



Title	熱力学的、速度論的、構造生物学的な解析手法を組み合わせたIgGとFc γ RIII の相互作用に関する研究
Author(s)	山口, 祐希
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/89489
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

熱力学的、速度論的、構造生物学的な解析手法を
組み合わせた IgG と FcγRIII の相互作用に関する研究

山口 祐希

2022年3月

大阪大学大学院工学研究科

生物工学専攻

目次

第一章 序論.....	4
第一節 IgG と抗体医薬品.....	4
第二節 FcγR と抗体医薬品	8
第三節 IgG と FcγRIII の結合部位に関する先行研究	12
第四節 IgG の糖鎖修飾と IgG-FcγRIII 相互作用に関する先行研究.....	15
第五節 抗原の結合と IgG-FcγRIII 相互作用における先行研究.....	18
第六節 博士論文構成.....	21
第二章 IgG-FcγRIII 相互作用の熱力学的および速度論的解析	23
第一節 緒言.....	23
第二節 実験材料および実験手法.....	25
第一項 材料.....	25
第二項 サンプルの精製.....	25
第三項 等温滴定カロリーメトリー (ITC)	26
第四項 バイオレイヤー干渉法 (BLI)	27
第五項 ネイティブ質量分析.....	27
第三節 結果.....	29
第一項 IgG1-FcγRIIIa 相互作用を駆動する熱力学パラメータの決定	29
第二項 IgG1-FcγRIIIa 相互作用を駆動する速度パラメータの決定	31
第四節 考察.....	33
第一項 IgG-FcγRIII 相互作用における Fab 領域の寄与	33
第二項 IgG-FcγRIII 相互作用に対する抗原の影響.....	34
第五節 小括.....	36
第三章 IgG-FcγRIII 相互作用の構造生物学的解析.....	37
第一節 緒言.....	37
第二節 実験材料および実験手法.....	39

第一項	材料.....	39
第二項	サンプルの精製.....	39
第三項	水素/重水素交換質量分析 (HDX-MS)	39
第四項	クロスリンク質量分析 (XL-MS)	41
第五項	XL-MS の距離制限に基づくタンパク質-タンパク質ドッキング	43
第三節	結果.....	44
第一項	フコシル化 IgG1 およびアフコシル化 IgG1 の高次構造の比較	44
第二項	HDX-MS による抗原および FcγRIIIa 結合時の IgG1 の観察.....	44
第三項	HDX-MS による IgG1 結合時の FcγRIIIa の観察	49
第四項	XL-MS の距離制限に基づく IgG1-FcγRIIIa 複合体モデル.....	51
第四節	考察.....	61
第一項	HDX-MS による IgG-FcγRIII 相互作用の 観察.....	61
第二項	Fab 領域の FcγRIII に対する結合部位	62
第三項	FcγRIII との結合に伴う IgG の構造変化.....	65
第四項	抗原の結合に伴う IgG の構造変化.....	66
第五節	小括.....	68
第四章	総括.....	69
補足資料	71
引用文献	89
発表論文	102
謝辞	103

第一章 序論

第一節 IgG と抗体医薬品

免疫グロブリン (immunoglobulin, Ig) は抗体とも呼ばれ、生体防御システムの免疫において、生体内に侵入した異物を認識し排除する重要な役割を果たしている。すべての Ig は、2本の軽鎖 (light chain, LC) と2本の重鎖 (heavy chain, HC) の4本のポリペプチド鎖が非共有結合およびジスルフィド結合で構成された Y 字型の構造をしており¹⁾、血液中や体液中に多く存在している。Ig は重鎖の違いに基づいて IgG、IgM、IgA、IgD、IgE の5つのクラスに分類され、さらに IgG は存在量の多い順に IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 の4つのサブタイプに分類される²⁾。IgG は Ig の全体量の 75% を占めており、IgG1 は IgG のおよそ 70% を占める。

IgG に関する初期の研究で、IgG はパパイン酵素で消化されると、抗原との結合能力を保持する2つの断片と簡単に結晶化する断片の3つに切断されることが報告されており³⁾、それぞれの断片に対応する領域が Fab (antigen binding fragment) および Fc (crystallizable fragment) と名付けられている。Fab 領域は、N 末端側の可変領域 (variable region) と呼ばれる配列変動性を示す VL および VH ドメインと、C 末端側の定常領域 (constant region) と呼ばれる配列が同一の CL および CH1 ドメインで構成される。VL と VH はすべての領域で配列変動性を示すわけではなく、相補性決定領域 (complementary determining region, CDR) と呼ばれる特に配列変動性の高い領域が3つ存在しており、この CDR の配列や構造の違いによって、IgG は特定の抗原に結合することができる。Fc 領域は2つの CH2 ドメインと2つの CH3 ドメインの定常領域のみで構成されており、Fab 領域の CH1 ドメインと Fc 領域の CH2 ドメインはヒンジ領域と呼ばれるリンカーでつながれている。また CH2 ドメインの 297 位のアスパラギン (N297) には N 型結合糖鎖 (Glycan) が付加されている (図 1)。

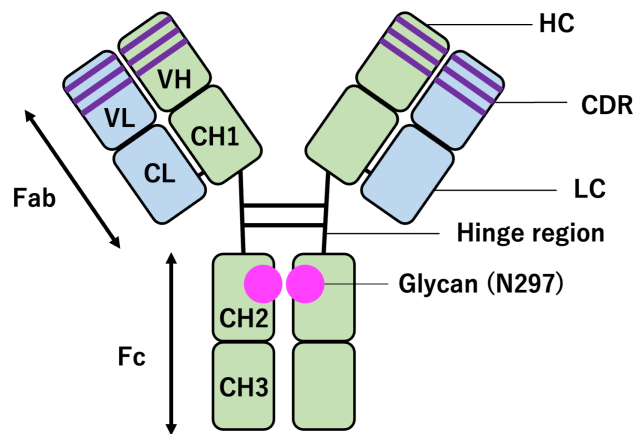


図 1. IgG1 の構造

抗体の研究のはじまりは、1890年に Behring と北里が、破傷風に対して免疫化されたウサギとマウスの血清に破傷風の毒素を中和する能力を持つ物質が存在することを報告したことによる⁴⁾。この論文では *antikörper*（ドイツ語で抗体）という表現は見受けられないが、のちにこの中和する能力を持つ血清成分が *Antibody*、すなわち抗体と呼ばれるようになった。抗体の正体が血清に存在するグロブリンであることは、1936年に Heidelberg と Pederson による、超遠心分離機を用いたウサギの肺炎レンサ球菌に対する抗体とウサギの血清成分の解析により、抗体の分子量が血清中のグロブリン成分の分子量の約 150,000 Da に非常に近いことが示されたことによって明らかにされた⁵⁾。続いて1939年には、Tiselius と Kabat による電気泳動を用いたさらに詳細な分析が行われ、ウサギのグロブリンは電気泳動度によってさらに α 、 β 、 γ の3つの画分に分けられること、ウサギの抗体は最もゆっくりと移動する γ -グロブリン画分に主に存在することが示され⁶⁾、抗体はグロブリンの中でも γ -グロブリン画分に属する血漿タンパク質であることが明らかになった。加えて、ウマの抗体は β と γ の両方の画分に存在したことから、質量の異なる抗体が存在することが示唆された。抗体の各成分は電気泳動度や沈降係数などに基づき、さまざまな呼び方がされていたが、1964年の世界保健機構の会議で、抗体の働きをするグロブリン成分は免疫グロブリン (*immunoglobulin, Ig*) と名称が統一することが決定され、最初に同定された最も

存在量が多い約 150,000 Da の γ -グロブリンは、IgG と名付けられた⁷⁾。

抗体が医薬品として利用されるようになったきっかけの 1 つは、B 細胞から算出される単一の抗体、すなわちモノクローナル抗体の生産技術の確立されたことである。生体内には何百万もの異なる抗体を産生する B 細胞が存在し、各 B 細胞は単一の抗体を産生する。生体が抗原 (antigen) にさらされると、この抗原を認識する能力をもつ B 細胞の刺激を引き起こし、刺激を受けた B 細胞は分裂を開始して、単一の抗体、すなわちモノクローナル抗体を産生する細胞のクローンを形成する。したがって、モノクローナル抗体を得るためには生体内から一種類の B 細胞を分取して培養すればいいが、動物細胞を長期間培養することは困難であった。1975 年に Köhler と Milstein は⁸⁾、骨髓腫細胞、すなわち骨髓で無限増殖するがん細胞と、特定の抗体を産生する B 細胞と融合させるハイブリドーマ技術により細胞培養で同一の抗体産生細胞を多数増殖させることに成功した。この技術を用いて、1986 年には、食品医薬品局により、世界で初めてモノクローナル抗体を利用した医薬品としてムロモナブ-CD3 が承認された⁹⁾。しかし、ムロモナブ-CD3 は免疫化されたマウスを用いて生産されたマウス抗体であったため、ヒトに投与した際に免疫系により排除され、副作用や有効性が低減する問題があった。

この問題を改善し、抗体医薬品の開発に進展をもたらしたもう 1 つのきっかけが、同時期の組換えタンパク質生産技術の発展である。1979 年に大腸菌を用いたインスリンの生産技術が確立され、医薬品として承認されたが¹⁰⁾、微生物の細胞では、真核生物のタンパク質が糖鎖修飾などの複雑な翻訳後修飾を持つタンパク質の生産が困難であるという課題があった。そこで動物細胞を用いた組換えタンパク質の生産技術の開発が進められた。1987 年には、チャイニーズハムスター卵巣 (Chinese hamster ovary, CHO) 細胞を用いて生産された組織プラスミノゲン活性化因子が、初めて哺乳類細胞を用いて生産された組換えタンパク質医薬品として承認された¹¹⁾。これらの組換えタンパク質生産技術の発展により、マウスとヒトの DNA を組み合わせた DNA を CHO 細胞に導入することで、よりヒトの IgG に近い抗体医薬品を生産することが可能となった。1997 年にはマウスの可変領域とヒトの IgG1 の定常領域を組み合わせたキメラ抗体であるリツキシマブが承認され、翌年

に CDR のみマウス由来で他の領域はヒトの由来の IgG1 であるヒト化抗体のトラスツズマブが承認された。さらに 2002 年には最初の完全ヒト抗体であるアダリムマブが承認され、これら抗体のヒト化技術やヒト抗体の作成技術は、抗体自身がもともと持っている抗原特異性の高さに加えて、抗体医薬品に対してヒトの免疫が働く免疫原性の問題を改善し、抗体医薬品の適用範囲を大幅に広げることとなった。抗体医薬品は有効性の高さと副作用の少なさから様々な病気の治療薬として積極的に開発されており、2020 年には抗体医薬品は治療薬の売上高上位 20 品目のうち 9 品目を占めたことに加えて、2021 年 4 月には 100 番目の抗体医薬品であるドスタリムマブが承認され、現在抗体医薬品の研究は医薬品開発において最も注目される分野の一つとなっている¹²⁾。

現在販売されている抗体医薬品の多くは、抗体の 5 つあるクラスのうち IgG が用いられている。理由としては、他の Ig と比較して幅広い抗原に結合できること、抗原特異性が高いこと、血中半減期が比較的長いことがあげられる^{2),13)}。IgG1 は IgG の 4 つあるサブクラスのうち、IgG1 が結合した標的細胞を破壊する免疫エフェクター機能である補体依存性細胞傷害 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) や抗体依存性細胞傷害 (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) を誘導する能力をもつために、がんの治療を目的とした抗体医薬品の有効成分として最も多く用いられている^{13),14)}。IgG3 も IgG1 と同様に、ADCC 活性および CDC 活性をもつが、安定性が低く凝集しやすいために免疫原性の問題があり、現時点で IgG3 の抗体医薬品は存在していない¹⁵⁾。また、IgG2 は ADCC 活性が小さく¹⁶⁾、IgG4 は CDC 活性を持たないため¹⁷⁾、IgG2 と IgG4 は抗体医薬品の設計においてエフェクター機能の誘導を調節および抑制したい場合に選択される¹⁴⁾。

第二節 FcγR と抗体医薬品

単球やリンパ球などの白血球上には Ig の各クラスと特異的に結合する受容体が存在し、それらは Ig の Fc 領域に結合することから Fc 受容体 (Fc receptor, FcR) と呼ばれる¹⁸⁾。FcR のうち、IgG に特異的に結合する受容体は FcγR という。白血球上に抗体の Fc 領域に特異的に結合する受容体が存在するという考えは、IgG に関する研究初期のロゼッタ形成アッセイによって確立された。その内容は、IgG によってコーティングされた赤血球は単球とロゼッタを形成するが、それらのロゼッタ形成は Fab 断片の添加ではそれほど阻害されない一方で、IgG や Fc 断片の添加によって顕著に阻害されるため、単球上には IgG の Fc 領域と特異的に結合する受容体が存在するといったものである¹⁹⁾。

ヒトの FcγR は FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIIa、FcγRIIIb の 6 つのクラスに分類される (図2)。さらに FcγRIIa は 131 位のアミノ酸残基が異なる H131 および R131、FcγRIIIa は 158 位のアミノ酸残基が異なる V158 および F158、FcγRIIIb は 4 つのアミノ酸残基が異なる NA1 (R36 N65 D82 V106) および NA2 (S36 S65 N82 I106) の多型を持つ。各 FcγR は構造や発現している白血球の種類、IgG の各サブタイプに対する親和性が異なっている²⁰⁻²²⁾。FcγRI は他のクラスと比較して IgG に対して高親和性 ($K_D \approx 10^{-8}$ M) で、FcγRII および FcγRIII は FcγRI よりも IgG に対して低い親和性 ($K_D \approx 10^{-6}$ - 10^{-7} M) を持つ。FcγR のうち、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIc、FcγRIIIa、FcγRIIIb は活性化型受容体、FcγRIIb が抑制型受容体である。炎症性サイトカインの放出や ADCC などのエフェクター機能が誘導される閾値は白血球上の活性化型受容体と抑制型受容体のバランスによって決まり、抑制型受容体の数が多いと閾値が高くなる²³⁾。グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー (glycosylphosphatidylinositol anchor, GPI anchor) 型の受容体である FcγRIIIb を除き、各 FcγR はシグナル伝達のための細胞内ドメインを持つ。活性化型受容体である FcγRIIa と FcγRIIc は免疫受容体活性化チロシンモチーフ (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) を含む単鎖の細胞内ドメインを持ち、FcγRI と FcγRIIIa は ITAM を含む 2 つの γ 鎖で構成されたホモダイマーである FcR γ サブユニットを持つ。これらの活性化 FcγR の ITAM は、免疫複合体によって凝集すると、Src ファミリーチロシンキナーゼによって

リン酸化され、活性化シグナルを伝達する。一方 FcγRIIb の受容体の細胞質内ドメインは、免疫受容体抑制チロシンモチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, ITIM) を含んでおり、免疫複合体によって活性化型受容体と一緒に凝集されると、負のシグナルを発する。FcγRIIb の ITIM は、活性化受容体の ITAM をリン酸化するのと同じ Src ファミリーチロシンキナーゼによってリン酸化され、抑制分子を動員し、抑制シグナルを伝達する²⁴⁾。

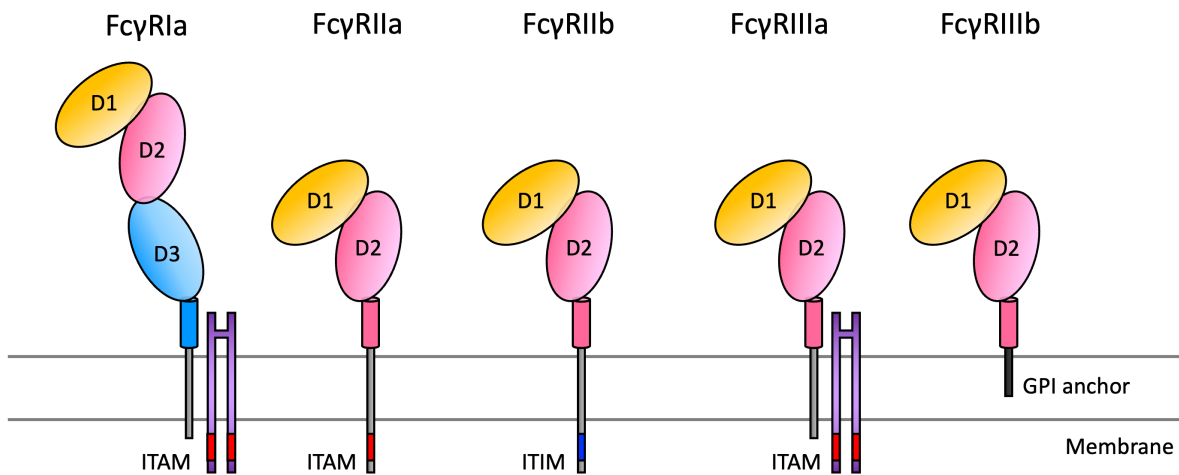


図 2. FcγR の構造

Caaveiro ら²²⁾の図 1 を参考に作成した。FcγR の D1 をオレンジ、D2 をピンク、D3 を水色で示している。

IgG と FcγR の相互作用によって引き起こされる免疫エフェクター機能のうち、標的の細胞を破壊する ADCC は、がんの治療を目的とした抗体医薬品が生体内での誘導を目的とする機能である。生体内に存在する多くの白血球上には活性化型および抑制型の FcγR が両方発現しているが、NK 細胞は他の白血球と異なり、抑制型の FcγRIIb が存在せず²¹⁾、FcγR ファミリー以外にも抑制型受容体を持たないために、ADCC の誘導において主要な免

疫エフェクター細胞である²⁵⁾。この NK 細胞上に主に存在する FcγR は FcγRIIIa である。FcγRIIIa は FcγRIII の 2 つあるアイソタイプのうちの一つで、もうひとつのアイソタイプである FcγRIIIb とは 97 %配列が同等である²²⁾。FcγRIII は二つの細胞外ドメインで構成されており、細胞膜より遠位のドメインはドメイン 1 (D1)、近位のドメインはドメイン 2 (D2) と呼ばれている。FcγRIIIa は NK 細胞のほかにも、単球、マクロファージに存在しており、FcγRIIIb は好中球と好塩基球上に存在している²⁴⁾。

FcγRIIIa が IgG の in vivo での抗腫瘍活性に必須であることは、1998 年に Clyne らによって活性型受容体である FcγRI および FcγRIIIa が共通して持っている γ 鎖を欠損させたマウスを用いた研究で初めて報告された²⁶⁾。続く研究で、抗体医薬品として販売されているリツキシマブやトラスツズマブでも同様に γ 鎖を欠損したマウスでは抗腫瘍活性の損失が見られたことに加え、抑制型受容体である FcγRIIb を欠損させたマウスでは抗腫瘍活性が増強することも明らかにされ²⁷⁾、抗体医薬品の抗腫瘍活性における IgG と FcγR の相互作用の重要性が示されている。

以上の経緯により、抗体医薬品の抗腫瘍活性を増強させ、より治療効果の高い医薬品を開発するための戦略として、アミノ酸置換や糖鎖改変などにより、IgG1 の FcγRIIIa に対する親和性を高め、より ADCC をより強く誘導するような抗体の研究が進められている²⁸⁾⁻³⁴⁾。実際抗体医薬品として市場に出ているモガムリズマブやオビヌツズマブは、糖鎖改変技術により、IgG1 がもつ糖鎖コアに付加するフコースの割合が低くなるように制御されている³⁵⁾。糖鎖改変技術の一つに POTELLIGENT[®]があり、これは抗体を生産する際の細胞に α 1,6-フコース転移酵素遺伝子が欠損した CHO 細胞を用いることで、フコースが結合していない抗体を取得することができる技術である。フコシル化されていない IgG1 は、FcγRIIIa に対する親和性がフコシル化されている IgG1 よりも強いため、ADCC 活性を高めることにつながる。さらに最近の研究により、IgG1 の Fc 部分を含む Fc 融合蛋白質による免疫複合体や抗体の凝集体、抗体とシリコンオイルの複合体によって FcγRIIIa を介した細胞シグナル伝達経路が活性化されることから、IgG1 と FcγRIIIa との相互作用が副作用や免疫原性に関連していることが示唆されている³⁶⁾⁻³⁸⁾。したがって、IgG1 と FcγRIIIa の相互

作用を詳細に理解することは、免疫機構の基礎的な理解に加えて、安全性と有効性の高い抗体医薬品の開発においても重要である。

第三節 IgG と FcγRIII の結合部位に関する先行研究

IgG に関する研究初期から、FcγR は IgG の Fc 領域に結合することが報告されてきたが、詳細な両者の結合部位は X 線結晶構造解析によって初めて明らかにされた。2000 年の Sondermann ら³⁹⁾を初めとし、これまでに IgG1 をヒンジ領域で切断した Fc 断片 (IgG1-Fc) と FcγRIII の複合体の結晶構造が複数報告されており、いずれも IgG1 の CH2 ドメインのヒンジ近傍と FcγRIII の D2 および D1-D2 間のリンカーの領域が相互作用することが示されている⁴⁰⁻⁴⁷⁾。詳細には、IgG1 側において CH2 の L234-S239 および D265-E269、N297-T299、A327-I332 が、FcγRIII において D1-D2 のリンカー領域の I85-W87、D2 の W110-A114、D126-H132、V155-K158 および H116-T119 のアミノ酸が結合に関与していると報告されている³⁹⁾ (図 3)。この結果は Fc 領域のアミノ酸を置換した際に FcγRIIIa に対する親和性が変化する残基と同じであること³³⁾、FcγRIIIa の多型である F158 と V158 が IgG1 に対する親和性が異なることによっても支持される⁴⁸⁾。しかし、これらの成果はあくまでも IgG1-Fc のみを用いた結果に基づいており、全長 IgG1 (すなわち、Fab 領域と Fc 領域の両方を含む) と FcγRIII 間の相互作用部位はいまだに不明である。その理由の一つとして、IgG を含む複合体の結晶化が難しいことが挙げられる。実際、これまでに全長 IgG の結晶構造は、ヒト IgG1 (PDB: 1MCO⁴⁹⁾)、マウス IgG2a (PDB: 1IGT⁵⁰⁾)、マウス IgG1 (PDB: 1IGY⁵¹⁾)、ヒト IgG1 (PDB: 1HZH⁵²⁾)、ヒト IgG4 (PDB: 5DK3⁵³⁾) ヒト IgG4 (PDB: 6GFE⁵⁴⁾) の 6 つに限られており、いずれも IgG のみの結晶である。

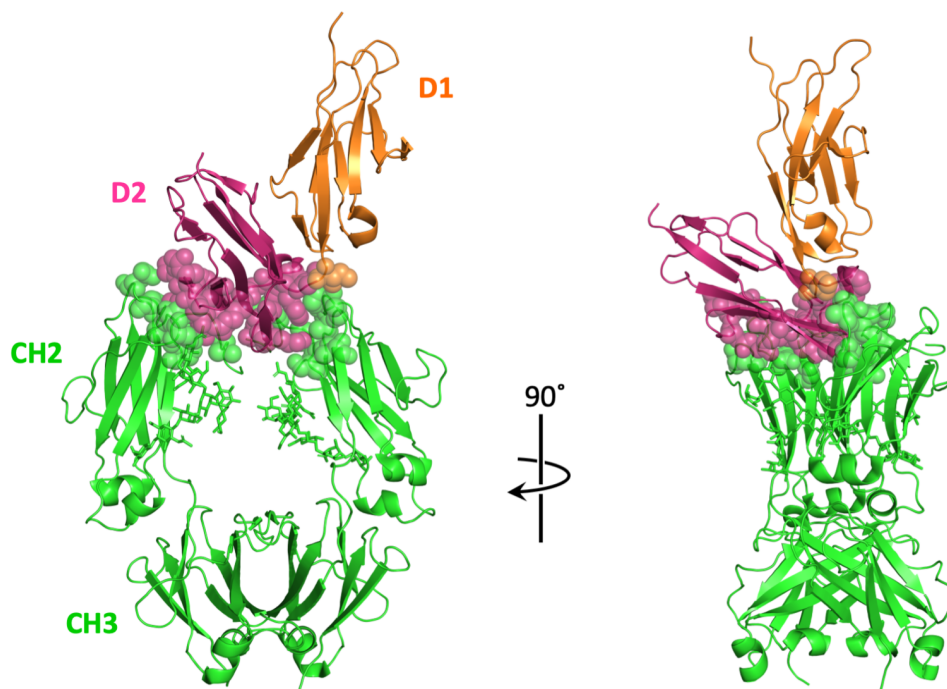


図 3. 報告されている IgG1-Fc-Fc γ RIII 複合体の結晶構造

IgG1-Fc-Fc γ RIII (PDB: 1E4K³⁹) の IgG1-Fc を緑、Fc γ RIII の D1 をオレンジ、D2 をピンク、結晶構造より IgG1-Fc と Fc γ RIII の結合に寄与しているとされるアミノ酸残基を球体で示した³⁹。図は PyMOL Molecular Graphics System, version 2.0 (Schrödinger) を用いて作成した。

生体内では、IgG は Fab 領域で抗原を認識したのちに免疫細胞を動員することで、エフェクター機能を誘導している、すなわち IgG は全長でその機能を発揮している。そのため、本博士論文の著者を含む研究グループは、Fc 領域と Fc γ RIII の相互作用のみでは、実際の IgG と Fc γ RIII の相互作用を議論するには情報が不足していると考え、全長の IgG と Fc γ RIII 間の相互作用を明らかにすることを目的として研究を行ってきた。2019 年には、高速原子間力顕微鏡 (high-speed atomic force microscopy, HS-AFM) によって、IgG1 と対応する IgG1-Fc の基盤表面に固定化した Fc γ RIIIa 分子に滞留時間を比較したところ、IgG1 が IgG1-Fc よりも 3 倍程度長く Fc γ RIIIa 上にとどまることを報告した。また同論文にて、抗

A 型肝炎ウイルス IgG1 抗体 (PMF37) を使用して行った水素/重水素交換質量分析 (hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry, HDX-MS) により、FcγRIIIa と結合した際に PMF37 において、報告されている Fc 領域の結合部分に加えて、Fab 領域にも重水素交換率の低下を示す領域が存在することを示し、IgG の Fc 領域だけではなく、Fab 領域も IgG-FcγRIII 相互作用に関与している可能性を示した⁵⁵⁾。さらに同時期に Shi ら⁵⁶⁾が高速光化学的酸化法 (fast photochemical oxidation of proteins, FPOP) を用いて、FcγRIII との相互作用の際に Fab が構造変化する可能性を報告したことに加えて、他のグループも分子動力学 (molecular dynamics, MD) シミュレーションに基づいて Fab と FcγRIII が相互作用する可能性を報告した^{57),58)}。このように、従来、IgG-FcγRIII 相互作用には、IgG の Fc 領域のみが介在すると考えられてきたが、近年では Fab 領域も関与しているという見方が支持されるようになってきている。

第四節 IgG の糖鎖修飾と IgG-FcγRIII 相互作用に関する先行研究

多くのタンパク質において、タンパク質の代表的な翻訳後修飾である糖鎖付加はタンパク質の構造や機能などに影響を与えることが知られているが、IgG1 や FcγRIIIa も例外ではない。IgG1 は CH2 ドメインの N297 に N 型結合糖鎖が付加されており、この糖鎖修飾を欠損させると、Fc 領域の構造が変化することや FcγR に対する親和性が低下することが報告されている^{59),60)}。一方 FcγRIIIa は 5 か所に糖鎖修飾を受けており、N45 に付加された糖鎖は IgG1 に対する親和性を弱める働きをし、N162 に付加された糖鎖は IgG1 との親和性を強める働きをすることが示されている⁶¹⁾。

IgG1 の N297 に付加された糖鎖は様々なプロファイルを持つ。これらの糖鎖プロファイルは主に 3 つの型に分類され、すべて N-アセチルグルコサミン (GlcNac) 2 つとマンノース 3 つで構成される共通のコア構造を持つ (図 4)。コア構造に、2 つに枝分かれした GlcNac が続き、2 本の GlcNac の片腕あるいは両腕にガラクトース、もしくはそのガラクトースにさらにシアル酸が結合した糖鎖構造を複合型糖鎖 (complex type) という。複合型糖鎖は、コアにフコースが付加するケースが多いという特徴を持つ。また、マンノース残基が 2~6 個結合した分岐型マンノース構造がコア構造に結合している糖鎖を、高マンノース型 (high mannose type) 糖鎖という。高マンノース型糖鎖では、コアにフコースが付加した糖鎖は存在しない。ハイブリッド型 (hybrid type) 糖鎖は、高マンノース型と複合型の両方がコアに結合した構造を持つ糖鎖構造のことを指し、コアにフコースが付加している場合としていない場合がある。第二章でも述べたが、治療効果の高い抗体医薬品の開発の標的として、糖鎖プロファイルと IgG の構造および FcγR に対する親和性の変化等の関係性を調べる研究が数多く行われている⁶²⁾。

