



# 展 TENBO 望

## 放射光 X 線により明らかとなった 抗体医薬品の作用メカニズム



玉田 太郎

Tamada Taro

((国研)量子科学技術研究開発機構 量子ビーム科学研究部門)

### 1 はじめに

抗体は生体内の防御機構～免疫～において重要な役割を果たしている分子（タンパク質）である。免疫は自然免疫と獲得免疫に大別できる。前者は生体内に常に存在する防御系で、体内に侵入してきた異物～抗原～に対して非特異的に機能する。一方、後者は後天的に獲得されるシステムで、一度記憶した抗原に対しては自然免疫よりも迅速かつ効率的に機能する。また、はしかやおたふくかぜなどに一度かかると二度とかからない（いわゆる「二度なし」）という現象も獲得免疫の特徴の1つで、これを利用した治療法が「ワクチン」の予防接種である。獲得免疫は「細胞性免疫」と「液性免疫」に大別することができ、前者はリンパ球系のT細胞（胸腺）が分化したキラーT細胞（細胞傷害性T細胞）が働く。後者は同じくリンパ球系のB細胞（骨髄）から産生される抗体が中心的な役割を果たす。

抗体は、『多様』な分子（抗原）それぞれに『特異的』に対応する能力がある。また、自己物質に対しては反応しない『寛容性』と上述のように「二度なし」という『記憶力』も併せ持つ。詳細については種々の教科書等を参照いただきたいが、本稿では『多様性』と『特異性』について少しだけ説明する。ヒトを含む哺乳類は5種類の抗体を持つが、全体の7割強をIgG（Ig：免疫グロブリンの略称）が占める。IgGは重鎖と軽鎖の2本のポリペプチド鎖から

構成されており、その折り畳まれた形状から一般的に「Y」の字で模式的に表わされる（図1）。「Y」の字の下半分が「Fc領域」、上半分が「Fab領域」と呼ばれるが、抗体は2つあるFab領域で抗原を特異的に認識する。実際には、Fab領域の更に半分（重鎖、軽鎖ともに約110アミノ酸）の「可変領域」（Fv領域）が抗原認識領域である。Fv領域を構成する遺伝子には種類の異なる（多いもので数十種）遺伝子ユニットが複数含まれており、その組み合わせの数は200万を超える。更に、B細胞が抗体を産生する際に生じる遺伝子の「組み換え」、「突然変異」も加わることによりその数は1兆に及ぶとされている。この抗体の『多様性』は利根川進博士が明らかにした現象で、この功績により1987年にノーベル医学・生理学賞を受賞している。

この抗体の『多様性』は遺伝情報が翻訳・合成さ

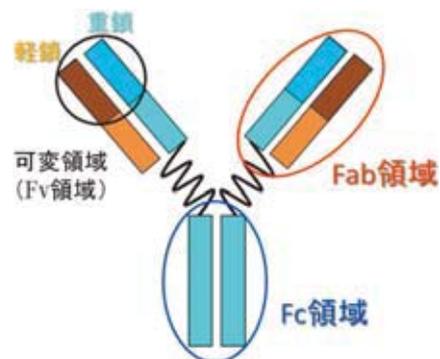


図1 抗体（IgG）の模式図

れたアミノ酸（ポリペプチド鎖）にも反映されるが、単に配列情報（1次構造）だけでなく、ポリペプチド鎖が折り畳まれた立体構造（3次構造）に反映され、その固有の立体構造が抗体の『特異性』を創出している。分子の特異的な認識はよく「鍵」と「鍵穴」に例えられるが、単に形状のみならず性質（電荷や疎水性など）が相補的に合致するように、抗体は多様な分子の中から目的の抗原を巧妙に認識し特異的に結合する。

抗体が有する極めて高い抗原認識特異性という特徴は医薬品に適した性質である。というのも、現行の医薬品の大きな問題の1つである副作用は、医薬品が本来作用すべきではない箇所に結合することも主要原因とされているためである。その点、抗体は目的の分子にピンポイントで作用することが可能なため、いわゆる「分子標的治療」（疾患に関係する特定の分子を狙い撃ちすることで副作用を抑えた治療効果が期待される）に多く用いられている。例えば、がん治療においては、様々な抗体が医薬品として臨床応用されており、進行・再発の大腸癌治療におけるベバシズマブ（商品名アバスタ）、乳癌治療におけるトラスツズマブ（商品名ハーセプチン）は、世界の医薬品売り上げのトップ10に入っている。

