

## [ 共同研究成果 ]

## 分子動力学計算による抗 iPS 細胞抗体と

## 糖鎖リガンドの相互作用様式の同定

大野 詩歩 (東北医科薬科大学 分子生体膜研究所)

抗体と糖鎖の相互作用を明らかにするための一般的な手法として X 線結晶構造解析があるが、糖鎖は結晶化が困難であることなどの問題点がある。そこで本研究では、未分化 iPS 細胞抗体-糖鎖複合体モデルの構築および相互作用解析による抗体の糖鎖認識機構の解明を目的として、分子動力学計算を実施した。

## 1. 序論

抗体のリガンド結合様式を原子レベルで解析する手法として、X 線結晶構造解析が広く用いられている。しかし、糖鎖は電子密度が低く、像を得ることが困難な傾向にある。近年、計算化学の分野は急速に発展しており、その代表例として AI を用いたタンパク質モデリングシステムである AlphaFold が挙げられる。しかし、AlphaFold では、学習データとなる糖鎖の結晶構造が限られているなど、未だ発展途上であり、糖鎖を含むタンパク質の構造予測精度は低い。また、抗体や糖鎖の動的挙動を調べるにはモデル構築だけでなく、分子動力学 (MD) 計算が不可欠である。本研究では、抗糖鎖抗体とリガンド糖鎖の複合体モデルを構築し、その結合様式を計算化学と NMR を組み合わせて、解明した。

## 2. 方法

抗体-糖鎖複合体の構築を行うため、リガンド糖鎖として lacto-*N*-fucopentaose I (LNFP I) (Fuc  $\alpha$  (1-2)Gal  $\beta$  (1-3)GlcNAc  $\beta$  (1-3)Gal  $\beta$  (1-4)Glc)、抗体は R-17F および R-13E を用いた [1]。ドッキングモデルの構築にあたり、PDB に登録されている LNFP I の結晶構造を抽出し、グリコシド結合まわりの二面角の傾向を抽出し、安定なコンホメーションを調査した。R-17F および R-13E 抗体の Fv 領域の立体構造モデルは、AlphaFold2 により作成した [2]。CDR は IMGT により定義した。リガンドは結晶構造から抽出した (PDB ID: 5VX5)。作成した抗体に対し、構造最適化のため MD シミュレーションを行った。MD シミュレーションは、力場に CHARMM-GUI を用い、溶媒モデルは TIP3P を用いた [3]。計算ソフトには GENESIS 1.7.0 [4, 5] を用いた。Steepest Descent 法を用いて 10,000 ステップのエネルギー最小化を実施し、100 ps の間昇温し、nVT アンサンブル下で平衡化を行った。抗体のみのシミュレーションでは、この昇温過程において重原子を固定した。その後、nPT アンサンブル下で平衡化を実施した。この段階の初めの 100 ps の間は重原子を固定し、その後さらに 2000 ps にわたり主鎖原子および C $\alpha$  原子を固定した。最終的に 300 K、タイムステップ 2 fs の条件下で nPT アンサンブルにおいて 100 ns の平衡化を実行した。シミュレーションのボックスサイズは、糖鎖-抗体複合体に対しては 78-83 Å  $\times$  78-83 Å  $\times$  78-83 Å とし、糖鎖のみのシミュレーションでは 60 Å  $\times$  60 Å  $\times$  60 Å とした。複合体のエピトープを実験的に同定するため、化学合成した LNFP I と R-17F あるいは R-13E の混合溶液に対して、STD-NMR を測定した。LNFP I の NMR 信号の帰属には 1D- $^1\text{H}$ 、2D DQF-COSY、CLIP-COSY、HOHAHA、NOESY、1D- $^{13}\text{C}$ 、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC を用いた。これらの結果を踏まえ、LNFP I と R-17F および R-13E 抗体とのドッキングシミュレーションを行った。ドッキングシミュレーションは、HADDOCK2.4 を用い STD-NMR とデータベース解析の結果を組み込んで行った [6, 7]。得られたドッキングポーズのクラスタリングを行い、妥当と思われる複合体構造