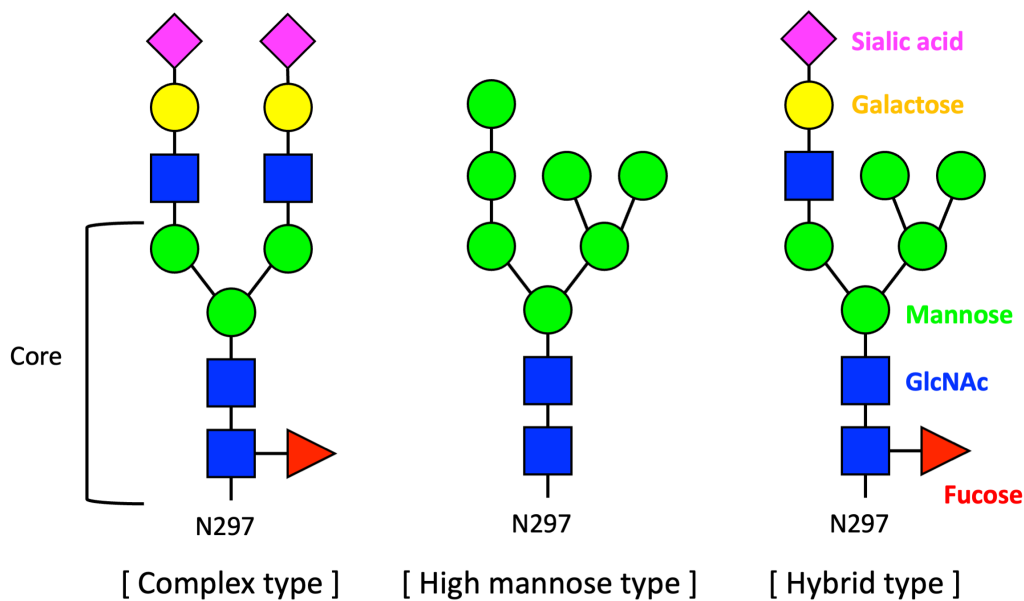


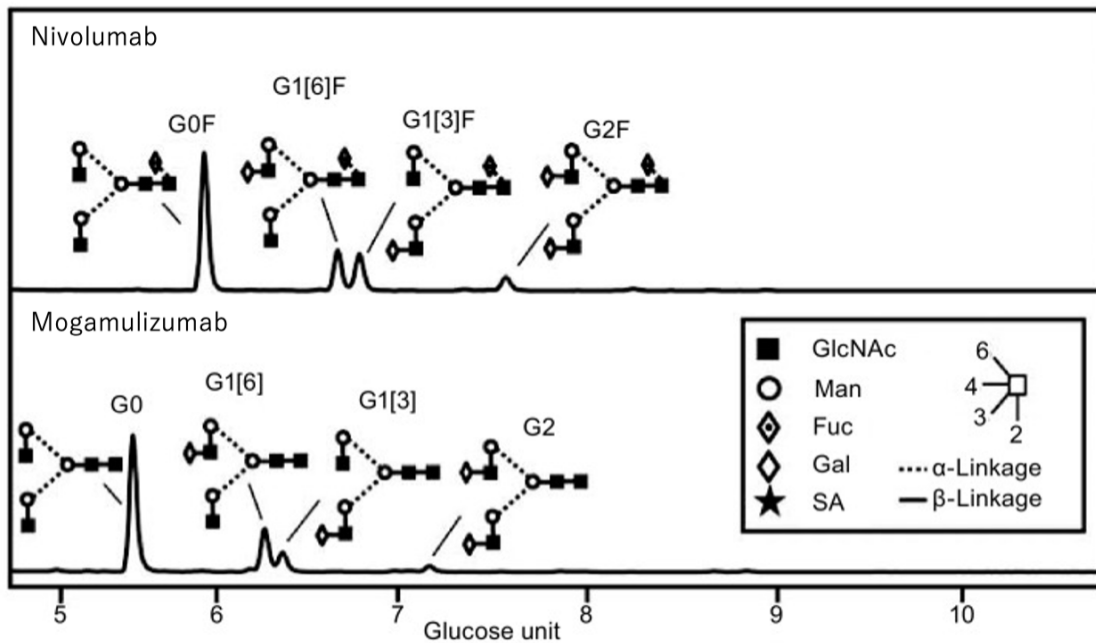
図 4. 複合型、高マンノース型、ハイブリッド型糖鎖の例。

青の四角が GlcNAc、緑の円がマンノース、黄の円がガラクトース、マゼンタのダイヤがシアル酸、赤の三角がフコースを表す。

IgG1 の糖鎖プロファイルのうち、IgG1 の FcγRIIIa との相互作用に大きな影響を与える糖の 1 つが、糖鎖コアに付加するフコースである。コアフコースを除去すると、CH2 の糖鎖が付加している領域の周辺に局所的な構造変化を引き起され^{63),64)}、FcγRIIIa の D2 の N162 糖鎖と K128 に挟まれた CH2 の Y296 の芳香環の向きが安定化されることが報告されている⁴⁵⁾。この局所的な構造変化が、アフコシル化 IgG1 の FcγRIIIa に対する結合において、エンタルピー (ΔH) の増加と会合速度定数 (k_{on}) の増加をもたらし³⁰⁾、結合親和性の上昇と ADCC 活性を増強に寄与していると考えられている^{28),29)}。

実際販売されている抗体医薬品は、複数の糖鎖プロファイルを持つ IgG が混在しており、その量比が異なっている。図 5 に Mimura ら⁶⁵⁾が抗体医薬品を用いて糖鎖分析を行った例を示す。ここで用いられているニボルマブ (Nivolumab) はアフコシル化 IgG4、モガムリズマブ (Mogamulizumab) がアフコシル化 IgG1 である。それぞれ複数の糖鎖プロファイ

ルが同定されており、フコースの有無が異なっているという結果が得られている。



IgG	Sialylation (%)	Terminal galactose (%)	Terminal GlcNAc (%)	Core fucose (%)
Nivolumab	1.3	42.4	56.3	100
Mogamulizumab	0	36.3	63.7	0

図 5. 親水性相互作用クロマトグラフィーによる抗体医薬品の糖鎖分析の例。

Mimura ら⁶²⁾の図 1 および表 1 より一部抜粋および改訂して作成した。

第五節 抗原の結合と IgG-FcγRIII 相互作用における先行研究

ADCC や CDC などの IgG が介在するエフェクター機能は、IgG が抗原を認識した後に、免疫細胞や補体が動員されることによって誘導される。したがって抗原の結合が IgG に免疫細胞や補体の動員を促すように働いているのではないかという仮説のもと、抗原の結合に伴う IgG の構造変化に関して研究が行われてきた。2003 年に Oda ら⁶⁶⁾は、ブトウ球菌由来のタンパク質で CH2-CH3 間に結合するプロテイン A および CH1 に結合するプロテイン G に対する IgG の結合親和性が、抗原を添加した際に変化することを報告した。この結果は、抗原の結合が、抗原の結合部位である CDR が存在する IgG の可変領域だけではなく、定常領域側にも影響を及ぼすことを示唆するものであった。

抗原結合に伴う Fab 領域に関する構造変化については、2012 年に Sela-Culang ら⁶⁷⁾によって、抗原に結合した状態としていない状態の IgG の Fab 領域 (IgG-Fab) の X 線結晶構造の比較から、抗原結合によって定常領域である CH1 の第一ループ (CH1_1 ループ) に構造変化が生じることが報告されている (図6)。また同論文にて、タンパク質のような大きな抗原が結合すると CH1_1 ループに比較的大きな構造変化が生じるが、ペプチドのような小さな抗原が結合してもわずかな構造変化しか生じない傾向にあることも報告された。この発見は、近年 Qaraghuli ら⁶⁸⁾の研究によっても確認されており、Fab 領域内の定常領域の構造変化の仕方は、タンパク質抗原の高次構造の違いによって 3 つのグループに分類できることが示された。さらに、Sun ら⁶⁹⁾によって、CH1_1 ループを含むペプチド (残基 148-210) が抗原との結合時に溶媒に対するアクセス性が増加することが、ヒドロキシラジカルフットプリント法 (hydroxyl radical foot printing, HRF) を用いた解析によって明らかにされており、このことも抗原の結合によって CH1_1 ループに構造変化が生じることを支持している。

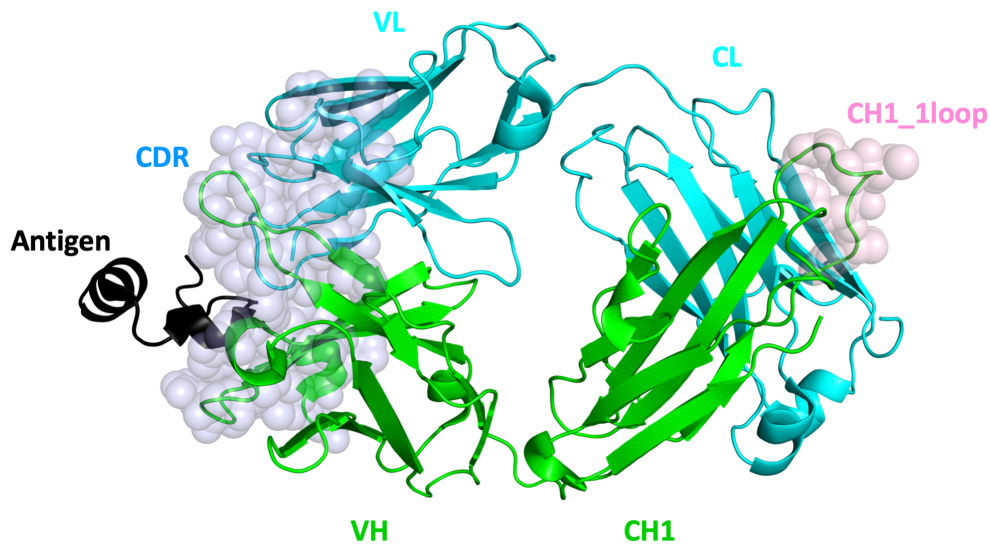


図 6. 報告されている抗原-IgG-Fab 複合体結晶構造。

Sela-Culang ら⁶⁷⁾の図 1 を参考に作成した。リツキシマブの Fab とリツキシマブの抗原 (antigen) である CD20 のペプチドの複合体の結晶構造 (PDB: 2OSL⁷⁰⁾) について、重鎖を緑、軽鎖をシアン、抗原を黒で示している。abYsis (<http://www.abysis.org/abysis/>) で同定された CDR と CH1_1 ループ (CH1_1loop) を球体で示した³⁹⁾。図は PyMOL Molecular Graphics System, version 2.0 (Schrödinger) を用いて作成した。

一方、Fc 領域の構造変化に関しては、2019 年に Zhao ら⁷¹⁾による MD シミュレーションにより、抗原の結合が Fab 領域と Fc 領域の配置を固定し、IgG の構造を Fc 領域に存在する FcγR との結合部位を開くような構造に偏らせることが報告されている。それに続く形で、2020 年に Orlandi ら⁷²⁾が酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法と HDX-MS を用いて、抗原の結合が FcγRIIIa との親和性を増加させること、抗原が結合すると CH2 に存在する FcγRIIIa の結合部位の重水素交換率が変化することを報告した。同年、Sun らによって、抗原の結合が Fc 領域の CH2-CH3 界面の残基にも構造変化を引き起こし、その構造変化部位が胎児性 Fc 受容体 (neonatal Fc receptor, FcRn) の結合部位と一致していること、ならびに抗原の結合が FcRn との親和性を増加させることが報告されている⁶⁹⁾。2021 年には、表面プラズモン共鳴法 (surface plasmon resonance, SPR)

を用いて IgG と FcγR の結合親和性を測定する際に、IgG の固定化に抗原を用いると FcγR との親和性が増加するという結果も報告されており⁷³⁾、抗原の結合は CDR だけではなく Fc 領域の FcγRIII との結合部位に構造変化をもたらすことで、IgG-FcγRIII 相互作用に影響を与えることが示されている。

第六節 博士論文構成

IgG と Fc γ R の相互作用は、これまで Fc 領域のみによって行われると考えられてきたが、近年、IgG-Fc γ RIII 複合体の形成には Fab 領域と Fc 領域の両方が関与している可能性が示唆されてきた⁵⁵⁾⁻⁵⁹⁾。しかし、Fab の IgG-Fc γ RIII 相互作用に対する役割や、Fab と Fc γ RIII の空間的な配置は実験的には明らかにされておらず、研究が必要である。また、IgG の糖鎖プロファイルや抗原の結合が、IgG と Fc γ RIII との相互作用に影響を与えることが多数報告されているが^{28)-30),71)-73)}、これらは主に Fc と Fc γ RIII 間の相互作用に注目されて議論されてきており、IgG の糖鎖プロファイルの違いや抗原の IgG への結合が Fab と Fc γ RIII 間の相互作用に与える影響についても検証が必要である。以上の背景により、本博士論文では、IgG-Fc γ RIII 相互作用に対する Fab 領域の役割を、IgG の糖鎖プロファイルおよび抗原の結合の影響も含めて包括的に理解することを目的とし、糖鎖修飾としてフォーースが付加している市販の抗体医薬品と付加していない抗体医薬品の両方を用いて解析を行った。

第二章では、IgG-Fc γ RIII 相互作用における Fab 領域の役割を熱力学および速度論的な観点から明らかにすることを試みた。熱力学および速度論的な解析には等温滴定カロリメトリー法 (isothermal titration calorimetry, ITC) バイオレイヤー干渉法 (bio-layer interferometry, BLI) を用いた。熱力学解析には 4 種類の抗体医薬品、速度論解析には 3 種類の抗体医薬品をサンプルとして使用した。その結果、IgG1 は IgG1-Fc と比較して、Fc γ RIIIa との結合に伴ってエンタルピーを獲得したほか、解離速度が遅くなっており、Fab 領域は IgG の Fc γ RIII との相互作用を安定化することが明らかになった。一方でエントロピー損失が大きく、会合速度が遅くなるため、平衡解離定数 (K_D) の変化はわずかであった。また、抗原の存在下では、IgG1 の Fc γ RIIIa から解離する速度が遅くなることが示され、抗原の結合は IgG と Fc γ RIII の相互作用を安定化させる方向に働くことが明らかとなった。

第三章では、糖鎖プロファイルおよび抗原の結合の影響を含めた IgG-Fc γ RIII 相互作用の構造生物学的な観点から明らかにする事を目的とした。まず、糖鎖プロファイルの違

いが IgG-FcγRIII 相互作用にどのように影響するかを調べるために、フコース付加の有無が異なる市販の抗体医薬品を 2 種類用いて、HDX-MS とクロスリンク質量分析 (XL-MS) による構造解析を行った。さらに IgG1 に抗原が結合した状態で HDX-MS の解析を行い、抗原が引き起こす IgG の構造変化がどのように IgG-FcγRIII 相互作用に影響するかを検証した。XL-MS と HDX-MS の結果から、IgG の Fab 領域の CL ドメインが FcγRIII に近接しており、FcγRIII の D1 および D2 と特異的に相互作用していることが明らかとなった。また、先行研究では、CH1 ドメインと FcγRIIIa の相互作用が報告されていること、HDX-MS の結果において FcγRIIIa の存在下で CH1 ドメインに重水素交換率が優位に低下した領域が見られたことから、Fab 領域の CH1 ドメインにも FcγRIII に対する結合部位が存在することが明らかとなった。したがって Fab-FcγRIII 相互作用には CL-FcγRIII 相互作用と CH1-FcγRIII 相互作用の 2 つのパターンが存在しており、検出できる相互作用は分析方法によって異なるということが明らかになった。さらに、これらの相互作用は、IgG の糖鎖修飾のフコース付加の有無に関わらず、本質的には同じであるが、Fc-D2 相互作用はアフコシル化によって増強される一方で、Fab の寄与はわずかに減少することが示された。また、抗原の結合に伴う Fab の構造変化の仕方は抗原の種類によって異なるものの、構造変化が生じた Fab の領域は Fab の FcγRIII との結合部位と同じであることが示された。第二章で示された抗原の結合が IgG の FcγRIII からの解離を遅くするように寄与することを考慮すると、抗原の結合に伴って Fab 領域には IgG と FcγRIII の複合体の形成を安定化させる働きをする構造変化が生じていることが明らかとなった。

第四章では、第二章、第三章の結果をふまえて、新しい IgG と FcγRIII の結合モデルを提案し、全体の総括とする。本博士論文で提案する、熱力学的、速度的、構造生物学的なデータから導かれる新しい結合モデルは、IgG-FcγRIII 相互作用に関する新しい洞察をもたらし、IgG-FcγRIII 相互作用の包括的な理解と、より有効性と安全性を高い抗体医薬品を開発するための新たな戦略に寄与することが期待される。

第二章 IgG-Fc γ RIII 相互作用の熱力学および速度論的解析

第一節 緒言

IgG と Fc γ R の相互作用は、これまで Fc 領域のみによって行われると考えられており、IgG1-Fc-Fc γ RIII 複合体の結晶構造解析によって、CH2 ドメインが Fc γ RIII の D2 に対する結合部位を形成していることが明らかにされている³⁹⁾⁻⁴⁷⁾。一方で、近年本博士論文の著者を含む研究グループ、ならびに他のグループによる溶液中での IgG-Fc γ RIII 相互作用に関する実験データや、MD シミュレーションにより、IgG-Fc γ RIII 複合体の形成には Fab 領域と Fc 領域の両方が関与していることが示されてきた⁵⁵⁾⁻⁵⁹⁾。しかし、IgG-Fc γ RIII 相互作用に Fab が寄与していることを定義する熱力学および速度パラメータは未解明であった。

以上の背景より、本研究では IgG-Fc γ RIII 相互作用における Fab の寄与を熱力学および速度論的な観点から明らかにすることを目的とした。IgG には、市販されている抗体医薬品からリツキシマブ（抗 CD20 マウス/ヒトキメラ IgG1）、アダリムマブ（抗 TNF ヒト IgG1）、トラスツズマブ（抗 HER2 ヒト化 IgG1）、モガムリズマブ（抗 CCR4 ヒト化 IgG1）の 4 種類を用いた。以下の文章ではリツキシマブを Rtx、アダリムマブを Ada、トラスツズマブを Trz、モガムリズマブを Mog と表記する。これら 4 種類の IgG1 は 2 種類の糖鎖プロファイル、すなわちフコシル化 IgG1 である Rtx、Ada、Trz と、アフコシル化 IgG1 である Mog に分けられる。これらから精製した Fc 断片 (IgG1-Fc) と熱力学パラメータの取得には ITC を用いた。ITC はリガンドおよびアナライトの固定化を行うことなく、直接熱力学パラメータ（ギブス自由エネルギー (Gibbs free energy) 変化; ΔG 、エンタルピー (enthalpy) 変化; ΔH 、エントロピー (entropy) 変化; ΔS) および平衡解離定数 (K_D) の値を得ることができる唯一の手法である。速度パラメータ（会合速度定数; k_{on} 、解離速度定数; k_{off} 、平衡解離定数; K_D) の取得には BLI を用いた。BLI は比較的新しい手法ではあるが、従来用いられてきた SPR 同様に、ラベルフリーかつリアルタイムで解離会合速度パラメータを取得でき、SPR と同等の値を得ることができる手法である⁷⁴⁾。BLI では生体内での状況を模倣するため、リガンドとして Fc γ RIIIa をバイオセンサー上に固定し、アナライトに IgG1 もしくはそれに対応する IgG1-Fc、抗原を飽和させた状態の IgG1 を用いて測定

を行った。

本章では、まず ITC を用いて取得した、IgG1 と Fc γ RIIIa、IgG1-Fc と Fc γ RIIIa の相互作用を定義づける熱力学パラメータを示し、IgG-Fc γ RIII 相互作用に対する Fab の寄与を熱力学的な観点から議論する。次に BLI を用いて取得した、フコシル化 IgG1 である Rtx と Ada、アフコシル化 IgG1 である Mog について、IgG1 および IgG1-Fc の Fc γ RIIIa への結合時における速度パラメータを示し、IgG-Fc γ RIII 相互作用に対する Fab の寄与を速度論的な観点から議論する。さらに Ada の抗原であるヒト腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) と、Mog の抗原である CC ケモカイン受容体 4 ペプチド (CC chemokine receptor 4 peptide, CCR4p) を用いて BLI の測定を行った結果を示し、抗原の存在下および非存在下における速度パラメータの違いから、抗原の IgG への結合が IgG-Fc γ RIII 相互作用に与える影響の検証も試みる。

第二節 実験材料および実験手法

第一項 材料

抗 CD20 マウス/ヒトキメラ IgG1 であるリツキシマブ (Rituximab, Rtx) および抗 HER2 ヒト化 IgG1 であるトラスツズマブ (Trastuzumab, Trz) は中外製薬株式会社から購入した。抗 TNF ヒト化 IgG1 であるアダリムマブ (Adalimumab, Ada) は、エーザイ株式会社から購入した。抗 CCR4 ヒト化 IgG1 であるモガムリズマブ (Mogamulizumab, Mog) は協和キリン株式会社から購入した。Mog の標的抗原である CCR4p は Scientific peptide 社から購入した。Ada の標的抗原であるヒト可溶性 TNF は、所属研究室における先行研究で使用した、シスメックス研究開発センターで生産されたものを使用した³⁶⁾。FcγRIIIa は、C 末端にヘキサヒスチジンタグおよび N43 と N160 に二つの N 型結合糖鎖を持つ組換え糖タンパク質として、本博士論文の著者を含む論文に記載の手法で生産されたものを大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 生命創成探究センターより提供され、使用した⁵⁵⁾。

第二項 サンプルの精製

界面活性剤等の製剤に含まれる添加剤を除去するため、IgG1 の精製を AKTAprime plus (GE ヘルスケア) に接続した HiTrap SP HP カラム (GE ヘルスケア) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーで行った。10 mM 酢酸緩衝液 (pH5.0) (富士フィルム和光純薬) 下でカラムに補足した IgG1 を、100 mM リン酸 (pH 8.0) (富士フィルム和光純薬) と 400 mM NaCl (富士フィルム和光純薬) を含む溶液で洗浄し、溶出した。

Fc 断片を取得するため、パパイン消化を活性化酵素:IgG1 比 1:100 かつ 37°C の条件で 4 時間実施した。活性化酵素には 100 mM L-システイン (Sigma-Aldrich) を含む 100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) でパパイン (Sigma-Aldrich) を希釈したものを使用した。IgG1 は、100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) で希釈し、終濃度を 10 mg/mL (Ada, Rtx, Trz) または 2.5 mg/mL (Mog) とした。N-エチルマレイミド (東京化成工業) を終濃度 30 mM となるように加えて消化反応を停止した。その後消化した IgG1 を 2 段階で精製し、Fc 断片を取得した。まず、50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH9.0) (ナカライテスク株式会社) で平衡化した

HiLoad Superdex 200 pg column (GE ヘルスケア) を用いて、サイズ排除クロマトグラフィーにより、パパインと Fab および Fc 断片の混合物を分離した。その後 Fc 断片と Fab 断片を陰イオン交換クロマトグラフィーにより実施した。20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.5) で平衡化した HiTrap Q HP カラム (GE ヘルスケア) で Fc 断片を捕捉し、20 mM Tris-HCl (pH8.5) および 1M NaCl 緩衝液で洗浄することで、Fc 断片を確認した。

精製した FcγRIIIa、Rtx、Ada、Mog、取得した Fc 断片、CCR4p および TNF は 10 倍希釈リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffer saline, PBS) (10×、pH7.4) (Thermo Fisher Scientific) に、4 °Cで一晩透析した。Trz は 20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、150 mM NaCl、0.005 % ポリソルベート 20^{注)} を含む溶媒に 4 °Cで一晩透析を行った。透析後のタンパク質は、Amicon Ultra Centrifugal Filter devices (Merck) を用いた限外ろ過により、各測定に最適な濃度に濃縮した。

注) 非イオン性界面活性剤。抗体医薬品においてバイアル等への吸着を防ぐために一般的によく用いられる添加剤の一つである⁷⁵⁾。

第三項 等温滴定カロリーメトリー (ITC)

Ada、Trz、Rtx、およびそれらの Fc 断片の測定には iTC200 (MicroCal LLC) を、Mog および Mog の Fc 断片については、MicroCal PEAQ-ITC (Malvern Panalytical) を使用して測定を行った。8 μM IgG または Fc 溶液をセルに満たし、100 μM の FcγRIIIa を滴定した。最初の注入は、1 μL (Ada, Trz, Rtx) もしくは 0.5 μL (Mog) とし、その後、2 μL (Ada, Trz, Rtx) で 19 回、もしくはまたは 1 μL (Mog) の 39 回注入を行った。注入は 298 K で 120 秒ごとに行った。得られたサーモグラムは NITPIC プログラム (version 1.3.0、2019 年 5 月) を用いて解析したのち、得られた規格化ピーク面積プロットを、SEDPHAT プログラム (バージョン 15.2、2018 年 12 月) を用いて $A + B \rightleftharpoons AB$ 相互作用モデルを用いてフィッティングした。Rtx、Mog、それぞれの Fc 断片について ITC のデータは KinITC を用いて解析を行い、溶液中の相互作用における速度パラメータを算出した。KinITC は、ITC の滴定曲線のベースラインに戻るまでの時間をプロットして繋いだ平衡時間曲線 (equilibration time

curve, ETC) から k_{off} を算出する手法である^{76),77)}。解析には、AFFINImeter (<https://www.affinimeter.com/>, version 1.2.3, Software for Science Developments, Santiago de Compostela, Spain) を用いた。

第四項 バイオレイヤー干渉法 (BLI)

BLIの測定には、Octet HTX システム (Sartorius) を用いた。センサーとして、高精度ストレプトアビジン (SAX) バイオセンサーを使用し、測定は 30 °C で行った。各アッセイの前に、SAX バイオセンサーのチップを 200 μL の PBS で 10 分間以上浸水させた。最初のアッセイステップでは、HBS-P+バッファー (Cytiva; 0.01 HEPES, 0.15 M NaCl および 0.05 % (v/v) Surfactant P20) を用いて 90 秒間ベースラインを確立し、続いてビオチン化した Fc γ RIIIa を固定した。その後、HBS-P+を用いて2回目のベースラインを取得し、IgG1 サンプルの会合と解離の測定を行った。IgG1 と IgG1-Fc の希釈系列は、Rtx と Ada については 2000 nM を 2 倍、Mog については 250 nM を 2 倍ずつ希釈することによって作製した。抗原存在下での Ada または Mog の Fc γ RIIIa に対する親和性は、250 nM の Ada サンプルに 1 μM TNF、または 250 nM の Mog サンプルに 500 nM CCR4p を添加し、それらの希釈系列を作ることで評価した。会合解離のサイクル後に 1 M MgCl₂ (富士フィルム和光純薬) を用いてセンサーの再生工程を行い、同一サンプルを 3 回測定した。

第五項 ネイティブ質量分析

Ada または TNF の溶媒を、分子量カットオフが 10 kDa の Bio-Spin 6 カラム (Bio-Rad Laboratories) を用いて 150 mM 酢酸アンモニウム (Sigma-Aldrich) 溶媒に交換した。Ada (0.7 μM) と TNF (6.3 μM) の混合物を調製し、氷上で 20 分間インキュベートした。5 μL のサンプルを、金コーティングを施したガラスキャピラリーにロードし、ナノエレクトロスプレーでイオン化した。質量分析には、Q Exactive UHMR (Thermo Fisher Scientific) を用い、spray voltage は 1.5 kV、source DC offset は 100 V、HCD voltage は 40 V、trapping gas pressure setting は 7.0 のポジティブイオンモードで測定を実施した。質量スペクトルは 4

mg/mL ヨウ化セシウムで校正し、BioPharma Finder version 3.2 (Thermo Fisher Scientific) を使用して解析した。

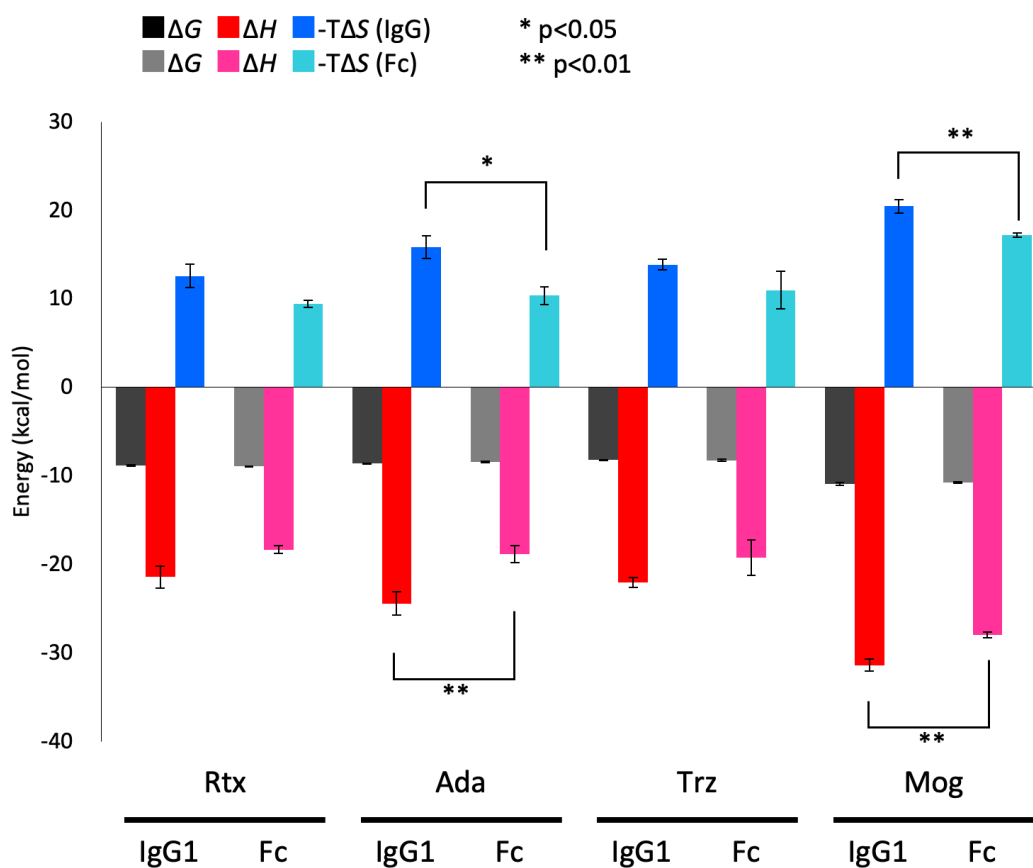
第三節 結果

第一項 IgG1-FcγRIIIa 相互作用を駆動する熱力学パラメータの決定

4 種類の IgG1 (Rtx, Ada, Trz, Mog) およびそれぞれの IgG1 から調製した Fc 断片 (IgG1-Fc) を用いて ITC の測定を行った結果を示す (図 7, S1)。IgG1 と FcγRIIIa、IgG1-Fc と FcγRIIIa の相互作用はすべてエンタルピーで駆動されており、複合体の形成には水素結合や静電相互作用およびファンデルワールス相互作用などの非共有結合性の相互作用が関与していることが示された。

