構造解析ユニット

補助事業代表者（所属・職名）
高木　淳一　（大阪大学蛋白質研究所・教授）

高難度タンパク質・複合体試料等の生産による支援と高度化

補助事業分担者（所属・職名）
有森　貴夫（大阪大学蛋白質研究所・准教授）、三原　恵美子（大阪大学蛋白質研究所・特任研究員）、的場　京子（大阪大学蛋白質研究所・特任研究員）

高度化における研究背景・目的

高度化研究では、以下の3つの項目を通して、次世代の支援技術基盤となり得るテクノロジーの創成を目指す。

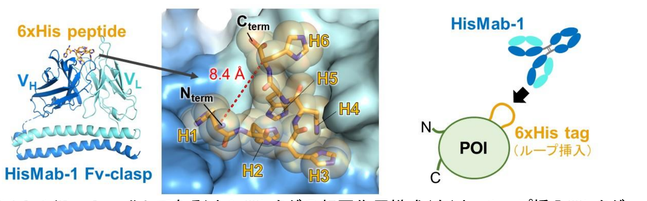
1. **難発現性・易凝集性タンパク質の高品質迅速生産に関わる新技術の開発**
   - 1−1. short hinge(sh)Fc融合法とそのtoolboxの開発
   - 1−2. ペプチド・タグシステムの改良
2. **受容体特異的AAVベクターの開発と評価**
   - 2−1. AAVベクターの効率的な新規精製法の開発
   - 2−2. 臓器標的型AAVベクターシステム「BiVE法」の開発
3. **アゴニスト性バイオ医薬の開発**

高度化の成果

1-1.short hinge(sh)Fc法の開発

支援分ポスターを参照

1-2. 新しいHisタグ抗体HisMab-1の開発と構造決定（東北大・加藤幸成Gとの課題間連携）



HisMab-1（Fv-clasp化してある）と6xHisタグの相互作用様式（左）と、ループ挿入Hisタグへの応用の概念図（右）

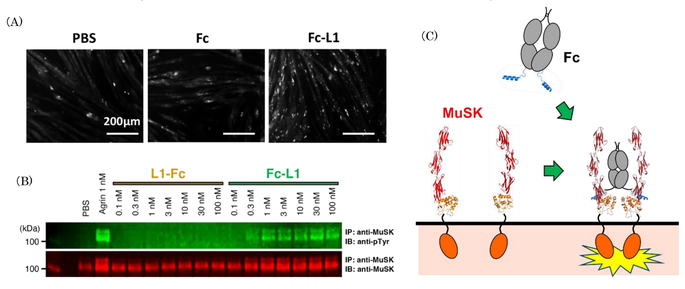
HisMab-1は、東北大加藤Gで樹立された新規抗Hisタグ抗体であり、Hisタグ融合蛋白質の特異的かつ高感度な検出に有用である。我々は、HisMab-1と6xHisペプチドの複合体構造を2.39 Å分解能で決定し、その高い特異性の分子機構を明らかにした。さらに、βヘアピンループ内に挿入した6xHisタグに対してもHisMab-1の親和性が低下しないことを確認し、HisMab-1がループ挿入Hisタグにも適用できることを示した(Hitomi et al, JMB, 2026)。

3. アゴニスト性バイオ医薬の開発

我々は、Fc蛋白質に受容体結合ペプチドを二価で提示（グラフト）することで、受容体を二量化して活性化できる人工アゴニスト蛋白質（“Mirabody”と呼ぶ）ができることをすでに示している。この戦略を、実際にアゴニスト医薬が望まれている受容体系に応用し、実用的なアゴニスト創成を試みるというのが項目3の目標である。これまでに下記の2つのアゴニストの創成に成功している。