の最適化のために MD シミュレーションを実施した。

### 3. 結果・考察

PDB に登録されている LNFP I のグリコシド結合まわりの各二面角を求めたところ、その分布は非常に限局されていたことから、LNFP I の構造は柔軟性が乏しいことが推察された(図 1)。

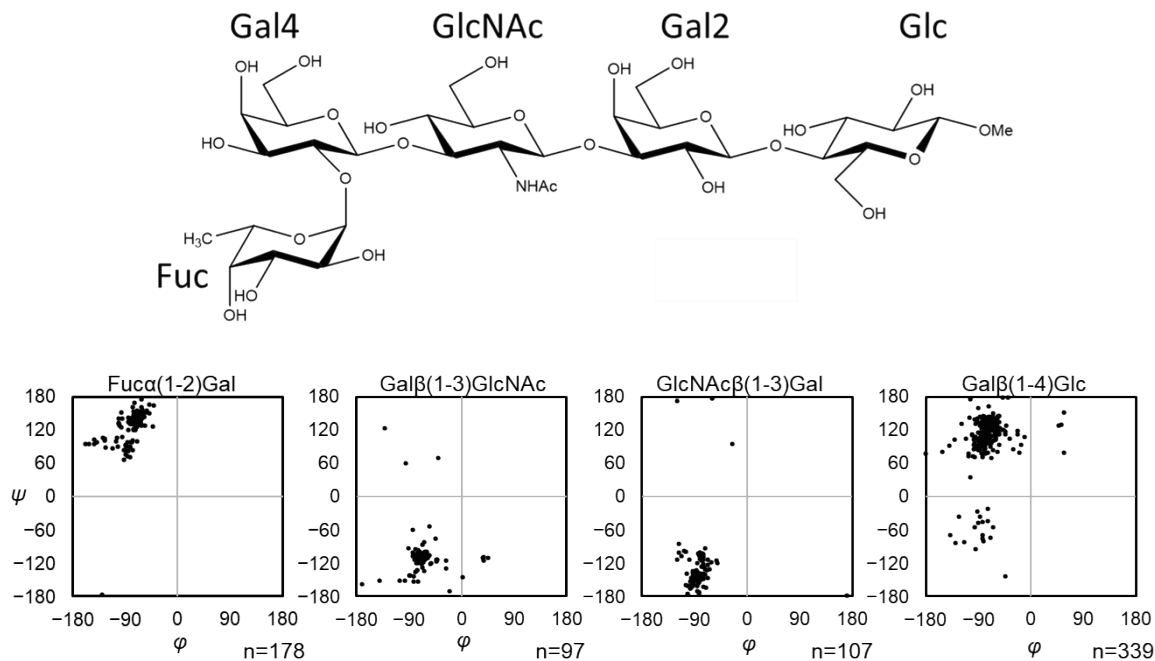


図 1. PDB に登録されている LNFP I の二面角の分布。六員環の単糖 (i) と単糖 (i-1) が 1-4 結合でつながっている場合、 $\phi$  (O5-C1(i)-O4(i-1)-C4(i-1))、 $\psi$  (C1(i)-O4(i-1)-C4(i-1)-C3(i-1)) と定義した。

2次元 NMR により LNFP I の NMR シグナルの帰属を行い、各抗体と LNFP I の STD-NMR の解析を行った。その結果、R-17F および R-13E はいずれも LNFP I の非還元末端側を共通のエピトープとして認識していることが示唆された。また、STD-NMR のシグナルは R-13E の方が R-17F よりも強かったため、R-13E と LNFP I の結合・解離は R-17F の場合と比べて速いことが示唆された (図 2)。