Mog と FcγRIIIa の相互作用において、Rtx、Ada、Trz と FcγRIIIa との相互作用と比較して、 ΔH および ΔG が大きく減少していた。この違いは、Mog のみアフコシル化 IgG1 であるために、糖鎖コアのフコースが欠乏していることに起因していると考えられる。これは、先行研究の報告とも一致している³⁰⁾。

IgG1-FcγRIIIa と IgG1-Fc-FcγRIIIa の相互作用については、すべての IgG1 で ΔG に有意な差は認められなかったが、Ada と Mog は対応する IgG1-Fc と比較して、 ΔH の減少が有意に大きく、 ΔS の減少も有意に大きいことが示された。また、統計的に有意ではないものの、Rtx および Trz についても、対応する IgG1-Fc と比較して、 ΔH の減少が大きく、 ΔS の減少が大きい傾向が認められた。以上の結果は、IgG1 と FcγRIIIa が複合体を形成した際に、IgG1 と FcγRIIIa 間の分子間相互作用が IgG1-Fc と FcγRIIIa 間よりも多く形成され、エンタルピーを獲得した一方で、IgG1-Fc と FcγRIIIa よりも IgG1 と FcγRIIIa の方が複合体を形成した際に分子の運動性を失い、エントロピーを損失したことを示している。



	ΔG (kcal/mol)	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)
Rtx	-8.86 ± 0.09	-21.4 ± 1.3	12.6 ± 1.3
Rtx Fc	-8.94 ± 0.06	-18.3 ± 0.4	9.41 ± 0.41
Ada	-8.61 ± 0.02	-24.4 ± 1.3	15.8 ± 1.3
Ada Fc	-8.45 ± 0.09	-18.8 ± 1.0	10.4 ± 1.0
Trz	-8.20 ± 0.04	-22.1 ± 0.6	13.9 ± 0.6
Trz Fc	-8.27 ± 0.12	-19.2 ± 2.0	11.0 ± 2.1
Mog	-10.9 ± 0.2	-31.4 ± 0.7	20.4 ± 0.7
Mog Fc	-10.7 ± 0.1	-28.0 ± 0.3	17.2 ± 0.2

図 7. ITC で取得した IgG1-FcγRIIIa 相互作用と IgG1-Fc-FcγRIIIa 相互作用の熱力学パラメータの比較。

第二項 IgG1-Fc γ RIIIa 相互作用を駆動する速度パラメータの決定

Rtx、Ada、Mog と対応する IgG1-Fc の Fc γ RIIIa との相互作用、および抗原の存在下における Ada と Mog の Fc γ RIIIa との相互作用における速度パラメータを解析した結果を示す (図 8, S2)。

Mog は Rtx と比較して k_{on} が 4 倍、Ada と比較して 3.5 倍大きく、 k_{off} が 5 分の 1 もしくは 6 分の 1 であったため、Fc γ RIIIa に対する K_D が 20 分の 1 以下の小さい値を示す結果となった。この結果は、Mog がアフコシル化 IgG1、Rtx や Ada がフコシル化 IgG1 であることに起因すると考えられ、これはフコースの欠乏により k_{on} が増加するという先行研究とも一致している³⁰⁾。

全長 Rtx、Ada、Mog はすべて対応する IgG1-Fc の k_{off} より小さい値を示した。この結果は、IgG1-Fc の Fc γ RIIIa への滞留時間が IgG1 と比較して著しく短縮されるという、本博士論文の著者を含むグループの以前の HS-AFM の結果と一致している⁵²⁾。さらに、KinITC 法を用いて ITC のデータを解析した結果より、^{76),77)}、溶液状態の相互作用においても IgG1 の k_{off} の値は IgG1-Fc の値よりもわずかに小さいことが示された (図 S3)。したがって固定化を行っていない溶液中での相互作用においても IgG1 は IgG1-Fc と比較して Fc γ RIIIa からの解離が遅いことが示された。しかし Mog では、Fc γ RIIIa に対する k_{off} の値が IgG1-Fc と比較して小さいといった IgG1 の有利性が、IgG1-Fc よりも k_{on} の値が小さいことによって相殺されてしまい、 K_D に有意差は生じなかった。

抗原の存在下において、Ada と Mog の Fc γ RIIIa に対する K_D は、抗原非存在下における K_D の値よりも有意に小さな値を示した。これは両者ともに k_{off} の値が、抗原の存在下において大きく減少したことに起因している。

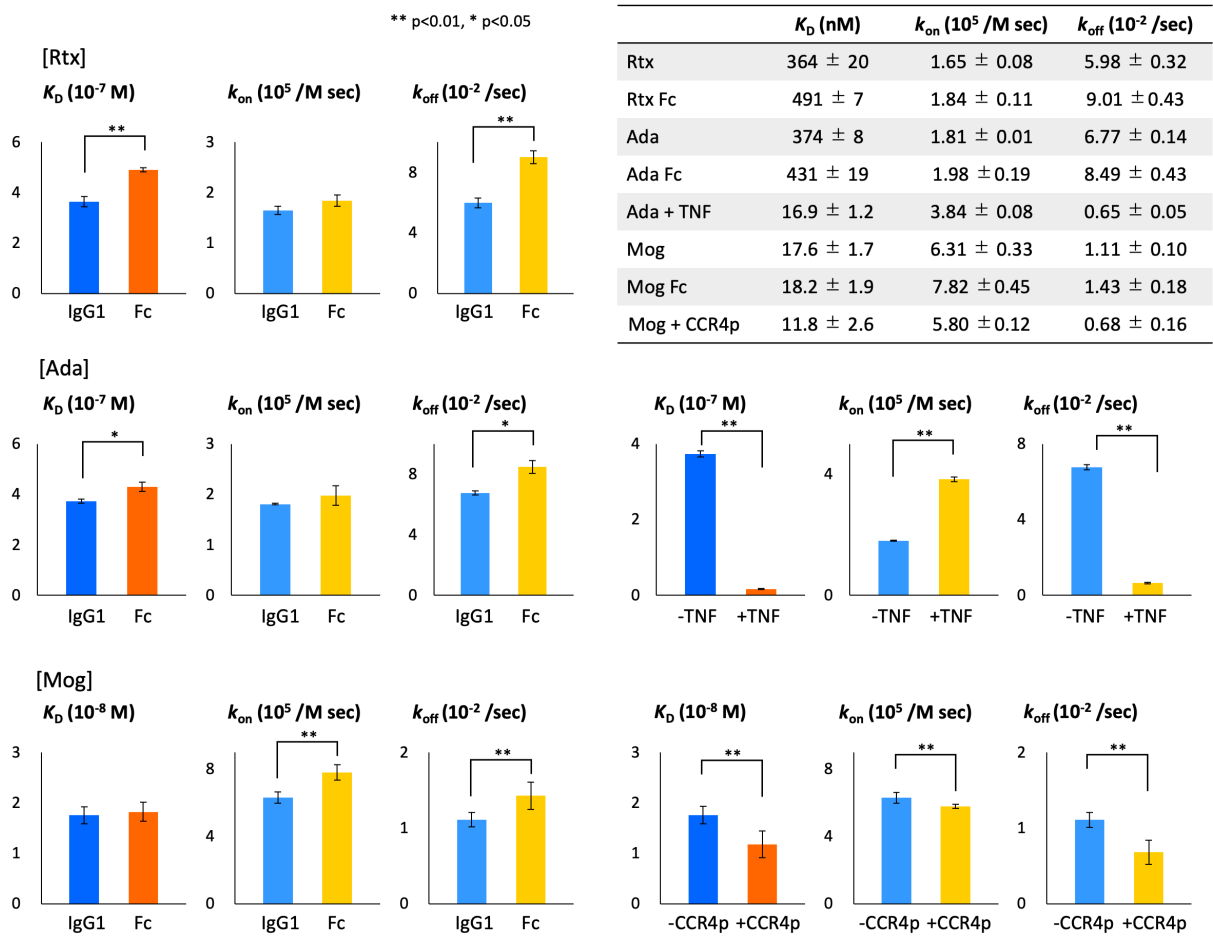


図 8. BLI で取得した IgG1-FcγRIIIa 相互作用と IgG1-Fc-FcγRIIIa 相互作用の速度パラメータの比較。

第四節 考察

第一項 IgG-FcγRIII 相互作用における Fab 領域の寄与

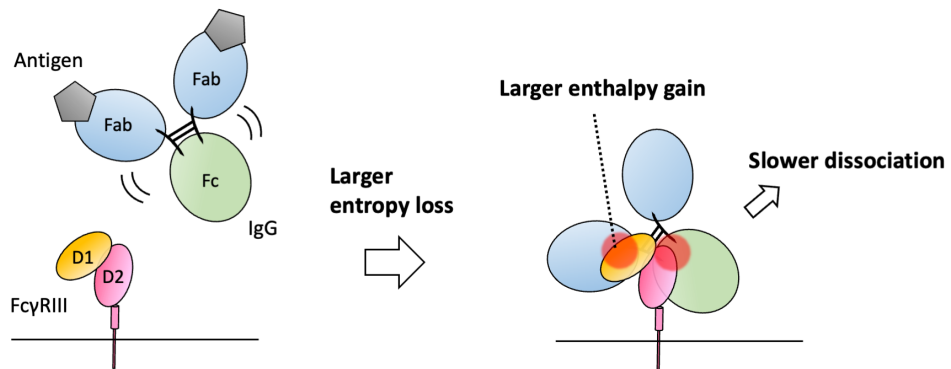
ITCの結果より、IgG1とFcγRIIIaの相互作用の $|\Delta H|$ は、IgG1-Fc-FcγRIIIaの相互作用の値より大きいことが示された。これは、FcγRIIIaと相互作用する際にIgG1-FcよりもIgG1の方が形成された水素結合および静電もしくはファンデルワールス相互作用等の非共有結合が多いことに起因しており、Fab領域にFcγRIIIaに対する結合部位が存在することを示唆している(図9)。一方、IgG1とFcγRIIIaの相互作用の $T|\Delta S|$ は、IgG1-FcとFcγRIIIaの相互作用よりも大きく、 ΔG に大きな変化は見られなかった。IgG1の $|\Delta S|$ がIgG1-Fcよりも大きかった原因は、IgG1-FcよりFab領域をもつIgGの方が、FcγRIIIaとの結合前の構造柔軟性が高かったためと考えられる。実際、IgGはFab領域とFc領域間をつなぐヒンジ領域の柔軟性が高く、溶液中で非常にさまざまな構造をとることが、クライオ電子トモグラフィによって示されている⁷⁸⁾。

BLIの結果より、IgG1とFcγRIIIaの結合時の k_{on} と k_{off} がIgG1-FcとFcγRIIIaの結合に比べて小さいことが示された。これはすなわち、IgG1とFcγRIIIaの相互作用は結合が遅く、解離も遅いことを意味する。したがって、IgG1のFcに対する k_{off} の有利性は k_{on} の不利性で相殺され、結果として K_D に大きな変化はないように見える。しかし、先行研究では抗原に対する k_{off} が小さいIgGほど、細胞表面にIgGが留まるためにADCCおよびCDC活性が増加することが報告されている⁷⁹⁾⁻⁸¹⁾。この報告を考慮すると、Fabの存在によるFcγRIIIaとの結合における k_{off} の減少は、IgGのFab領域がIgG-FcγRIII相互作用を安定化し、FcγRIIIのシグナル経路の活性化に必要な抗原-IgG-FcγRIII複合体の形成を促進するように働くことを示唆していると考えられる。以上より、IgGのFab領域は単なる抗原認識モジュールではなく、その後のFcγRIIIの活性化につながるIgG-FcγRIII相互作用の安定化と免疫複合体の形成を促進し、免疫エフェクター機能を調節している可能性が示された。

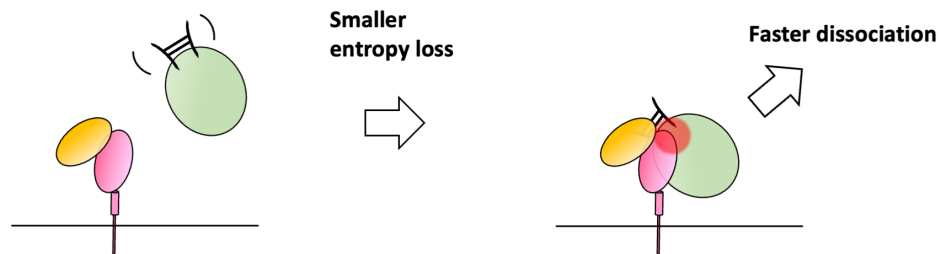
第二項 IgG-FcγRIII 相互作用に対する抗原の影響

抗原を用いた BLI の結果より、抗原の結合に伴い、Ada と Mog の両方において、 k_{off} の値が減少することが示された。Ada の場合、TNF は 2 分子の Ada と結合する可能性があるため、 k_{off} が小さくなったのはアビディティ効果によるものとも考えられるが³⁶⁾、同じ濃度域のネイティブ質量分析の測定では Ada は主に TNF と 1 : 2 複合体を形成しており、溶液状態で大きな複合体は観察されなかった (図 S4)。したがって Ada と Mog の結果は、IgG が抗原に結合すると、解離速度の低下を介して、IgG-FcγRIII 複合体の形成を安定化することを示唆していると考えられる。また、TNF は単量体が 18 kDa で、溶液中で安定な三量体を形成しているタンパク質である。Ada が TNF と結合すると k_{on} が増加するという BLI の結果から、IgG が三量体のタンパク質抗原と結合しても、FcγRIII は立体障害なく IgG 上の結合部位に接近できると考えられる。以上より、抗原の IgG へ結合は、Fab 領域によって安定化された IgG-FcγRIII 相互作用をさらに安定化させるように働き、抗原-IgG-FcγRIII 複合体の形成を促進する可能性が示された (図 9)。

[Antigen-IgG-FcγRIII interaction]



[IgG-Fc-FcγRIII interaction]



[Antigen-IgG-FcγRIII interaction]

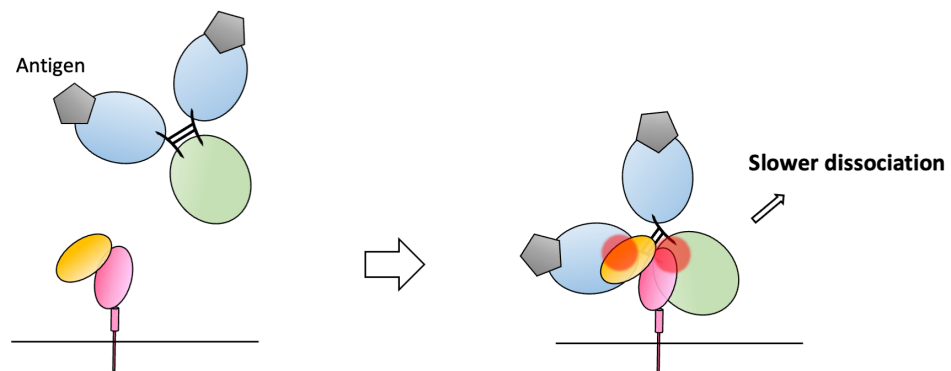


図 9. ITC および BLI の結果に基づく、IgG、IgG-Fc および抗原存在時における IgG と FcγRIII との相互作用の模式図。

IgG の Fab 領域はエンタルピーの獲得と解離速度の低下によって IgG-FcγRIII 相互作用に寄与する一方で、エントロピーの損失を増大させる。さらに抗原の結合は、解離速度の低下を介し、Fab が安定化した IgG-FcγRIII 相互作用をさらに安定化するように働く。

第五節 小括

本章では、IgG-FcγRIII 相互作用に対する Fab 領域の寄与を ITC および BLI を用いて熱力学的および速度論的に議論した。ITC の結果より、IgG の Fab 領域は FcγRIII に対して新たな結合部位を提供し、エンタルピーを獲得するように働く一方で、Fab 領域の存在に伴う結合前の自由度の高さがエントロピーを損失する方向に働くことが示された。また、BLI の結果より、Fab 領域は FcγRIII からの解離速度の低下を介して IgG1-FcγRIIIa の複合体を安定化するような働きをすることが明らかとなった。また、IgG1 と IgG1-Fc の $|\Delta H|$ 、 $|\Delta S|$ 、 k_{off} の違いは、フコシル化 IgG1 である Rtx、Ada、Trz およびアフコシル化 IgG1 である Mog で同じであることから、糖鎖プロファイルの違いがあっても、Fab の IgG-FcγRIII 相互作用への寄与は本質的には同等であることを示された。さらに、抗原が結合すると Fab の存在によって安定化された IgG-FcγRIII 相互作用がさらに安定化されることが示された。以上の結果から Fab 領域は細胞表面での抗原-IgG-FcγRIII 複合体の安定な形成を促し、媒介する免疫エフェクター機能を調節していることが示唆された。

以上の成果は、近年新たに示されてきた Fc 領域に加えて Fab 領域も IgG-FcγRIII 相互作用に関与しているという知見を裏付けるものであり、本研究により、IgG-FcγRIII 相互作用における Fab 領域の役割が熱力学および速度パラメータによって初めて定義された。

第三章 IgG-FcγRIII 相互作用の構造生物学的解析

第一節 緒言

第二章では、熱力学的および速度的な解析により、IgG の Fab 領域がエンタルピーの獲得と解離速度の低下を介して IgG-FcγRIII 相互作用に寄与していることが明らかとなった。しかし、Fab に存在すると考えられる FcγRIII との結合部位や、抗原の結合が IgG-FcγRIII 相互作用の安定化にどのように寄与しているのかという点はいまだに不明である。

そこで本研究では、糖鎖プロファイルおよび抗原の結合の影響を含めて、結合部位や結合に伴う構造変化といった構造生物学的な観点から、IgG-FcγRIII 相互作用を理解することを目的とした。そのため、HDX-MS および XL-MS を用いて、糖鎖の異なる IgG について FcγRIII との結合部位および結合に伴う構造変化の特定を試みた。また、抗原が引き起こす IgG の構造変化を HDX-MS を用いて観察し、どのように IgG-FcγRIII 相互作用に影響するかを検証した。HDX-MS はタンパク質を重水にさらした際の主鎖のアミド水素の交換割合の経時的な変化を質量分析によって検出し、重水素交換速度の変化からタンパク質の結合部位や構造変化をとらえる手法である⁸²⁾。HDX-MS はサンプルの結晶化の必要がないこと、比較的大きな分子量のタンパク質を測定できることを特徴としており、リガンドータンパク質間の相互作用解析やタンパク質のフォールディング、ダイナミクスの解析など幅広く利用されている。本博士論文の著者も HDX-MS を用いた解析により、Fab 領域に FcγRIII への結合部位が存在する可能性を示唆している⁵⁵⁾。しかし、HDX-MS のみでは、X線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡法、核磁気共鳴法のように原子の配置をみることができないため、Fab 領域と FcγRIII の立体配置を決定することはできない。一方 XL-MS は、タンパク質に架橋剤を添加して反応させ、質量分析によって架橋されたアミノ酸の位置を特定する手法である⁸³⁾。XL-MS に使用するクロスリンク試薬は、架橋可能な距離が決まっているため、架橋されたアミノ酸残基間の距離を決定できる。したがって、架橋されたアミノ酸残基間の距離制限に基づいたタンパク質-タンパク質ドッキングによって複合体の構造モデルを構築することで、タンパク質同士の立体配置を決定することができる。

本章では、フコシル化 IgG1 である Rtx とアフコシル化 IgG1 である Mog に対して HDX-

MS および XL-MS を行った結果を示し、糖鎖プロファイルの異なる IgG について、Fab と FcγRIII との結合部位の同定および FcγRIII との結合に伴う IgG の構造変化部位の特定を試みる。さらに抗原が異なる Ada と Mog を用いて HDX-MS を行った結果を示し、抗原の結合に伴う IgG の構造変化部位を明らかにする。さらに HDX-MS と XL-MS の組み合わせによって決定した Fab と FcγRIII との結合部位との比較ならびに第二章の結果をふまえて、抗原の結合が Fab と FcγRIII 間の相互作用に与える影響を議論する。

第二節 実験材料および実験手法

第一項 材料

抗 CD2 マウス/ヒトキメラ IgG1 であるリツキシマブ (Rtx) は中外製薬株式会社から購入した。抗 TNF ヒト化 IgG1 であるアダリムマブ (Ada) は、エーザイ株式会社から購入した。抗 CCR4 ヒト化 IgG1 であるモガムリズマブ (Mog) は協和キリン株式会社から購入した。Mog の標的抗原である CCR4p は Scientific peptide 社から購入した。Ada の標的抗原であるヒト可溶性 TNF は、所属研究室における先行研究で使用した、シスメックス研究開発センターで生産されたものを使用した³³⁾。ヒト可溶性 FcγRIIIa は、C 末端にヘキサヒスチジンタグおよび N43 と N160 に二つの N 型結合糖鎖を持つ組み換え糖タンパク質として、本博士論文の著者を含む論文に記載の手法で生産されたものを大学共同利用機関法人自然科学研究機構 生命創成探究センターより提供され、使用した⁵⁵⁾。

第二項 サンプルの精製

IgG1 は、界面活性剤等の製剤に含まれる添加剤を除去するために、HiTrap SP HP カラム (GE ヘルスケア) を用いた陽イオン交換クロマトグラフィーで精製を行った。10 mM 酢酸緩衝液下 (pH5.0) (富士フィルム和光純薬) でカラムに補足した IgG1 を、100 mM リン酸 (pH 8.0) (富士フィルム和光純薬) と 400 mM NaCl (富士フィルム和光純薬) を含む溶液で洗浄し、溶出した。精製した IgG1 および TNF、CCR4p は 10 倍希釈 PBS (10×、pH7.4) (Thermo Fisher Scientific) に、4 °C で一晩透析した。

第三項 水素/重水素交換質量分析 (HDX-MS)

HDX-MS の測定には、シリンジクーラーが付随されている自動 HDx3 システム (LEAP Technologies) を用いた。各タンパク質サンプルを重水素化した PBS (pD 7.4) で 10 倍に希釈したのち、20°C で様々な時間 (41、60、180、600、3,600 または 14,400 秒) で重水素交換反応を行った。HDX-MS による異なる状態間の正確な比較のため、すべての IgG1-FcγRIIIa、CCR4p-Mog-FcγRIIIa、TNF-Ada 複合体の測定は、タンパク質を固定化およ

び修飾せずに溶液中のタンパク質間相互作用を観察できる ITC から推定した K_D 値を用いて、IgG1、Fc γ RIIIa、CCR4p および TNF の濃度を慎重に調整して測定を行った。IgG1 側の解析のために、IgG1、Fc γ RIIIa または特定の抗原を次に示す最終濃度で混合した。<Rtx (0.7 μ M) および Fc γ RIIIa (11.8 μ M) ; Mog (0.7 μ M) および Fc γ RIIIa (1.0 μ M) ; Mog (0.7 μ M) ; および CCR4p (1.0 μ M) ; Mog (0.7 μ M)、Fc γ RIIIa (1.0 μ M) および CCR4p (1.0 μ M) ; Ada (0.7 μ M) および Fc γ RIIIa (11.6 μ M) ; Ada (0.7 μ M) および TNF (6.3 μ M) > Fc γ RIIIa の解析のために、IgG1、Fc γ RIIIa または CCR4p をこれらの最終濃度で混合した。<Rtx (24.9 μ M) および Fc γ RIIIa (4.9 μ M) ; Mog (5.3 μ M) および Fc γ RIIIa (4.9 μ M) ; Mog (5.3 μ M)、Fc γ RIIIa (4.9 μ M) および CCR4p (5.4 μ M) > 希釈したタンパク質サンプルに等量の 200 mM リン酸二水素ナトリウム二水和物 (富士フィルム和光純薬)、4 M グアニジン塩酸塩 (富士フィルム和光純薬)、400 mM TCEP 塩酸塩 (富士フィルム和光純薬) を混合し、pH2.5 まで下げ、0 °C で急冷することで、交換反応を停止させた。反応を停止させたサンプルを固定化ペプシンカラム Enzymate BEH Pepsin Column (2.1 mm \times 30 mm) (Waters) でオンライン消化し、その後、消化されたペプチドを Acclaim PepMap300 C18 5 μ m (1 \times 15 mm) (Thermo Fisher Scientific) でトラップして脱塩し、Hypersil Gold (1 \times 50 mm, 1.9 μ m) (Thermo Fisher Scientific) で分離した。LC システムには、Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。消化およびトラップ、脱塩は、ローディングポンプを 100 μ L/min で 4 分間、溶媒にはギ酸 (関東化学) を用いて pH2.5 に調整した MS 用蒸留水を用いた。分離には、0.1 % ギ酸含有 100 % アセトニトリル溶媒 (関東化学) で 8 % から 30 % のグラジエントを 9 分間行うようグラジエントポンプをセットした。さらに、2 M グアニジン塩酸塩含有 100 mM リン酸バッファー (pH 2.5) を注入し、0.1 % ギ酸含有 100 % アセトニトリル溶媒で 8 % から 90 % まで 4 分間のグラジエントを 2 回行い、サンプル測定間に全システムのラインを毎回洗浄した。質量分析には、Q Exactive HF-X (Thermo Fisher Scientific) を用い、キャピラリー温度を 275 °C、分解能 120,000、質量範囲 (m/z) を 260-2000 に設定して測定を行った。システムのチェックとしてシトクロム C (Sigma Aldrich) を 43,200 秒間重水素交換させたサンプルを測定して逆交換を確認した。

同定された 65 本のペプチドを用いた逆交換率の計算値は 41 % で、これは Masson らが推奨する範囲を満たしている⁷⁶⁾。重水素交換をさせていないサンプルの測定データを、Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析し、ペプチドの同定を行った。また重水素交換させたデータから、HD-Examiner version 3.2.1 (Sierra Analytics) を用いて各同定ペプチドの重水素交換率を算出した。各サンプルの各反応時間の測定は、3 回行った。各ペプチドについて、各重水素交換反応時間における重水素交換率の差をすべての反応時間にわたって足し合わせた累積重水素交換率の差 (ΔD_2) が、計算した有意差の基準より大きいもしくは小さい場合に、そのペプチドの重水素交換率に有意に差があるとみなすこととした。有意差の基準は、自作した python 3 スクリプトを使用して 2 つのサンプルを比較し、プールした標準偏差に基づく *t* 検定によって算出された計算値の 5 倍に設定した (表 S1-S4, 図 S5, S6)⁸⁴⁾。構造は、UCSF ChimeraX バージョン 1.2 を用いて表した^{85),86)}。

第四項 クロスリンク質量分析 (XL-MS)

まず IgG1 同士のクロスリンクが生じない濃度を検討した。ジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide, DMSO) (富士フィルム和光純薬) に 500 mM に溶解し、20 mM HEPES (Thermo Fisher Scientific) を用いて希釈したグルタル酸ジスクシンイミジル (disuccinimidyl glutarate, DSG) (Thermo Fisher Scientific) を異なる IgG1 濃度 (2、5、7、10、20、30、40 μ M) を含む 20 mM HEPES に添加した。DSG の濃度は、タンパク質濃度の 100 倍とした。混合物したサンプルすべてについて SDS-PAGE を行い、室温で 30 分間インキュベートした後、250 mM Tris-HCl を加えて反応を停止した。結果として、5 μ M 以上の Rtx と 2 μ M 以上の Mog について IgG1 同士がクロスリンクした二量体のバンドが検出されたため、Rtx (1 μ M) と Fc γ RIIIa (3 μ M)、Mog (1 μ M) と Fc γ RIIIa (1.5 μ M) を含む 20mM HEPES を用いて SDS-PAGE サンプルを作成した。これらのサンプルでは、クロスリンクされた IgG1-Fc γ RIIIa 複合体が観察され、IgG1-IgG1 の複合体の形成はわずかであった (図 S7)。したがって、この条件を XL-MS の解析に適用した。クロスリンク反応が終了し

