

ドッキングシミュレーションに基づく 卵黄抗体の結合能の改変と高抗体卵作出への挑戦

名古屋大学大学院生命農学研究科・教授 村井 篤嗣

■ 緒 言

母ドリの血中 IgY は卵黄に取り込まれ、次世代ヒナの免疫防御に必須の分子である。この卵黄抗体の産業利用は、高価な生産コストがネックとなってきた。我々は、卵への IgY の輸送を担う受容体が母ドリの卵巣に存在するとの仮説を立てて、この受容体の同定を目指してきた。そして、その候補受容体の一つとして、FcRY 受容体を選抜した(Murai et al., 2020)。FcRY は分子サイズが 180 kDa の一回膜貫通型受容体であり、① N 末端システインリッチドメイン、②フィブロネクチンタイプII (FN II) ドメイン、③ 8 個の C タイプレクチン様ドメイン (CTLD)、④膜貫通ドメイン、⑤細胞質内ドメインの計 5 領域で構成される(West et al., 2004)。血中 IgY は卵巣の毛細血管の終末部に到達すると、FcRY 受容体と結合して血管内皮細胞を通過することが判明した(Okamoto et al., 2024)。

本研究では、IgY 抗体の卵黄への取り込みを司る FcRY 受容体のアミノ酸配列を改変して高抗体卵を作出することを目指して、FcRY 受容体と卵黄抗体とのドッキングシミュレーションを基にして、互いに近接するアミノ酸配列を選抜し、FcRY 受容体と IgY の近接アミノ酸配列を同定することを目的とした。将来、FcRY 受容体と IgY のアミノ酸配列を置換することで両分子の結合能を強化し、卵黄抗体の輸送量を増加させることを目標とする。

■ 方 法

1. FcRY 受容体と IgY とのドッキングシミュレーション

FcRY と IgY の構造予測は、AlphaFold2 を高速化し、ウェブブラウザから利用できるように開発された ColabFold (ver. 1.5.5) で行った。ニワトリ FcRY (膜貫通ドメインを除いた 24-1398 残基) と IgY-Fc (可変領域を除いた C \cup 3-4 領域；342-568 残基) の配列を解析に用いた。鋳型には、ニワトリ単量体 IgY-Fc (PDB 2W59_A)、およびニワトリ FcRY のヒトの相同遺伝子であるホスホリパーゼ A2 受容体 (PLA2R；PDB 7QSR) を用いた。ColabFold による結合予測は AlphaFold multimer v2 predictions を用いて 3 回の試行を行った。構造予測および結合予測は、predicted local distance test scores と predicted aligned error を基に、最もランクが高いものを選択した。また、HADDOCK (ver. 2.4) を用いたドッキングシミュレーションも行った。ColabFold を用いて予測された構造をシステムにアップロードし、結晶構造解析で得られた FcRY/IgY の結合に重要な FcRY 領域 (CTLD4, 5, 6；He and Bjorkman, 2011) と、我々の研究で卵黄への IgY の取り込みに重要であることが判明した IgY の 359-365 番目までの 7 つのアミノ酸残基 (PGDLYIG；Murai et al., 2013) を結合領域と仮定して、ドッキングシミュレーションした。得られた FcRY/IgY 構造のうち、HADDOCK score が最も低いものを選択した。ColabFold, HADDOCK で得られた構造は、Pymol を用いて解析し、IgY の Y363 または G365 と水素結合する FcRY 側の残基を選抜した。

2. 組換え FcRY の作出

分泌型の FcRY タンパク質を作出するために、FcRY の細胞膜貫通領域を除くニワトリ FcRY の遺伝子断片 (36-1396 のアミノ酸残基をコード) を発現ベクターに連結した (野生型 FcRY)。3 つの FcRY 変異体 (R841A, R900A, S929A) は野生型の発現ベクターに部位特異的変異を導入して作出了。標的の遺伝子配列に変異導入が導入されたことを確認するために、発現ベクターの遺伝子配列を解析した。これらの発現ベクターを浮遊チャイニーズハムスター卵巣ガン細胞 (CHO-S 細胞) に導入し、培養液を回収した。培養液に分泌された FcRY タンパク質は、カルボキシル基末端に付加された His タグに対するアフィニティカラムを用いて精製した。精製したタンパク質はポリアクリルアミドゲル電気泳動後の染色により、精製度と分子サイズを確認した。FcRY タンパク質の濃度は 280 nm 波長での吸光度から換算した (A280/1.0=1 mg/mL)。

