

近接効果を利用した架橋酵素融合タンパク質による部位特異的抗体修飾

○西岡莉子¹・飯田龍哉¹・南畑孝介¹・佐藤峻¹・木村道夫¹・神谷典穂^{1,2} (¹九大院工、²九大未来化セ)

Proximity-based site-specific modification of antibody by a novel cross-linking enzyme fusion protein
(Graduate School of Engineering, Kyushu University¹, Center for Future Chemistry, Kyushu University²)
NISHIOKA, Riko¹; IIDA, Ryuya¹; MINAMIHATA, Kosuke¹; SATO, Ryo¹; KIMURA, Michio¹; KAMIYA, Noriho^{1,2}

抗体-薬物複合体 (Antibody-drug conjugate, ADC) は、抗体の特異性と低分子薬物の薬効を両立した次世代医薬品として注目されている。ADC の作製においては、ADC の有効性や安全性の観点から、部位特異的な修飾法が好ましい。従来、Lys 残基や Cys 残基を対象とする化学修飾法が用いられてきたが、抗体にはこれらのアミノ酸残基が多く存在するため、反応部位の制御は困難である。これに対して、近年、ネイティブ抗体の部位特異的な修飾法として、抗体結合タンパク質による抗体への近接効果を利用した酵素を用いた手法が報告されている。当研究室では、微生物由来トランスグルタミナーゼ活性型前駆体 (ProMTG) に抗体結合タンパク質 protein G (pG) を融合した ProMTG-pG が、IgG 抗体 (Herceptin) の特定の Lys 残基に蛍光ラベル化 Gln 基質を修飾可能なことを見出した。一方、ProMTG-pG への自己ラベル反応と、抗体共存下における凝集形成が確認されたことから、本研究では、pG 部位を置換した新規 pG 融合 MTG 変異体を作製し、2つの課題の解決を試みた (Fig. 1a)。

まず、抗体の Fc または Fab 領域に特異的に結合する pG 変異体に注目し、これらの Lys 及び Gln 残基を置換した ProMTG-pG(Fc), ProMTG-pG(Fab) を作製した。Herceptin と各 pG 融合 MTG 変異体を混合後、濁度 (OD₆₀₀) 測定により凝集形成を評価した結果、ProMTG-pG を用いた場合と比較して、何れの pG 融合 MTG 変異体においても OD₆₀₀ 値が低く、pG 部位の置換により凝集が解消されることが示された。また、IgG 抗体と薬物モデル Gln 基質を用いた架橋活性評価より、pG の全ての Lys 残基を Arg 残基に、Gln 残基を Asn 残基に置換した ProMTG-pG(Fab) において、自己ラベル反応が完全に抑制され、pG 配列中の Lys 残基が自己ラベルの反応点であったことが示された (Fig. 1b)。以上の結果から、pG 部位の特異性の改変とアミノ酸残基の置換によって、上述の課題の解決に成功した。さらに、何れの変異体も ProMTG-pG と同様に、抗体の重鎖に存在する Lys65 に薬物モデル Gln 基質を修飾可能であり、各 pG 融合 MTG 変異体の抗体への基質修飾率を評価した結果、ProMTG-pG(Fab) は約 90% と高い修飾率を達成していることも明らかとなった。

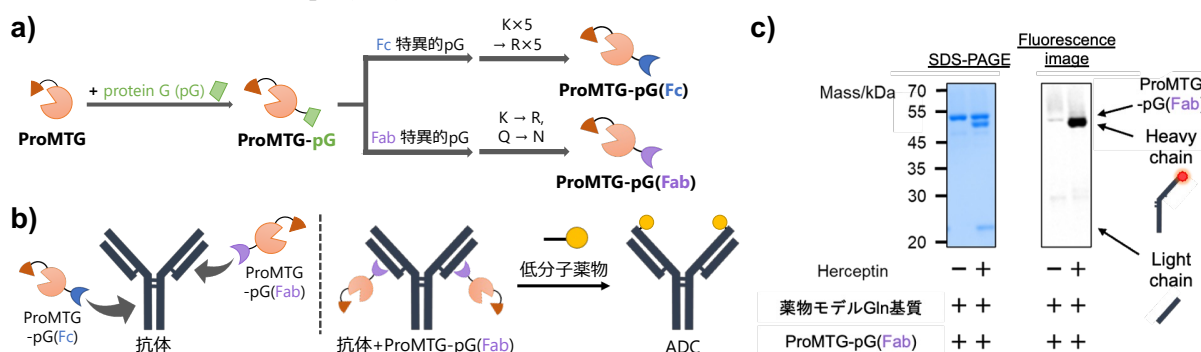


Fig. 1. (a) Design of novel ProMTG-pG mutants. (b) Conceptual diagram of this research. (c) Evaluation of cross-linking activity of ProMTG-pG(Fab).

【謝辞】 本研究は、AMED 課題番号 JP21ac0121004 の支援を受けたものです。

【参考文献】 1) W. Yu et al., *Bioconjugate Chem.*, **32**, 1058-1066 (2021)