

2023 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	非対称均一糖鎖抗体の構造生物学的研究とエフェクター機能向上
キーワード	① <i>N</i> -グリコシル化、② Fc γ RIIIa 結合、③ ADCC

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏 名	ヒランヤコン メタニー Hiranyakorn Methanee
配付時の所属先・職位等 (令和5年4月1日現在)	星薬科大学・特任助教
現在の所属先・職位等	星薬科大学・助教
プロフィール	分子科学研究所にて博士取得。専門は、構造生物学、複合糖質科学

1. 研究の概要

IgG は治療薬において不可欠な抗体であり、Fab 領域は抗原認識に、Fc 領域はエフェクター分子との相互作用に寄与する。Fc 領域は2つの同一鎖からなり、それぞれ普遍的に *N*-結合型糖鎖をもつ。IgG の *N*-グリコシル化は抗体の機能を調節するために重要である。*N*-結合型糖鎖構造と Fc γ RIIIa 結合親和性との関係を理解することは、抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) に対する治療用抗体の開発に不可欠である。しかし、*N*-結合型糖鎖生合成経路の複雑さにより、抗体には対称および非対称の高度な多様性をもつ *N*-結合型糖鎖構造が存在する。そのため、糖鎖構造と抗体機能の関係は依然として不明確である。本研究では、均一な *N*-結合型糖鎖をもつ IgG を用いて、*N*-結合型糖鎖と抗体活性の相関関係を明らかにすることを目指す。従来の IgG 糖鎖工学は対称的 *N*-結合型糖鎖の合成に限定されていたが、今回、独自に見出した高度な精製方法と化学酵素反応を組み合わせることで均一な糖鎖をもつ非対称グリコシル化リツキシマブの調製に成功した。また、Fc γ RIIIa アフィニティーカラムクロマトグラフィーと表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いてリツキシマブの *N*-結合型糖鎖構造と Fc γ RIIIa 結合親和性との関係を調査した。さらに、作製した IgG の生物活性、生物物理学的特性、および構造解析に重点を置き、これによりその生物学的機能に対する未踏のメカニスティックな洞察を探索する。この研究により、タンパク質の構造的基盤に関する統合的理解を促進し、治療用 IgG における糖鎖利用技術の向上に寄与する。

2. 研究の動機、目的

これまで、タンパク質に対する糖鎖の影響、なかでも *N*-結合型糖鎖構造と IgG 機能との関係は大いに関心を集めてきた。*N*-結合型糖鎖は IgG の構造と機能にとって非常に重要である。*N*-結合型糖鎖構造と ADCC と関係する Fc γ RIIIa 結合親和性との関係を理解することは、効果的な治療薬の開発に不可欠である。本研究は、独自に開発した調製方法に基づいて、非対称 *N*-結合型糖鎖構造と抗体機能の関係を解明するものである。我々は、Fc γ RIIIa 親和性クロマトグラフィーを用いて、非対称タイプを含む均一な糖鎖構造を有するリツキシマブを作製した。この研究の目的は、1) 均一な対称および非対称 *N*-結合型糖鎖を有する IgG の系統的合成、

2) Fc 受容体との結合親和性および ADCC のような生物活性の評価、3) NMR による均一なグリコシル化 IgG の構造特性評価である。均一な非対称グリコシル化 IgG の作製、および構造特性評価のための新しい方法論を開発する。

3. 研究の結果

1) 均一な糖鎖を有するリツキシマブライブラリの作製に成功した。
2) 抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) 活性に関連する *N*-結合型糖鎖構造と Fc γ RIIIa 結合親和性との関係を理解するために、均一なグリコシル化リツキシマブライブラリを Fc γ RIIIa カラムクロマトグラフィーおよび表面プラズモン共鳴 (SPR) で解析した。その結果、親抗体リツキシマブと比較して、糖鎖改変リツキシマブは結合親和性に有意な差異が見られた。特に、リツキシマブの糖鎖長が Fc γ RIIIa への結合親和性に大きな影響を与え、シアル酸およびガラクトースの存在と配置がこの効果にさらに寄与することがデータから示された。これらの結果は、結合親和性を細かく制御できる我々の方法論の長所を強調しており、必要に応じて親和性の向上および低下を促進することができる。G2/G2 ペアは 46 倍の親和性向上を示し、G0/G0 ペアは 101 倍の低下を示す (表 1)。これらの結果は、疾患治療のための抗体の有効性を高めるための糖鎖工学の重要性を示すものである。さらに、この相互作用は、Fc 糖鎖工学が作用様式を調節する可能性を提供するものである。我々の発見は、生命現象理解を構造生物学の知見から理解するための重要な知識を提供し、治療効果を高めるための糖鎖利用に新しい道を開くものである。

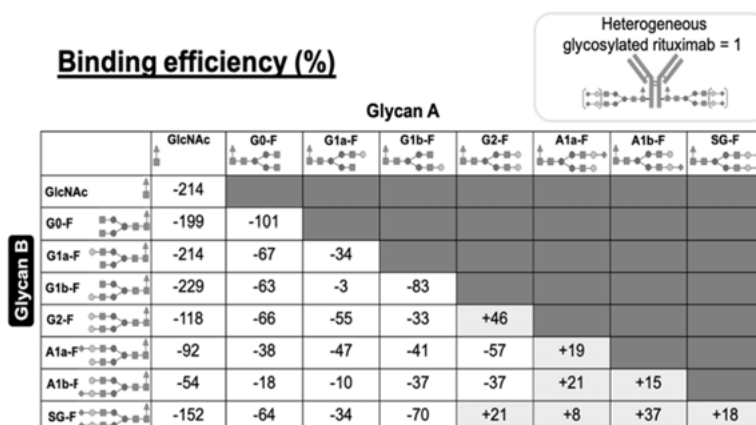


表 1. 均一なグリコシル化リツキシマブの Fc γ RIIIa 結合親和性評価 Fc γ RIIIa 結合親和性の KD 値は SPR 解析により測定。

4. 研究者としてのこれからの展望

糖鎖構造と IgG 機能との関係を明らかにするためには、糖鎖と IgG の構造特性評価が重要である。私は、NMR を用いて非対称グリコシル化 IgG の構造と動態を原子レベルで研究することを目指している。しかし、非対称 *N*-結合型糖鎖抗体の NMR 立体構造解析は、得られるであろう複雑な情報と分析方法の不十分さにより依然として困難であると予想される。この問題を克服するために、 ^{13}C 標識糖鎖を用いて NMR のピーク強度を増強し、 ^{15}N 標識 IgG を用いて非対称グリコシル化 IgG の複雑な構造を解析する予定である。
さらに、NMR データをサポートするために、GROMACS ソフトウェアを用いた分子動力学 (MD) シミュレーションを実施し、*N*-結合型糖鎖が IgG 構造に与える影響を調査することを目指す。構造生物学から得られる情報と生物活性の調査を組み合わせることで、糖鎖構造と IgG 機能の関係を明らかにすることができると思う。

5. 支援者 (寄付企業等や社会一般) 等へのメッセージ

この度は、私たちの研究にご支援いただき誠にありがとうございます。ご支援により、非対称グリコシル化 IgG の構造解析とその機能に関する研究を進めることができました。また、伏見製薬所株式会社、東ソー株式会社にも御援助いただきました。併せて御礼申し上げます。この研究は、より効果的な治療用抗体の開発に向けた重要な一歩となります。