3. FcRY 変異体と IgY との結合量の測定

Copper-coated 96 well plate (Pierce, ThermoFisher Scientific, 15146) に、His タグをカルボキシル基末端に持つ FcRY (10 μ g/ml, 1×PBS, 0.05% Tween20, 20 mM MES, pH6.0) を 100 μ l 添加し、室温で 1 時間インキュベートし、FcRY を 96 ウェルプレートに固定した。洗浄バッファー 200 μ l で 3 回洗浄後、

1% (w/v) ウシ血清アルブミンを含んだバッファー-150 μ l を添加し、室温で 30 分間ブロッキングした。洗浄後、段階希釈したニワトリ IgY (1-10,000 ng/mL) を含むバッファー-100 μ l をそれぞれ加え、1 時間インキュベートした。洗浄後、抗ニワトリ IgY-HRP 標識抗体を 100 μ l ずつ加えて 1 時間静置し、洗浄後、o-Phenylenediamine 含有発色剤を加えた。十分な発色が確認できたら反応を停止し、490 nm の吸光度を測定した。

■ 結 果

FcRY と IgY の立体構造と結合を様々な条件でシュミレーションした(表 1)。条件 1 により FcRY と IgY-Fc 複合体の構造を予測したところ、FcRY の CTLD5 領域(マゼンタ)と CTLD6 領域(シアン)が IgY-Fc(薄紫)とドッキングする結合モデルが構築できた(図 1A)。この時、IgY-Fc を構成する Gly³⁶⁵ 残基(G365; 緑)が、FcRY の CTLD5 領域に存在する Arg⁸⁴¹(R841; 青破線)と水素結合を形成するモデルを得た(図 1B)。解析ソフトウェア HADDOCK を採用した条件 2 では、FcRY の CTLD5 領域に存在する Arg⁹⁰⁰(R900; 青破線)と IgY-Fc の G365(緑)が水素結合を形成する予測モデルが得られた(図 1C)。条件 3 では、FcRY の構造予測の精度をより高めるために、鳥類 FcRY のヒトでの相同遺伝子である PLA2R の立体構造を鋳型とした。この条件では、通常の IgY-Fc との結合はモデル化できなかつたが、過去に卵黄への IgY 輸送量が通常の 2 倍近く高くなることが証明された IgY-Fc の G365A 変異体(Takimoto et al., 2013)と相互作用するモデルが構築された。その場合、FcRY の CTLD5 領域に存在する Ser⁹²⁹(S929) と結合する予測モデルが得られた。そこで、FcRY の R841、R900、S929 の 3 つのアミノ酸残基をそれぞれ側鎖構造が単純な Ala に置換した変異体を作出することとした。

作出した野生型 FcRY と 3 つの FcRY 変異体を固相化し、IgY との結合量を測定した。何れの変異体においても IgY の濃度依存的に FcRY と結合した(図 2)。しかし、S929 変異体だけは、他の 3 つの FcRY よりも IgY の結合が次第に弱くなる傾向にあった。そこで、それぞれの FcRY/IgY 結合カーブを 4 パラメータロジスティック曲線で回帰した(図 3A)。4 つのパラメータの値は、それぞれ図 3B の値となり、S929 変異体では、結合する IgY の最大量を示す「Ymax」、近似曲線の中央値にあたる IgY 濃度であり IgY が結合する効力を示す「ED50」、中央値での近似曲線の傾きを示し結合の親和性の使用となる「傾き」が、他の 3 つの変異体よりも低くなった。これらの結果から、FcRY の S929 を Ala に置換することで IgY の結合能力が低下することが判明した。

■ 考 察

本研究では、近年開発が目覚ましいタンパク質の立体構造解析ソフトウェアである AlphaFold2 を活用して、卵黄への IgY 抗体の輸送を担うことが判明した FcRY 受容体と IgY の結合モデルを予測した。IgY と相互作用する FcRY 側のアミノ酸残基をシュミレーションし、実際に生化学的手法により合成した FcRY 変異体と IgY との結合活性を測定したところ、FcRY の 929 番目の Ser 残基が IgY と相互作用する可能性が示された。一方で、相互作用すると推測された他の 2 つのアミノ酸残基(R841 と R900)は IgY とは結合していない可能性が高いと考えられた。AlphaFold2 による FcRY と IgY との結合予測は未だ不完全であるが、互いに結合するアミノ酸残基を予測することは可能であり、これまで煩雑で時間と費用がかかったタンパク質の構造予測と結合予測に要する時間を短縮化することが可能と考えられた。