3-1. 筋特異的キナーゼMuSKに対するアゴニストの創成

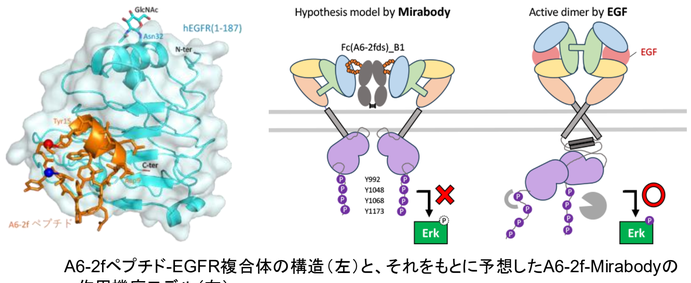
筋特異的キナーゼMuSKは神経筋接合部（NMJ)の形成を通して正常な筋の発生や維持に必須であり、MuSKの人工アゴニストは重症筋無力症（MG）を始めとした難病の治療薬になることが期待されている。MuSKアゴニスト作用をもつFc融合タンパク質（Fc-L1)について、細胞での活性評価と立体構造解析を通して、このアゴニストがなぜMuSKを活性化できるのかを明らかにし、論文として報告した(Mizutani et al, Structure, 2025)。



Fc融合型MuSK架橋剤（Fc-L1)によるMuSKの活性化を、マウス筋管細胞上のアセチルコリン受容体クラスタリング誘導（A)およびMuSK自己リン酸化（B)によって評価した。Fc-L1はL1ペプチド部分でMuSK細胞外領域を2分子引き寄せ、活性化型2量体構造を誘導することがX線結晶構造解析から推定された（C)。

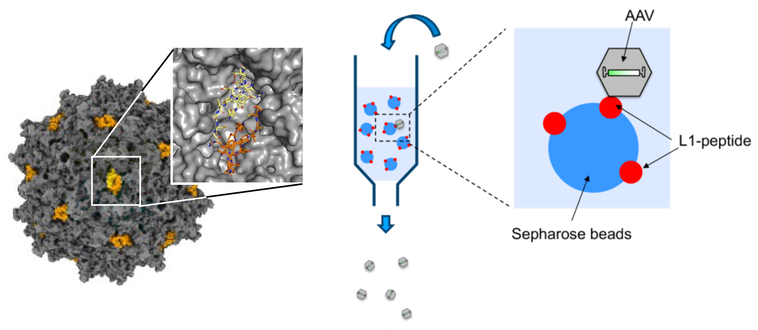
3-2. EGFRに対する人工アゴニストの創成

EGFRに結合するペプチドA6-2fを提示するA6-2f-Mirabodyがいわゆるインバースアゴニスト活性を持つことを明らかにし、さらにA6-2fペプチドとEGFRの複合体構造を1.4Åで解明することで、Mirabodyが細胞上でどのようにEGFRを2分子引き寄せているかも明らかにできた（図5）。



A6-2fペプチド-EGFR複合体の構造（左）と、それをもとに予想したA6-2f-Mirabodyの作用機序モデル（右）

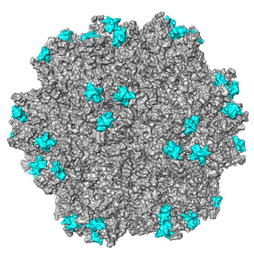
2-1. AAVベクターの効率的な新規精製法の開発



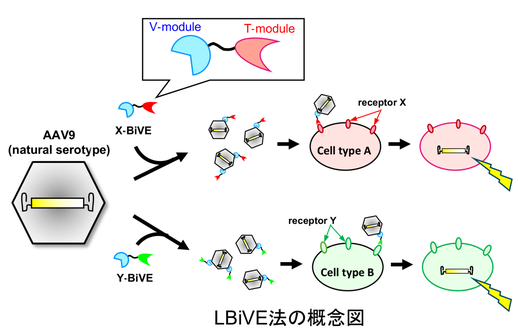
環状ペプチドL1−AAVキャプシド複合体のクライオ電顕構造（左）と、L1リガンドを用いたアフィニティー精製の概念図（右）