たサンプルを、減圧乾燥機を用いて濃縮し、Microbiospin カラム (BioRad) を通過させて過剰なクロスリンク試薬を除去した。その後、各サンプルを濃縮し、50 μ L の 8 M 尿素 (Sigma Aldrich) 含む 50mM 重炭酸アンモニウム (ABC) (富士フィルム和光純薬) 水溶液を添加して変性させた。サンプルを 50 mM ジチオスレイトール (ナカライテスク) と共に 56 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートした後、50 mM ヨードアセトアミド (富士フィルム和光純薬) と共に室温・暗所で 45 分インキュベートした。1 M の尿素が最終濃度 50 mM になるよう ABC で希釈後、100 μ g/50 mM Trypsin/LysC 酢酸溶液 10 μ L を加え (Thermo Fisher Scientific)、37 $^{\circ}$ C にて一晩インキュベートした。その後、消化されたサンプルを、減圧乾燥機を用いて乾燥させ、50 μ L 5 % DMSO/10 % ギ酸/85 % H₂O に再懸濁した。再懸濁したサンプルを SCX Stage Tip (GL Science) にロードし、20 %アセトニトリル/0.4 %ギ酸で洗浄し、20、50、200、500、1000 mM 酢酸アンモニウム (Sigma Aldrich) で溶出させた。溶出されたサンプルを減圧乾燥機で乾燥させ、5 % DMSO/10 %ギ酸/85 % H₂O に再懸濁し、LC-MS/MS システムに注入した。LC システムには Easy-n LC1200 system (Thermo Fisher Scientific) を用いた。脱塩および分離にはトラップカラム (0.075 \times 20 mm, Thermo Fisher Scientific) と溶出カラム (0.075 \times 150 mm, Nikkyo Technos) を使用した。移動相 A には 0.1 %ギ酸を含む蒸留水、移動相 B には 0.1 %ギ酸を含む水/アセトニトリル (2/8) を用いた。LC の条件は 300 nL/min で、5 %-95 %の移動相 B を 40 分間グラジエントさせた。質量分析は Orbitrap Eclipse (Thermo Fisher Scientific) を用いて実施した。Rtx サンプルの場合は 305 $^{\circ}$ C、Mog サンプルの場合は 300 $^{\circ}$ C の Ion Transfer Tube 温度で FullMS スキャンを実施した。分解能は 60,000、質量範囲 (m/z) は 380-1600、Funnel RF level は 30 で測定を行った。続く ddMS/MS スキャンは stepped collision energies が 25%と 30%、分解能 30,000 の高エネルギー衝突解離法で行った。データ解析は Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Fisher Scientific) にインストールされている XlinkX を用いて行い、20 以上のスコアを持つ IgG1 と Fc γ RIIIa の分子間クロスリンクをタンパク質-タンパク質ドッキングに使用した。

第五項 XL-MS の距離制限に基づくタンパク質-タンパク質ドッキング

Rtx-Fc-Fc γ RIIIa 複合体モデル作成の初期構造には、フコシル化 IgG1-Fc と Fc γ RIIIa の複合体の結晶構造 (PDB:3SGJ) より、IgG1-Fc と Fc γ RIIIa をそれぞれ抽出して使用した。Mog-Fc-Fc γ RIIIa 複合体モデル作成の初期構造には、アフコシル化 IgG1-Fc と Fc γ RIIIa の複合体の結晶構造 (PDB:3AY4) より、IgG1-Fc と Fc γ RIIIa をそれぞれ抽出して使用した。3AY4 の Fc γ RIIIa の不足している電子密度 (すなわち残基 G31-T40) は Alphafold2 を使って補い⁸⁷⁾、補った構造は YASARA サーバーを使ってエネルギーを最小化した⁸⁸⁾。また、IgG-Fab と Fc γ RIII の立体配置の決定には、IgG の結晶構造ではなく IgG-Fab の結晶構造を用いることで、IgG のヒンジ領域の柔軟性を加味したモデル構築を試みた。これは、最近の研究の IgG のヒンジ領域は柔軟であるため、溶液中では IgG1 の Fc に対する Fab の位置にばらつきがあるという報告を反映するためである^{78),89)}。Rtx-Fab-Fc-Fc γ RIIIa 複合体モデル作成の初期構造には、Rtx の Fab フラグメント (PDB ID: 4KAQ) とフコシル化 IgG1-Fc-Fc γ RIIIa (PDB ID: 3SGJ) の結晶構造を使用した。Mog-Fab-Fc-Fc γ RIIIa 複合体のモデル作成に関しては、Rtx-Fab (PDB ID: 4KAQ) の結晶構造を用いて Discovery Studio version 20.1 (Dassault Systèmes) で作成した Mog の Fab 断片のホモロジーモデルと、アフコシル化 IgG1-Fc-Fc γ RIIIa (PDB ID: 3AY4) を初期構造として選択した。ドッキングの前処理として、Rtx-Fab、Mog-Fab、Fc γ RIIIa、各 IgG1-Fc について、溶媒がアクセス可能な表面の割合が 25 % 以上であることを基準に、タンパク質間相互作用に寄与すると考えられる残基を DisVis で選択し、HADDOCK の計算に用いた⁹⁰⁾⁻⁹²⁾。Rtx-Fc-Fc γ RIIIa ならびに Mog-Fc-Fc γ RIIIa のドッキングを行うため、Rtx-CH2 と Fc γ RIIIa、Mog-CH2 と Fc γ RIIIa で検出された分子間のクロスリンクについて DisVis を用いて検証した。また、Rtx-Fab-Fc-Fc γ RIIIa ならびに Mog-Fab-Fc-Fc γ RIIIa のドッキングを行うため、Rtx-Fab と Fc γ RIIIa、Mog-Fab と Fc γ RIIIa 間で検出されたクロスリンクの拘束について DisVis を用いて検証した。DisVis によって選択されたクロスリンクを最大距離 24 Å (N ϵ -N ϵ 距離) の拘束条件とし、デフォルトの解析パラメータを使用してドッキングを行った^{90),93),94)}。図は PyMOL Molecular Graphics System, version 2.0 (Schrödinger) を用いて作成した。

第三節 結果

第一項 フコシル化 IgG1 およびアフコシル化 IgG1 の高次構造の比較

第二章において、先行研究と同様にアフコシル化 IgG1 はフコシル化 IgG1 と比較して FcγRIIIa に対する結合親和性が向上していることが示された。そこで、フコシル化 IgG1 である Rtx とアフコシル化 IgG1 である Mog を用いて HDX-MS を行い、IgG の高次構造に対するフコシル化の影響を調べた。Rtx と Mog を比較するため、可変領域の第 4 フレームワークと定常領域の、共通して同定された共通 143 本のペプチドについて重水素交換率の経時変化を観察した。観察した領域についてのペプチドの配列カバー率は 80.8 %であった。予想に反し、N 型結合糖鎖が存在する N297 の周辺に、重水素の取り込みに有意な差は認められなかったが、糖鎖付加部位から遠い領域である、CL の E110-V120、I122-V137、K154-T183、V201-C219、CH3 の I379-N392 で、Mog の重水素交換率が Rtx と比較して有意に低下していることが確認された (図 10A)。

第二項 HDX-MS による抗原および FcγRIIIa 結合時の IgG1 の観察

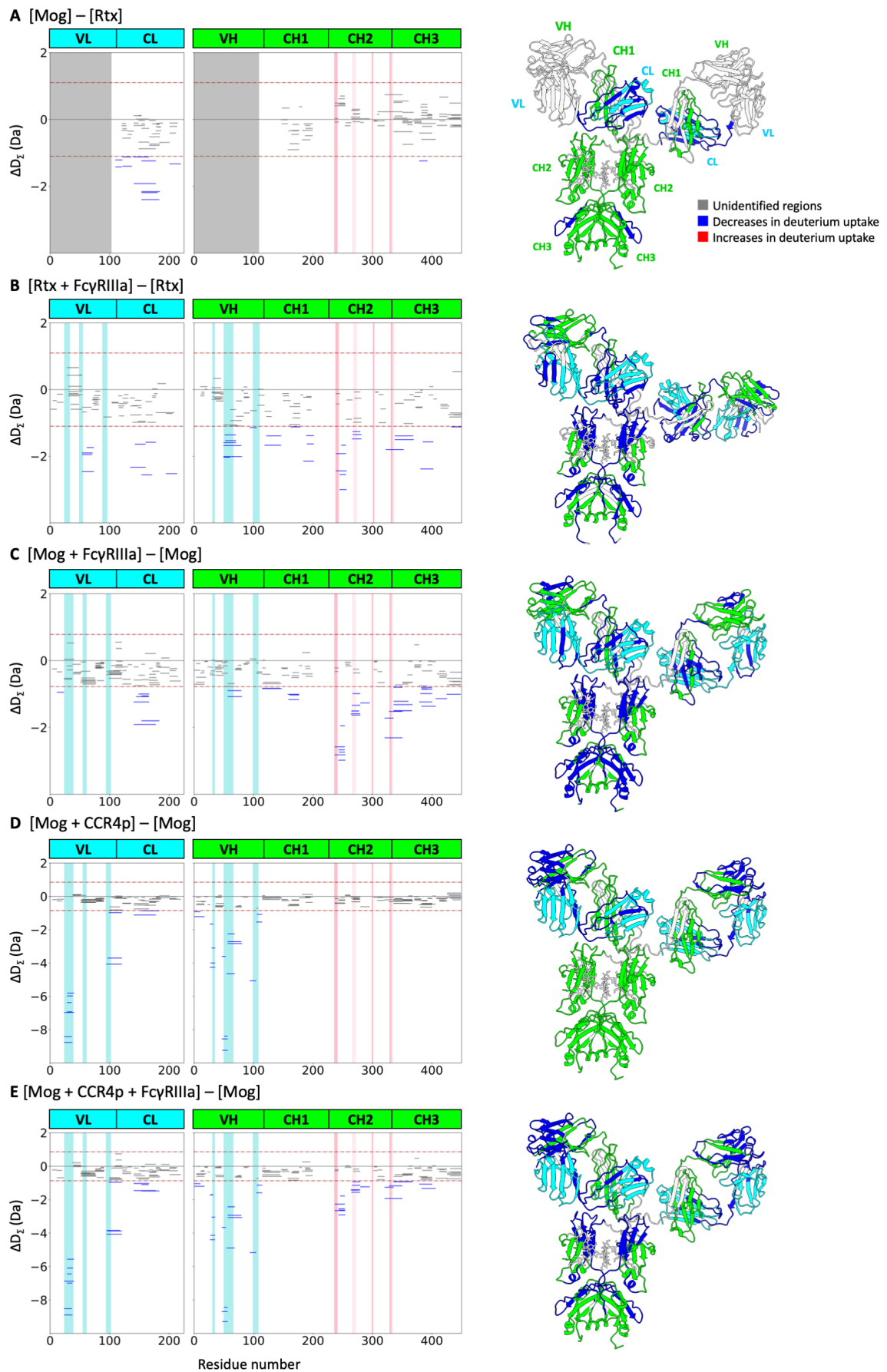
フコシル化が IgG と FcγRIII の結合様式に与える構造的な影響を調べるために、Rtx と Mog について FcγRIIIa 非結合時と FcγRIIIa 結合時の重水素交換率を比較した。また、抗原-IgG1-FcγRIIIa 複合体の HDX-MS を行い、FcγRIIIa との相互作用における抗原結合の影響を明らかにした。抗原-IgG1-FcγRIIIa 複合体の測定には、抗原の有無にかかわらず IgG1-FcγRIIIa 複合体割合を維持できる条件で HDX-MS を行うために、FcγRIIIa に対して十分に高い親和性を持つ Mog を選択した。

Rtx の重水素交換率について、FcγRIIIa 非結合時および FcγRIIIa 結合時で共通して同定された 178 のペプチドについて観察した。これらのペプチドの軽鎖および重鎖の配列カバー率は 84.8 %であった。FcγRIIIa との結合に伴い、VL の A54-T73、CL の Q154-T171 と V195-C213、VH の A50-Y60、Y94-D105、CH1 の V119-L146、N163-L178、Y184-T201、CH2 の L239-M256、V266-W281、CH2-CH3 の Y323-V352、CH3 の I381-L402、H433-G450 において、重水素交換率の有意な低下が観察された (図 10B)。

Mog については、227 本のペプチドが 4 種類の状態、すなわち Mog のみ、Mog-FcγRIIIa 二者複合体、CCR4p-Mog 二者複合体、CCR4p-Mog-FcγRIIIa 三者複合体で共通して同定され、これらのペプチドの軽鎖と重鎖の配列カバー率は 91.9 %であった。Mog と Mog-FcγRIIIa 複体の重水素交換率を比較すると、VL の P12-C23、CL の K154-T183、VH の Y57-Y80、CH1 の V115-L147 と S159-L176、CH2 の L237-M254 と V265-W279、CH2-CH3 の Y321-V350、CH3 の W383-F406、F407-F425 と F425-G448 において、複合体形成時に重水素交換率の有意な低下が観察された (図 10C)。また、CCR4p が Mog に結合した際は、CDR を含むもしくは CDR に近い領域に存在するペプチドである、VL の R24-Y37 と Q95-A117、VH の E1-S17、F27-S35、V48-T56、Y57-Y80、Y94-F104 の重水素交換率が有意に低下することが示された (図 10D)。興味深いことに、CDR から離れた領域である CL の L141-T177 も重水素交換率の有意な低下が観察された。この領域は先行研究の抗原-IgG-Fab 複体の結晶構造の比較においても構造変化が検出されていない領域である⁶⁷⁾。また、IgG への抗原の結合は、Fc 領域のアロステリックな構造変化を誘発し、FcγRIIIa への IgG の結合を促進することが示唆されているが^{71),72)}、本測定では、Fc 領域における重水素交換率の変化は検出されなかった。また CCR4p の存在下においても、FcγRIIIa が結合した際には Mog の重水素交換率が有意に低下し、その低下した領域は CCR4p 非存在下における Mog の重水素交換率が低下した領域とほとんど一致していた (図 10E)。

CCR4p はペプチド抗原であるが、先行研究ではタンパク質抗原はペプチド抗原よりも Fab の構造に与える影響が大きいことが報告されている⁶⁷⁾。したがって、CCR4p よりも大きな抗原の結合が IgG-FcγRIII 相互作用に与える構造的な影響を調べるために、Ada、FcγRIIIa、TNF を用いて HDX-MS を行った。Ada については、198 本のペプチドが 3 種類の状態、すなわち Ada のみ、Ada-FcγRIIIa 二者複合体、TNF-Ada 二者複合体で共通しており、ペプチドの軽鎖と重鎖の配列カバー率は 86.6 %であった。FcγRIIIa との結合に伴って Ada の重水素交換率が、VL の L47-F71、CL の I117-S131 と K149-T178、VH の L4-L18、F27-Y32、W36-E46 と I51-L79、CH1 では V117-L146、N163-L178、Y184-L197、CH2 では L239-L255、V266-W281、Y282-T303、CH2-CH3 では Y323-V352、CH3 では I381-L402、

H437-K451 で有意に低下していることが観察された (図 10F)。また Ada に TNF が結合した際には、CDR を含むまたはそれに近いペプチドである、VL の L47-F71、VH の E1-S17、F27-Y32、I51-D62、S63-L79、L102-L108 において重水素交換率を有意に低下することが示された。さらに、CDR の一部ではない領域である CL の I117-S131 と L136-E161、CH1 の V117-L146、N163-L178 と Y184-L197、CH2 の Y282-T303、CH2-CH3 の T311-V352 と CH3 の I381-L402 においても、有意な重水素交換率の低下が観察された (図 10G)。



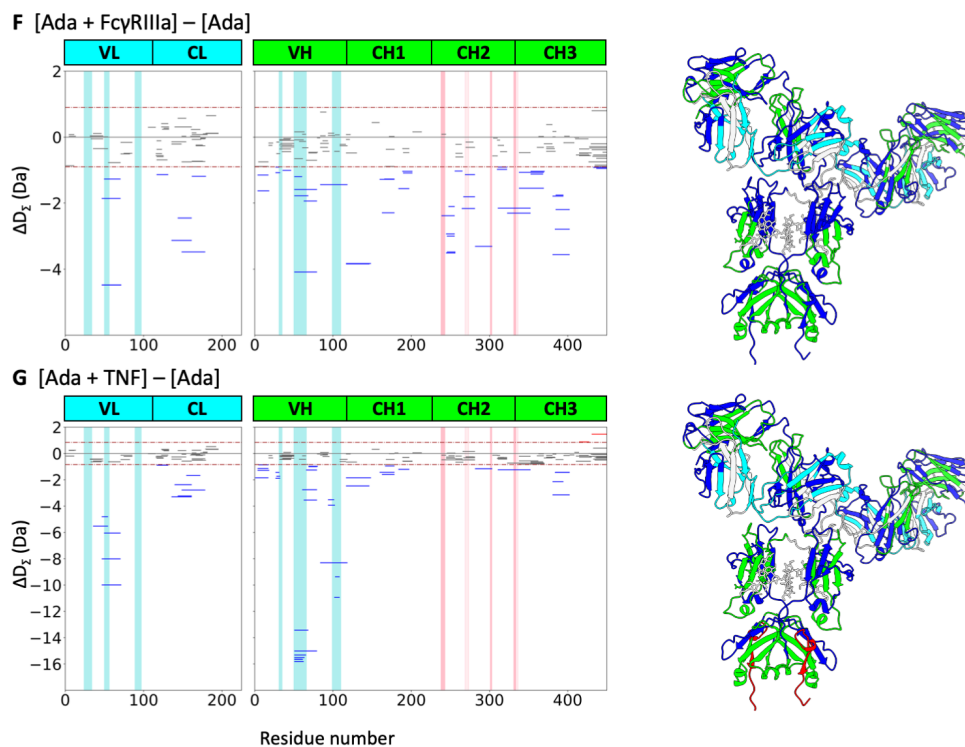


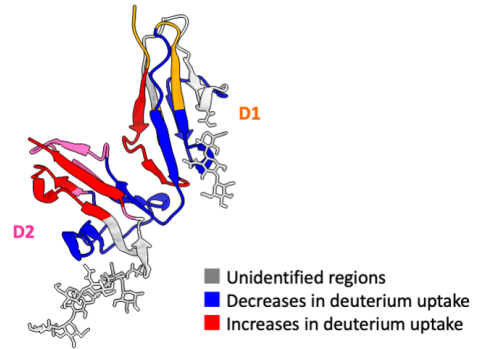
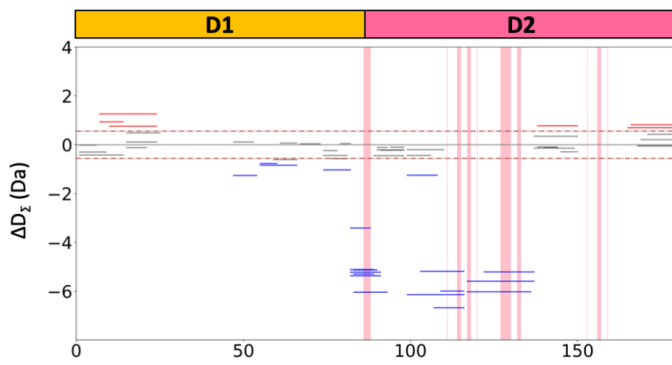
図 10. IgG1 の HDX-MS 分析の結果。

左図は (A) Mog と Rtx、(B) Rtx と FcγRIIIa 結合時の Rtx、(C) Mog と FcγRIIIa 結合時の Mog、(D) Mog と CCR4p 結合時の Mog、(E) Mog と CCR4p および FcγRIIIa 結合時の Mog、(F) Ada と FcγRIIIa 結合時の Ada、(G) Ada と TNF 結合時の Ada の同定された各ペプチドの累積重水素交換率の差をプロットしたグラフである。水色の領域は abYsis (<http://www.abysis.org/>) に基づく CDR、赤色の領域は Sondermann らによって報告された結合部位³⁹⁾、破線は有意差の基準とした値を示している。右図は、HDX-MS の結果を (A, C, D, E) Mog、(B) Rtx、(F, G) Ada のホモロジーモデルにマッピングしたものである。重水素交換率が低下した領域は青で、重水素交換率が上昇した領域は赤、同定でされなかった領域は薄い灰色、軽鎖はシアン、重鎖は緑で示した。ホモロジーモデルは、ヒト抗ヒト免疫不全ウイルス-1 gp120 IgG1 (PDB ID: 1HZH⁵²⁾) の結晶構造をテンプレートとして、Discovery Studio (Dassault Systèmes) で構築した。

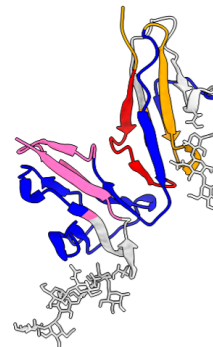
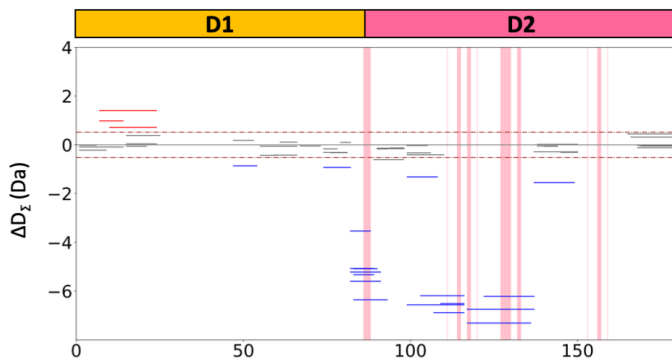
第三項 HDX-MS による IgG1 結合時の FcγRIIIa の観察

FcγRIIIa について重水素交換率の経時変化を観察したところ、全配列の 80.5 % をカバーする 58 本のペプチドが 3 種類の状態、すなわち Rtx-FcγRIIIa 二者複合体、Mog-FcγRIIIa 二者複合体、CCR4p-Mog-FcγRIIIa 三者複合体で共通して検出された。Rtx に結合した際、D1 の I47-Y54、F55-E66、S74-L82、D1-D2 の E83-A93、D2 の R107-L116、H117-D136 のペプチドで重水素交換率が有意に低下した一方で、D1 の V7-T24、D2 の Y138-Y150 と V166-H179 では重水素交換率が有意に上昇した (図 11A)。同様に、Mog と結合した際には、D1 の I47-Y54 と S74-L82、D1-D2 の E83-A93、D2 の R107-L116、H117-D136、F137-S149 で重水素交換率の有意な低下と、D1 の V7-T24 の重水素交換率の有意な上昇が観察された (図 11B)。また、CCR4p-Mog 複合体と結合した際には、Mog と結合した際とほぼ同じ領域において重水素交換率の有意な低下が観察された (図 11C)。

A [FcyRIIIa + Rtx] – [FcyRIIIa]



B [FcyRIIIa + Mog] – [FcyRIIIa]



C [FcyRIIIa + Mog + CCR4p] – [FcyRIIIa]

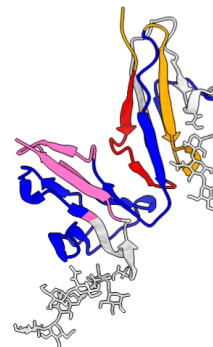
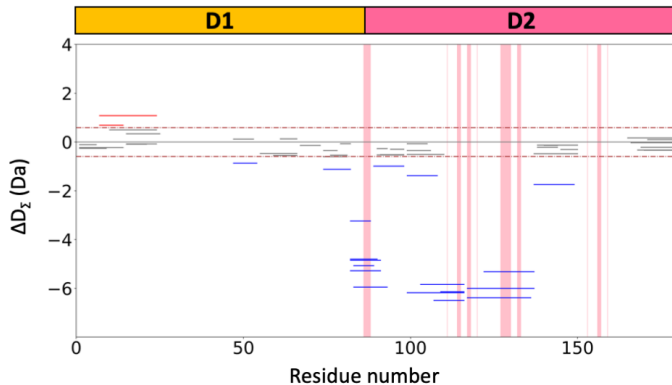


図 11. FcyRIIIa の HDX-MS 分析の結果。

左図は (A) FcyRIIIa と Rtx 結合時の FcyRIIIa、(B) FcyRIIIa と Mog 結合時の FcyRIIIa、(C) FcyRIIIa と CCR4p-Mog 複合体結合時の FcyRIIIa の同定された各ペプチドの累積重水素交換率の差をプロットしたグラフである。赤色の領域は Sondermann らによって報告された結合部位³⁹⁾、破線は有意差の基準とした値を示している。右図は、HDX-MS の結果を IgG1-Fc-FcyRIIIa の結晶構造 (PDB ID: 3AY4⁴¹⁾) から抽出した FcyRIIIa の構造にマッピングしたものである。重水素交換率が低下した領域は青、重水素交換率が上昇した領域は赤、同定でされなかった領域は薄い灰色、D1 はオレンジ、D2 はピンクで示している。

第四項 XL-MS の距離制限に基づく IgG1-FcγRIIIa 複合体モデル

IgG-FcγRIII 複合体における IgG-Fab の空間配置を調べることを目的として、Rtx-FcγRIIIa 複合体と Mog-FcγRIIIa 複合体について、DSG をクロスリンク試薬として用いて XL-MS を実施した。Rtx-FcγRIIIa 複合体と Mog-FcγRIIIa 複合体について、それぞれ 31 個と 17 個の分子間クロスリンクが確認された (表 1, 2)。

	Protein1	Region1	PepSeq1	AbsPos1	Protein2	Region2	PepSeq2	AbsPos2
1	Rtx	VL	LEIKR	106	FcyRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99
2	Rtx	VL	LEIKR	106	FcyRIIIa	D2	NTALHKVTYLQNGK	118
3	Rtx	VL	LEIKR	106	FcyRIIIa	D2	KYFHHNSDFYIPK	129
4	Rtx	VL	LEIKR	106	FcyRIIIa	D2	ATLKDSGSYFCR	145
5	Rtx	CL	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPR	125	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
6	Rtx	CL	EAKVQWK	144	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
7	Rtx	CL	EAKVQWK	144	FcyRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99
8	Rtx	CL	EAKVQWK	144	FcyRIIIa	D2	NTALHKVTYLQNGK	118
9	Rtx	CL	EAKVQWK	144	FcyRIIIa	D2	VTYLQNGKGR	126
10	Rtx	CL	EAKVQWK	144	FcyRIIIa	D2	KYFHHNSDFYIPK	129
11	Rtx	CL	EAKVQWK	144	FcyRIIIa	D2	ATLKDSGSYFCR	145
12	Rtx	CL	ADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTK	187	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
13	Rtx	CL	ADYEKHK	187	FcyRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99

14	Rtx	CL	ADYEKHK	187	FcyRIIIa	D2	CHSWKNTALHK	112
15	Rtx	CL	ADYEKHK	187	FcyRIIIa	D2	KYFHHNSDFYIPK	129
16	Rtx	CL	ADYEKHK	187	FcyRIIIa	D2	ATLKDSGSYFCR	145
17	Rtx	CL	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	189	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
18	Rtx	CL	VYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	206	FcyRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99
19	Rtx	VH	ATLTADKSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCAR	74	FcyRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99
20	Rtx	CH1	VDKKAEPK	218	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
21	Rtx	CH1	KAEPK	218	FcyRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99
22	Rtx	CH1	KAEPK	218	FcyRIIIa	D2	NTALHKVTYLQNGK	118
23	Rtx	CH1	KAEPK	218	FcyRIIIa	D2	KYFHHNSDFYIPK	129
24	Rtx	CH2	CKVSNKALPAPIEK	326	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
25	Rtx	CH2	CKVSNKALPAPIEK	330	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
26	Rtx	CH2	VSNKALPAPIEK	330	FcyRIIIa	D2	CHSWKNTALHK	112
27	Rtx	CH2	VSNKALPAPIEK	330	FcyRIIIa	D2	KYFHHNSDFYIPK	129

28	Rtx	CH3	LTVDKSR	418	FcγRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
29	Rtx	CH3	LTVDKSR	418	FcγRIIIa	D2	VTYLQNGKGR	126
30	Rtx	CH3	LTVDKSR	418	FcγRIIIa	D2	KYFHHNSDFYIPK	129
31	Rtx	CH3	LTVDKSR	418	FcγRIIIa	D2	ATLKDSGSYFCR	145

表 1. XL-MS で同定された Rtx と FcγRIIIa 間のクロスリンク

	Protein1	Region1	PepSeq1	AbsPos1	Protein2	Region2	PepSeq2	AbsPos2
1	Mog	VL	VEIKR	112	FcyRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99
2	Mog	VL	VEIKR	112	FcyRIIIa	D2	KYFHHSDFYIPK	129
3	Mog	CL	EAKVQWK	150	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
4	Mog	CL	EAKVQWK	150	FcyRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99
5	Mog	CL	EAKVQWK	150	FcyRIIIa	D2	ATLKDSGSYFCR	145
6	Mog	CL	ADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTK	193	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
7	Mog	CL	ADYEKHK	193	FcyRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99
8	Mog	CL	HKVYACEVTHQGLSSPVTK	195	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
9	Mog	VH	DNAKNSLYLQMNSLR	76	FcyRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99
10	Mog	CH1	KVEPK	216	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
11	Mog	CH1	KVEPK	216	FcyRIIIa	D2	KYFHHSDFYIPK	129
12	Mog	CH2	CKVSNKALPAPIEK	324	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20
13	Mog	CH2	CKVSNKALPAPIEK	328	FcyRIIIa	D1	VLEKDSVTLK	20

14	Mog	CH2	VSNKALPAPIEK	328	FcγRIIIa	D2	CHSWKNTALHK	112
15	Mog	CH3	LTVDKSR	416	FcγRIIIa	D2	WVFKEEDPIHLR	99
16	Mog	CH3	LTVDKSR	416	FcγRIIIa	D2	VTYLQNGKGR	126
17	Mog	CH3	LTVDKSR	416	FcγRIIIa	D2	KYFHHNSDFYIPK	129

