
ドッキングシュミ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ュミ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 とのドッキングシュミレーション

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 C₁3-4 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ュミ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、ドッキングシュミレーションした。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した。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ー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 ($A_{280}/1.0 = 1 \text{ mg/mL}$)。

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 ($10 \text{ } \mu\text{g/mL}$, $1 \times \text{PBS}$, $0.05\% \text{ Tween20}$, 20 mM MES , $\text{pH}6.0$) を $100 \text{ } \mu\text{L}$ 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 $200 \text{ } \mu\text{L}$ 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ったが、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成することとした。

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、結合領域を探索した。本解析で使った、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、続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_v3 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 立体構造の鋳型予測) + 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。

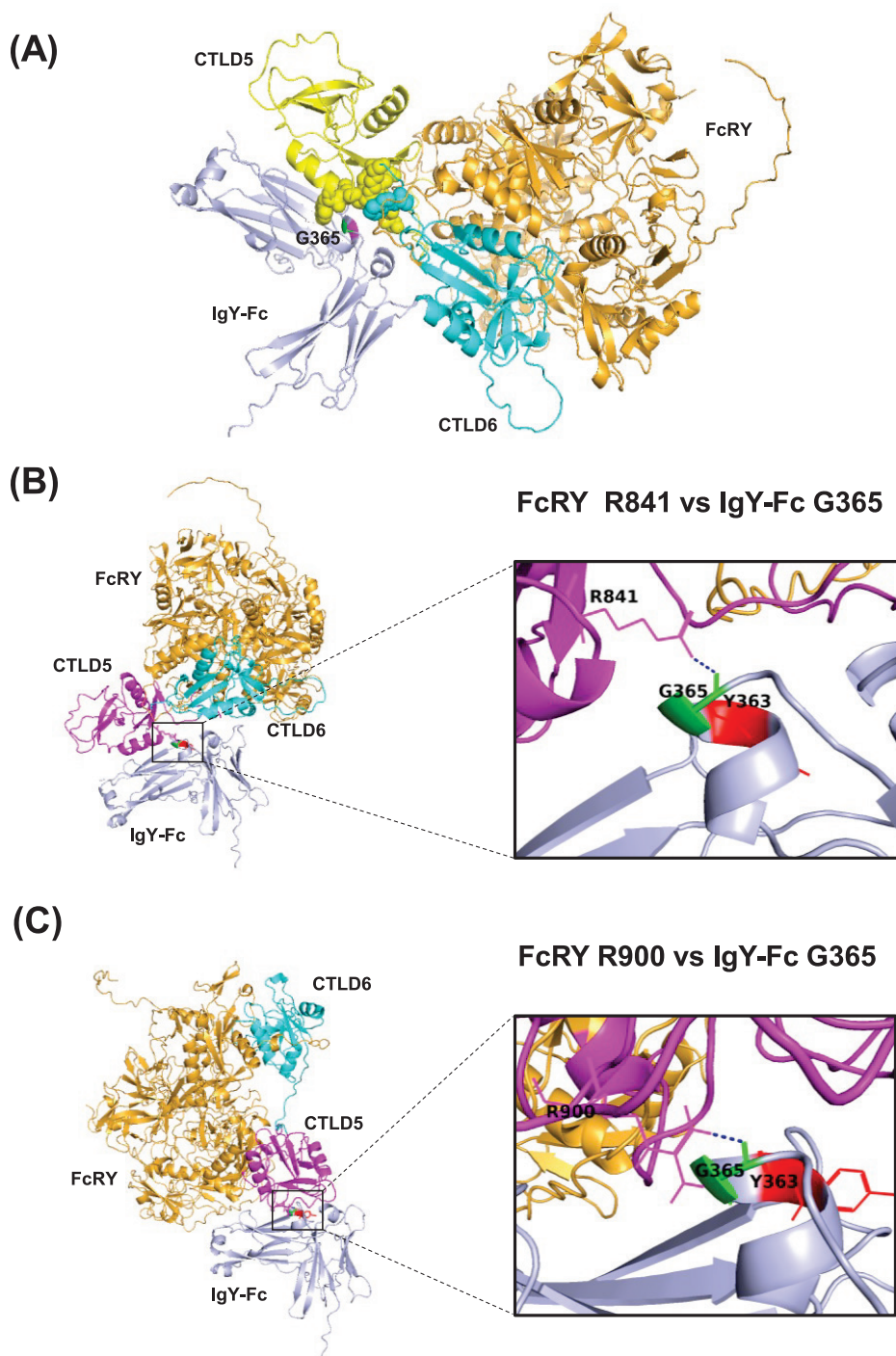


図 1. FcRY と IgY-Fc の立体構造と結合のシュミレーション。

(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。

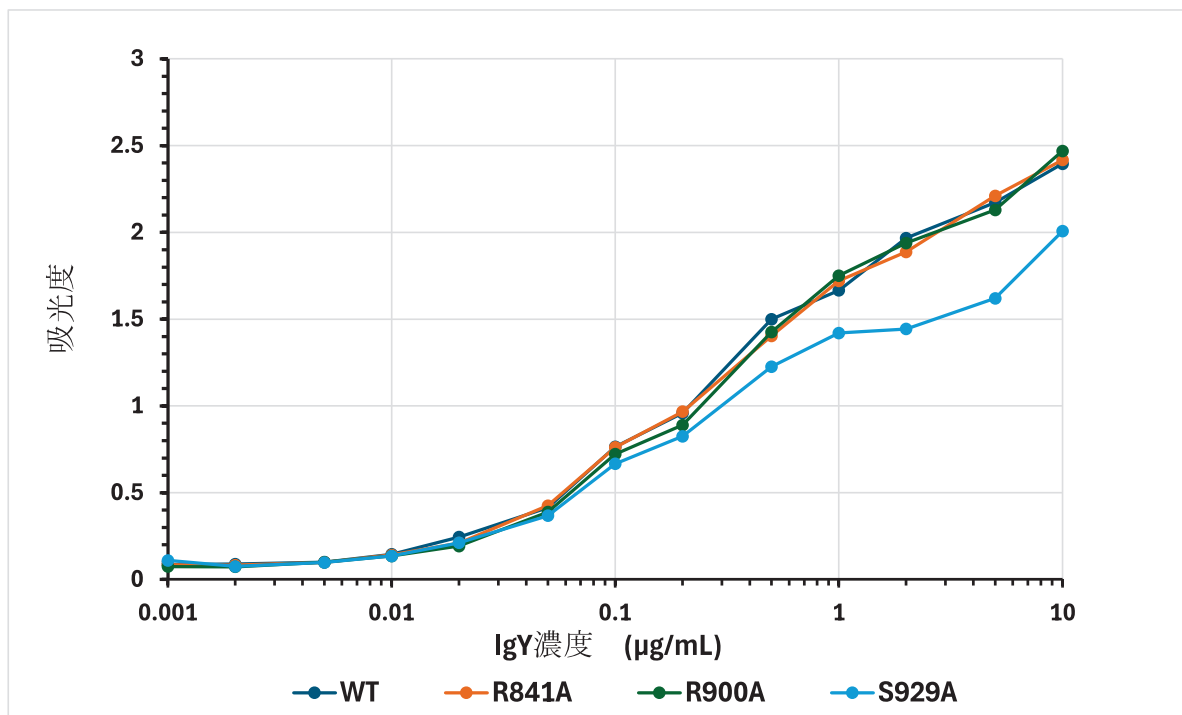
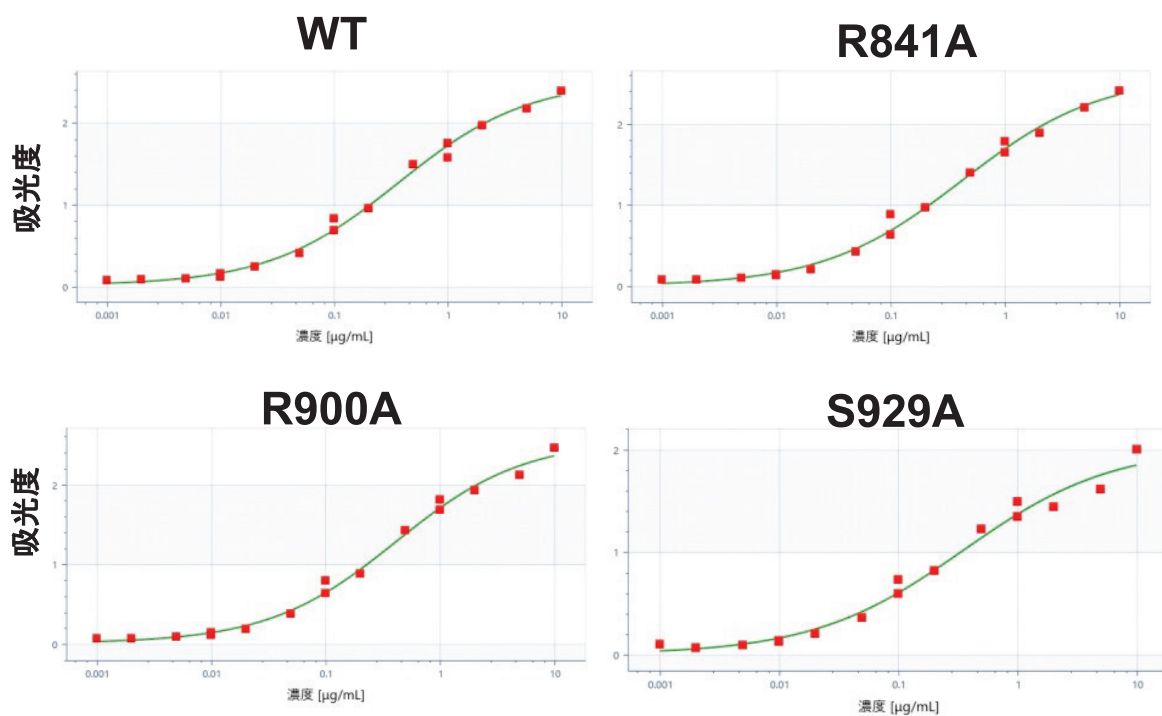


図 2. FcRY 変異体と IgY の結合量の測定。

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 µg/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 (<i>a</i>)	Ymax (<i>d</i>)	傾き (<i>b</i>)	ED50 (<i>c</i>)
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)。

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

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。