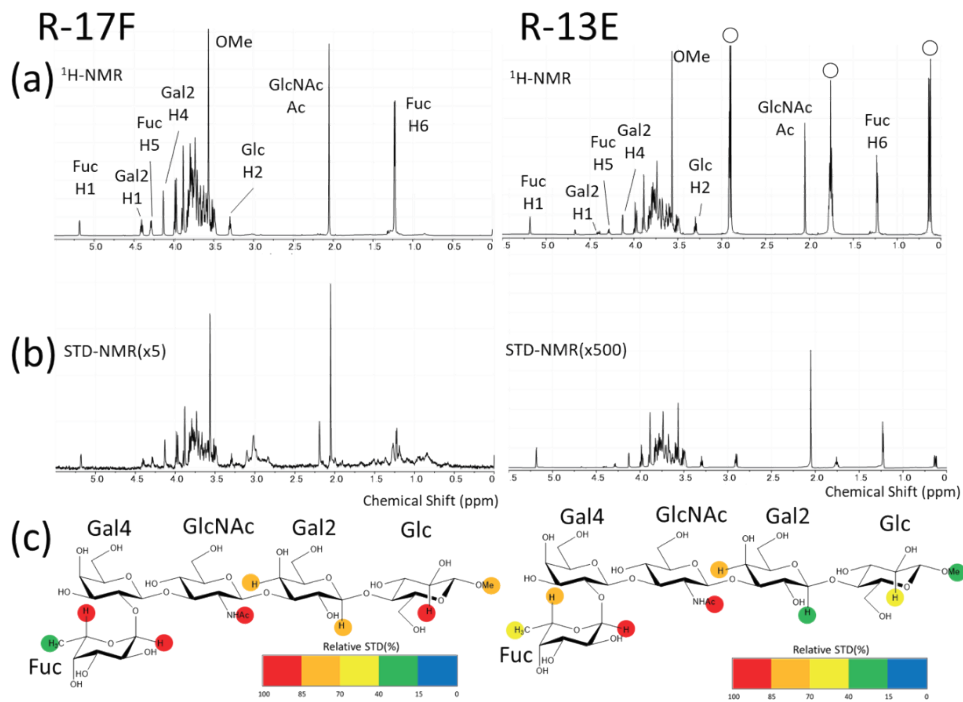


図 2. R-17F または R-13E と LNFP I の STD-NMR 解析。(a) リガンド糖鎖のみで測定したスペクトル。○は化学シフトの基準物質 DSS に由来するシグナル。(b) STD-NMR 測定で得た差スペクトル。(c) 各プロトンの強度比。強度比は(差スペクトルの強度)/(コントロールスペクトルの強度)として算出した。強度比が一番大きい GlcNAc の Ac プロトンを 100% とし、色分けを行った。STD-NMR のシグナル強度は R-17F においてはコントロールの 5 倍、R-13E においてはコントロールの 500 倍にした。

LNFP I-抗体複合体モデルを作成するため、ドッキングシミュレーションを行った。さらに糖鎖は多様なコンホメーションを取り得るため、静的構造解析のみでは認識機構の理解は不十分である。そこで、得られた複合体の最適化のため、100 ns の MD シミュレーションを行った。その結果、R-17F-LNFP I 複合体は結合を維持していたが、R-13E-LNFP I 複合体は 100 ns のシミュレーション時間の間、結合を維持することができなかった(図 3)。