表 2. XL-MS で同定された Mog と FcγRIIIa 間のクロスリンク

まず、Rtx-Fc と Fc γ RIIIa、Mog-Fc と Fc γ RIIIa 間のクロスリンクの距離制限を用いて、HADDOCK を用いてドッキングモデルを作成した^{90),93)}。その結果、Rtx-Fc-Fc γ RIIIa 複合体では 180 構造が 13 つのクラスターに、Mog-Fc-Fc γ RIIIa 複合体では 186 構造が 12 つのクラスターに分類された。図 12 に、Rtx-Fc-Fc γ RIIIa 複合体と Mog-Fc-Fc γ RIIIa 複合体について、最もエネルギーの低いクラスターからスコアが高い 4 つの構造を示した。Rtx-Fc-Fc γ RIIIa のモデル構造は、第一章第三節で示したような報告されている IgG1-Fc-Fc γ RIIIa の結晶構造と類似した構造が得られた。フコシル化 IgG1-Fc-Fc γ RIIIa 構造 (PDB: 3SGJ) との RMSD 値を計算すると、0.889 Å であった。一方、Mog-Fc-Fc γ RIIIa のモデル構造は、報告されている IgG1-Fc-Fc γ RIIIa の結晶構造と比較して、Fc と Fc γ RIIIa の接触界面は類似しているものの、Fc γ RIIIa が傾いて結合しており、D1 が CH2 に近づいた構造が得られた。この Rtx と Mog の得られた構造の違いは、Rtx-Fc γ RIIIa 複合体を測定した際に同定されている CH2-D2 間のクロスリンク (VSNKALPAPIEK-KYFHNSDFYIPK) が、Mog-Fc γ RIIIa 複合体では同定されなかったことに起因すると考えられる。すなわち、Mog-Fc-Fc γ RIIIa のドッキングでは CH2-D2 間の拘束条件が欠損したことにより、Fc と Fc γ RIIIa の配置が決めきれず、結果として D1 が CH2 に近い構造が最も低いエネルギーのクラスターとして分類されたということである。先行研究でも拘束条件が 1 本少ないことでエネルギーが最低となるモデル構造に違いが生じるといった報告がある⁹⁵⁾。実際に、最も低いエネルギーのクラスターに分類された構造より、結晶構造に近いモデル構造が分類されたクラスターも存在した (図 S8)。以上より、XL-MS で同定されたクロスリンクを拘束条件として構築したモデル構造は、拘束条件が少ないと結晶構造の構造から離れた結果になってしまうことに留意する必要があるが、比較的結晶構造に近いモデル構造が取得でき、タンパク質間の接触界面を決定できることが示された。

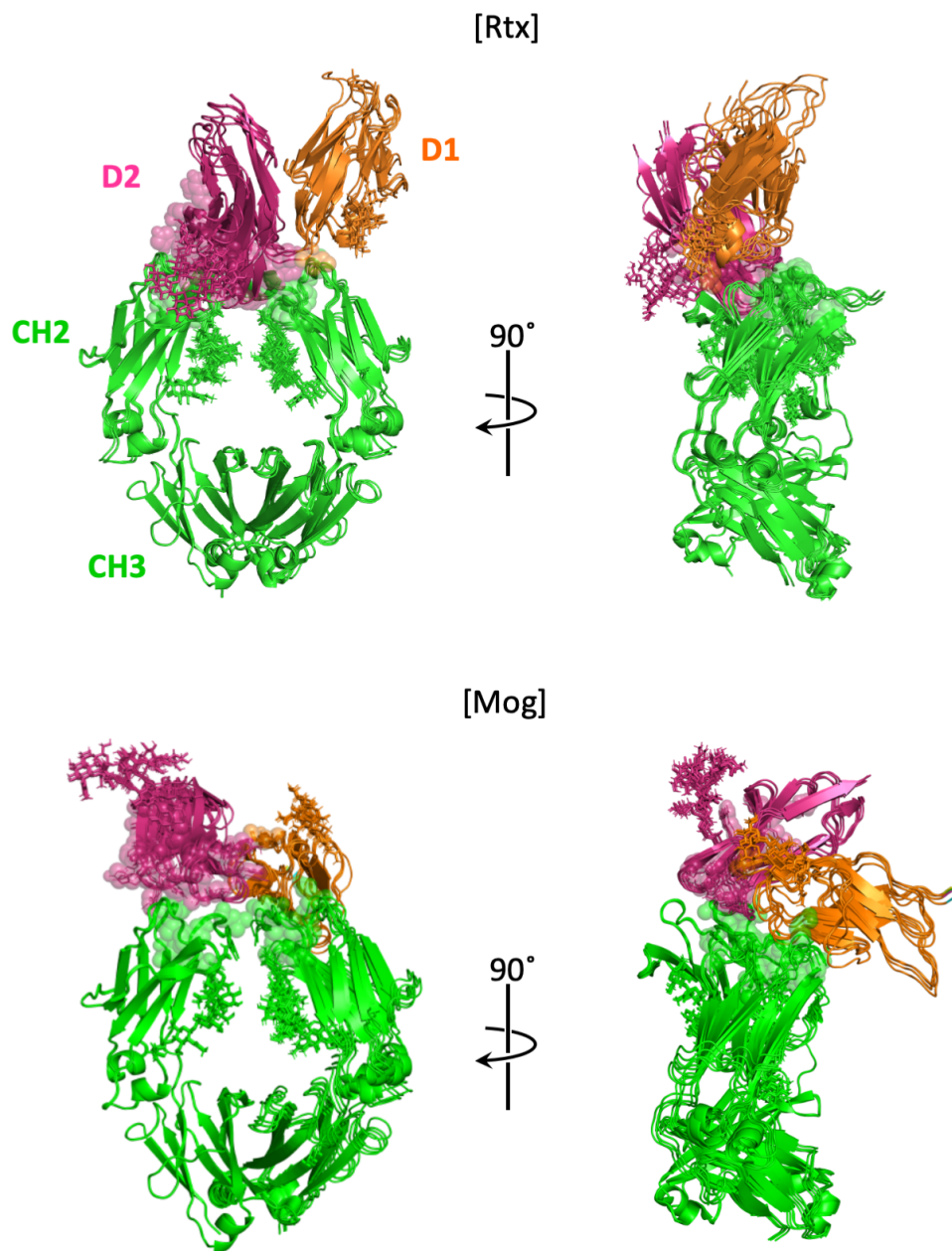


図 12. ドッキングで得られた Rtx-Fc-Fc γ RIIIa 複合体および Mog-Fc-Fc γ RIIIa 複合体のモデル構造の重ね合わせ。

IgG1-Fc と Fc γ RIII の結合に寄与していると報告されているアミノ酸残基を球体で示した³⁹⁾。

この結果を受け、IgG-Fab と FcγRIIIa の空間配置を決定するために、IgG1-Fc-FcγRIIIa 複合体のモデル構造を構築した際と同様に、XL-MS で同定されたクロスリンクを拘束条件として、Rtx-Fab と Fc-FcγRIIIa、Mog-Fab と Fc-FcγRIIIa についてタンパク質-タンパク質ドッキングを行った。ヒンジ領域の柔軟性を考慮するため^{78),89)}、ドッキングモデルの作成にはIgGの結晶構造を使用せず、Fab断片の構造を使用した。ドッキングの結果、Rtx-Fab-Fc-FcγRIIIa 複合体では 199 構造が 1 つのクラスターに、Mog-Fab-Fc-FcγRIIIa 複合体では 147 構造が 7 つのクラスターに分類された。図 13 に、Rtx-Fab-Fc-FcγRIIIa 複合体と Mog-Fab-Fc-FcγRIIIa 複合体について、最もエネルギーの低いクラスターからスコアが高い 4 つの構造を示した。Rtx-Fab、Mog-Fab とともに CL ドメインが FcγRIIIa に近づくように配置されており、この実験で用いた条件では IgG1 の糖鎖修飾のフコース付加の有無に関わらず、Fab 領域は CL ドメインが FcγRIIIa 側を向くような配置で FcγRIIIa に近接していることが示された。

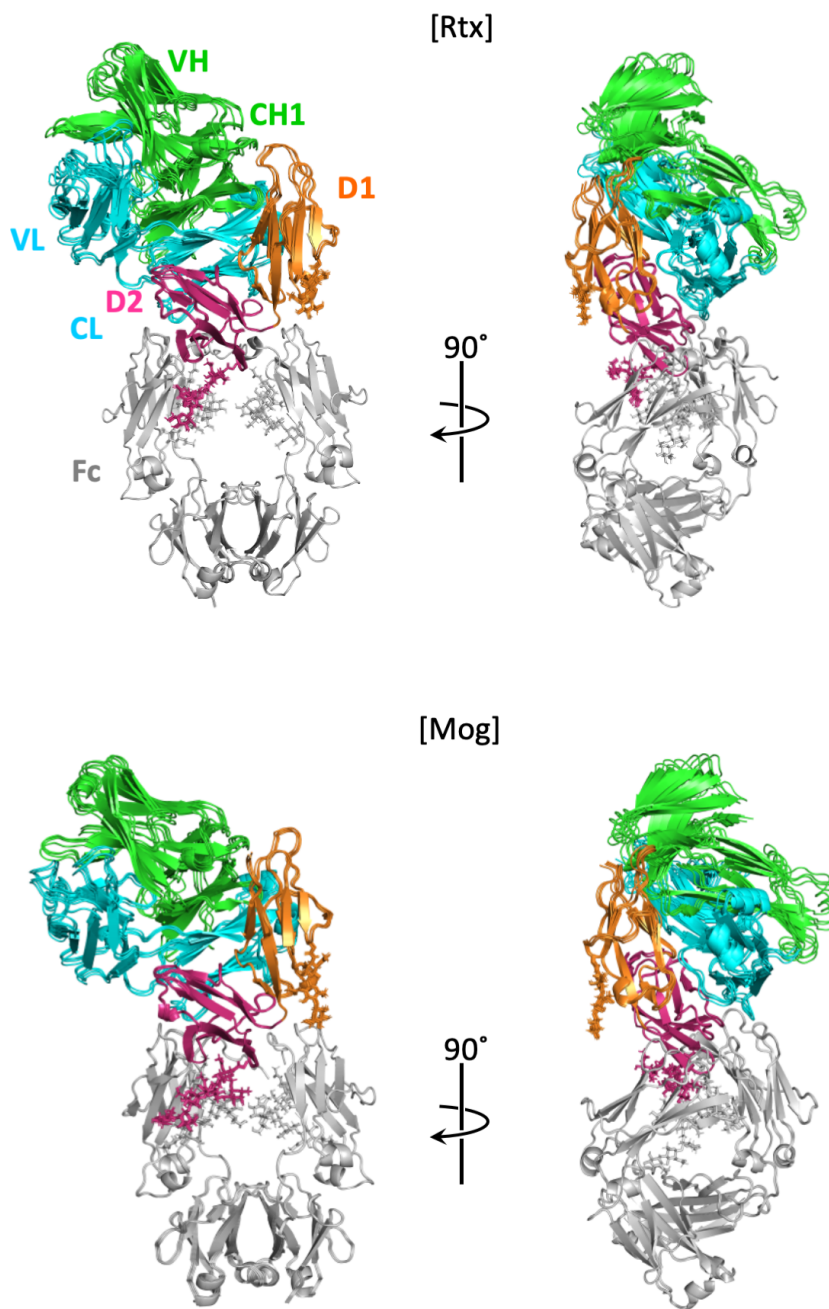


図 13. ドッキングで得られた Rtx-Fab-Fc-Fc γ RIIIa 複合体および Mog-Fab-Fc-Fc γ RIIIa 複合体の構造の重ね合わせ。

第四節 考察

第一項 HDX-MS による IgG-FcγRIII 相互作用の観察

Rtx および Mog について FcγRIIIa に結合した際の HDX-MS の結果に着目する。Rtx および Mog は FcγRIIIa との結合時に、結晶構造解析で同定されていた結合部位を含むペプチド、すなわち Rtx では CH2 の L239–M256 と V266–W281、CH2-CH3 の Y323–V352 (Mog では、L237–M254、V265–W279、Y321–V350 がそれぞれの部位に対応) の重水素交換率が有意に低下していた。さらに、Rtx と Mog で共通して、CH2 の結合部位から遠位に位置しているペプチド、すなわち CL の Q154–T171、CH1 の V119–L146 と N163–L178、CH3 の I381–L402 と H433–G450 (Mog では、CL の K154–T183、CH1 の V115–L147 と S159–L176、CH3 の W383–F406 と F425–G448 がそれぞれの部位に対応) も有意に重水素交換率が低下していることが観察された。したがって、CH2 のフコースの有無にかかわらず、IgG の Fab は FcγRIII との相互作用に寄与しており、FcγRIII との結合に伴って IgG にはアロステリックな構造変化が生じることが示唆された。CH1 の V157–L164 およびこれらの残基を含むペプチドが FcγRIIIa 存在下で状態に変化が生じることが、Houde ら⁵⁹⁾の HDX-MS、Shi⁵⁶⁾らと Sun ら⁵⁴⁾の HRF によっても検出されている。

一方、FcγRIIIa に関して、Rtx および Mog の結合した際に、結晶構造で報告されている結合部位を含むあるいはそれに近い領域に存在するペプチドである、D1-D2 の S74–L82 と E83–A93、D2 の R107–L116 と H117–D136 は、共通して重水素交換率が有意に低下していることが明らかとなった。また、報告されている結合部位とは遠位に存在する D1 の I47–Y54 も、Rtx および Mog の結合時に共通して重水素交換率の低下が観察された。以上の結果より、FcγRIII が D1、D2 を介して IgG1 と相互作用していることが示唆された。興味深いことに、D1 の V7–T24 は Rtx および Mog との結合において、重水素交換率が上昇していることが示された。これは FcγRIII が IgG と結合する際に D1-D2 界面に構造変化が生じることを示唆している。

また、糖鎖の違いにおける IgG と FcγRIII の相互作用の違いも HDX-MS によって明らかとなった。第一章第四節でも述べたが、先行研究によって、IgG のフコースを除去する

と糖鎖が付加している部位の周辺に局所的な構造変化が生じ^{63),64)}、この構造変化により FcγRIIIa への結合親和性と ADCC 活性が高まることが報告されている²⁸⁾⁻³⁰⁾。Rtx はフコシル化 IgG1 であり、Mog はアフコシル化 IgG1 である。興味深いことに、FcγRIIIa と結合した際に、Rtx のみ CL の V195–C213 および CH1 の Y184–T201 の重水素交換率の低下が観察された。また、FcγRIIIa 側においては、D1 の F55–E66 は Rtx と複合体を形成した場合のみ有意に重水素交換率が低下した一方で、D2 の F137–S149 は Mog と複合体を形成した場合のみ有意に重水素交換率が低下していることが示された。すなわち、Rtx-FcγRIIIa と Mog-FcγRIIIa の HDX-MS の結果を比較すると、Rtx-FcγRIIIa では Rtx の Fab と FcγRIIIa の D1 がより重水素交換反応から保護されているのに対し、Mog-FcγRIIIa では FcγRIIIa の D2 がより重水素交換反応から保護されていることが示された。したがって、アフコシル化により、Fab の D1 への結合の寄与がわずかに減少する一方で、Fc-D2 相互作用が促進されることが示唆された。

第二項 Fab 領域の FcγRIII に対する結合部位

第一項で IgG の Fab と FcγRIII の D1 が結合している可能性が示されたが、HDX-MS では、IgG-FcγRIII 複合体における Fab と FcγRIII の空間配置に関する情報を得ることはできない。そこで、本研究では IgG1-FcγRIIIa 複合体について XL-MS を行い、XL-MS の結果から得られた拘束条件を用いてドッキングモデルを構築した。図 14 は図 13 で示した Rtx-Fab-FcγRIIIa 複合体のモデル構造に、Rtx の FcγRIIIa 結合時の HDX-MS の結果をマッピングしたものである。Rtx-Fab の FcγRIIIa に近接した領域では、重水素交換率が明らか低下していることが示された。Rtx-Fab-FcγRIIIa のドッキングモデルの構造では、Fab において 2 箇所、D1 および D2 の 1 箇所ずつが主な結合部位として同定された。接触界面 1 には、CL の Q154–T171、CH1 の N163–L178、D1 の I47–Y54 および F55–E66、接触界面 2 には CL の V195–T213 および D2 の H117–D136 の重水素交換率が低下した領域もしくはその近くに位置する残基が含まれている。CL-D1 間の Q154:D57、G156:F55、N157:F55、CH1-D1 間の S180:S52、S180:S53、CL-D2 の H197:S135、S201:H132、S202:H133 の距離はすべて 2-

7Å の範囲にあり、これらのアミノ酸は Fab-FcγRIII 相互作用に参加している可能性が高いといえる。また、Mog の Fab は Rtx の Fab に比べて重水素交換率が低下した領域の数は少ないものの、Mog-Fab-FcγRIIIa のモデル構造においても、CL の K154-T183 は D1 の I47-Y54 に近接しており、Rtx の Fab と Mog の Fab は糖鎖プロファイルに関わらず、FcγRIIIa との相互作用は類似していることが推察される。

一方で、Rtx と Mog に共通して重水素交換率の低下が観察された領域である、CH1 の V119-L146 と N163-L178 (Mog の対応する部位は V115-L147 と S159-L176) は、XL-MS の距離制限を用いて構築したモデル構造ではこれらを議論することは困難である。しかし、この CH1 の重水素交換率の低下は、FcγRIIIa との別の相互作用領域を示している可能性があり、これは IgG1 の CH1 ドメインが FcγRIIIa と相互作用することを示した MD シミュレーションを用いた先行研究からも支持される^{57),58)}。IgG1 の CH1 が FcγRIIIa に近接しているモデル構造が得られない理由としては、クロスリンクの拘束条件を用いたモデル構築の技術的限界が考えられる。すなわち、CH1-FcγRIIIa と CL-FcγRIIIa の両方のクロスリンクの距離制限を満たすような Fab と FcγRIIIa の空間配置が存在せず、XL-MS で同定した CL-FcγRIIIa のクロスリンクの数が CH1-FcγRIIIa のクロスリンクの数よりも多いために、CL-FcγRIIIa のクロスリンクを優先的にドッキングモデル構築の際の拘束条件として使用することになったという理由である。以上の結果から、Fab-FcγRIII の相互作用には 2 つのパターンが存在し、これらの相互作用の検出は使用する方法に依存することが示唆された。すなわち、CL-FcγRIII 相互作用は XL-MS により観察することができ、MD シミュレーションは CH1-FcγRIII 相互作用を捉えることが可能であり、HDX-MS は両者の相互作用を評価することが可能であると考えられる。

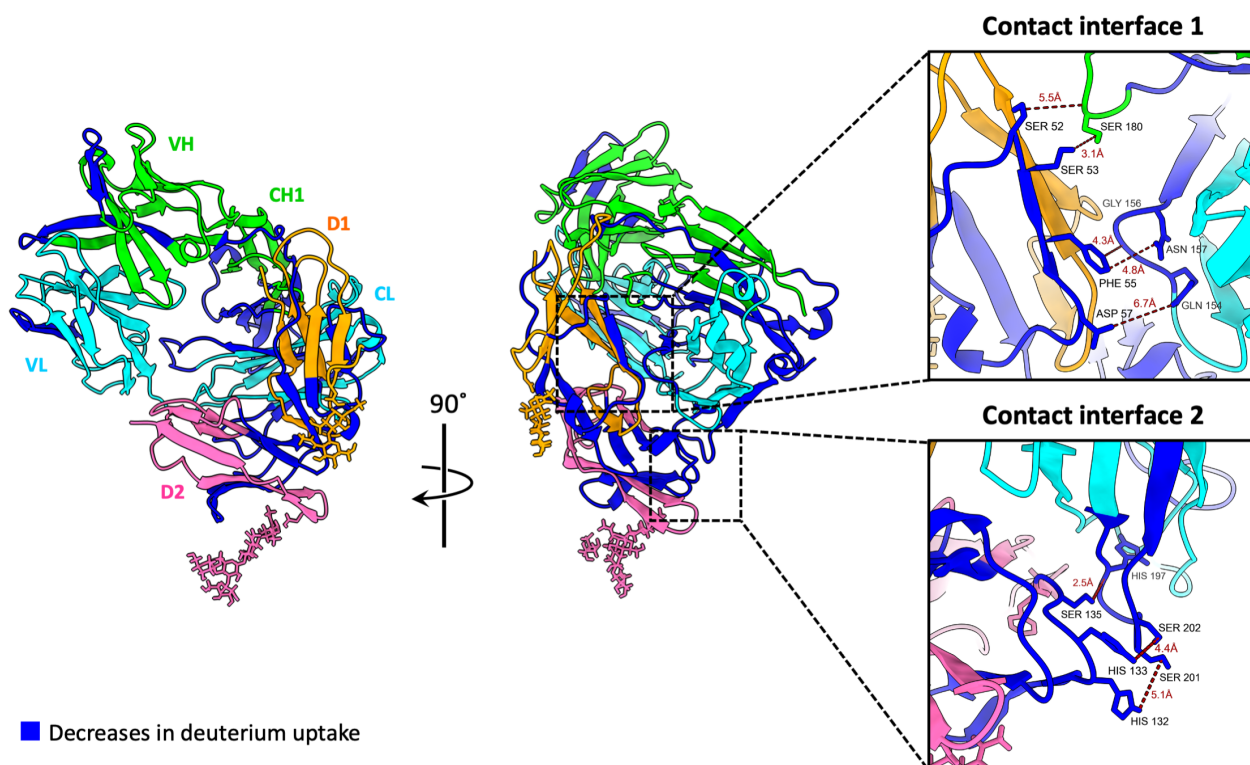


図 14. HDX-MS の結果をマッピングした Rtx-Fab-Fc-FcγRIIIa 複合体の最適解から抽出した Rtx-Fab-FcγRIIIa のモデル構造。

重水素交換率が低下した領域を青、Fab の軽鎖をシアン、Fab の重鎖を緑、FcγRIIIa の D1 をオレンジ、FcγRIIIa の D2 をピンクで示した。拡大図は Fab と FcγRIIIa の接触界面 1、2 を示す。

第三項 FcγRIII との結合に伴う IgG の構造変化

本項では、HDX-MS によって観察された FcγRIII との結合に伴う IgG の構造変化について議論する。CH3 の I381-L402 と H433-G450 (Mog の対応部位は W383-F406 と F425-G448) は、FcγRIIIa との結合時に明らかに重水素交換反応から保護されていたが、報告されている結晶構造と XL-MS の結果を用いて作成したドッキングモデルから考えると、これらの領域は FcγRIIIa との直接の相互作用部位ではないと考えられる。IgG の構造変化に関する先行研究では、Latypov ら⁹⁶⁾が、酸性ストレスによって CH3 に先行して CH2 ドメインのアンフォールディングが引き起こされ、最終的に CH3 の酸性残基である E380 と E430 のプロトン化による部分変性によって、CH2 の K248 と CH3 の E380、CH2 の K338 と CH3 の E430 の間の二つの静電的な相互作用が破壊されることを報告している (これらの残基は Rtx の K252 (CH2)、K344 (CH2)、E384 (CH3)、E434 (CH3) および Mog の K250 (CH2)、K342 (CH2)、E382 (CH3)、E432 (CH3)) に対応する)。さらに最近の HDX-MS を用いた研究によって、熱ストレス条件において IgG は、部位 1 から部位 2 (部位 1 : CH2 の F235-M252、部位 2 : CH3 の S424-G446) へと構造変化が伝播し、Fc 領域の 2 つの部位での重水素交換が増加することが報告されている⁹⁷⁾。以上の研究は、CH2 の構造変化が生じると、CH3 においても CH2 と同様の構造変化が誘導されることを示唆している。また興味深いことに、Rtx ならびに Mog の両方で FcγRIIIa との結合時に重水素交換率の低下が観察された、CH2-CH3 の Y323-V352 と CH3 の H433-G450 (Mog は Y321-V350 と F425-G448 が対応) は、Diebolder ら⁹⁸⁾と Wang ら⁹⁹⁾による解析で変異を入れると六量体形成を促進するアミノ酸である E345R、E430G、S440Y を含んでいた。E345R、E430G、S440Y の三箇所に変異の入った IgG (Rtx の対応部位は E349、E434、S444、Mog の対応部位は E347、E432、S442) は IgG の六量体の形成が促進され、野生型よりも C1q を動員する能力が高いことが報告されている。以上の結果より、IgG が免疫細胞上の FcγRIII に結合すると、IgG の CH2 に構造変化が生じ、その構造変化が伝播して CH3 にも構造変化が生じるが、その CH3 の構造変化は細胞表面での IgG のクラスター化を促進する可能性が示唆された。

第四項 抗原の結合に伴う IgG の構造変化

本項では、HDX-MS によって観察された抗原との結合に伴う IgG の構造変化について議論する。第一章第五節で述べたように、先行研究では抗原の結合時に Fab 領域の特に CH1₁ ループに構造変化が生じることが報告されている⁶⁷⁻⁶⁹)。これらの先行研究と同様に、本研究の HDX-MS のデータは、抗原との結合が Fab 部分の重水素交換率の挙動に変化をもたらすことを示した。Ada の TNF との結合によって重水素交換率が低下した CL の領域は、Mog の CCR4p の結合により検出された領域とほぼ同じであった。一方、Ada の CH1 において、TNF との結合により重水素交換率が低下した領域は、Mog と CCR4p が相互作用した際には検出されなかった。すなわち、TNF との結合によって生じた CL の I117-S131 と L136-E161 の重水素交換率の低下は、CCR4p との結合によっても観察されたが (Mog の対応部位 : L141-T177)、CH1 の V117-L146、N163-L178、Y184-L197 には CCR4p と結合した際には重水素交換率に変化は見られなかった。Ada の重水素交換率の低下を示した CH1 の領域は、CH1₁ ループと CH1 ドメイン内の他のループが含まれており、これらの領域は、HRF によって抗原との結合により溶媒へのアクセス性が向上することが報告されている領域と一致する⁶⁹)。これらの結果は、Ada が TNF と結合すると CH1₁ ループをはじめとする CH1 ドメインの構造変化が生じるが、CCR4p との結合では、CH1₁ ループに構造変化は起こらないことを示唆している。この CH1₁ ループの構造変化の違いは、タンパク質抗原である TNF とペプチド抗原である CCR4p の違いから生じたと考えられ、これは Sela-Culang らの報告とも一致する⁶⁷)。重要なこととして、Ada の CL と CH1 ドメインの両方で TNF との結合時に、重水素交換率が低下した領域は、FcγRIIIa との結合時にも重水素交換率が低下している領域であった。同様に、Mog と CCR4p の結合で重水素交換率が低下した領域は、Mog が FcγRIIIa との結合した際に重水素交換率の低下が観察された領域と一致していた。第二章に記載したように、BLI の結果より、抗原の結合時には IgG1 の FcγRIIIa に対する k_{off} の値が有意に減少することが示されている。Ada の FcγRIIIa に対する k_{off} が TNF 存在下で有意に減少したことと本研究の HDX-MS の結果を鑑みると、TNF と Ada の結合は CL および CH1 ドメインの構造変化をもたらし、Ada が安定な TNF-Ada-

FcγRIIIa 複合体の形成を促進するような構造に変化している可能性が示唆される。また、CCR4p に結合した Mog の FcγRIIIa に対する k_{off} は、CCR4p に結合していない Mog の k_{off} と比較して有意に減少しているが、Ada と比較すると減少の割合はわずかであり、この減少の割合の差は HDX-MS で観察された CCR4-Mog 相互作用に伴う Mog の構造変化が CL ドメインのみであることに関係していると考えられる。また、TNF との結合により Ada の CH2 および CH3 ドメインでの重水素交換率が減少することから、TNF の結合では Fc にも構造変化が生じ、TNF-Ada-FcγRIIIa 複合体の安定化につながることを示唆された。

第五節 小括

第三章では、糖鎖プロファイルの異なる市販の抗体医薬品、Rtx および Mog を用いて、HDX-MS ならびに XL-MS を行い、糖鎖プロファイルの影響を含めて IgG-FcγRIII 相互作用における結合部位と結合に伴う構造変化部位を明らかにした。さらに抗原の種類がタンパク質抗原とペプチド抗原である、Ada と Mog を用いて HDX-MS を行い、IgG-FcγRIII 相互作用における抗原結合の影響を議論した。HDX-MS と XL-MS を組み合わせた結果、Fab の CL ドメインは FcγRIII に近接しており、FcγRIII の D1 および D2 に対する結合部位を持っていることが明らかになった。また、CH1 にも重水素交換率の低下が観察されたが、これは FcγRIII と相互作用する別の領域である可能性が示唆された。したがって、Fab-FcγRIII 相互作用には、CL-FcγRIII 相互作用と CH1-FcγRIII 相互作用の 2 パターンが存在しており、用いるアプローチの違いによって検出される相互作用が異なることが示唆された。これらの相互作用はフコシル化の有無に関わらず本質的には同じであるが、アフコシル化により Fc-D2 相互作用は増強され、Fab の寄与はわずかに減少することが示された。また HDX-MS により、FcγRIII 結合に伴って CH3 の構造変化が生じることが示され、これは細胞表面でのクラスター化の促進に寄与している可能性が示唆された。さらに、抗原の結合による Fab の構造変化は、抗原-IgG-FcγRIII 複合体の形成の促進と安定化に寄与しており、その寄与の割合は抗原の結合がひきおこす Fab の構造変化に依存していることが示された。

以上より、IgG は Fab の CL に FcγRIII との結合部位を持ち、抗原の結合によって生じる Fab の構造変化によって IgG-FcγRIII 相互作用が安定化されることが明らかになった。

第四章 総括

本研究では糖鎖プロファイルおよび抗原の結合の影響を含めた、IgG-FcγRIII 相互作用の包括的な理解を目的とし、熱力学的、速度論的、構造生物学的な解析を行なった。ここで、第二章および第三章、ならびに先行研究をふまえて、IgG の FcγRIII との新規結合モデルを提案する (図 15)。まず、抗原が結合すると FcγRIII との結合を促進させるように IgG の構造が変化する。この抗原の結合に伴う IgG の構造変化は抗原によって異なり、CCR4p のような抗原 (タイプ A) が結合すると CL ドメインの構造変化が起こる。一方、TNF のような抗原 (タイプ B) が結合すると、CL に加えて CH1、CH2、CH3 にも構造変化が生じる。FcγRIII は IgG の Fab 部分と Fc 部分の両方に結合し、その際の Fab-FcγRIII 相互作用には、CL-FcγRIII 相互作用と CH1-FcγRIII 相互作用の 2 パターンが存在する。FcγRIII が IgG に結合すると CH2 から CH3 へ構造変化が伝播し、その後細胞表面で抗原-IgG-FcγRIII 複合体がクラスター化することにより、FcγRIII のシグナル経路が活性化される。

