

実施課題名：HIVエンベロープスパイク蛋白質の膜近傍のエピトープを認識する抗体の相互作用解析

【背景】

HIVエンベロープのスパイク蛋白質は高い変異率を有し、それにより宿主の免疫を回避されているが、膜付近における配列の変異率が他の部位と比べて低いことが明らかとなってきた。一方で我々は近年、低分子化合物をコンジュゲートした抗体が効率的に細胞膜近傍のエピトープを認識することを明らかにしてきている。膜抗原を効率的に認識する抗体の相互作用様式が明らかとすることで、HIVに対して高い反応性を持つ抗体を得る指針を得ることを目指している。

【実施内容】

本研究では、HIVエンベロープに存在するスパイク蛋白質の膜貫通領域に着目し、スパイク蛋白質の膜近傍の配列(MPER)とこれをエピトープとする抗体(抗MPER抗体)の相互作用解析を達成することを目標としている。特に申請者が精通しているナノディスクの技術を活用し、溶液系において簡便に膜タンパク質と抗体の相互作用を解析する方法論を開発することに取り組んだ。

具体的には、スパイク蛋白質の膜近傍の配列と膜貫通領域のペプチドを大腸菌発現系にて安定同位体標識を施し、単離精製する条件検討を行い、NMR計測の試料を準備することができた。また、抗MPER抗体を安定同位体標識するために動物細胞発現系を用いた方法の開発を行い、高収量で抗MPER抗体を得ることができた。これらをNMR計測に供し、MPERおよび、抗MPER抗体双方について、NMR信号を観測することに成功した。

今後これらの相互作用解析とNMR信号の帰属を行うことで、抗MPER抗体とMPERの相互作用のエピトープ、パラトープの詳細に関する情報を得ることが期待できる。

Fig. 1 HIVスパイク蛋白質(MPER)に結合する抗体の模式図

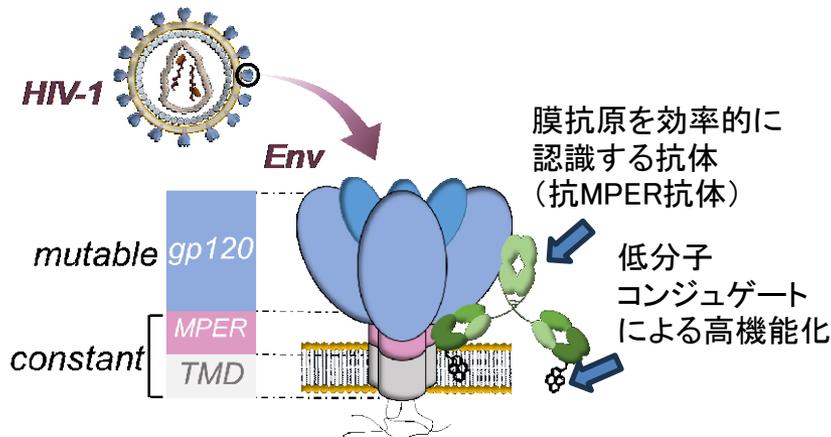
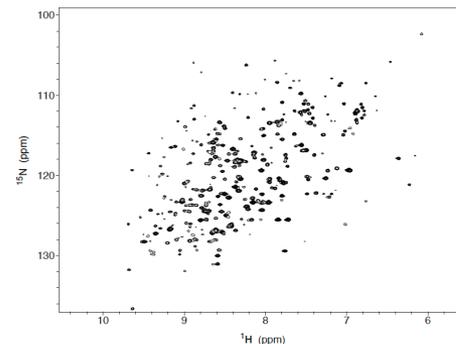
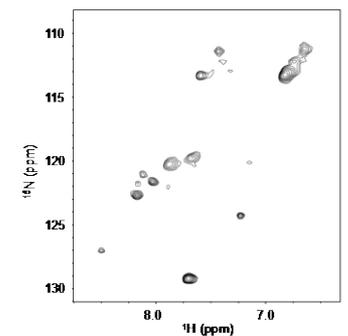


Fig. 2 抗MPER抗体の<sup>1</sup>H<sup>15</sup>N-HSQC



抗MPER抗体を高収量で得るための発現方法を開発し、<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N標識した。

MPERの<sup>1</sup>H<sup>15</sup>N-HSQC



MPER標識体を作出することに成功した。

NMR プラットフォーム  
実施課題 利用報告書

課題受付番号	PF22-01-056		
利用課題名	HIV エンベロープスパイク蛋白質の膜近傍のエピトープを認識する抗体の相互作用解析		
所属機関	九州大学大学院		
所属部署	薬学研究院		
役職・氏名	役職	教授	氏名 カアベイロ ホセ
利用実施時期、及び期間	2022年 1月 31日～2024年 2月 28日  総利用日数: 7日  <input checked="" type="checkbox"/> 当初計画どおり・ <input type="checkbox"/> 当初計画変更 (変更理由)		