遺伝子治療ベクターAAVについては簡便・迅速・安価な大量精製法の開発が世界中で求められている。本高度化では、天然（未改変）のキャプシドに結合する環状ペプチド（L1)を単離し、これを用いることにより、世界で初めての「抗体ではない有機化合物を固定化リガンドとしたアフィニティー精製法」の開発に成功した。さらに、L1とAAVキャプシドの複合体のクライオ電顕構造を2.48Å分解能で決定し、ペプチド—キャプシドの相互作用について原子分解能で明らかにした。L1は、精製のみならず試料中のキャプシド濃度を極めて高感度で定量する方法にも応用でき、既存の抗体を用いたELISA法より約100倍の高感度定量が可能になった。

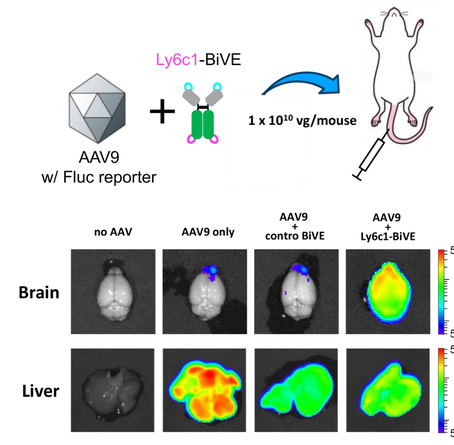
2-2. 臓器標的型AAVベクターシステム「BiVE法」の開発



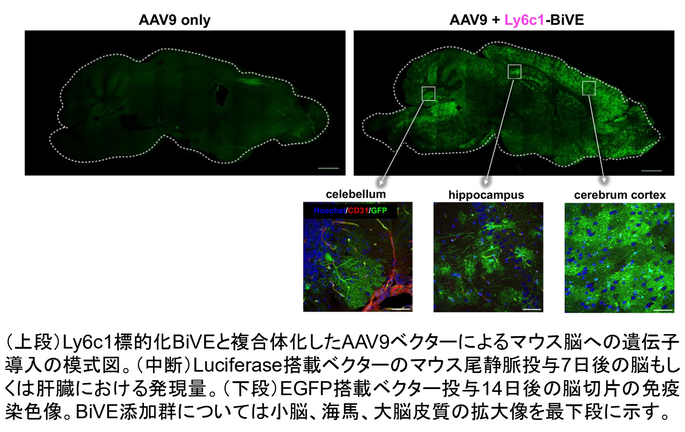
L19ペプチド（水色）とAAV9複合体のクライオ電顕構造



LBiVE法の概念図

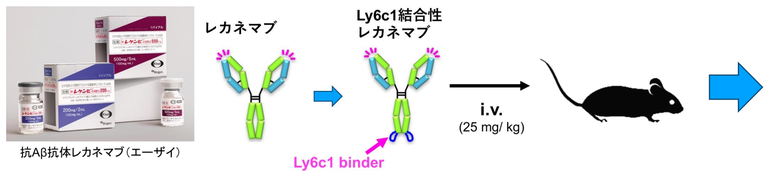


本研究開発項目では、ウイルスと標的受容体に同時に結合できる二重特異性バインダーを利用して、全く改変を加えていない天然のAAVキャプシドを標的依存性ウイルスに変換する技術「Bispecific Virus Engager; BiVE」法を開発した。2-1とは別のAAV9結合性環状ペプチド（L19)が、AAVの細胞への感染を阻害しない事を利用し、「V-moduleにこれを用いた。T-moduleにはBBBの内皮細胞に発現するLy6c1に結合する環状ペプチドを用い、この両方を提示するBiVE分子を天然型AAV9と反応させ、これをマウスに尾静脈経由で投与した結果、天然型AAV9のみではほぼ全く脳内での発現が見られなかったのに対し、BiVEの添加によりLucレポーターの発現が脳で30倍に増え、一方肝臓では7割減になることが確認された（右上図)。さらに、脳切片の免疫染色により、レポーター（GFP）は脳内の広い領域で様々な神経細胞において遺伝子発現が見られることを明らかにした（右下図)。本BiVE法はT-moduleの特異性を変更することにより原理的にはあらゆる細胞や臓器に対する特異性をAAVに附与することができる。

