **26**, 113–122
- 16) Asano,R., Kumagai,T., Nagai,K., Taki,S., Shimomura,I., Arai,K., Ogata,H., Okada,M., Hayasaka,F., Sanada,H., Nakanishi,T., Karvonen,T., Hayashi,H., Katayose,Y., Unno,M., Kudo,T., Umetsu,M., & Kumagai,I., (2013) *Protein Eng. Des. Sel.* **26**, 359–367
- 17) Bargou,R., Leo,E., Zugmaier,G., Klinger,M., Goebeler,M., Knop,S., Noppeney,R., Viardot,A., Hess,G., Schuler,M., Einsele,H., Brandl,C., Wolf,A., Kirchinger,P., Klappers,P., Schmidt,M., Riethmuller,G., Reinhardt,C., Baeuerle,P.A., & Kufer,P., (2008) *Science* **321**, 974–977
- 18) Mirkin,C.A., & Taton,T.A., (2000) *Nature* **405**, 626–627
- 19) Watanabe,H., Nakanishi,T., Umetsu,M., & Kumagai,I., (2008) *J. Biol. Chem.* **283**, 36031–36038
- 20) Umetsu,M., Mizuta,M., Tsumoto,K., Ohara,S., Takami,S., Watanabe,H., Kumagai,I., & Asdschiri,T., (2005) *Adv. Mater.* (2005) **17**, 2571–2575
- 21) Hattori,T., Umetsu,M., Nakanishi,T., Tsumoto,K., Ohara,S., Abe,H., Asano,R., Adschiri,T., & Kumagai,I., (2008) *Biochem. Biophys. Res. Commu.*, **365**, 751–757
- 22) Hattori,T., Umetsu,M., Nakanishi,T., Sawai,S., Kikuchi,S., Asano,R., & Kumagai,I., (2012) *Bioconjug. Chem.* **23**, 1934–1944
- 23) Sugiyama,A., Umetsu,M., Nakazawa,H., Niide,T., Onodera,T., Hosokawa,K., Hattori,S., Asano,R.,& Kumagai,I.,(2017) *Sci. Rep.* **7**, 2862

熊谷先生ご略歴

- 1948年 新潟市に生まれる
1972年 東京大学教養学部基礎科学科 卒業
1977年 東京大学大学院理学系研究科相関理化学課程
博士課程 修了
理学博士
1977年 日本学術振興会奨励研究員
1978年 三菱化成生命科学研究所 特別研究員
1980年 マックスプランク分子遺伝学研究所 研究員
1982年 ベルリン自由大学生物化学研究所 研究員
1983年 東京大学工学部工業化学科 助手
1988年 東京大学工学部工業化学科 講師
1990年 東京大学工学部工業化学科 助教授
1994年 東京大学工学部化学生命工学科 助教授
1995年 東北大学大学院工学研究科生物工学専攻
教授
2004年 東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻
教授
2013年 東北大学名誉教授
2013年 東北大学大学院工学研究科バイオ工学専攻
客員教授
2017年 東京農工大学大学院工学研究院 客員教授