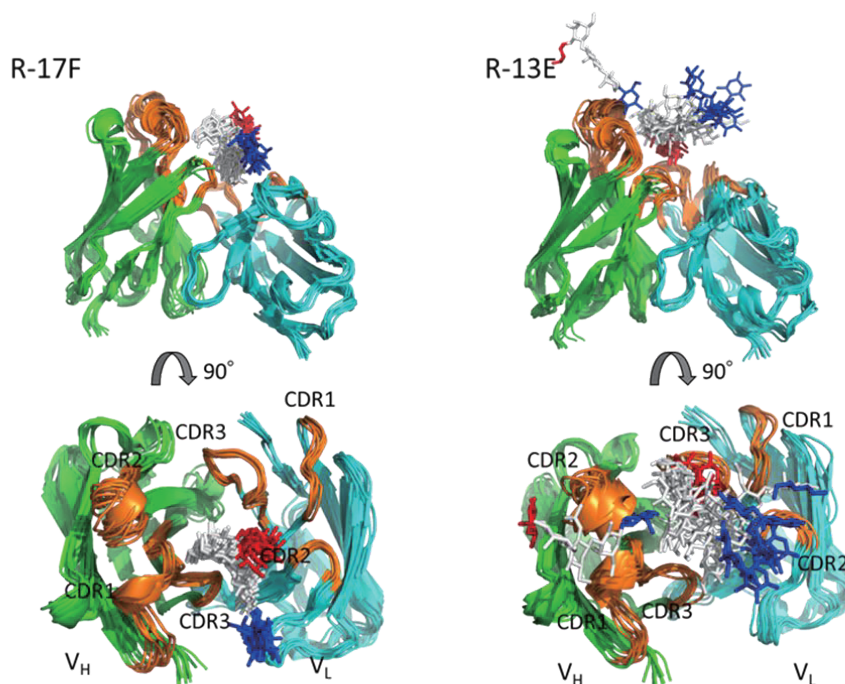


図 3. MD シミュレーション(100 ns)における複合体の構造。各スナップショットは 10 ns ごとに抽出した構造である。緑は H 鎖、水色は L 鎖、オレンジは CDR、赤は Fuc、青は Glc を示す。

H 鎖と L 鎖のどちらが結合安定性に寄与しているかを評価するため、(1) H 鎖は R-17F の配列であり、L 鎖は R-13E の配列を有するモデルと、(2) H 鎖は R-13E の配列であり、L 鎖は R-17F の配列を有するモデルの 2 つに対し MD シミュレーションを行ったところ、(2) のモデルのみ結合を維持していた。したがって結合には R-17F の L 鎖のアミノ酸残基がリガンドとの結合に重要であることが示された。

次に、遊離型および複合体状態の抗体に対する分子動力学シミュレーションにおいて、R-13E および R-17F のアミノ酸の RMSF 値を計算することにより、LNFP I 複合体における抗体の動的評価を行った。遊離型と比較して、R-13E の L 鎖の CDR3 の RMSF 値は LNFP I への結合に伴い減少した。対照的に、遊離型と複合体状態の R-17F では、この領域の RMSF 値に有意な差は認められなかった(図 4)。

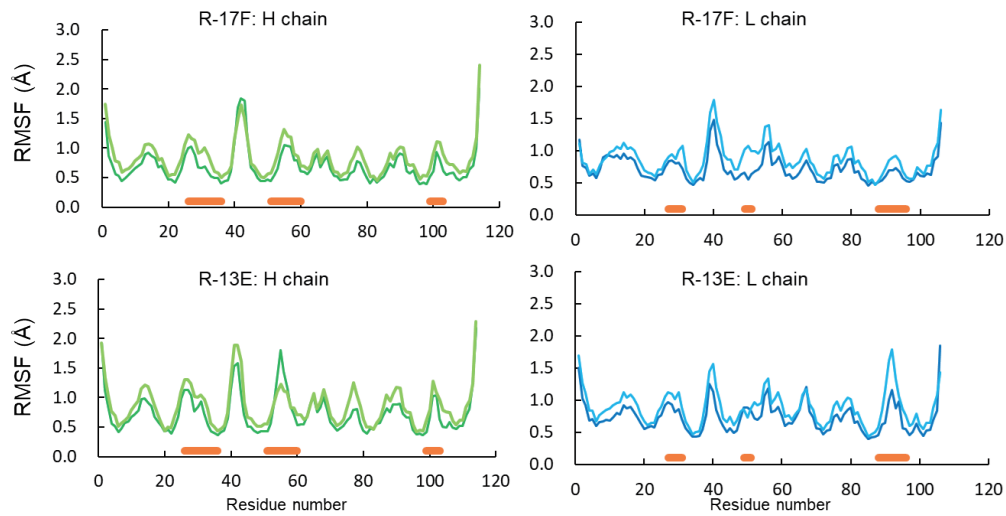


図 4. 分子動力学シミュレーション中における抗体残基の RMSF 解析。

上は R-17F、下は R-13E について、アミノ酸残基単位で算出した RMSF プロットを示す。RMSF 値は、R-17F では 100 ns、R-13E では 50 ns のシミュレーションを用いて計算した。抗体単独状態の RMSF 値は、R-17F を黄緑色、R-13E を水色で示し、抗体-リガンド複合体の RMSF 値は、それぞれ緑色および青色で示した。RMSF 値は、独立した 3 回のシミュレーション (run 1-3) の平均値である。相補性決定領域 (CDR) はオレンジ色で示した。