## 1. 本課題の概要・目的

本研究では、HIV エンベロープに存在するスパイク蛋白質の膜貫通領域(MPER)に着目し、スパイク蛋白質の膜近傍の配列とこれをエピトープとする抗体(抗 MPER 抗体)の相互作用解析を達成することを目標としている。膜貫通領域付近にエピトープが存在する場合、抗原と抗体の相互作用解析に従来の構造生物学的手法を適用することは難しく、相互作用解析を行うための技術開発が必須である。特に申請者が精通しているナノディスクの技術を活用し、溶液系において簡便に膜タンパク質と抗体の相互作用を解析する方法論を開発することを目指している。

## 2. 成果の概要

### 実施内容

MPER を大腸菌発現系にて安定同位体標識を施す方法論を構築した。疎水性の高い膜貫通ペプチドである MPER について、可用性のタグを連結させたうえで膜画分を回収する方法により、高い収量で目的ペプチドを得てナノディスクに包埋する方法を構築した。その結果、MPER について、良好な  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを得ることに成功した。また、抗 MPER 抗体についても相互作用の情報を得るために、安定同位体標識を行うための技術開発を行なった。動物細胞を用いた一過性発現系の構築を検討した。発現誘導の条件や培地交換の条件、添加物の検討を行い、劇的に発現量を向上させることに成功した。これにより、均一に  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  標識された抗 MPER 抗体の Fab 領域を取得することに成功し、良好な  $^1\text{H}-^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを得ることに成功した。

### 本課題により得られた成果と当初目標との比較

MPER および、抗 MPER 抗体は調製の難しい膜貫通ペプチドや産生の難しい高分子量蛋白質である。本研究課題で安定同位体標識法を開発し、それぞれ NMR 計測を可能とするサンプル調製の技術基盤を構築することができた。本研究を通じて水溶性の低い膜貫通蛋白質や高分子量蛋白質を収量高く得る方法を開発できたことが大きな成果である。本成果は、抗体のみならずバイオ医薬品として可能性を秘めたタンパク質一般に応用可能

な技術基盤をもたらすものである。

## 成果発表

1. 吉永 晴哉、RUJAS, E., NIEVA, J.L、妹尾 暁暢、谷中 冴子、カアベイロ ホセ「膜付近のエピトープを認識する抗 HIV 抗体の相互作用解析」、第 23 回日本蛋白質科学会年会、名古屋、2023 年 6 月
2. 吉永 晴哉、RUJAS, E., NIEVA, J.L、妹尾 暁暢、谷中 冴子、カアベイロ ホセ「HIV に対する部位特異的化学生修飾抗体の相互作用メカニズムの解明」、第 22 回次世代を担う若手のためのファーマバイオフォーラム、福岡、2023 年 9 月
3. 朝倉 陽菜、吉永 晴哉、谷中 冴子、妹尾 暁暢、ルハス エドウルネ、ニエバ ホセルイス、カアベイロ ホセ「化学修飾された広域中和抗 HIV-1 抗体の詳細な相互作用様式の解明」、第 3 回日本抗体学会、仙台、2024 年 12 月

## 今後の展開

本研究課題で確立した技術は様々な真核細胞由来の蛋白質の安定同位体標識試料調製に適用することが期待される。また、MPER と抗 MPER 抗体に関しては、得られた試料の多次元計測により、信号の帰属に取り組むとともに、相互作用解析を実施していく予定である。

### **3. 社会・経済への波及効果の見通し**

抗体はバイオ医薬品の中核であり、その開発過程や製造工程において高次構造を評価することは極めて重要である。本研究の成果は、抗体および、抗原蛋白質の溶液内における高次構造を原子レベルで評価する基盤を与えるものである。今後、安定同位体標識技術をさらに高度化・低コスト化することにより、抗体以外のバイオ医薬品の高次構造評価を溶液中において実施する道を切り開くことができる。このように、本研究の成果は、抗体医薬のバイオ医薬品の設計・創成・品質評価に資するものである。

### **4. 利用における感想(改善要望等を含む)**

生命創成探究センターでの遠隔利用、サンプル調製におけるサポート、周辺機器での分析を大変ありがたく思っております。今後もどうぞよろしくお願いいたします。

### **5. 今後の NMR プラットフォームに対する期待**

九州という遠方からの利用のため、現地に行くと旅費がかかりますが、現地に行ったほうが研究が進む側面もあります。旅費サポートが有るとより良いと思います。

### **6. 成果公開延期の希望の有無**

( ) あり : ( ○ ) なし

「あり」の場合理由:

### **7. その他**

### **8. 利用施設**

#### 生命創成探究センター

溶液 800MHz

利用期間 1: 20 年 月 日 ~ 20 年 月 日

利用期間 2: 2024 年 1 月 7 日 ~ 2024 年 1 月 10 日

## 9. その他の利用施設

なし