本稿で紹介する“KMTR2”も医薬品としての応用を目指した抗体の1つである。KMTR2はTRAIL-R2（腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド受容体-2）と呼ばれるタンパク質に作用することで、がん細胞特異的にアポトーシス（細胞死）の信号を伝える<sup>1)</sup>。これまでその詳細なメカニズムは明らかではなかったが、今回、放射光X線を用いて得られた精緻な原子構造情報に基づいた機能解析により明らかにした<sup>2)</sup>。本稿では、KMTR2（とTRAIL-R2）の構造の特徴と機能解明に繋がった着眼点を中心に、KMTR2の作用メカニズムを紹介する。

## 2 KMTR2/TRAIL-R2 複合体の立体構造解析

KMTR2はヒトのTRAIL-R2と相互作用し、がん細胞特異的にアポトーシスを誘導する抗体として、キリンビール(株)(現 協和発酵キリン(株))において、完全にヒトの配列を有する抗体を産生するマウス<sup>3)</sup>(KMマウス)から創製された。TRAIL-R2は細

胞表面に存在する膜タンパク質であるが、細胞の外側で特定の分子と相互作用することで、アポトーシスの信号を細胞の内部に伝える。実際に、KMTR2が認識するのもTRAIL-R2の細胞外の領域である。よって、今回の構造解析のターゲットとして、KMTR2のFab領域とヒトTRAIL-R2の細胞外領域を選択した。

それぞれを単量体として調製し、溶液状態で混ぜ合わせることにより、1:1で結合した複合体を作製し結晶化に供した。タンパク質の結晶は低分子（有機・無機）の結晶とは異なり、分子間には空隙も多く、溶液中で3次元的に規則正しく並んだ（浮かんだ）状態である。そのため、タンパク質の結晶は非常に脆く、かつ十分な回折能を示さないことも多い。そこで、放射光施設の強力なX線を利用することが必須であると考え、SPring-8のアンジュレータビームライン（BL41XU）にて回折実験を行った。放射光のような強力なX線を用いた場合、回折能は向上する半面、脆いタンパク質結晶はすぐに壊れてしまう。そこで、結晶を抗凍結液に浸し（上述のようにタンパク質結晶は空隙が多いため、抗凍結剤を分子間に浸み渡らせることが可能である）、液体窒素下で瞬間冷却することにより、低温状態で照射損傷を抑えた測定を実現した。その結果、2.1 Å分解能という原子レベルでの構造情報を知ることが可能な高い分解能で回折データを収集できた（図2）。

構造決定は既知のTRAIL-R2及びFab（抗原を認識する領域以外の立体構造は概ね保存されている）



図2 SPring-8 (BL41XU) での実験の様子  
タンパク質結晶（四角内：長辺で0.1 mmほどの小さな結晶）をセットし、窒素気流（100 K）下で回折実験を実施した。なお、この写真は約10年前に撮影したもので、現在の実験ハッチ内の仕様は大きく変更されている

の構造情報を用いた分子置換法という方法で行った。最終的に、約4,000原子（KMTR2の重鎖222アミノ酸、軽鎖214アミノ酸、TRAIL-R2 71アミノ酸：N末端側の約20アミノ酸とC末端側の約50アミノ酸は結晶中で揺らいでいるため観察できなかった、他に水分子276個、抗凍結剤として用いたグリセロールや結晶化条件に含まれた各種イオンも数分子ずつ）の精緻な構造情報を取得できた（図3）。KMTR2はTRAIL-R2のN末端側（細胞表面から一番離れた箇所）を認識していた。認識において、重鎖も軽鎖もほぼ同等に関与しており、図からわかるように、先端から伸びたループ（ひも状で示されている）で「絡め取る」ようにTRAIL-R2と結合していた。このループは“CDR”（相補性決定領域）と呼ばれており重鎖・軽鎖ともに3つずつ存在するが、Fv領域の中でも特に変化に富んだ領域で、まさに抗原と「相補的に」相互作用する直接の担い手である。なお、今回はKMTR2のFab領域単独の立体構造も決定したが、CDRの構造はTRAIL-R2複合体状態の構造とは異なっており、抗原を認識するように自在に変化していることもわかった。

四角内の拡大図から、KMTR2は多くの水素結合によってTRAIL-R2を認識していることがわかる（その中には水分子も介在している）。また、いくつかの環状の側鎖を持つアミノ酸（図ではH：ヒスチジン、Y：チロシン、W：トリプトファンと示している）も相互作用に関わっており、認識の様式が多様なこともわかる。これらの相互作用により、抗体