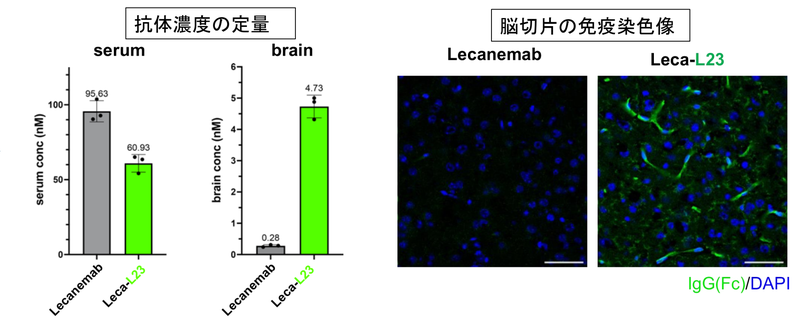


（上段）Ly6c1標的化BiVEと複合体化したAAV9ベクターによるマウス脳への遺伝子導入の模式図。（中断）Luciferase搭載ベクターのマウス尾静脈投与7日後の脳もしくは肝臓における発現量。（下段）EGFP搭載ベクター投与14日後の脳切片の免疫染色像。BiVE添加群については小脳、海馬、大脳皮質の拡大像を最下段に示す。

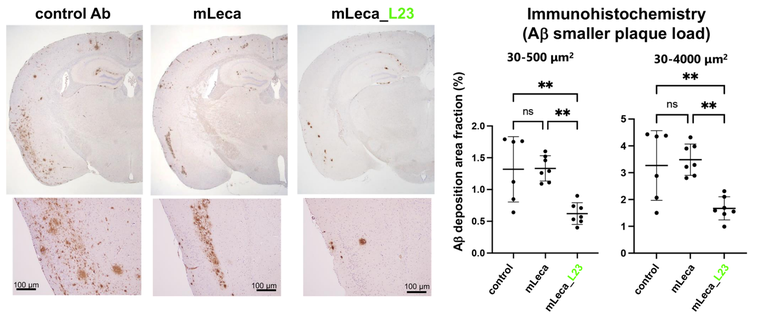
4. 抗体医薬への脳移行性の附与



抗Aβ抗体レカネマブ（エーザイ）



抗体を始めとするバイオ医薬品において、組織・臓器特異的なデリバリーは重要な課題である。とくに、中枢神経系への薬物送達のためには血液脳関門（Blood-Brain Barrier, BBB）の透過が必須であり、トランスフェリン受容体などを介したreceptor-mediated transcytosis（RMT）を利用するBBB透過法が開発されているが、実用的かつ汎用性の高い方法はまだ存在しない。これまでに我々は、標的分子結合性を持つ環状ペプチドから、その活性構造を取りだしてあらゆるタンパク質上に埋め込む技術（LassoGraft法）を開発し、これにより二重特異性抗体（Addbody）を極めて簡単に創成できることを示している。本研究では、脳血管内皮に存在するLy6ファミリー分子を認識する環状ペプチド配列を使って既存の抗体をAddbody化することで、BBB透過能を賦与できることを発見した。この方法をアルツハイマー病（AD）に対する病態改善薬であるLecanemabに応用したところ、ADモデルマウスの脳内のAβプラーク除去効率を飛躍的に増大できることが確認された。このシステムを利用すれば、様々な既存および新規の中枢疾患医薬抗体の効果の増大や投与量の低減が可能になると期待される



（上段）承認済み抗AD抗体医薬レカネマブにLy6c1バインダーペプチドをグラフトしたAddbodyを正常マウスに投与し、その脳移行性をグラフト無し抗体と比較したもの。（下段）アルツハイマー病モデルマウス（A7系統）におけるレカネマブ投与の薬理効果。プラークの出現し始める12月齢から3mg/kg（左）もしくは0.3mg/kg（右）で毎週16回投与し、16月齢での脳内Aβプラークを染色、定量した。