本研究の熱力学的および速度論的な解析により、Fab 領域は FcγRIII との相互作用部位を提供し、IgG-FcγRIII 相互作用を安定化するように働くことが明らかとなった。また、構造生物学的な解析によって、IgG の Fab 領域は CL と CH1 の両方に FcγRIII に対する結合部位を持つことに加えて、抗原と結合する際には構造変化を介して、IgG-FcγRIII 相互作用をさらに安定化するように働くことが示された。以上より、Fab 領域は単なる抗原認識モジュールではなく、抗原-IgG-FcγRIII 複合体の安定な形成に寄与しており、細胞表面での抗原-IgG-FcγRIII 複合体のクラスター化を促進させ、続く免疫エフェクター機能のための免疫細胞の活性化を調節していると考えられる。

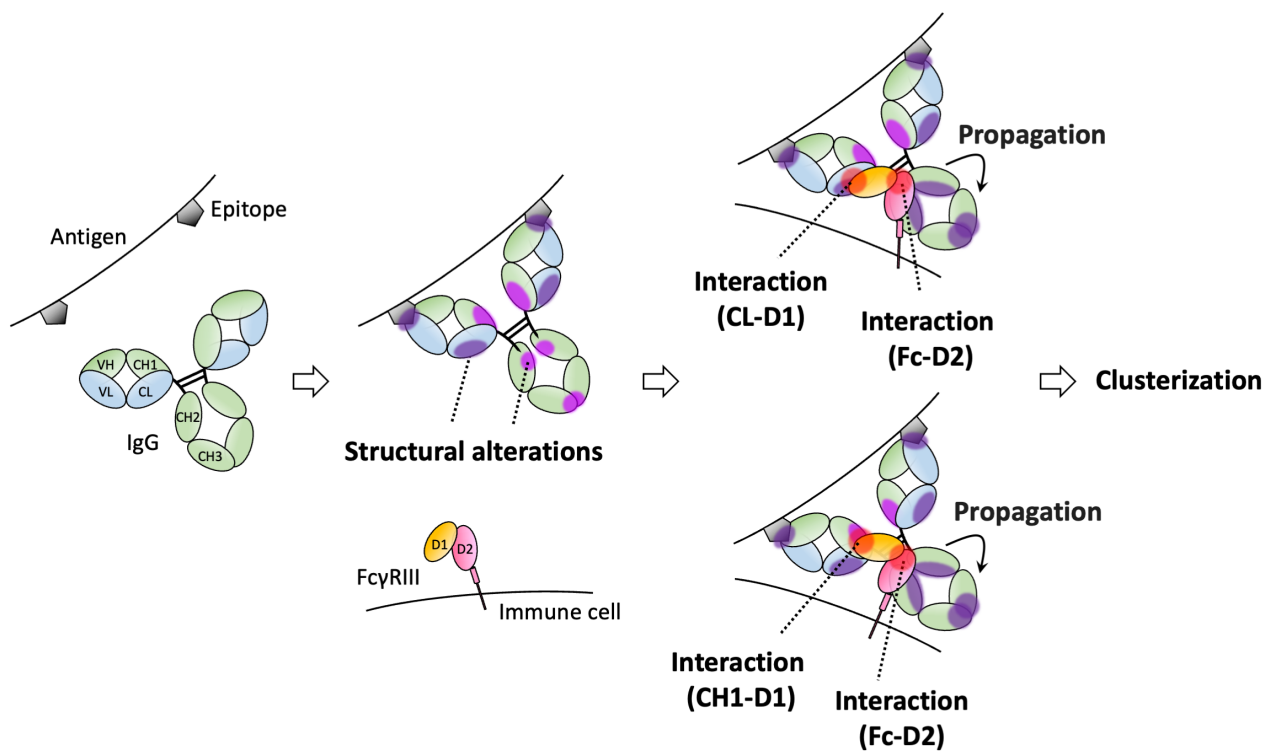


図 15. 抗原、IgG、FcγRIII の新規結合モデル

本研究で提案する、熱力学的、速度論的、構造生物学的な解析によって導かれた新しい結合モデルは、抗原、IgG、FcγRIII の三者相互作用に関する新たな洞察をもたらし、IgG-FcγRIII 相互作用の包括的な理解と、IgG が介在する免疫エフェクター機能の調節機構の解明に貢献することが期待できる。また本研究の成果は、これまで主に Fc 領域のアミノ酸置換や糖鎖に重点が置かれてきた抗体医薬品の開発において、Fab 領域も開発の標的となることを示唆しており、抗体医薬品が有効性と安全性を高めるためにまだ改良の余地がある魅力的な開発候補であることを示している。

補足資料

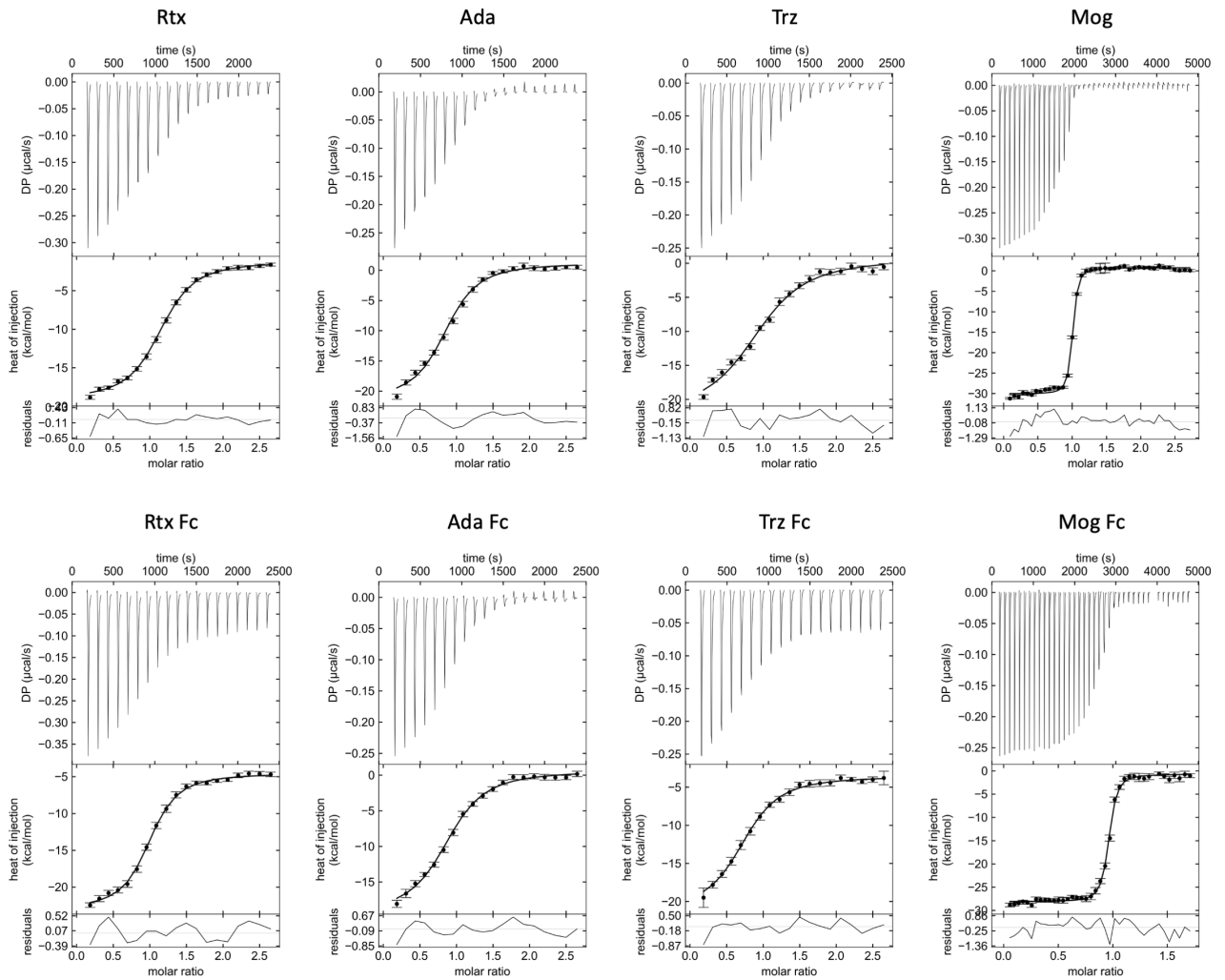


図 S1. ITC の測定で得られた IgG1-FcγRIIIa 相互作用（上段）および IgG1-Fc-FcγRIIIa 相互作用（下段）相互作用のサーモグラム。

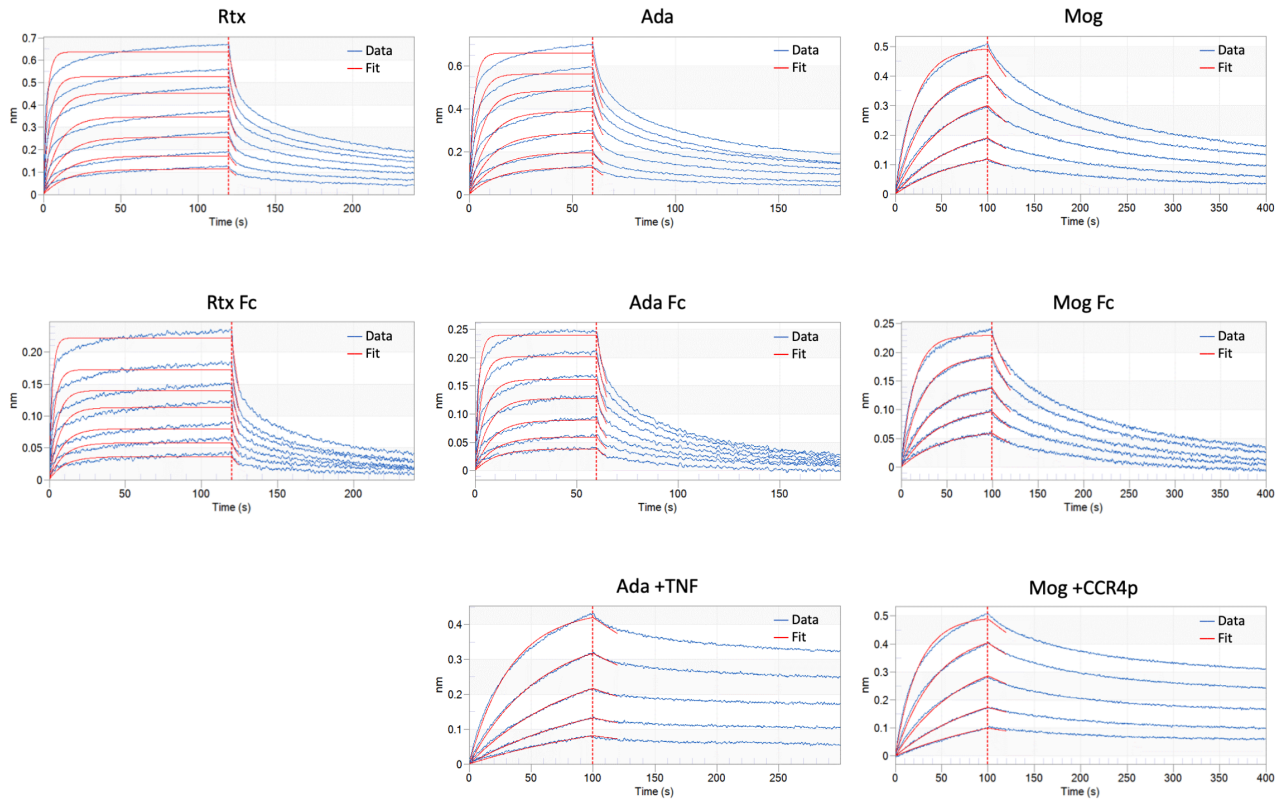


図 S2. BLI 測定で得られた IgG1-Fc γ RIIIa 相互作用（上段）、IgG1-Fc-Fc γ RIIIa（中段）、抗原-IgG1-Fc γ RIIIa の相互作用のセンサグラム。

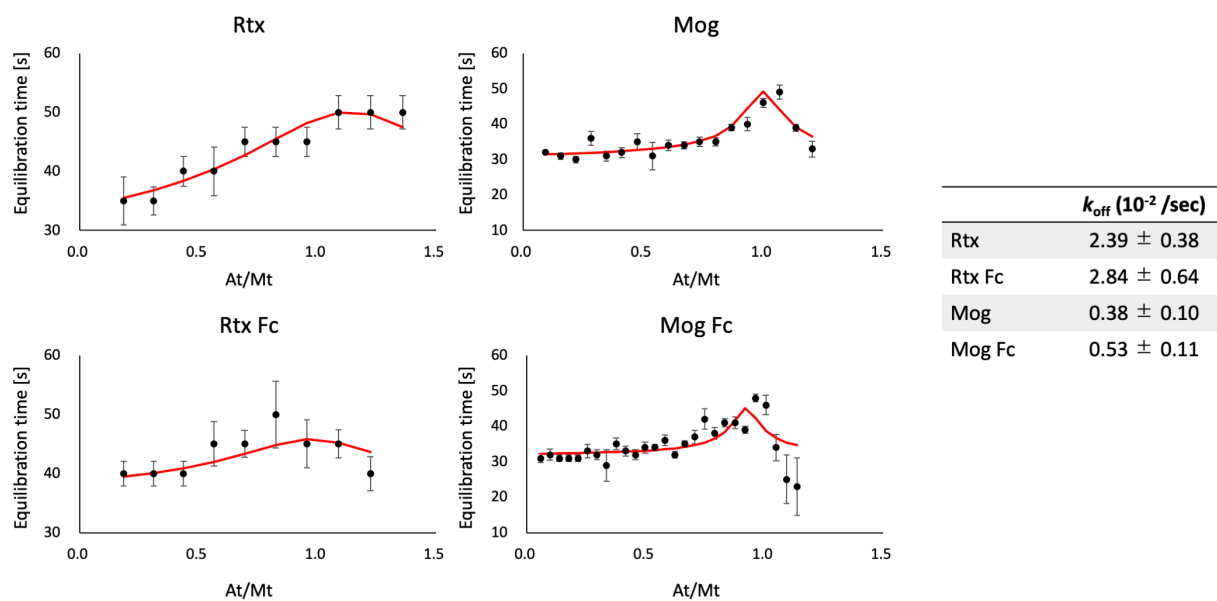


図 S3. KinITC によって得られた IgG1-FcγRIIIa (上段) および IgG1-Fc-FcγRIIIa (下段) の相互作用の ETC と算出された k_{off}

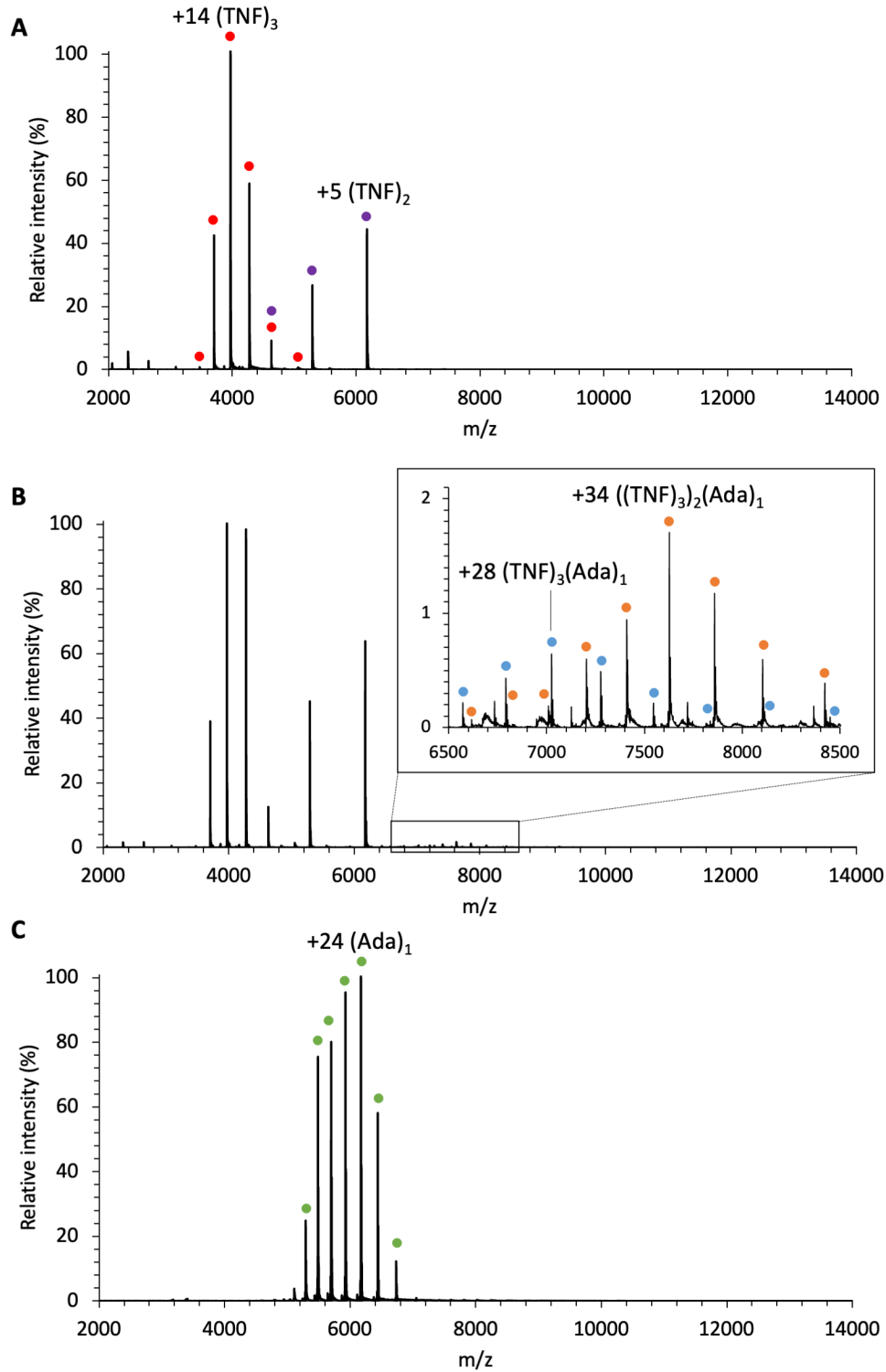
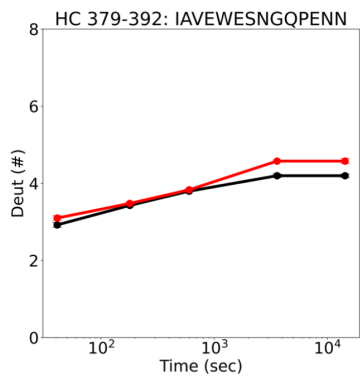
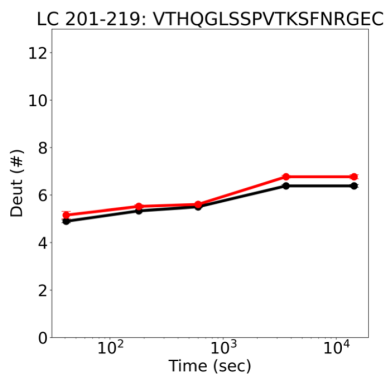
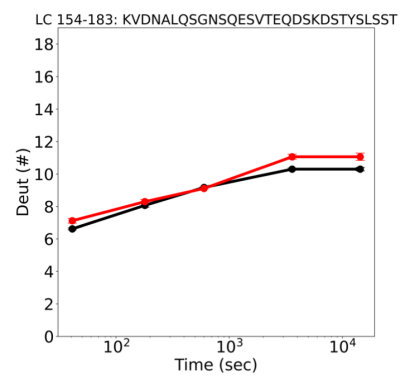
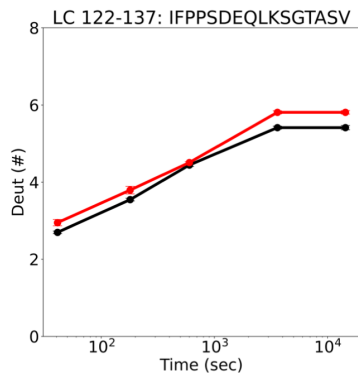
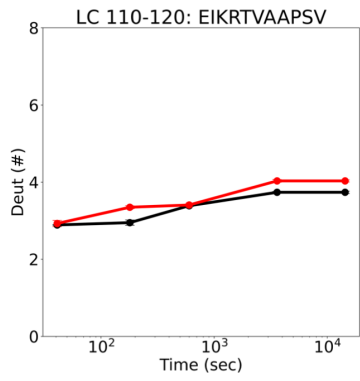


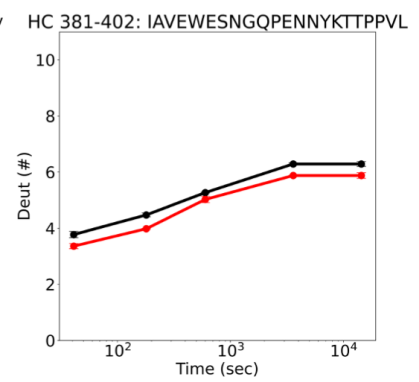
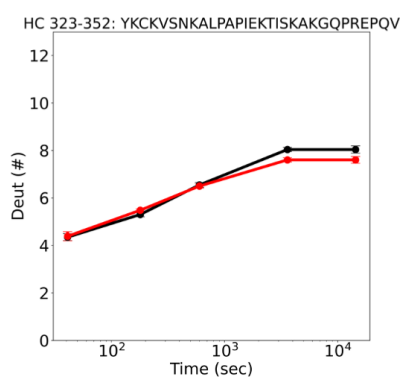
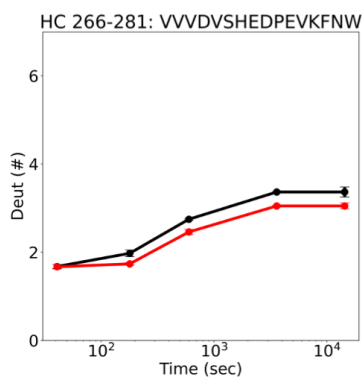
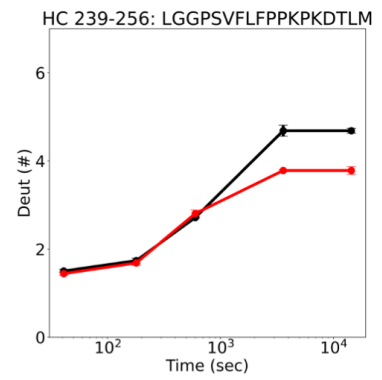
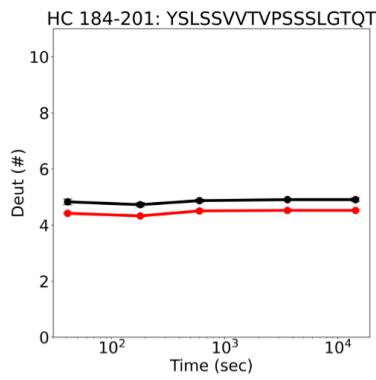
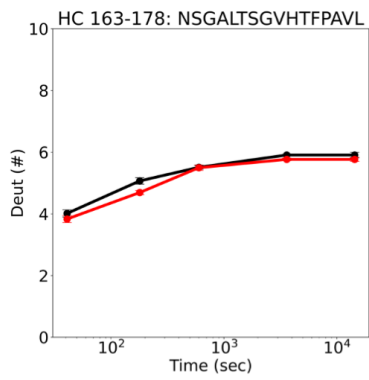
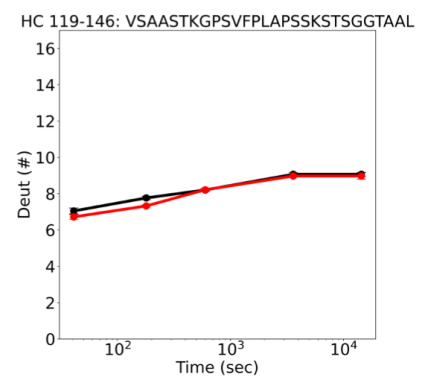
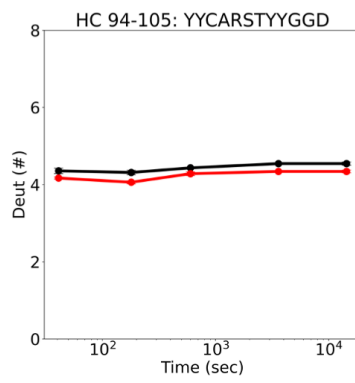
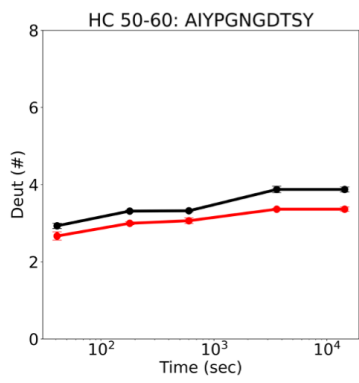
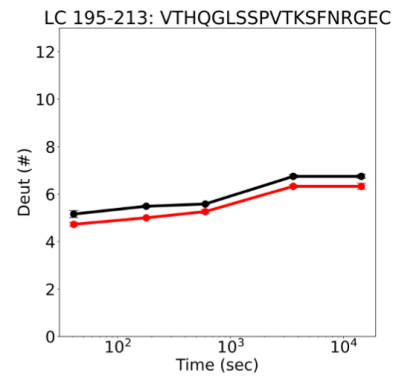
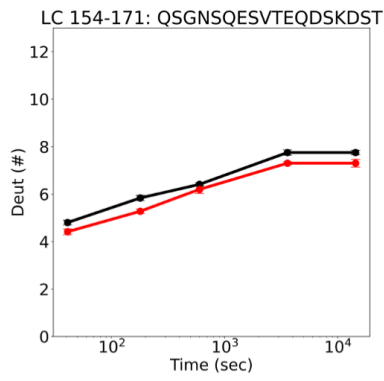
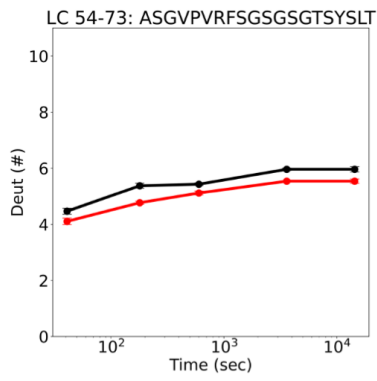
図 S4. ネイティブ質量分析を用いて取得した、TNF 三量体と Ada をモル比 (A) 1:0、(B) 3:1、(C) 0:1 で混合したサンプルのマススペクトル。

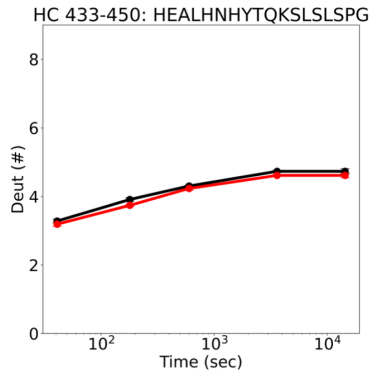
分子量 37,038 Da のスペクトルは紫色の丸、55,553 Da は赤色の丸、148,083 Da は緑色の丸、203,646 Da は青色の丸で、259,210 Da はオレンジ色の丸で示している。