R-13E および R-17F の糖鎖結合部位をアミノ酸残基レベルで明らかにするため、抗体のアミノ酸の溶媒露出度 (SASA) を算出し、糖鎖との接触部位を評価した。その結果、R-17F は CDR 領域を介して LNFP I と広範囲に接触していることを示した。対照的に、R-13E は CDR 領域と LNFP I との相互作用が R-17F と比較して少ないことが明らかになった。特に、L 鎖の CDR2 と LNFP I との相互作用はごくわずかであった。次に、MD 計算中の L 鎖の CDR2 および CDR3 領域の挙動を検討した (図 5)。

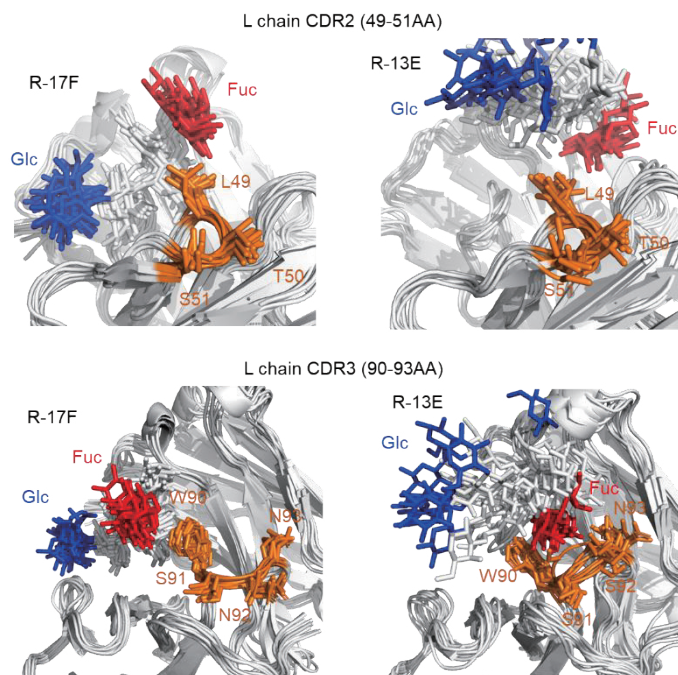


図5. R-17F-LNFP I 複合体と R-13E-LNFP I 複合体が異なる領域の構造の拡大図。(A) L鎖 (L) CDR2 周辺構造 (アミノ酸: 49-51)。(B) L鎖 CDR3 周辺構造 (アミノ酸残基 90-93)。100 ナノ秒シミュレーションにおける抗体-LNFP I 複合体の重ね合わせスナップショットを示す。主要アミノ酸残基を含む構造を10 ナノ秒ごとに抽出。Fuc 残基は赤、Glc 残基は青で表示。

R-17F-LNFP I 複合体では、CDR2 領域のアミノ酸残基はシミュレーション全体を通じて一貫して類似した立体構造が観察できた。これに対し、R-13E-LNFP I 複合体における同領域のアミノ酸残基はフレキシブルな配向を示した。同様に、R-17F の CDR3 領域内のアミノ酸残基は安定した立体構造をとったが、R-13E ではフレキシブルな配向を示した。特に、R-13E における 91-92 残基のアミノ酸は著しく不規則な運動を示した。これらの結果から、LNFP I が R-13E の結合ポケットに適切に適合できず、その結果として CDR 領域のアミノ酸がフレキシブルな配向を示すことが示唆された。

最後に、MD 計算により得られた R-17F-LNFP I 複合体の構造的妥当性を検証するため、LNFP I の還元末端から脂質部分を延長し、糖鎖-脂質構造体を脂質二重層モデルに埋め込むことで、脂質二重層環境下における複合体モデルを構築した。その結果、抗体分子と脂質二重層との間に立体的衝突は認められなかった (図6)。