結合予測が不完全であった最大の理由として、FcRY の構造予測が不十分であったことが挙げられる。FcRY の分子量は 180 kDa であり、約 1500 個のアミノ酸残基で構成される(West et al., 2004)。FcRY の立体構造は、低温(クライオ)電子顕微鏡法によるものが報告されているが(He and Bjorkman, 2011)、当時の技術では分解能が十分ではなく、FcRY と IgY との相互作用領域が明確ではなかった。しかし、CTLD5 から CTLD6 の何れかが近接していることが推測されたため、本研究ではこの解析結果を元に、結合領域を探査した。本解析で使用した、条件 1 と条件 2 はその情報に基づいており、その条件で抽出された FcRY の R841 と R900 は実際には IgY と結合している可能性が低いことが判明した。そこで、FcRY の構造を予測するために、データベース上に登録されていたヒトの相同遺伝子を利用することとした。ヒトの相同遺伝子はホスホリパーゼ A2 受容体と命名されており、我々が調査した限りでは抗体との結合能を持たない(未発表データ)。このホスホリパーゼ A2 受容体の立体構造を鋳型にして FcRY の構造を予測し、結合モデルを構築した結果からは、はじめて IgY と相互作用する FcRY 側の有望なアミノ酸残基を見つけ出すことができた。この S929 のアミノ酸残基の周辺を標的にして、IgY 側のアミノ酸残基にも手を加えることで、より多くの IgY を卵黄に輸送するための戦略を立てられる可能性が示された。

本試験では、構造予測した2つのタンパク質間の相互作用アミノ酸を推定し、実際に合成した分子間で相互作用する可能性を示した。今後は、この知見を動物個体に適用し、卵黄へ高レベルで輸送される抗体分子の開発や、その受け手となるFcRY側の構造に変化を加えることで卵の抗体量を増やす試みが必要であろう。

■ 要 約

母ドリの血中IgYは卵黄へ取り込まれて、その後次世代のヒナに伝播されることで免疫防御機能を発揮する。本研究では、IgYの卵黄への輸送を担うFcRY受容体に着目し、FcRY受容体とIgYとの結合シミュレーションを基にして、互いに近接するアミノ酸配列を同定することで、卵黄へのIgY輸送量を増加させることを目標とした。ColabFoldを用いてFcRYとIgYの立体構造の予測を行い、統いて結合シミュレーションを行った。本解析により見出されたFcRY側の近接アミノ酸をAlaに置換したFcRY変異体を作出し、IgYとの結合活性を測定した。結合シミュレーションにより、FcRYのR841, R900, S929がIgYと相互作用する可能性が示唆された。S929変異体のみIgYとの結合能が低下し、R841とR900変異体では変化が見られなかった。よって、FcRYのS929はIgYとの結合に重要なアミノ酸残基である可能性が示された。本研究により、IgYの卵黄輸送を強化するための分子戦略が示された。

■ 文 献

- He Y & Bjorkman PJ (2011) Structure of FcRY, an avian immunoglobulin receptor related to mammalian mannose receptors, and its complex with IgY. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108 : 12431-12436.
- Murai A, Hamano T, Kakiuchi M, Kobayashi M & Horio F (2020) Evaluation of a receptor gene responsible for maternal blood IgY transfer into egg yolks using bursectomized IgY-depleted chickens. Poult. Sci., 99 : 1914-1920.
- Okamoto M, Sasaki R, Ikeda K, Doi K, Tatsumi F, Oshima K, Kojima T, Mizushima S, Ikegami K, Yoshimura T, Furukawa K, Kobayashi M, Horio F & Murai A (2024) FcRY is a key molecule controlling maternal blood IgY transfer to yolks during egg development in avian species. Front. Immunol., 15 : 1305587.
- Takimoto T, Doi K, Kobayashi M, Horio F & Murai A (2013) Amino acid substitution in the C ν 3 domain causes either elevation or reduction of IgY uptake into egg yolks of quail. Vet. Immunol. Immunopathol., 153 : 289-297.
- West AP, Herr AB & Bjorkman PJ (2004) The chicken yolk sac IgY receptor, a functional equivalent of the mammalian MHC-related Fc receptor, is a phospholipase A2 receptor homolog. Immunity, 20 : 601-610.