（KMTR2）が『特異的』に抗原（TRAIL-R2）を認識していることが明らかになった。

### 3 KMTR2はどのようにしてアポトーシスの信号を伝えるのか？

前節で述べたように、KMTR2のTRAIL-R2認識機構を放射光X線により原子レベルで明らかにすることができた。しかしながら、この情報だけではKMTR2がアポトーシスの信号をどのように伝え、がん細胞を細胞死に至らしめるのかを理解することはできなかった。先述のベバシズマブやトラスツズマブは受容体（TRAIL-R2とは異なる）を介する信号を“OFF”にすることで抗腫瘍作用を発揮する抗体で、医薬品の用語では、アンタゴニスト（拮抗薬・遮断薬）と呼ばれる。アンタゴニストの場合、本来信号を伝える分子（リガンドと呼ばれる）を「ブロック」している様子を明らかにすればいいので、その理解は比較的容易である。

一方、KMTR2はTRAIL-R2を介する信号を“ON”にすることでその作用を発揮するというアンタゴニストとは真逆の性質を持っている。このような物質を「アゴニスト（作動薬）」と呼ぶが、アゴニストが如何にしてその機能を発揮しているかを理解するためには、その状態をダイレクトに押さえる必要がある（図3で示した1:1複合体の構造情報だけではその理解は不十分だった）。先行研究において、KMTR2がアゴニストとしての活性を示す際に

TRAIL-R2を重合しているという知見があった<sup>2)</sup>。そこで、その重合の様子を今回の構造情報から迫ることができないかと考えた。先述のようにタンパク質の結晶においては、タンパク質分子が溶液中で規則正しく並んでいるが、その並びの中にKMTR2の機能を理解するヒントが隠れていると着想した。というのも、別のタンパク質（顆粒球コロニー刺激因子受容体）の研究の際に同様の経験をしたことがあったためである<sup>4)</sup>。

図4は図3で示した1:1複合体に結晶中の規則性に基づいて隣の分子（1:1複合体）を加えた「2:2複合体」である。この2:2複合体がTRAIL-R2重合の基本単位

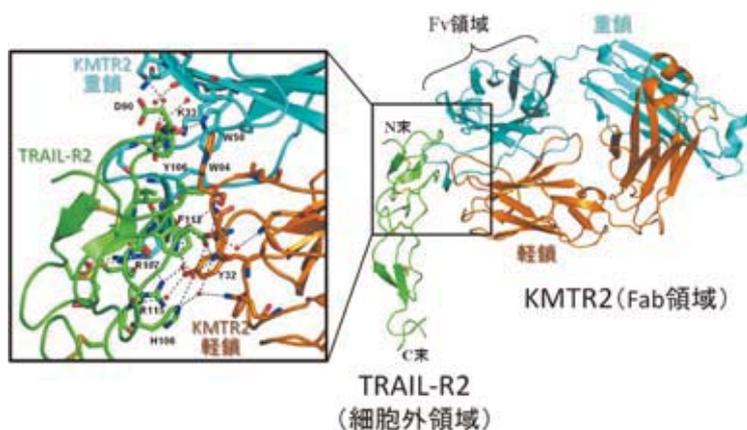


図3 KMTR2/TRAIL-R2複合体の立体構造  
KMTR2（Fab領域）とTRAIL-R2（細胞外領域）の1:1複合体として構造決定された。四角内がKMTR2とTRAIL-R2の相互作用部位の拡大図。点線は水素結合。小さな丸は水分子

となり、がん細胞におけるアポトーシス信号の伝達を司っているとの仮説を立てた。この仮説を実証するには如何にすればよいか。いくつかの案が浮かんだが、この2:2複合体が出来ないような細工を逆に施すことで、KMTR2によるアポトーシスの信号が遮断され、がん細胞の細胞死が抑制されれば、今回の仮説が実証されるというアイデアを検討することとした。