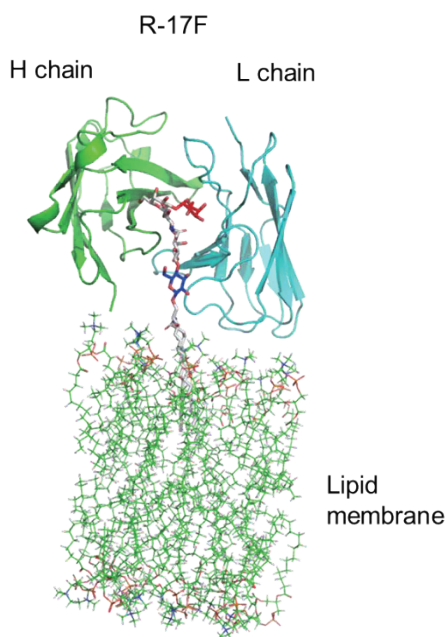


図 6. 脂質二重膜上の LNFP I 含有糖脂質と複合体を形成した R-17F 抗体のモデル。モデルは、100 ナノ秒時点の分子動力学シミュレーションから得られた R-17F-LNFP I 複合体を用いて構築された。抗体-糖脂質複合体が脂質膜に埋め込まれたモデルを生成するため、LNFP I の還元末端から脂質鎖を延長した。

これは、本研究において構築した R-17F-LNFP I 複合体モデルが、脂質膜環境下においても物理的に妥当な配置をとり得ることを示しており、本モデルの構造的妥当性を支持するものである。

#### 4. 結論

本研究は、困難とされる糖鎖-抗体複合体の構築と、その結合様式の解明を計算化学と NMR を組み合わせることで明らかにした。この手法は他の組み合わせの抗体-糖鎖複合体に対しても応用でき、新規抗体デザインに貢献することができる。

#### 謝辞

本研究は、東北大学サイバーサイエンスセンターのスーパーコンピュータを活用することで実現することができた。また、研究遂行にあたり、同センターの関係各位より貴重なご指導とご協力を賜ったことに深く感謝申し上げます。さらに、MD シミュレーションにご協力いただいた李秀栄博士（国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所）、ならびに NMR 測定に多大なご支援をいただいた 松木智之様、佐藤慎一様（東北医科薬科大学） に対し、心より感謝の意を表す。

#### 参考文献

[1] H. Nakao, et al., Characterization of novel antibodies that recognize sialylated keratan

- sulfate and lacto-*N*-fucopentaose I on human induced pluripotent cells: comparison with existing antibodies, *Glycobiology*, **33**, 150-164 (2023)
- [2] J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583–589 (2021)
- [3] F.A. Momany and R.Rone, Validation of the general purpose QUANTA ®3.2/CHARMm® force field, *J. Comput. Chem.*, **13**, 888–900 (1992)
- [4] C. Kobayashi, J. Jung, Y. Matsunaga, T. Mori, T. Ando, K. Tamura, M. Kamiya, and Y. Sugita, GENESIS 1.1: A hybrid-parallel molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms on multiple computational platforms, *J. Comput. Chem.*, **38**, 2193-2206 (2017)
- [5] J. Jung, T. Mori, C. Kobayashi, Y. Matsunaga, T. Yoda, M. Feig, and Y. Sugita, GENESIS: a hybrid-parallel and multi-scale molecular dynamics simulator with enhanced sampling algorithms for biomolecular and cellular simulations, *Wiley Interdiscip Rev. Comput. Mol. Sci.*, **5**, 310-323 (2015)
- [6] C. Dominguez, R. Boelens, and Alexandre M. J. J. Bonvin, HADDOCK: A Protein–Protein Docking Approach Based on Biochemical or Biophysical Information, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1731-1737 (2003)
- [7] S.J. de Vries, A.D.J. van Dijk, M. Krzeminski, M. van Dijk, A. Thureau, V. Hsu, T. Wassenaar and A.M.J.J. Bonvin, HADDOCK versus HADDOCK: New features and performance of HADDOCK2.0 on the CAPRI targets, *Proteins.*, **69**, 726-733 (2007)