A Mog vs Rtx

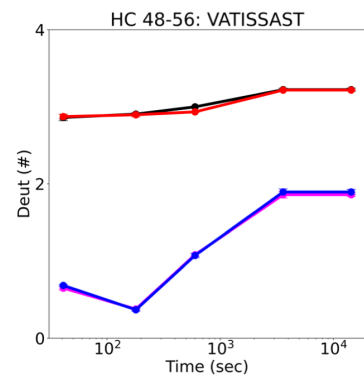
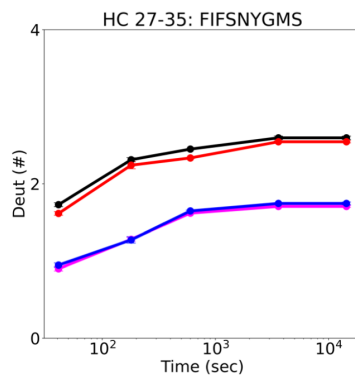
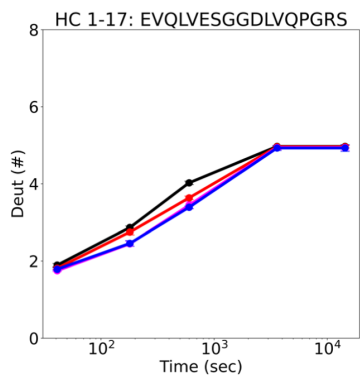
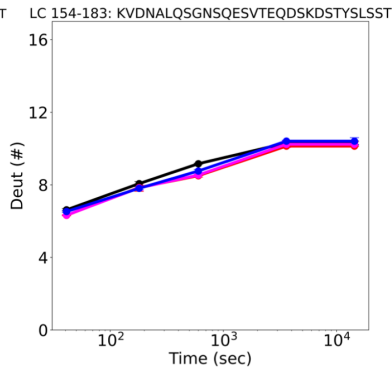
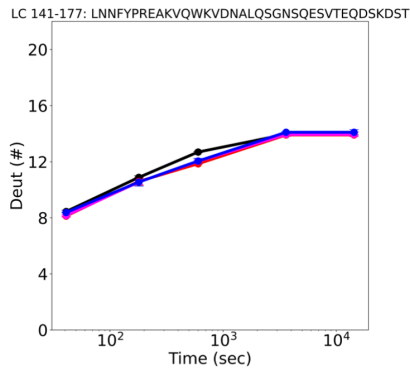
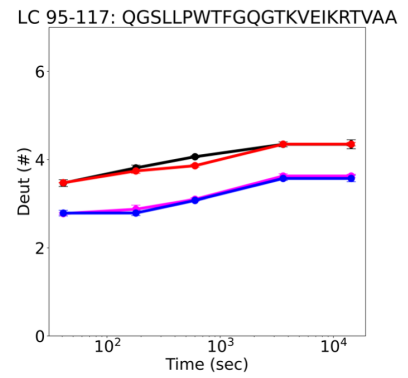
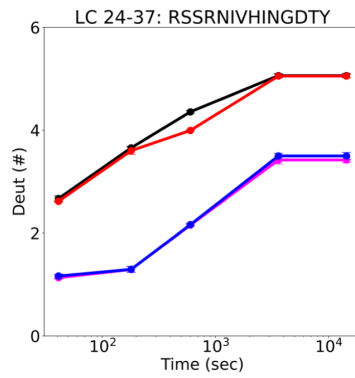
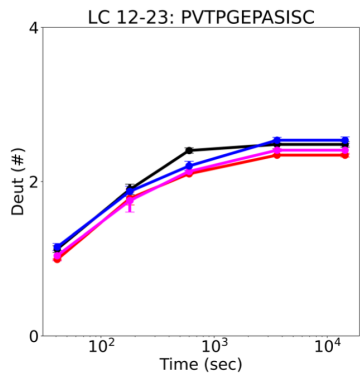


B Rtx vs Rtx-FcγRIIIa

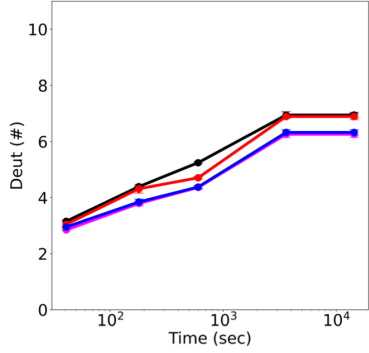




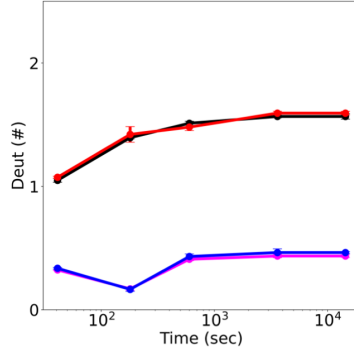
C Mog vs Mog-FcγRIIIa vs CCR4p-Mog vs CCR4p-Mog-FcγRIIIa



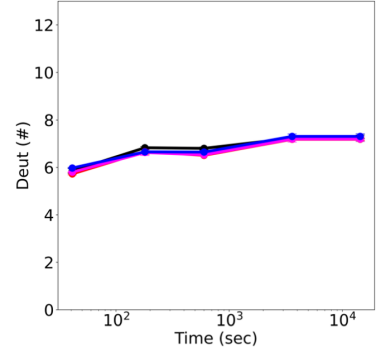
HC 57-80: YSYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLY



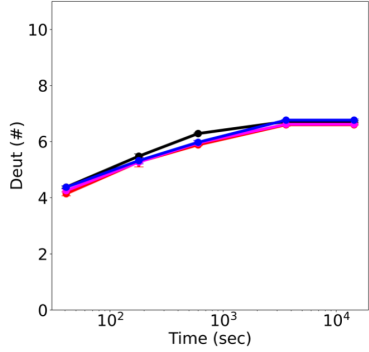
HC 94-104: YYCGRHSDGNF



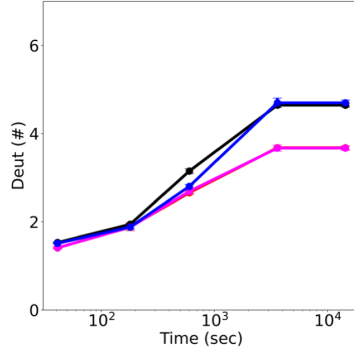
HC 115-147: VTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCL



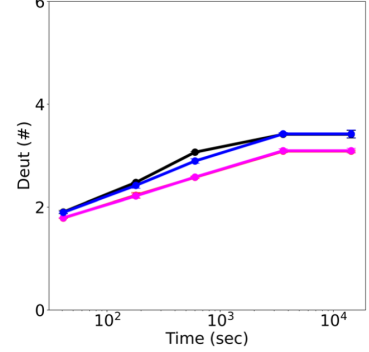
HC 159-176: SWNSGALTSGVHTFPAVL



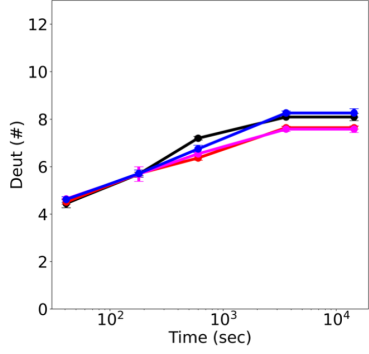
HC 237-254: LGGPSVFLFPPKPKDTLM



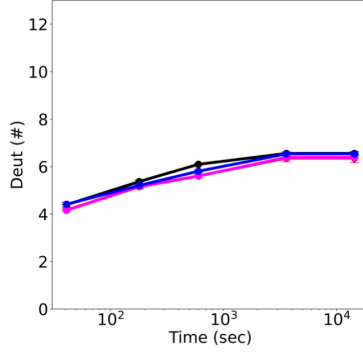
HC 265-279: VVDVSHEDPEVKFNW



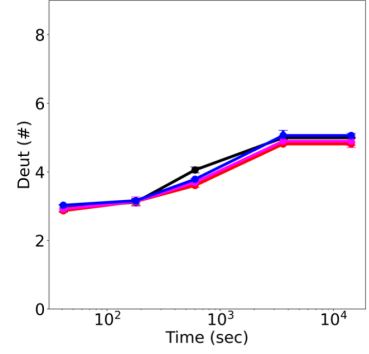
HC 321-350: YKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQV



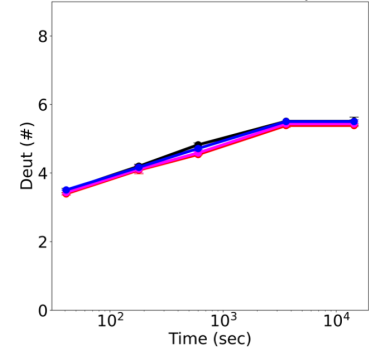
HC 383-406: WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF



HC 407-425: FLYSKLTVDKSRWQQGNVF

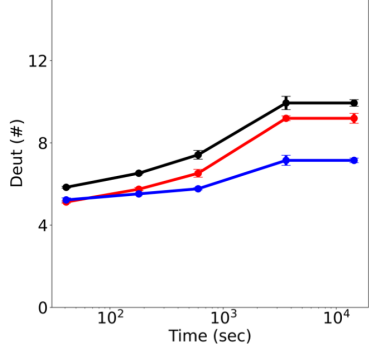


HC 425-448: FSCSVMHEALHNNHYTQKLSLSLSPG

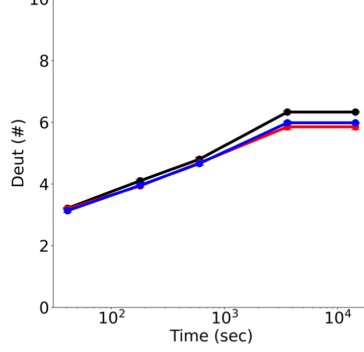


D Ada vs Ada-FcγRIIIa vs TNF-Ada

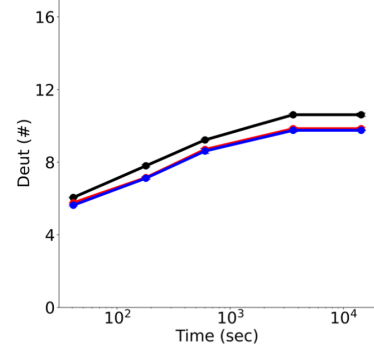
LC 47-71: LIYAASTLQSGVPSRFRSGSGSGTDF



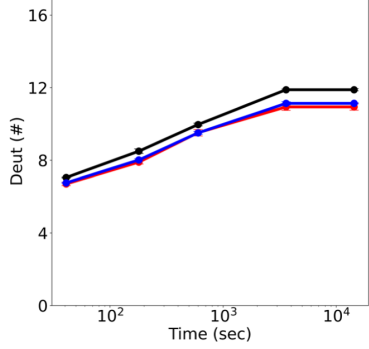
LC 117-131: IFPPSDEQLKSGTAS



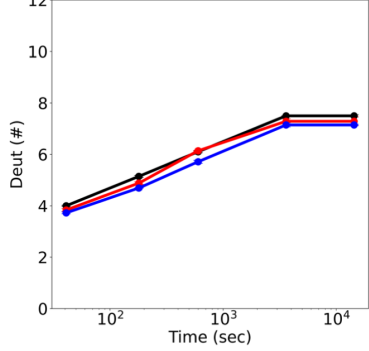
LC 136-161: LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE



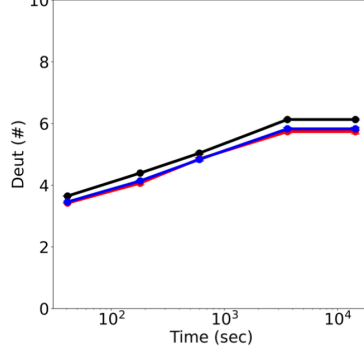
LC 149-178: KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYLSST



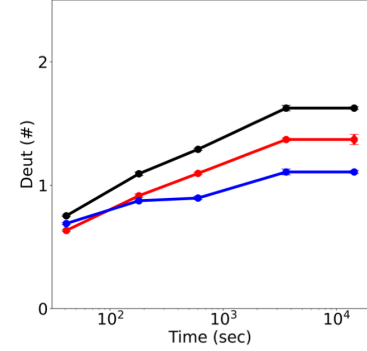
HC 1-17: EVQLVESGGGLVQPGRS



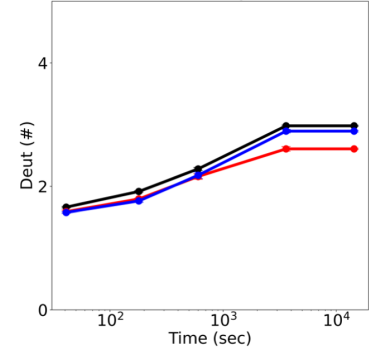
HC 4-18: LVESGGGLVQPGRSL



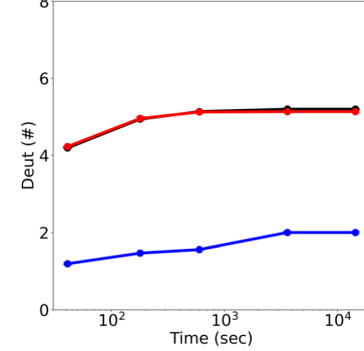
HC 27-32: FTFDDY



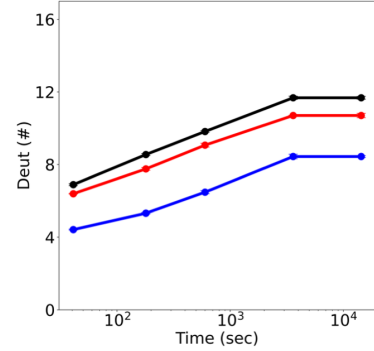
HC 36-46: WVRQAPGKGLE



HC 51-62: ITWNSGHIDYAD



HC 51-79: ITWNSGHIDYADSVGRFTISRDNKNSL



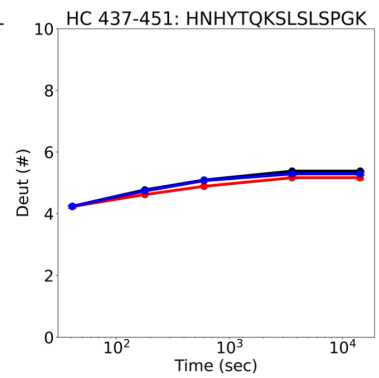
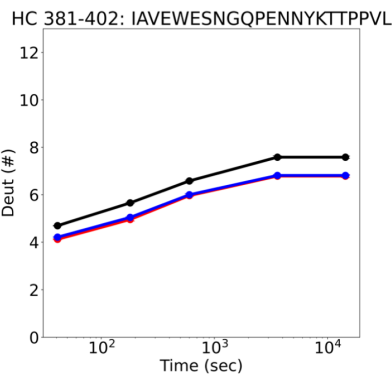
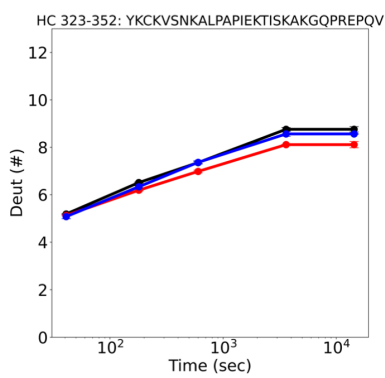
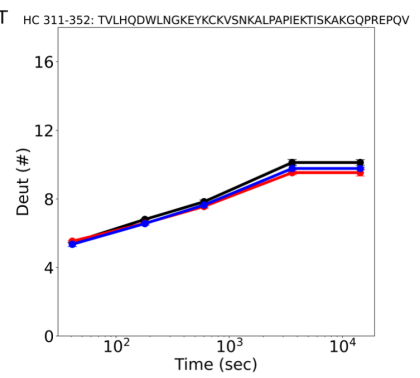
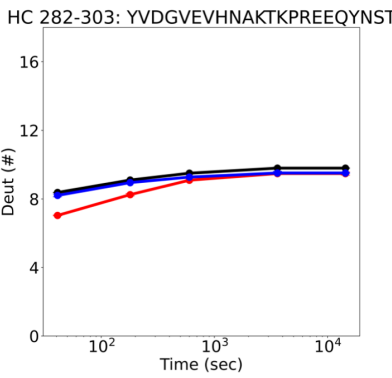
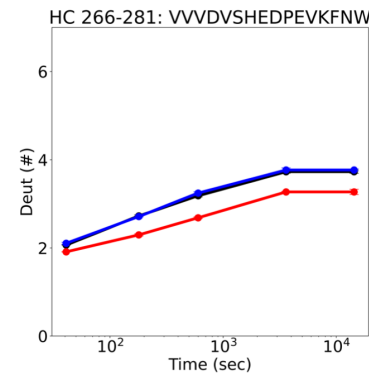
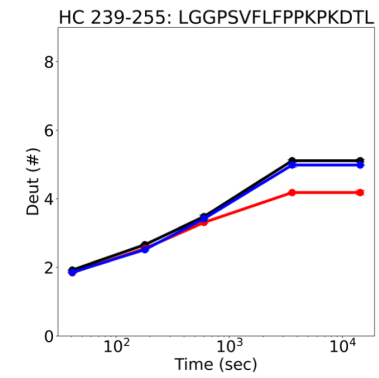
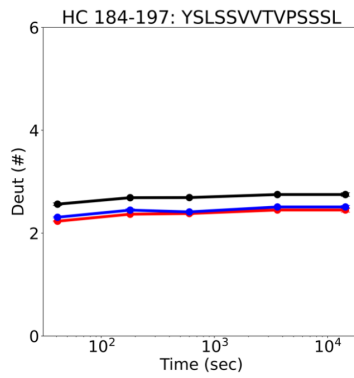
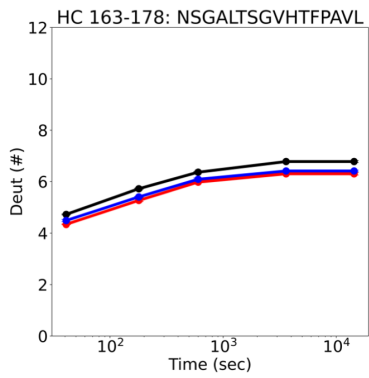
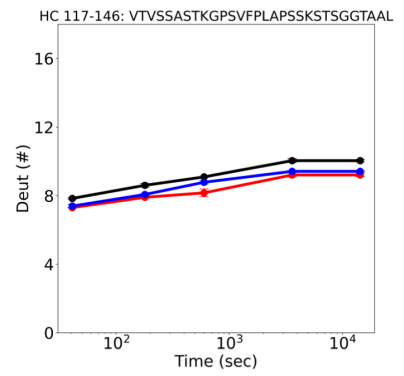
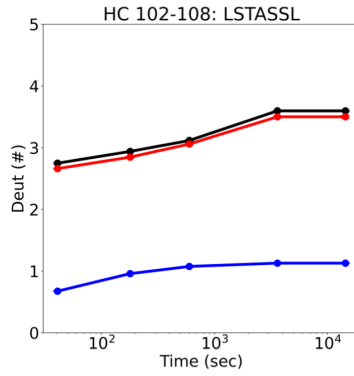
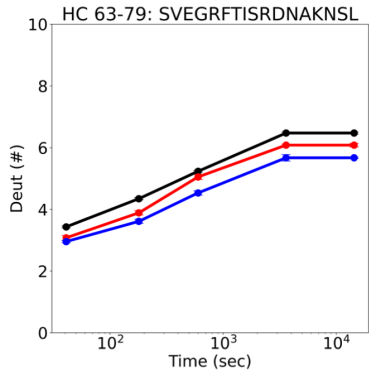


図 S5. IgG1 の HDX-MS における代表的なペプチドの重水素交換の経時変化のグラフ。

(A) Rtx (黒) と Mog (赤)、(B) Rtx (黒) と Rtx-Fc γ RIIIa 複合体 (赤)、(C) Mog (黒) と Mog-Fc γ RIIIa 複合体 (赤)、CCR4p-Mog 複合体 (青)、CCR4p-Mog-Fc γ RIIIa 複合体 (マゼンタ)、(D) Ada (黒) と Ada-Fc γ RIIIa 複合体 (赤)、TNF-Ada 複合体 (青) のデータをプロットした。

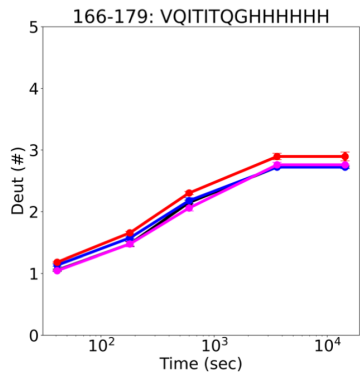
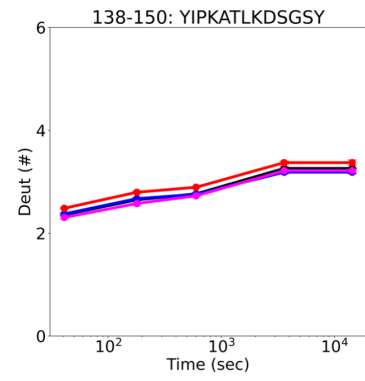
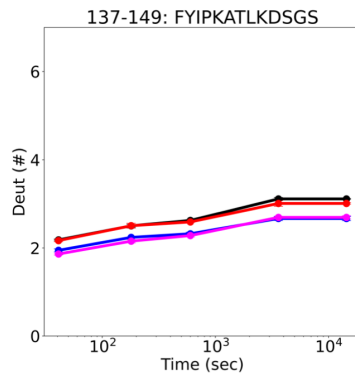
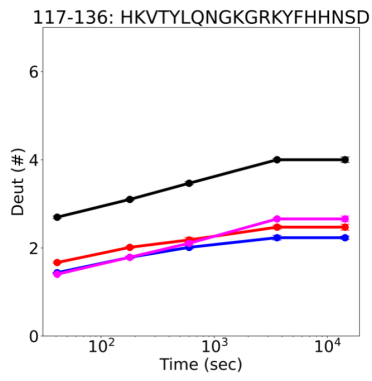
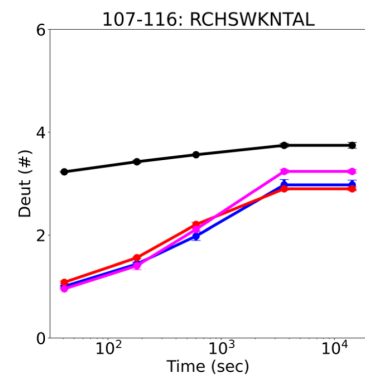
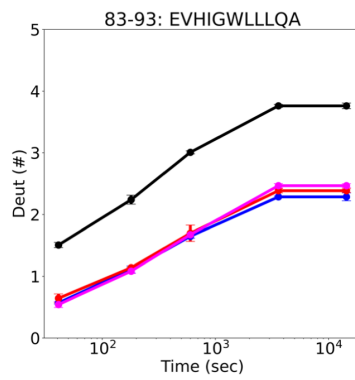
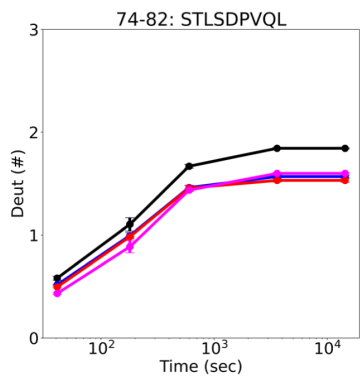
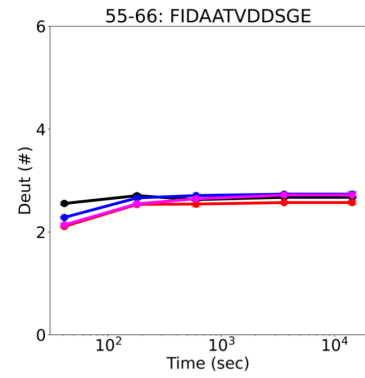
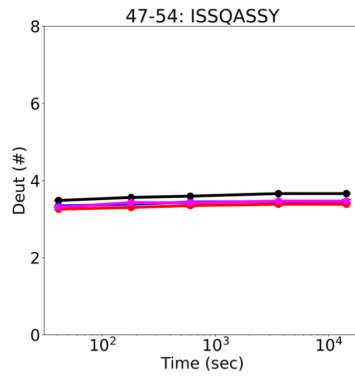
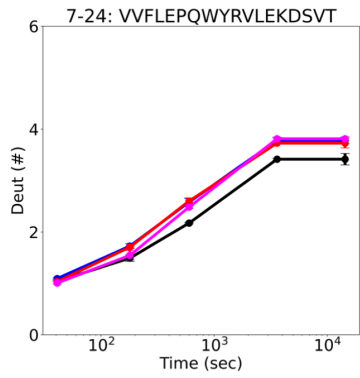


図 S6. FcγRIIIa の HDX-MS における代表的なペプチドの重水素交換の経時変化のグラフ。
FcγRIIIa (黒) と Rtx-FcγRIIIa 複合体 (赤)、Mog-FcγRIIIa 複合体 (青)、CCR4p-Mog-FcγRIIIa 複合体 (マゼンタ) のデータをプロットした。

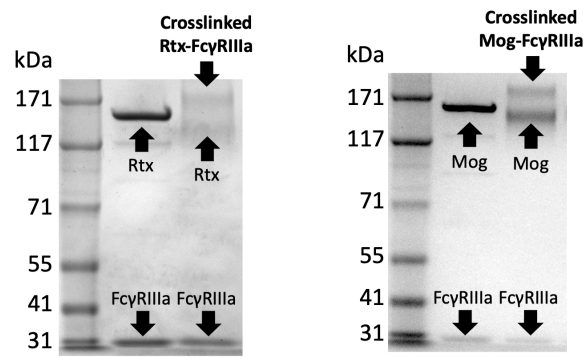


図 S7. クロスリンク反応前後の Rtx と Fc γ RIIIa および Mog と Fc γ RIIIa 混合物の SDS-PAGE。

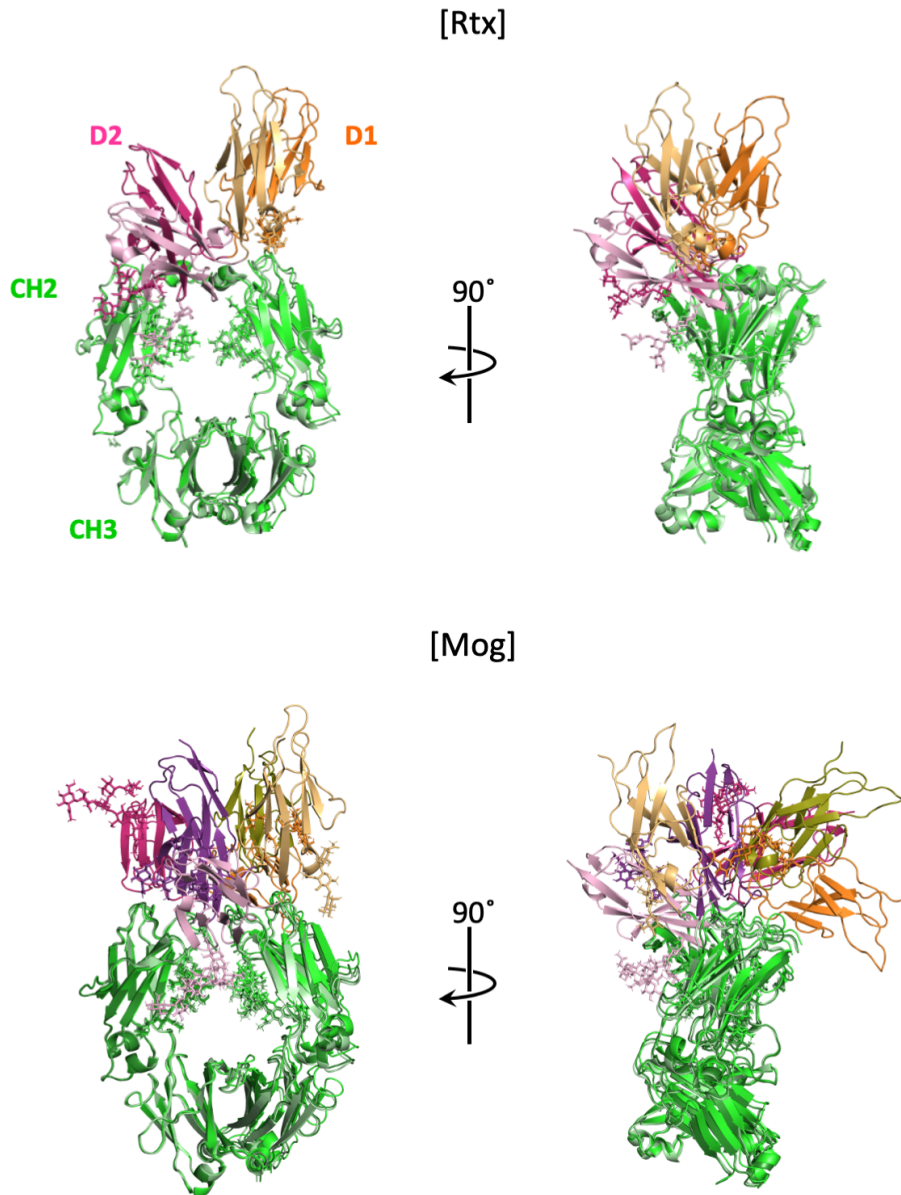


図 S8. ドッキングで得られた Rtx-Fc-Fc γ RIIIa 複合体および Mog-Fc-Fc γ RIIIa 複合体の代表的なモデル構造と報告されている結晶構造の重ね合わせ。

左図は、Rtx-Fc-Fc γ RIIIa の最もエネルギー低いクラスターの構造 (D1: オレンジ、D2: ピンク、Fc: 緑) に、フコシル化 IgG1-Fc-Fc γ RIIIa (PDB: 3SGJ⁴²⁾) (D1: 薄オレンジ、D2: 薄ピンク、Fc: 薄緑) を重ねている。右図は Mog-Fc-Fc γ RIIIa の最もエネルギーの低いクラスターの構造 (D1: オレンジ、D2: ピンク、Fc: 緑) に、アフコシル化 IgG1-Fc-Fc γ RIIIa (PDB: 3AY4⁴¹⁾) (D1: 薄オレンジ、D2: 薄ピンク、Fc: 薄緑)、9 番目にエネルギーの低いクラスター (D1: 黄土色、D2: 紫、Fc: 深緑) の構造を重ねている。

Data set	Rtx (control)	Mog
The number of peptides		143
Sequence coverage		80.79 %
Average peptide length / Redundancy		13.97 / 4.36
Repeatability (pooled standard deviation)	0.0501	0.0667
Significant differences in HDX ($\Delta D_z > u(\Delta D_z) - 99\%$)	n/A	1.11

表 S1. Rtx と Mog の比較における HDX-MS の測定結果まとめ

Data set	Free (control)	binding to FcγRIIIa
The number of peptides		178
Sequence coverage		84.79%
Average peptide length / Redundancy		13.28 / 3.56
Repeatability (pooled standard deviation)	0.0552	0.0630
Significant differences in HDX ($\Delta D_z > u(\Delta D_z) - 99\%$) (Da)	n/A	1.11

表 S2. Rtx と FcγRIIIa 結合時の Rtx の比較における HDX-MS の測定結果まとめ

Data set	Free (control)	Binding to FcγRIIIa	binding to CCR4p	binding to CCR4p and FcγRIIIa
The number of peptides			227	
Sequence coverage			91.92%	
Average peptide length / Redundancy			13.50 / 4.59	
Repeatability (pooled standard deviation)	0.0425	0.0409	0.0477	0.0497
Significant differences in HDX ($\Delta D_z > u(\Delta D_z) - 99\%$) (Da)	n/A	0.784	0.849	0.869