表1. FcRY と IgY の間の予測される相互作用アミノ酸残基

使用したソフトウェア	FcRY	IgY-Fc
	アミノ酸残基	アミノ酸残基 ⁴
条件1: ColabFold ¹	R841	G365, A365
条件2: ColabFold + HADDOCK ²	R900	G365, A365
条件3: ColabFold (FcRY 立体構造の鋸型予測) + HADDOCK ³	S929	A365

¹ ColabFold を用いて IgY-Fc と FcRY の立体構造と結合を予測した。

² ColabFold を用いて IgY-Fc と FcRY の立体構造を予測した後、HADDOCK を用いて FcRY の CTLD5 領域と IgY の PGDLYIG (359-365) 残基との結合を予測した。

³ FcRY のヒトホモログの phospholipase A2 receptor (PLA2R)の結晶構造解析データを用いて ColabFold にて FcRY の立体構造を予測し、その後、上記2と同様の方法で FcRY と IgY-Fc との結合を予測した。

⁴ G365 は野生型 IgY のアミノ酸残基、A365 は IgY 変異体 (G365A) のアミノ酸残基を意味する。

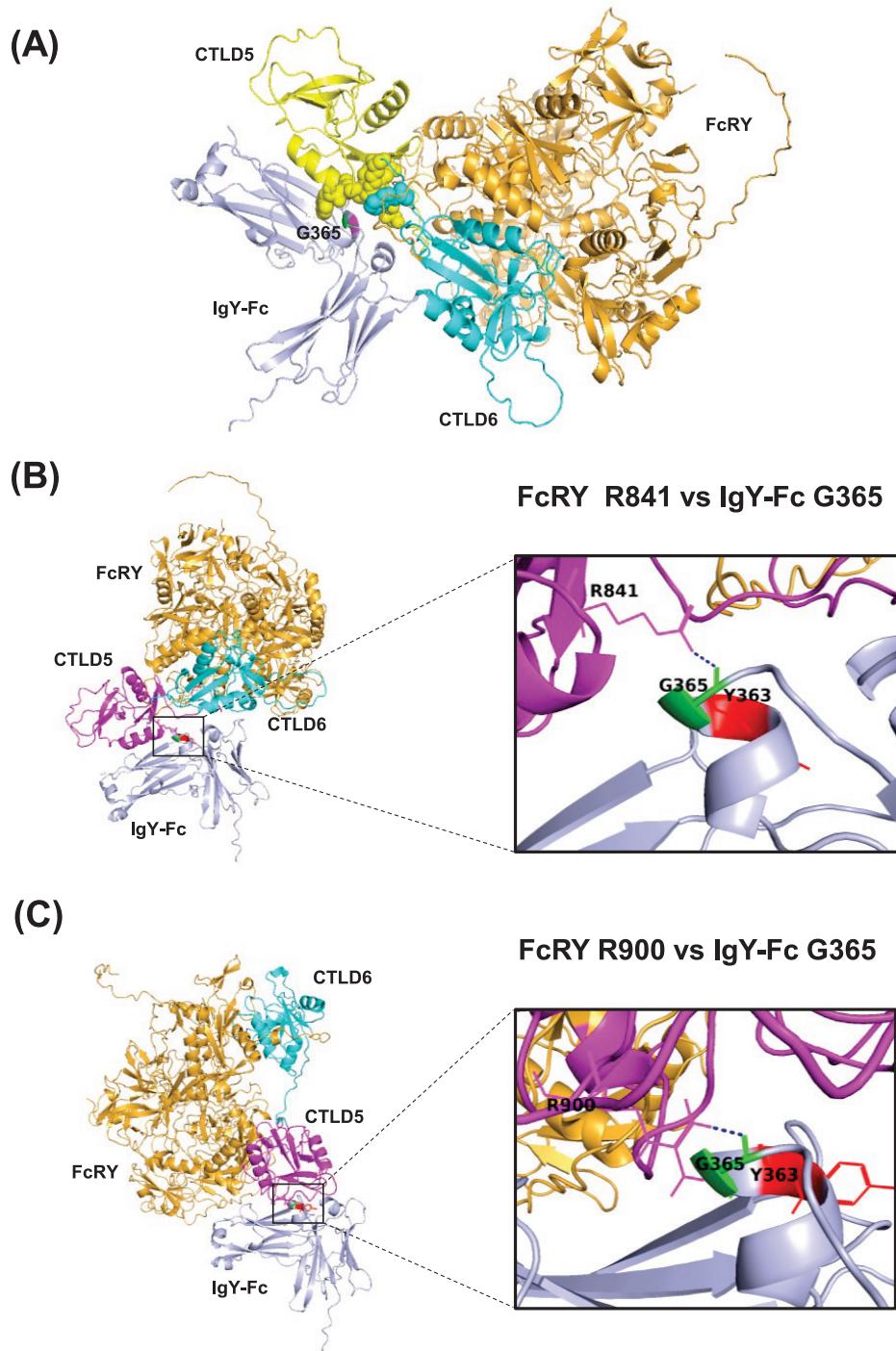


図 1. FcRY と IgY-Fc の立体構造と結合のシュミレーション。

(A) 表 1 の条件 1 で FcRY/IgY-Fc 複合体の構造を予測した。FcRY は CTLD5 領域(マゼンタ)と CTLD6 領域(シアン)とその他の領域(オレンジ)で色分けし、IgY-Fc は薄紫で色分けした。

(B) 条件 1 で解析した時の結合シュミレーションの拡大図。近接するアミノ酸残基同士の拡大図を右側に示した。FcRY の R841(マゼンタ)と IgY-Fc の G365(緑)が水素結合(青破線)を形成する。

(C) 条件 2 で解析した時の結合シュミレーションの拡大図。FcRY の R900(マゼンタ)と IgY-Fc の G365(緑)が水素結合(青破線)を形成する。

