

酸性および中性下の免疫グロブリン G の溶液構造 Solution structure of Immunoglobulin G under acidic and neutral pH conditions

今村比呂志¹, 八桁清樹¹, 渋谷理紗², 本田真也^{1,2,*}

¹産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門, 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1

²東京大学大学院新領域創成科学研究科, 〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5

Hiroshi Imamura¹, Seiki Yageta², Risa Shibuya², and Shinya Honda^{1,2,*}

¹ Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

² Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

1 はじめに

モノクローナル抗体は製薬産業において顕著な成長を見せている医薬品であり、リウマチやがんなど深刻な病気に対しても広く使用されている。抗体の製造、輸送、保管過程の化学的劣化が従来問題視されてきたが、ここ十数年の間に抗体の物理的劣化も特に注目されるようになってきた。物理的劣化とはアンフォールディングや凝集であり、そのような劣化した分子は活性を有さないだけでなく、最悪の場合、免疫原性を引き起こす可能性もある。医薬品製造の下流プロセスでは、抗体のクロマトグラフィー精製の際に酸溶液を溶出液として用いる。酸溶液はウイルスの不活化の役割もあり、安全性確保のため必須の工程である。酸溶液は抗体の天然構造は不安定化する。その後の中和操作によって抗体はリフォールディングするが、同時にミスフォールディングや凝集も起こる。そのため、これらの劣化した分子種を検出し取り除く必要がある。物理的劣化のメカニズムを解明し、劣化を抑える方法の開発が現在の課題である。この問題意識のもと、我々は最近、酸で劣化した抗体に特異的に相互作用する人工タンパク質を見いだした [1]。しかし、その相互作用メカニズムの解明は、酸による抗体の構造変化の知見が不足しているため十分ではない。以前より我々は抗体の局所構造[2]や構成ドメイン[3]の pH 依存性について明らかにしてきた。本研究では、小角 X 線散乱 (SAXS) を用いて抗体のグローバルな溶液構造の pH 依存性の解明に取り組んだ。

2 実験

SAXS 測定は BL10C のビームラインで行った。X 線の波長は 0.1488 nm、カメラ長は 1047 mm とし、ベヘン酸銀の散乱パターンを用いて校正した。X 線散乱は、PILATUS3 2M (DECTRIS Ltd., Switzerland) で検出した。ヒト化モノクローナル抗体 (免疫グロブリン G) の凍結乾燥粉を PBS-T に溶解させ、約 12 mg/mL とし、0.01 M のリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) を用いて 4 °C で透析した。その母液を二

倍に希釈後、0.1 M グリシン塩酸塩 (pH 2.0) を用いて 4 °C で 7 時間透析し、さらに測定まで 14 時間 4 °C で保管した。透析サンプルは緩衝液で希釈し、測定に供した。測定の温度は、25.0 ± 0.1°C に設定した。1 枚の画像データにつき 2 秒の X 線露光を行い、各条件毎に 30 枚のデータを取得した。画像の一次元化は *Nika* [4]を用いて行い、X 線損傷の影響のあるデータは除外した。

3 結果および考察

散乱プロファイルの Kratky プロットによると、中性下で見られる球状の構造は、酸性下でも保持されていることがわかった。一方で、中性下では特徴的なピークが存在するが、酸性下ではそれらが見られなかった。これらのピークは天然状態のマルチドメイン構造に由来するものであり、酸による構造変化を明らかにするため、今後さらなる解析を進める。

謝辞

本研究の一部は、経済産業省の「平成 25 年度個別化医療に向けた次世代医薬品創出基盤技術開発 (国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」及び「平成 26 年度次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (国際基準に適合した次世代抗体医薬等製造技術)」、及び国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) の「次世代医療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業」の支援によって行われた。

参考文献

- [1] H. Watanabe, K. Yamasaki, S. Honda, *J. Biol. Chem.* **6**, 289 (2014).
- [2] Y. W. Feng, A. Ooishi, S. Honda, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **57**, 143 (2012).
- [3] S. Yageta, T. M. Lauer, B. L. Trout, S. Honda, *Mol. Pharmaceutics* **12**, 1443 (2015).
- [4] J. J. Ilavsky, *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 324 (2012).

* s.honda@aist.go.jp