



ペプチド抗体と VEGF タンパク質からなる複合体結晶の立体構造解析

加茂昌之¹、道上雅孝²、伊中浩治¹、藤井郁雄²

1 (株)丸和栄養食品, 2 大阪府立大学・理学研究科

キーワード：ペプチド抗体, 血管内皮細胞増殖因子, ヘリックス・ループ・ヘリックス・ペプチド

1. 測定実施日

2020 年 6 月 16 日	BL2S1	(1 シフト)
2020 年 7 月 9 日	BL2S1	(1 シフト)
2020 年 9 月 9 日	BL2S1	(1 シフト)
2020 年 10 月 13 日	BL2S1	(1 シフト)

2. 概要

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は血管新生のカスケードの最上位に位置する分子である。がん細胞では活発に血管新生が行われており、VEGF-A と受容体の結合を阻害する薬剤はがん細胞の増殖を抑制することが期待されるため有効な抗がん剤となり得る。

現在、VEGF-A と受容体の結合を阻害する薬剤はアバスチンに代表される抗体医薬が主に用いられているが、製造コストや、その大きさ故に細胞膜を透過できない等の問題点も指摘されている。我々はこれらの抗体医薬の欠点を解消すべく、ヘリックス・ループ・ヘリックス構造に基づいたペプチド抗体の開発を進めている。今回は JAXA 高品質タンパク質結晶生成実験に応募し VEGF-A とペプチド抗体複合体の高分解能回折データを取得したので報告する。

3. 背景と研究目的

がん細胞は数 mm 以上の固形腫瘍へ成長するために血液の供給が必要であり、がん細胞の周辺では血管の形成（血管新生）が非常に活発に行われている。血管新生は多段階の反応を経て進むが、この一連の反応が始まるキッカケは、血管内皮細胞増殖因子（VEGF）が人体の受容体と結合することである。従って、VEGF に結合する物質は、VEGF と受容体との結合を阻害できるため、抗がん剤になり得る。

現在、VEGF と受容体の結合を阻害する薬剤はアバスチンに代表される抗体医薬が主に用いられているが、ヒトに対する抗原性を低下させるためのヒト化が必要であること、現在の抗体医薬のほとんどがモノクローナル抗体であるため生産には膨大なコストがかかることや、その開発、生産には特許が複雑に絡むこと、体内に滞留する時間が長いこと抗体医薬に対する中和抗体の発生やひとたび副作用が発生すると重大な局面を招きかねないこと、その大きさ故に投与方法が注射に限定されること、ならびに細胞膜を透過できないため細胞表面のタンパク質に対してしか作用できないこと等の問題点が指摘されている、昨今、疾患に関与するタンパク質は概ね細胞外に 20%、細胞内に 80%と言われているが、抗体医薬は前述のように細胞膜を透過出来ないため細胞内のタンパク質をターゲットとすることが出来な

い。これらの抗体医薬の欠点を解消すべく、我々は進化分子工学的手法を用いてヘリックス・ループ・ヘリックス構造に基づいたペプチド抗体の開発を進めている。X線結晶構造解析による詳細な結合様式の解明と進化分子工学による広範囲で迅速なスクリーニング技術を組み合わせることにより、抗体医薬の代替となり得るペプチド抗体の開発を目的とする。

4. 実験内容

ヒト由来 VEGF の受容体結合ドメイン(VEGF-A₈₋₁₀₉)は大腸菌 Origami2(DE3) 株を宿主として可溶性画分に発現した。ペプチド抗体(VS42-LR3) はファージディスプレイ法により選択され、化学合成により調製した。VEGF-A₈₋₁₀₉ と VS42-LR3 を混合した後、陰イオン交換カラムにより複合体のみを高純度に精製した。複合体の結晶化は硫酸アンモニウムを沈殿剤とする条件で行った。高分解能結晶を得ることを目的として JAXA 高品質タンパク質結晶生成実験に応募した。国際宇宙ステーション (ISS) のきぼう実験棟で作製した結晶と地上で作製した結晶をあいち SR BL2S1 で測定した。