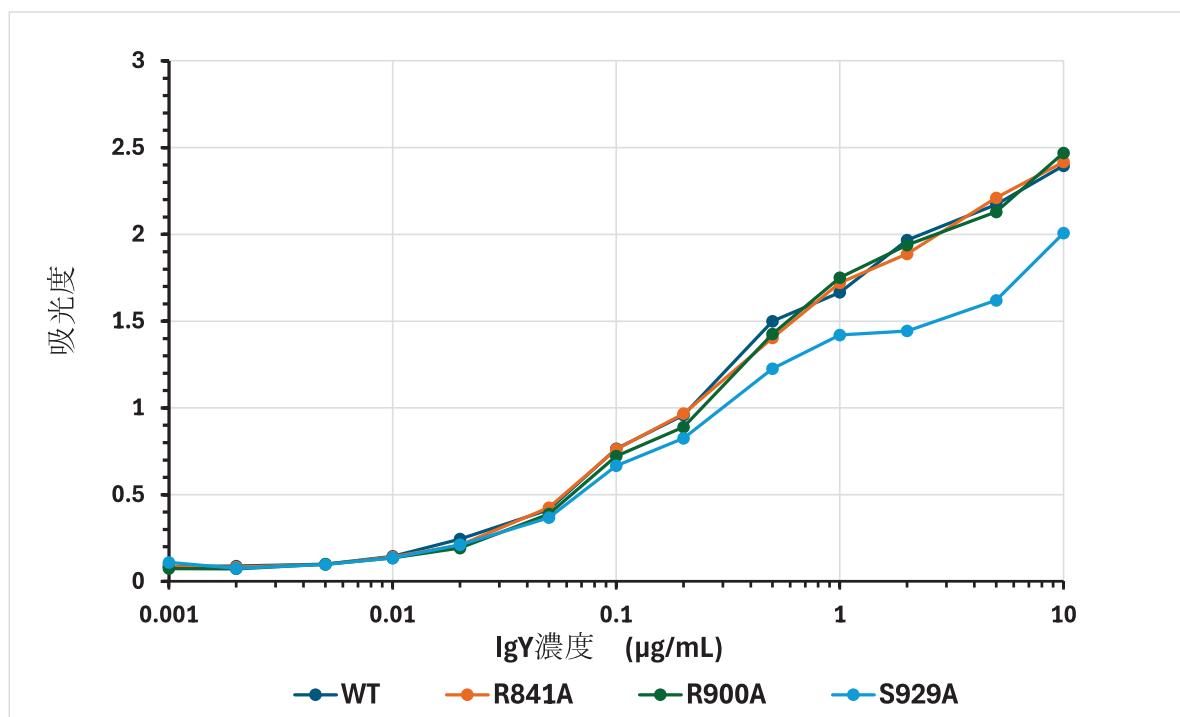
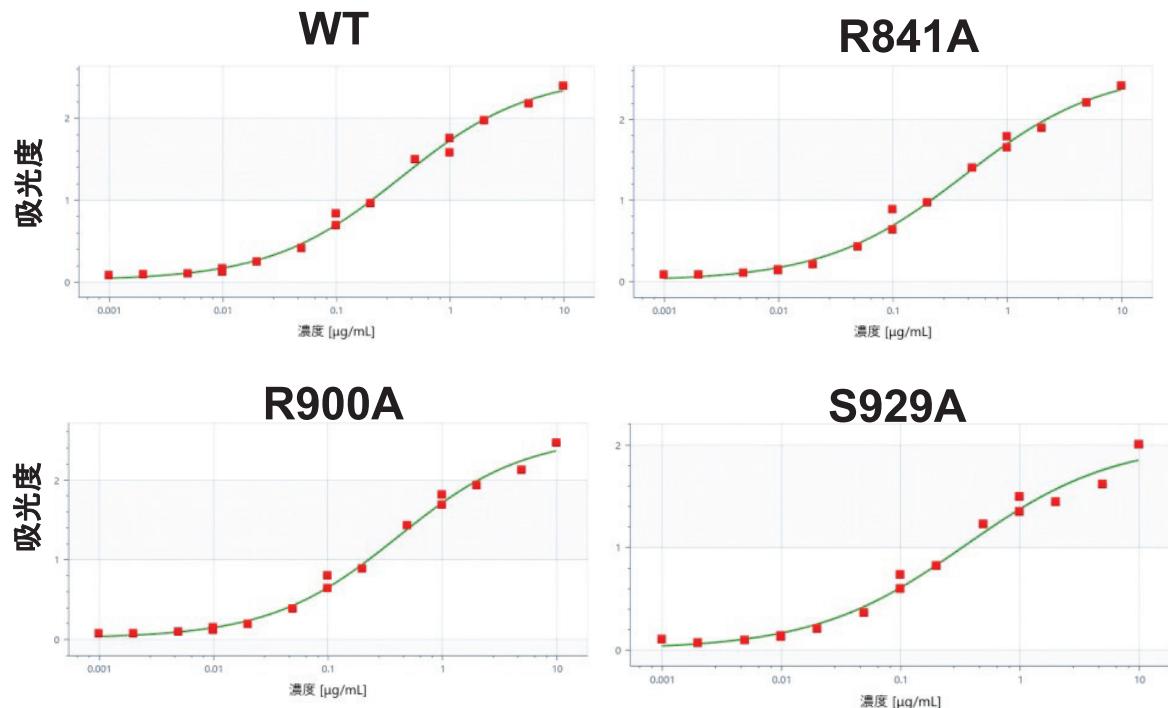


図 2. FcRY 変異体と IgY の結合量の測定。

4 種類の組換え型 FcRY(WT, R841A, R900A, S929A) を 96 ウェルプレートに His タグで固相化し、段階的に希釈した IgY(0.001-10 $\mu\text{g/mL}$) を加えた。結合した IgY を HRP-標識抗 IgY 抗体と反応させた後、発色させた。

(A)



(B)

	Ymin (a)	Ymax (d)	傾き (b)	ED50 (c)
WT	0.0223	2.53	0.762	0.371
R841A	0.0051	2.61	0.716	0.426
R900A	0.0189	2.56	0.779	0.415
S929A	0.0099	2.03	0.690	0.353

図3. FcRY 変異体と IgY の結合量を 4 パラメータロジスティック曲線¹で回帰した時の回帰曲線 (A) と係数(B)。

$$^1 \quad Y = d + \left\{ a - d \middle/ \left(1 + \left(X/c \right)^b \right) \right\}$$

但し Y=吸光度, X=IgY 濃度, a=下方漸近線, d=上方漸近線, b=傾き, c=縦軸が(a+b)/2 である中間点の横軸。