表 S3. Mog と FcγRIIIa および CCR4p 結合時の Mog の比較における HDX-MS の測定結果まとめ

Data set	Free (control)	binding to FcγRIIIa	binding to TNF
The number of peptides		198	
Sequence coverage		86.62%	
Average peptide length / Redundancy		13.12 / 3.91	
Repeatability (pooled standard deviation)	0.0450	0.0505	0.0439
Significant differences in HDX ($\Delta D_z > u(\Delta D_z) - 99\%$) (Da)	n/A	0.899	0.836

表 S4. Ada と FcγRIIIa および TNF 結合時の Ada の比較における HDX-MS の測定結果まとめ

Data set	Free (control)	With Rtx	With Mog	With Mog and CCR4p
The number of peptides			58	
Sequence coverage			80.45%	
Average peptide length / Redundancy			9.88 / 3.20	
Repeatability (pooled standard deviation)	0.0282	0.0317	0.0274	0.0313
Significant differences in HDX ($\Delta D_z > u(\Delta D_z) - 99\%$) (Da)	n/A	0.563	0.522	0.560

表 S5. FcγRIIIa および Rtx、Mog、CCR4p-Mog 複合体結合時の FcγRIIIa の比較における HDX-MS の測定結果まとめ

引用文献

1. Davies DR, Padlan EA, Segal DM. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Annu Rev Biochem.* 1975;44:639-667. doi: 10.1146/annurev.bi.44.070175.003231. PMID:806253
2. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125:237-249. doi: 10.1016/j.jaci.2009.09.046. PMID:20176268
3. Porter RR. The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem J.* 1959;73:119-126. doi: 10.1042/bj0730119. PMID:14434282
4. von Behring E, Kitasato S. Ueber das Zustandekommen der diphtherie-immunität und der tetanus-immunität bei thieren. *Dtsch Med Wschr.* 1890;16:1113-1114. PMID:1749380
5. Heidelberger M, Pedersen KO. The molecular weight of antibodies. *J Exp Med.* 1937;65:393-414. doi: 10.1084/jem.65.3.393. PMID:19870608
6. Tiselius A, Kabat EA. An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J Exp Med.* 1939;69:119-132. doi: 10.1084/jem.69.1.119. PMID:19870831
7. Cohen S. Nomenclature of human immunoglobulins. *Immunology.* 1965;8:1-5. PMID:14245308
8. Köhler, G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975;256:495-497. PMID:15728446
9. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, Lee CC, Tsai HZ, Li HJ, Wu HC. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci.* 2020;27:1-30. doi: 10.1186/s12929-019-0592-z. PMID:31894001
10. Goeddel D V., Kleid DG, Bolivar F. Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76:106-110. doi: 10.1073/pnas.76.1.106. PMID:85300
11. Jayapal KP, Wlaschin KF, Hu WS, Yap MGS. Recombinant protein therapeutics from CHO Cells - 20 years and counting. *Chem Eng Prog.* 2007;103:40-47.
12. Mullard A. FDA approves 100th monoclonal antibody product. *Nat Rev Drug Discov.*

- 2021;20:491-495. doi: 10.1038/d41573-021-00079-7. PMID:33953368
13. Muhammed Y. The best IgG subclass for the development of therapeutic monoclonal antibody drugs and their commercial production: a review. *Immunome Res.* 2020;16:1-12. doi: 10.35248/1745-7580.20.16.173.
 14. Yu J, Song Y, Tian W. How to select IgG subclasses in developing anti-tumor therapeutic antibodies. *J Hematol Oncol.* 2020;13:1-10. doi: 10.1186/s13045-020-00876-4. PMID:32370812
 15. The Antibody Society. Therapeutic monoclonal antibodies approved or in review in the EU or US. (date accessed); www.antibodysociety.org.
 16. de Taeye SW, Bentlage AEH, Mebius MM, Meesters JI, Lissenberg-Thunnissen S, Falck D, Sénard T, Salehi N, Wuhrer M, Schuurman J, et al. FcγR binding and ADCC activity of human IgG allotypes. *Front Immunol.* 2020;11:1-16. doi: 10.3389/fimmu.2020.00740. PMID:32435243
 17. Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Front Immunol.* 2014;5:1-17. doi: 10.3389/fimmu.2014.00520. PMID:25368619
 18. Daëron M. Fc receptor biology. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:203-234. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.203. PMID:9143687
 19. Abramson N, Gelfand EW, Jandl JH, Rosen FS. The interaction between human monocytes and red cells: Specificity for igit subclasses and igit fragments. *J Exp Med.* 1970;132:1207-1215. doi: 10.1084/jem.132.6.1207.
 20. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008;8:34-47. doi: 10.1038/nri2206. PMID:18064051
 21. Hogarth PM, Pietersz GA. Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11:311-331. doi: 10.1038/nrd2909.
 22. Caaveiro JMM, Kiyoshi M, Tsumoto K. Structural analysis of Fc/FcγR complexes: A blueprint for antibody design. *Immunol Rev.* 2015;268:201-221. doi: 10.1111/imr.12365.

PMID:26497522

23. Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fcγ receptors: Old friends and new family members. *Immunity*. 2006;24:19-28. doi: 10.1016/j.immuni.2005.11.010. PMID:16413920
24. Albanesi M, Daëron M. The interactions of therapeutic antibodies with Fc receptors. *Immunol Lett*. 2012;143:20-27. doi: 10.1016/j.imlet.2012.02.005. PMID:22553779
25. Lo Nigro C, Macagno M, Sangiolo D, Bertolaccini L, Aglietta M, Merlano MC. NK-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in solid tumors: biological evidence and clinical perspectives. *Ann Transl Med*. 2019;7:105-105. doi: 10.21037/atm.2019.01.42.
26. Clynes R, Takechi Y, Moroi Y, Houghton A, Ravetch J V. Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:652-656. doi: 10.1073/pnas.95.2.652. PMID:9435247
27. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch J V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med*. 2000;6:443-446. doi: 10.1038/74704. PMID:10742152
28. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Gloria Meng Y, Weikert SHA, Presta LG. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem*. 2002;277:26733-26740. doi: 10.1074/jbc.M202069200. PMID:11986321
29. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, et al. The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2003;278:3466-3473. doi: 10.1074/jbc.M210665200. PMID:12427744
30. Okazaki A, Shoji-Hosaka E, Nakamura K, Wakitani M, Uchida K, Kakita S, Tsumoto K, Kumagai I, Shitara K. Fucose depletion from human IgG1 oligosaccharide enhances binding enthalpy and association rate between IgG1 and FcγRIIIa. *J Mol Biol*. 2004;336:1239-1249.

doi: 10.1016/j.jmb.2004.01.007. PMID:15037082

31. Subedi GP, Barb AW. The immunoglobulin G1 N-glycan composition affects binding to each low affinity Fc γ receptor. *mAbs*. 2016;8:1512-1524. doi: 10.1080/19420862.2016.1218586. PMID:27492264
32. Dekkers G, Treffers L, Plomp R, Bentlage AEH, Boer M de, Koeleman CAM, Lissenberg-Thunnissen SN, Visser R, Brouwer M, Mok JY, et al. Decoding the human immunoglobulin G-glycan repertoire reveals a spectrum of Fc-receptor- and complement-mediated-effector activities. *Front Immunol*. 2017;8:877. doi: 10.3389/fimmu.2017.00877. PMID:28824618
33. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ R. *J Biol Chem*. 2001;276:6591-6604. doi: 10.1074/jbc.M009483200. PMID:11096108
34. Mimoto F, Igawa T, Kuramochi T, Katada H, Kadono S, Kamikawa T, Shida-Kawazoe M, Hattori K. Novel asymmetrically engineered antibody Fc variant with superior Fc γ R binding affinity and specificity compared with afucosylated Fc variant. *mAbs*. 2013;5:229-236. doi: 10.4161/mabs.23452. PMID:23406628
35. Beck A, Reichert JM. Marketing approval of mogamulizumab: A triumph for glyco-engineering. *mAbs*. 2012;4:419-425. doi: 10.4161/mabs.20996. PMID:22699226
36. Krayukhina E, Noda M, Ishii K, Maruno T, Wakabayashi H, Tada M, Suzuki T, Ishii-Watabe A, Kato M, Uchiyama S. Analytical ultracentrifugation with fluorescence detection system reveals differences in complex formation between recombinant human TNF and different biological TNF antagonists in various environments. *mAbs*. 2017;9:664-679. doi: 10.1080/19420862.2017.1297909. PMID:28387583
37. Tada M, Aoyama M, Ishii-Watabe A. Fc γ Receptor activation by human monoclonal antibody aggregates. *J Pharm Sci*. 2020;109:576-583. doi: 10.1016/j.xphs.2019.10.046. PMID:31676270

38. Krayukhina E, Yokoyama M, Hayashihara KK, Maruno T, Noda M, Watanabe H, Uchihashi T, Uchiyama S. An assessment of the ability of submicron- and micron-size silicone oil droplets in dropped prefillable syringes to invoke early- and late-stage immune responses. *J Pharm Sci.* 2019;108:2278-2287. doi: 10.1016/j.xphs.2019.02.002. PMID:30790580
39. Sondermann P, Huber R, Oosthulzen V, Jacob U. The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-FcγRIII complex. *Nature.* 2000;406:267-273. doi: 10.1038/35018508. PMID:10917521
40. Radaev S, Motyka S, Fridman WH, Sautes-Fridman C, Sun PD. The structure of a human type III Fcγ receptor in complex with Fc. *J Biol Chem.* 2001;276:16469-16477. doi: 10.1074/jbc.M100350200. PMID:11297532
41. Mizushima T, Yagi H, Takemoto E, Shibata-Koyama M, Isoda Y, Iida S, Masuda K, Satoh M, Kato K. Structural basis for improved efficacy of therapeutic antibodies on defucosylation of their Fc glycans. *Genes to Cells.* 2011;16:1071-1080. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01552.x. PMID:22023369
42. Ferrara C, Grau S, Jäger C, Sondermann P, Bruñker P, Waldhauer I, Hennig M, Ruf A, Rufer AC, Stihle M, et al. Unique carbohydrate-carbohydrate interactions are required for high affinity binding between FcγRIII and antibodies lacking core fucose. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:12669-12674. doi: 10.1073/pnas.1108455108. PMID:21768335
43. Mimoto F, Kadono S, Katada H, Igawa T, Kamikawa T, Hattori K. Crystal structure of a novel asymmetrically engineered Fc variant with improved affinity for FcγRs. *Mol Immunol.* 2014;58:132-138. doi: 10.1016/j.molimm.2013.11.017. PMID:24334029
44. Ahmed AA, Keremane SR, Vielmetter J, Bjorkman PJ. Structural characterization of GASDALIE Fc bound to the activating Fc receptor FcγRIIIa. *J Struct Biol.* 2016;194:78-89. doi: 10.1016/j.jsb.2016.02.001. PMID:26850169
45. Sakae Y, Satoh T, Yagi H, Yanaka S, Yamaguchi T, Isoda Y, Iida S, Okamoto Y, Kato K. Conformational effects of N-glycan core fucosylation of immunoglobulin G Fc region on its

- interaction with Fc γ receptor IIIa. *Sci Rep.* 2017;7:1-10. doi: 10.1038/s41598-017-13845-8. PMID:29062024
46. Falconer DJ, Subedi GP, Marcella AM, Barb AW. Antibody Fucosylation Lowers the Fc γ RIIIa/CD16a affinity by limiting the conformations sampled by the N162-Glycan. *ACS Chem Biol.* 2018;13:2179-2189. doi: 10.1021/acscchembio.8b00342. PMID:30016589
47. Kiyoshi M, Caaveiro JMM, Tada M, Tamura H, Tanaka T, Terao Y, Morante K, Harazono A, Hashii N, Shibata H, et al. Assessing the heterogeneity of the Fc-Glycan of a therapeutic antibody using an engineered Fc γ Receptor IIIa-immobilized column. *Sci Rep.* 2018;8:3955. doi: 10.1038/s41598-018-22199-8. PMID:29500371
48. Bruhns P, Iannascoli B, England P, Mancardi DA, Fernandez N, Jorieux S, Daëron M. Specificity and affinity of human Fc γ receptors and their polymorphic variants for human IgG subclasses. *Blood.* 2009;113:3716-3725. doi: 10.1182/blood-2008-09-179754. PMID:19018092
49. Guddat LW, Herron JN, Edmundson AB. Three-dimensional structure of a human immunoglobulin with a hinge deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:4271-4275. doi: 10.1073/pnas.90.9.4271. PMID:8483943
50. Harris LJ, Larson SB, Hasel KW, McPherson A. Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry.* 1997;36:1581-1597. doi: 10.1021/bi962514+. PMID:9048542
51. Harris LJ, Skaletsky E, McPherson A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol.* 1998;275:861-872. doi: 10.1006/jmbi.1997.1508. PMID:9480774
52. Saphire EO, Parren PWHI, Pantophlet R, Zwick MB, Morris GM, Rudd PM, Dwek RA, Stanfield RL, Burton DR, Wilson IA. Crystal structure of a neutralizing human IgG against HIV-1: A template for vaccine design. *Science.* 2001;293:1155-1159. doi: 10.1126/science.1061692. PMID:11498595

53. Scapin G, Yang X, Prosis WW, McCoy M, Reichert P, Johnston JM, Kashi RS, Strickland C. Structure of full-length human anti-PD1 therapeutic IgG4 antibody pembrolizumab. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;22:953-958. doi: 10.1038/nsmb.3129. PMID:26595420
54. Blech M, Hörer S, Kuhn AB, Kube S, Göddeke H, Kiefer H, Zang Y, Alber Y, Kast SM, Westermann M, et al. Structure of a therapeutic full-length anti-NPRA IgG4 antibody: dissecting conformational diversity. *Biophys J.* 2019;116:1637-1649. doi: 10.1016/j.bpj.2019.03.036. PMID:31023536
55. Yogo R, Yamaguchi Y, Watanabe H, Yagi H, Satoh T, Nakanishi M, Onitsuka M, Omasa T, Shimada M, Maruno T, et al. The Fab portion of immunoglobulin G contributes to its binding to Fcγ receptor III. *Sci Rep.* 2019;9:11957. doi: 10.1038/s41598-019-48323-w. PMID:31420591
56. Shi L, Liu T, Gross ML, Huang Y. Recognition of human IgG1 by Fcγ Receptors: Structural insights from hydrogen-deuterium exchange and fast photochemical oxidation of proteins coupled with mass spectrometry. *Biochemistry.* 2019;58:1074-1080. doi: 10.1021/acs.biochem.8b01048. PMID:30666863
57. Sun Y, Izadi S, Callahan M, Deperalta G, Wecksler AT. Antibody–receptor interactions mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2021;297:100826. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100826. PMID:34044019
58. Kralj S, Hodošek M, Podobnik B, Kunej T, Bren U, Janežič D, Konc J. Molecular Dynamics simulations reveal interactions of an IgG1 antibody with selected Fc receptors. *Front Chem.* 2021;9:705931. doi: 10.3389/fchem.2021.705931. PMID:34277572
59. Houde D, Peng Y, Berkowitz SA, Engen JR. Post-translational modifications differentially affect IgG1 conformation and receptor binding. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9:1716-1728. doi: 10.1074/mcp.M900540-MCP200. PMID:20103567
60. Kiyoshi M, Tsumoto K, Ishii-Watabe A, Caaveiro JMM. Glycosylation of IgG-Fc: A molecular perspective. *Int Immunol.* 2017;29:311-317. doi: 10.1093/intimm/dxx038.

PMID:28655198

61. Hayes JM, Frostell A, Cosgrave EFJ, Struwe WB, Potter O, Davey GP, Karlsson R, Anneren C, Rudd PM. Fc gamma receptor glycosylation modulates the binding of IgG glycoforms: A requirement for stable antibody interactions. *J Proteome Res.* 2014;13:5471-5485. doi: 10.1021/pr500414q. PMID:25345863
62. Yamaguchi Y, Barb AW. A synopsis of recent developments defining how N-glycosylation impacts immunoglobulin G structure and function. *Glycobiology.* 2020;30:214-225. doi: 10.1093/GLYCOB/CWZ068. PMID:31822882
63. Matsumiya S, Yamaguchi Y, Saito J ichi, Nagano M, Sasakawa H, Otaki S, Satoh M, Shitara K, Kato K. Structural comparison of fucosylated and nonfucosylated Fc fragments of human immunoglobulin G1. *J Mol Biol.* 2007;368:767-779. doi: 10.1016/j.jmb.2007.02.034. PMID:17368483
64. Yanaka S, Yogo R, Inoue R, Sugiyama M, Itoh SG, Okumura H, Miyanoiri Y, Yagi H, Satoh T, Yamaguchi T, et al. Dynamic views of the Fc region of immunoglobulin G provided by experimental and computational observations. *Antibodies.* 2019;8:39. doi: 10.3390/antib8030039.
65. Mimura Y, Katoh T, Saldova R, O'Flaherty R, Izumi T, Mimura-Kimura Y, Utsunomiya T, Mizukami Y, Yamamoto K, Matsumoto T, et al. Glycosylation engineering of therapeutic IgG antibodies: challenges for the safety, functionality and efficacy. *Protein Cell.* 2018;9:47-62. doi: 10.1007/s13238-017-0433-3. PMID:28597152
66. Oda M, Kozono H, Morii H, Azuma T. Evidence of allosteric conformational changes in the antibody constant region upon antigen binding. *Int Immunol.* 2003;15:417-426. doi: 10.1093/intimm/dxg036. PMID:12618486
67. Sela-Culang I, Alon S, Ofra Y. A systematic comparison of free and bound antibodies reveals binding-related conformational changes. *J Immunol.* 2012;189:4890-4899. doi: 10.4049/jimmunol.1201493. PMID:23066154

68. Al Qaraghuli MM, Kubiak-Ossowska K, Ferro VA, Mulheran PA. Antibody-protein binding and conformational changes: identifying allosteric signalling pathways to engineer a better effector response. *Sci Rep.* 2020;10:1-10. doi: 10.1038/s41598-020-70680-0. PMID:32792612
69. Sun Y, Estevez A, Schlothauer T, Wecksler AT. Antigen physiochemical properties allosterically effect the IgG Fc-region and Fc neonatal receptor affinity. *MAbs.* 2020;12:1-9. doi: 10.1080/19420862.2020.1802135. PMID:32795110
70. Du J, Wang H, Zhong C, Peng B, Zhang M, Li B, Huo S, Guo Y, Ding J. Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *J Biol Chem.* 2007;282:15073-15080. doi: 10.1074/jbc.M701654200. PMID:17395584
71. Zhao J, Nussinov R, Ma B. Antigen binding allosterically promotes Fc receptor recognition. *mAbs.* 2019;11:58-74. doi: 10.1080/19420862.2018.1522178. PMID:30212263
72. Orlandi C, Deredge D, Ray K, Gohain N, Tolbert W, DeVico AL, Wintrode P, Pazgier M, Lewis GK. Antigen-induced allosteric changes in a human IgG1 Fc increase low-affinity Fc γ receptor binding. *Structure.* 2020;28:516-527.e5. doi: 10.1016/j.str.2020.03.001. PMID:32209433
73. Wang W, Chen Q. Antigen improves binding of IgGs to Fc γ Rs in SPR analysis. *Anal Biochem.* Published online 2021:114411. doi: 10.1016/j.ab.2021.114411. PMID:34648807
74. Kamat V, Rafique A. Designing binding kinetic assay on the bio-layer interferometry (BLI) biosensor to characterize antibody-antigen interactions. *Anal Biochem.* 2017;536:16-31. doi: 10.1016/j.ab.2017.08.002. PMID:28802648
75. Manning MC, Liu J, Li T, Holcomb RE. *Rational design of liquid formulations of proteins.* Vol 112. 1st ed. Elsevier Inc.; 2018. doi: 10.1016/bs.apcsb.2018.01.005. PMID:29680234
76. Burnouf D, Ennifar E, Guedich S, Puffer B, Hoffmann G, Bec G, Disdier F, Baltzinger M, Dumas P. KinITC: A new method for obtaining joint thermodynamic and kinetic data by isothermal titration calorimetry. *J Am Chem Soc.* 2012;134:559-565. doi:

10.1021/ja209057d. PMID:22126339

77. Dumas P, Ennifar E, Da Veiga C, Bec G, Palau W, Di Primo C, Piñeiro A, Sabin J, Muñoz E, Rial J. Extending ITC to kinetics with kinITC. In: *Methods in Enzymology*. Vol 567. ; 2016:157-180. doi: 10.1016/bs.mie.2015.08.026. PMID:26794354
78. Zhang X, Zhang L, Tong H, Peng B, Rames MJ, Zhang S, Ren G. 3D structural fluctuation of IgG1 antibody revealed by individual particle electron tomography. *Sci Rep*. 2015;5:09803. doi: 10.1038/srep09803. PMID:25940394
79. Reusch U, Burkhardt C, Fucek I, Le Gall F, Le Gall M, Hoffmann K, Knackmuss SHJ, Kiprijanov S, Little M, Zhukovsky EA. A novel tetravalent bispecific TandAb (CD30/CD16A) efficiently recruits NK cells for the lysis of CD30+ tumor cells. *mAbs*. 2014;6:727-738. doi: 10.4161/mabs.28591. PMID:24670809
80. Zhao Q, Ahmed M, Tassev D V., Hasan A, Kuo TY, Guo HF, O'Reilly RJ, Cheung NKV. Affinity maturation of T-cell receptor-like antibodies for Wilms tumor 1 peptide greatly enhances therapeutic potential. *Leukemia*. 2015;29:2238-2247. doi: 10.1038/leu.2015.125. PMID:25987253
81. Teeling JL, French RR, Cragg MS, Van Den Brakel J, Pluyter M, Huang H, Chan C, Parren PWHI, Hack CE, Dechant M, et al. Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood*. 2004;104:1793-1800. doi: 10.1182/blood-2004-01-0039. PMID:15172969
82. Ozohanics O, Ambrus A. Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry: A novel structural biology approach to structure, dynamics and interactions of proteins and their complexes. *Life*. 2020;10:1-18. doi: 10.3390/life10110286.
83. O'Reilly FJ, Rappsilber J. Cross-linking mass spectrometry: methods and applications in structural, molecular and systems biology. *Nat Struct Mol Biol*. 2018;25:1000-1008. doi: 10.1038/s41594-018-0147-0. PMID:30374081
84. Weis DD. Recommendations for the Propagation of Uncertainty in Hydrogen Exchange-

- Mass Spectrometric Measurements. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2021;32:1610-1617. doi: 10.1021/jasms.0c00475. PMID:33764776
85. Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, Ferrin TE. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci.* 2018;27:14-25. doi: 10.1002/pro.3235. PMID:28710774
86. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* 2021;30:70-82. doi: 10.1002/pro.3943. PMID:32881101
87. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021;596:583-589. doi: 10.1038/s41586-021-03819-2. PMID:34265844
88. Krieger E, Koraimann G, Vriend G. Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - A self-parameterizing force field. *Proteins Struct Funct Genet.* 2002;47:393-402. doi: 10.1002/prot.10104. PMID:11948792
89. Jay J, Bray B, Qi Y, Igbini E, Wu H, Li J, Ren G. IgG Antibody 3D Structures and Dynamics. *Antibodies.* 2018;7:18. doi: 10.3390/antib7020018. PMID:31544870
90. Honorato R V, Koukos PI, Jiménez-García B, Tsaregorodtsev A, Verlato M, Giachetti A, Rosato A, Bonvin AMJJ. Structural biology in the clouds: The WeNMR-EOSC ecosystem. *Front Mol Biosci.* 2021;8:72953. doi: 10.3389/fmolb.2021.729513. PMID:34395534
91. van Zundert GCP, Bonvin AMJJ. DisVis: Quantifying and visualizing accessible interaction space of distance-restrained biomolecular complexes. *Bioinformatics.* 2015;31:3222-3224. doi: 10.1093/bioinformatics/btv333. PMID:26026169
92. van Zundert GCP, Trellet M, Schaarschmidt J, Kurkcuoglu Z, David M, Verlato M, Rosato A, Bonvin AMJJ. The DisVis and PowerFit web servers: Explorative and integrative modeling of biomolecular complexes. *J Mol Biol.* 2017;429:399-407. doi: 10.1016/j.jmb.2016.11.032. PMID:27939290

93. Van Zundert GCP, Rodrigues JPGLM, Trellet M, Schmitz C, Kastiris PL, Karaca E, Melquiond ASJ, Van Dijk M, De Vries SJ, Bonvin AMJJ. The HADDOCK2.2 web server: User-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *J Mol Biol.* 2016;428:720-725. doi: 10.1016/j.jmb.2015.09.014. PMID:26410586
94. Leitner A, Walzthoeni T, Kahraman A, Herzog F, Rinner O, Beck M, Aebersold R. Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry, and bioinformatics. *Mol Cell Proteomics.* 2010;9:1634-1649. doi: 10.1074/mcp.R000001-MCP201. PMID:20360032
95. Zhang MM, Beno BR, Huang RYC, Adhikari J, Deyanova EG, Li J, Chen G, Gross ML. An integrated approach for determining a protein-protein binding interface in solution and an evaluation of hydrogen-deuterium exchange kinetics for adjudicating candidate docking models. *Anal Chem.* 2019;91:15709-15717. doi: 10.1021/acs.analchem.9b03879. PMID:31710208
96. Latypov RF, Hogan S, Lau H, Gadgil H, Liu D. Elucidation of acid-induced unfolding and aggregation of human immunoglobulin IgG1 and IgG2 Fc. *J Biol Chem.* 2012;287:1381-1396. doi: 10.1074/jbc.M111.297697. PMID:22084250
97. Noda M, Ishii K, Yamauchi M, Oyama H, Tadokoro T, Maenaka K, Torisu T, Uchiyama S. Identification of IgG1 aggregation initiation region by hydrogen deuterium mass spectrometry. *J Pharm Sci.* 2019;108:2323-2333. doi: 10.1016/j.xphs.2019.02.023. PMID:30851343
98. Diebolder CA, Beurskens FJ, De Jong RN, Koning RI, Strumane K, Lindorfer MA, Voorhorst M, Ugurlar D, Rosati S, Heck AJR, et al. Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science.* 2014;343:1260-1263. doi: 10.1126/science.1248943. PMID:24626930
99. Wang G, de Jong RN, van den Bremer ETJ, Beurskens FJ, Labrijn AF, Ugurlar D, Gros P, Schuurman J, Parren PWHI, Heck AJR. Molecular basis of assembly and activation of

complement component C1 in complex with immunoglobulin G1 and antigen. *Mol Cell.*
2016;63:135-145. doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.016. PMID:27320199

発表論文

Rina Yogo, Yuki Yamaguchi, Hiroki Watanabe, Hirokazu Yagi, Tadashi Satoh, Mahito Nakanishi, Masayoshi Onitsuka, Takeshi Omasa, Mari Shimada, Takahiro Maruno, Tetsuo Torisu, Shio Watanabe, Daisuke Higo, Takayuki Uchihashi, Saeko Yanaka, Susumu Uchiyama and Koichi Kato. The Fab portion of immunoglobulin G contributes to its binding to Fc γ receptor III. Sci Rep. 2019; 9(1): 11957.

Yuki Yamaguchi, Natsumi Wakaizumi, Mine Irisa, Takahiro Maruno, Mari Shimada, Koya Shintani, Haruka Nishiumi, Rina Yogo, Saeko Yanaka, Daisuke Higo, Tetsuo Torisu, Koichi Kato and Susumu Uchiyama. The Fab portion of immunoglobulin G has sites in the CL domain that interact with Fc gamma receptor IIIa. mAbs. 2022;14(1);2038531.

(本学位論文に關与する論文)

謝辞

本研究を進めるにあたり厚いご指導を賜りました、大阪大学工学研究科 高分子バイオテクノロジー領域 内山進 教授、鳥巢哲生 助教、丸野孝浩 氏に謹んで感謝を申し上げます。学位審査および本学位論文の作成において、ご指導を賜りました、大阪大学工学研究科 大政健史 教授ならびに栗栖源嗣 教授に心より感謝申し上げます。

また本研究の遂行に際し、多くのご協力をいただきました、大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 生命創成探究センター 加藤晃一 教授、谷中冴子 助教、與語理那 氏、Thermo Fisher Scientific 株式会社 肥後大輔 氏、渡邊史生 氏、永島良樹 氏に厚く御礼申し上げます。本研究の遂行において実験にご協力いただいた、同研究室 若泉なつみ 氏、入佐充音 氏、西海遥夏 氏、嶋田麻里 氏、新谷晃也 氏に心より感謝申し上げます。また、HDX-MS のノウハウを教えてくださいました、同研究室 尾山博章 氏、株式会社ユー・メディコ 野田勝紀 氏に謹んで感謝を申し上げます。

さらに、研究室生活を温かく支えてくださった、同研究室の石井健太郎 特任助教、長谷川淳 特任教授、杉山峰崇 招へい教授、山根拓也 招へい准教授、露峰明子 秘書、研究員の皆様、先輩方、同期、学生諸氏、株式会社ユー・メディコの皆様に心より感謝を申し上げます。また、学会等でディスカッションをしてくださった他大学の先生方、学生諸氏、企業の皆様にも厚く御礼申し上げます。

最後に、博士後期課程への進学に理解を示し、いつも応援し支えてくれた家族ならびにいつも温かく支えてくれた友人に深い感謝の意を表し、謝辞とさせていただきます。