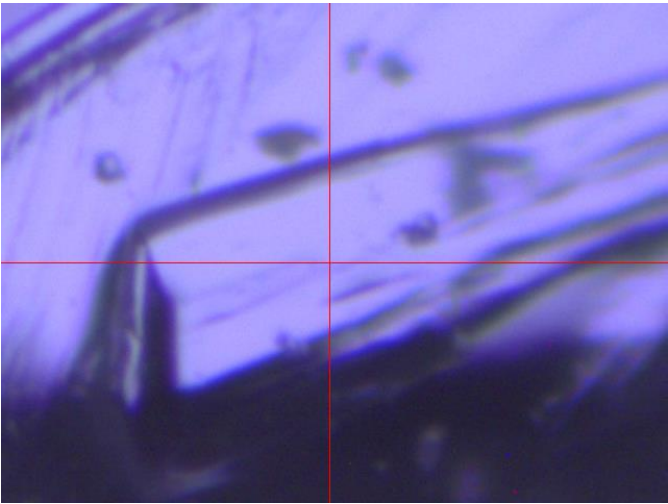


Fig.1 VEGF-A₈₋₁₀₉ と VS42-LR3 の共結晶
200709 AichiSR BL2S1 にて撮影

5. 結果および考察

2020 年 6 月から 9 月の間の 4 シフトのビームタイムで 11 個のデータセットを取得した。基本的な測定条件としては振動角 0.5°、露光時間は 1 フレーム当たり 5 秒間で行った。

	宇宙結晶	地上結晶
空間群	<i>P6₃22</i>	<i>P6₃22</i>
格子定数		
a, b, c (Å)	40.9, 40.9, 312.4	40.8, 40.8, 311.5
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 120.0	90.0, 90.0, 120.0
Resolution(Å)	35.41–2.10 (2.16–2.10)	77.86–2.51 (2.62–2.51)
<i>R</i> _{merge}	0.145 (0.971)	0.293 (1.392)
Completeness (%)	98.7 (98.3)	100.0 (100.0)
I / σ(I)	9.7 (2.2)	7.2 (2.0)
Redundancy	14.0 (15.0)	15.8 (18.1)

括弧内の数値は最も高分解能のシェルの数値を示す。

Table 1 宇宙結晶と地上対照結晶の回折データの統計値の比較

きぼう実験棟の微小重力環境下で作製した結晶は $2.1\text{ \AA}$ の分解能を示した。対して地上対照結晶の分解能は $2.5\text{ \AA}$ であり、微小重力下での結晶は顕著に分解能が向上していた。結晶はいずれも $P6_522$ の空間群に属しており、宇宙結晶の格子定数は $a = b = 40.89, c = 312.38\text{ \AA}$ 、地上結晶の格子定数は $a = b = 40.83, c = 311.45\text{ \AA}$ であり両者に大きな違いはなかった。回折データの精度を示す R_{merge} は宇宙結晶では 0.145 、地上対照結晶では 0.293 であった。この結果は宇宙結晶のほうが精度の高い回折データを取得できたことを示している。データの完全性はいずれの結晶でも最外角で 95% 以上であり構造解析に十分なデータを取得することが出来た。現在、構造解析を行っている。

6. 今後の課題

VEGF と VS42-LR3 複合体の結晶化に成功し JAXA 高品質タンパク質結晶生成実験を利用することにより、 $2.1\text{ \AA}$ 分解能の回折データを取得することが出来た。しかしながら、新規のペプチド抗体の開発に資するためには水分子も含めた詳細な分子モデルが必要であり、現在の分解能では不足であると考えられる。今回の結晶はきぼう実験棟の微小重力環境下で作製した結晶も含めて全て 20°C で作製したものである。現在、 4°C でも同じ条件で結晶が得られており、今後はこの結晶の解析ならびに 4°C での結晶化条件の最適化も進めていきたい。

また、今回得られた結晶は c 軸が $300\text{ \AA}$ と長く、回折実験時の回折斑点の重なりが懸念される。異なる格子定数を有する結晶化条件の探索も必要であると考えられる。