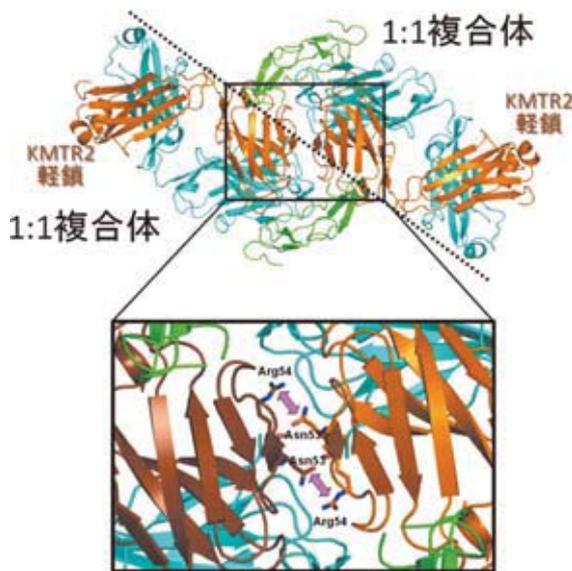


図4 結晶中に見出した2:2複合体構造  
1:1複合体が結晶中の規則性(点線:2回対称)に基づいて2:2複合体を形成していた。四角内は複合体が近接した様子の拡大図。軽鎖(CDR2)がお互いを認識している。なお、この図は図3を90度回転(下から見た)している

2つの1:1複合体間はKMTR2軽鎖のCDR2同士が近接していた。特に2つのアミノ酸(アスパラギンAsn53とアルギニンArg54)が最も近く、この2つのアミノ酸間の相互作用が2:2複合体形成に必須であると考えられた。そこで、この相互作用を解消するためにAsn53をアルギニンに置換した変異体(LkN53R)を作製した。アルギニンは嵩高かつプラスの電荷の側鎖を有するという特徴を持っている。Asn53をアルギニンに置換することで、Asn53とArg54間の相互作用はアルギニン同士が衝突かつ静電的に反発することにより解消されるはずである。LkN53R変異体を用いて種々の検証実験を実施した。

#### 4 仮説の実証

まず、この変異導入のTRAIL-R2の重合度への影響をゲルろ過クロマトグラム(溶液中の分子サイズを解析できる手法)で確認したところ、KMTR2は分子量が高い複合体(>20量体)が多く存在しているのに対し、LkN53Rはそのような複合体はほぼ消失し、ほとんどが単量体(1:1複合体)であった(図5a)。すなわち、図4で示した2:2複合体がTRAIL-R2重合の基本単位であることを実証できた。なお、変異導入による重合度の変化は別の手法(共焦点蛍光顕微鏡)を用いて、細胞レベルでも生じていることを確認した。

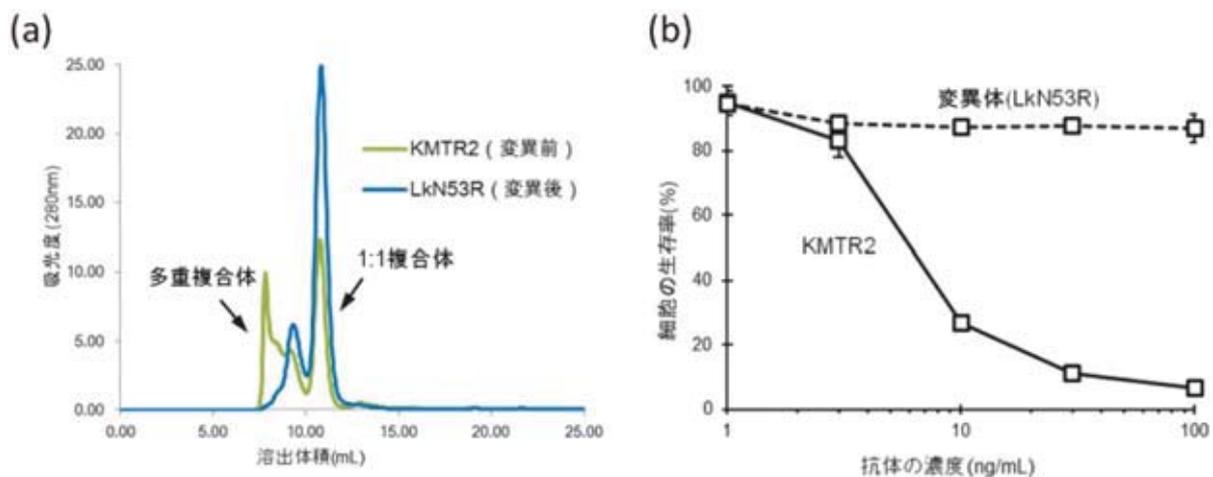


図5 仮説の実証結果  
(a) KMTR2及びLkN53RとヒトTRAIL-R2複合体のゲルろ過クロマトグラム。変異導入前後で重合状態が大きく変化していることが分かる。(b) 腫瘍細胞のアポトーシス誘導活性。変異を導入することにより腫瘍細胞の生存率は保たれた

