

免疫グロブリン G の Fc 領域の糖鎖の除去で open 構造は誘起されない: 溶液小角 X 線散乱による証明

Aglycosylation does not induce the open structure of Fc region of immunoglobulin G proven by solution small angle X-ray scattering

今村比呂志^{1,2}, 八桁清樹¹, 渋谷理紗³, 本田真也^{1,3*}

¹ 産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門, 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1

² 立命館大学生命科学部, 〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

³ 東京大学大学院新領域創成科学研究科, 〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

Hiroshi Imamura^{1,2}, Seiki Yageta¹, Risa Shibuya³, and Shinya Honda^{1,3*}

¹ Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

² Department of Applied Chemistry, College of Life Sciences, Ritsumeikan University, 1-1-1 Nojihigashi, Kusatsu, Shiga 525-8577, Japan

³ Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

1 はじめに

ヒト免疫グロブリン G1 (IgG1) の crystallizable fragment (Fc) 領域は、免疫グロブリンフォールドを有する 4 つのドメインをドーナツ状に配置した構造を有している。さらに C_H2 ドメインは N 結合型糖鎖を有しており、この糖鎖はドーナツの内側の空隙を埋めるように存在する (図 1)。この糖鎖は、Fc 領域の構造安定性と免疫応答に関与しており、糖鎖を除去すると免疫応答に関与する Fc 受容体との結合親和性が消失する。しかし、この現象の分子論的なメカニズムは、未だ完全には明らかにされていない。

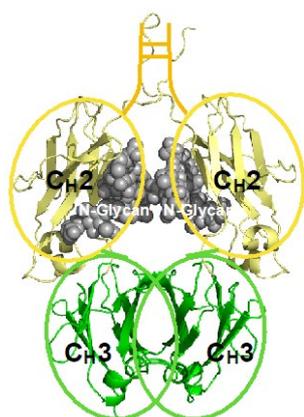


図 1. IgG1 の Fc 領域の結晶構造 (PDB: 1OQX).

これまでに糖鎖除去による結合親和性低下の要因として、いくつかの仮説が提案されている。その一つは、Fc 領域中の C_H2 ドメインの空間配置 (C_H2 ドメイン配向) の変化である。Borrok らの小角 X 線散乱 (SAXS) 法を用いた解析[1]では、糖鎖を除去した Fc 領域 (aglycosylated Fc; aFc) が、糖鎖を有する

Fc 領域 (glycosylated Fc; gFc) よりも大きな回転半径 (R_g) を示すことから、aFc の C_H2 ドメイン配向は gFc よりも外側に広がっている (=“糖鎖除去による open 構造の誘起”) と解釈した。しかし、その後の NMR の残余双極子相互作用を用いた解析[2]では、糖鎖除去による C_H2-C_H3 ドメイン間における配向に大きな変化は観測されず、先の SAXS 解析の解釈とは矛盾した結論が得られた。

そこで我々は、gFc と aFc を用意し、SAXS 測定を実施し、さらに過去の SAXS 解析では実施されなかった結晶構造を基に算出した SAXS の理論プロファイルと測定プロファイルとの比較を行い、溶液中における gFc と aFc の C_H2 ドメイン配向の特性を明らかにした[3]。

2 実験

SAXS 測定は BL10C のビームラインで行った。X 線の波長は 0.12 nm、カメラ長は 2028 mm とし、ベヘン酸銀の散乱パターンを用いて校正した。X 線散乱は、PILATUS3 2M (DECTRIS Ltd., Switzerland) で検出した。糖鎖を有する IgG1 の Fc 領域 (gFc) はパパインによる IgG1 の酵素分解処理で得た。糖鎖を有しない IgG1 の Fc 領域 (aFc) は *E. coli* の発現系で得た[1,2]。精製したサンプルの分子量、糖鎖の不均一性を LC-MS 分析により評価した (詳細は[4] 参照)。精製タンパク質溶解液を透析により 20 mM クエン酸-リン酸緩衝液 (pH 7.0) に調整し、透析液で 2-5 mg/mL に希釈して測定に供した。測定の温度は、25.0 ± 0.1°C に設定した。1 枚の画像データにつき 2 秒の X 線露光を行い、濃度条件毎に 15 枚のデータを取得した。画像の一次元化には Nika [5]を用いた。

3 結果および考察

図 1 に示した gFc と aFc の SAXS 解析より、回転半径 (R_g) は糖鎖除去 (gFc \rightarrow aFc) により増加していることが分かった。この傾向は Borrok らの報告 [1] と一致しているが、距離分布関数と構造モデリングの解析 ([3] に詳述) により、Borrok らの“糖鎖除去による open 構造の誘起”という解釈が妥当ではないことが分かった。図 1 に模式的に描いたように、タンパク質の形状は変化しなくても、糖鎖が除去されることで、糖鎖に由来する散乱が消失し、 R_g の増加が起こる [3]。

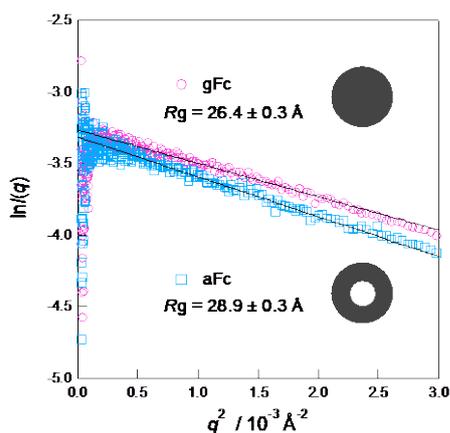


図 1. gFc と aFc のギニエプロットと R_g . 黒い球は gFc を表す. aFc は gFc と同じ大きさの球だが、糖鎖が除かれた部分 (白い部分) が空洞となった中空球で模式化した。

4 まとめ

糖鎖除去 (gFc \rightarrow aFc) により R_g は増加するが、 C_{H2} ドメイン配向は同等である。溶液中における gFc と aFc の距離分布関数と C_{H2} ドメイン配向のモデリング解析の詳細は既報 [3] を参照されたい。

謝辞

本研究の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の課題番号 JP17ac0101003 の支援を受けた。

参考文献

- [1] M. J. Borrok *et al.*, *ACS Chem Biol.* **7**, 1596 (2012).
- [2] G. Subedi *et al.*, *Structure* **23**, 9 (2015).
- [3] S. Yageta *et al.*, *mAbs* **11**, 453 (2019).
- [4] S. Yageta *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* **12**, 1443 (2015).
- [5] J. J. Ilavsky, *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 324 (2012).

成果

1. 本成果は Taylor & Francis 出版の mAbs (Volume 11, Issue 3, 2019) のカバーアートに選出された。
2. 小角 X 線散乱データは Small Angle Scattering Biological Data Bank (SASBDB) にそれぞれ SASDDG2, SASDDH2 として登録された。