

3D ドメインスワッピング構造の安定化に寄与する界面アミノ酸に着目した多量化抗体軽鎖の探索とその会合挙動

○山口 将平¹・酒井 隆裕¹・真島 剛史¹・小林 直也¹・一二三 恵美²・宇田 泰三³・廣田 俊¹ (1 奈良先端大、2 大分大 全学研究推進機構、3 九州先端研 ナノテク)

Search of oligomerizable antibody light chains by focusing on interface amino acid residues that stabilize the 3D domain-swapped structure (Division of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology¹, Research Promotion Institute, Oita University², Nano-tech Lab, Information Technologies and Nanotechnologies³)
 YAMAGUCHI, Shohei¹; SAKAI, Takahiro¹; MASHIMA, Tsuyoshi¹; KOBAYASHI, Naoya¹; HIFUMI, Emi²; UDA, Taizo³; HIROTA, Shun¹

医薬品に幅広く利用されている抗体は不安定で会合しやすく、凝集や粘度上昇などが問題となる場合が多い。しかし、その会合挙動について原子レベルで詳細に調べた研究は限定的である。当研究室では、ヒト抗体軽鎖#4 の可変領域 (VL) において、3D ドメインスワッピング (3D-DS) による 2 量体がさらに 2 量

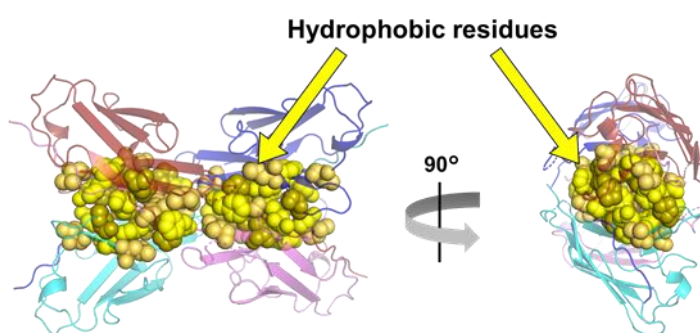


Figure 1. Tetrameric structure of VL (#4).

化して 4 量体を形成することを原子レベルでの立体構造から明らかにした (Fig. 1)。本研究では、VL (#4) の 3D-DS 2 量体間の相互作用と構造安定化に重要と考えられる疎水性アミノ酸残基が多く保存された VL をデータベースから探索し、3D-DS が起こるか調査した。注目したアミノ酸残基 9 個が保存された SARS-CoV-2 中和抗体軽鎖可変領域 PR1077VL が見付き、その会合挙動を調べた。さらに、金属イオン添加により抗体様タンパク質 β -2-Microglobulin の会合体形成が促進することが報告されており、銅イオン添加による PR1077VL の 2 量体形成の促進を試みた。

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により、PR1077VL は単量体と 2 量体の平衡状態で存在することが見出された (Fig. 2a)。次に、PR1077VL に 2 当量の銅イオンを添加したところ、2 量体の割合が約 5% から約 20% に増加した (Fig. 2b)。また、SEC により単離した 2 量体を 4°C で一晩静置して再度 SEC で分析すると、2 量体は解離していなかったことから、銅イオン添加により形成した 2 量体は安定であることが示された。SEC により単離した単量体と 2 量体は、非還元 SDS-PAGE において、いずれも単量体の位置にバンドが確認され、2 量体は非共有結合で形成されることが示された。さらに、銅イオン添加後の 2 量体量の経時変化を SEC により分析すると、72 時間経過後も増加し続けた。この結果から、PR1077VL の 2 量化は通常のタンパク質の複合化よりも会合速度が極めて遅く、タンパク質の大きな構造変化を伴うことが示唆された。

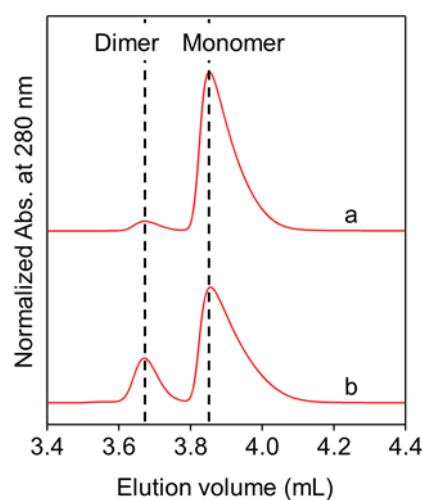


Figure 2. SEC elution curves of PR1077VL: a) without CuCl_2 , b) with CuCl_2 .