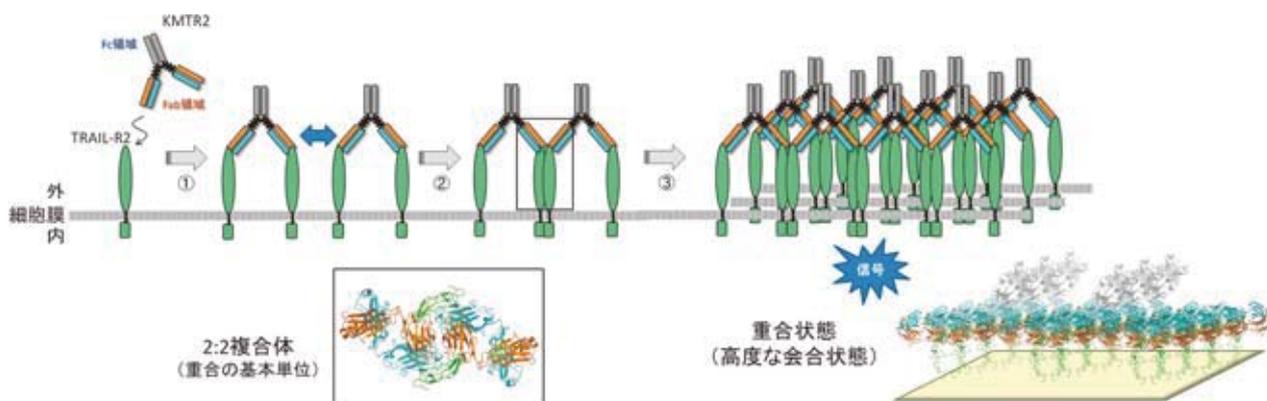


図6 KMTR2によるTRAIL-R2の高度な会合の様子(モデル)

①KMTR2は細胞の外側で、細胞膜上に存在するTRAIL-R2を認識・結合する。②KMTR2のFab(軽鎖)同士が認識し合うことで2:2複合体が形成される。③2:2複合体を基本単位として、細胞膜上でTRAIL-R2の高度な会合が形成され、アポトーシスの信号が伝達される

次に、アゴニスト活性への影響についてであるが、図5bに示すように腫瘍細胞のアポトーシス誘導活性には両者の間に大きな違いがあった。

KMTR2においては、濃度依存的にアポトーシスが誘導され、100 ng/mLの濃度においては腫瘍細胞がほとんど死滅していた(実線)。一方、LkN53Rは濃度をあげても細胞の生存率はほとんど変わらなかった(破線)。なお、TRAIL-R2への結合力に変化が無いことは複数の手法により確認済みであり、今回観察したアゴニスト活性の変化は図4の2:2複合体を基本単位とした重合状態が形成されるか否かに起因していることを実証することができた。

## 5 まとめ

放射光X線により取得した精緻な立体構造情報と、それに基づいて作製した変異体を用いた結晶を組み合わせることにより、結晶中に見出したKMTR2(Fab領域)とヒトTRAIL-R2(細胞外領域)の2:2複合体を基本単位として、TRAIL-R2の高度な会合が腫瘍細胞の表面で形成されることで、アポトーシスが誘導され細胞死が引き起こされるといふ作用メカニズムを原子レベルで初めて明らかにすることができた(図6)。KMTR2のようなアゴニスト抗体の作用メカニズムの詳細は不明なことが多

く、今回の結果はそれを原子レベルで解き明かしたという点で基礎科学的に意義深いですが、今回得られた知見に基づいて、新たな切り口での高機能な抗体分子の作製、引いてはより効果の高い抗がん剤の開発に繋がることを期待される。

### 【謝辞】

本研究は筆者がキリンビール(株)在職時から開始し、現所属の前身である(国研)日本原子力研究開発機構に移った後も継続することで完成した。一貫して本研究をご支援いただいた故黒木良太博士に御礼申し上げます。また、本稿に記載した内容は日本原子力研究開発機構の米澤悌博士(現所属:大正製薬(株))、協和発酵キリン(株)の新見大輔氏、池田昌弘氏、片岡之郎博士(現所属:(株)アネロファーマサイエンス)、森英治博士、元木一宏博士との共同研究の成果である。末筆ながら、改めて御礼申し上げます。

### 参考資料

- 1) Motoki, K., *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 3126-3135 (2005)
- 2) Tamada, T., *et al.*, *Sci. Rep.*, **5**, 17936 (2015)
- 3) Ishida, I., *et al.*, *Cloning Stem Cells*, **4**, 91-102 (2002)
- 4) Tamada, T., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3135-3140 (2006)