

抗体医薬に対する抗イディオタイプ DNA アプタマーの X 線結晶構造解析 Structural analysis of anti-idiotypic DNA aptamer against therapeutic monoclonal antibody

菱木麻美*, 橋本博

静岡県立大学薬学部

〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1

Asami HISHIKI* and Hiroshi HASHIMOTO

School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka

52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka, 422-8526, Japan

1 はじめに

アプタマーとは、複雑な三次元構造を取ることで標的分子に結合する 1 本鎖の DNA または RNA 分子である。タンパク質、ペプチド、低分子化合物、金属イオンなどを標的分子とし、高い結合性と特異性から、医薬品、各種分析センサー、分離剤などに利用される。抗体医薬の血中薬物濃度分析法（バイオアナリシス法）では、抗薬物抗体を用いる方法や化学発光免疫測定などが汎用されてきたが、抗体を用いる分析は補足抗体の保存状態やロット間差の違いに基づく分析結果の相違や精度低下が危惧される。そのため、安価、均質、化学・物理的安定性に優れた DNA アプタマーのバイオアナリシスへの適用は、優れた抗薬物アプタマーの開発を推進するものと期待される。

アバスタチン（一般名 bevacizumab）は、血管内皮増殖因子（VEGF）を選択的に阻害して抗がん作用を示す抗体医薬である。先行研究により開発された抗 bevacizumab DNA アプタマーは解離定数 130 nM であり、他の抗体医薬やヒト内在性 IgG を認識しないことは分かっていたが、その詳細な結合様式は解明されていなかった。そこで、bevacizumab と抗 bevacizumab DNA アプタマーの結合様式を明らかにするため、複合体での X 線結晶構造解析を行なった。

2 実験

アバスタチン製剤から回収した bevacizumab をパパイン消化し、Protein A カラムを用いて Fab 断片を高純度に精製した。精製した Fab 断片と抗 bevacizumab DNA アプタマーを混合して結晶化スクリーニングを行なった。得られた条件を基に結晶化条件を最適化し、0.2 M LiSO₄, 0.1 M Imidazole-HCl pH 6.2, 20% (w/v) PEG 1,500, 15% (v/v) MPD をリザーバー溶液に用いて、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて共結晶を得た。PF BL-17A にて X 線回折強度データを収集し、抗 VEGF 抗体の Fab 断片 (PDB ID: 1BJ1) をサーチモデルとしてプログラム MOLREP を用いた分子置換法で構造解析し、プログラム Coot, プログラム REFMAC で構造精密化した。

3 結果および考察

bevacizumab の Fab 断片と抗 bevacizumab DNA アプタマーの複合体構造を 1.7 Å 分解能で決定した。構造解析の結果、DNA アプタマーは bevacizumab の重鎖と 1:1 で結合していた。bevacizumab は重鎖に 3 箇所の相補性決定領域 (CDR) を有するが、1 箇所でリガンドと点結合する既存の多くのアプタマーと異なり、本 DNA アプタマーは、3 箇所の全ての CDR と相互作用していた。この多点相互作用が、DNA アプタマーのイディオタイプ性と高い特異性に寄与していると考えられる。

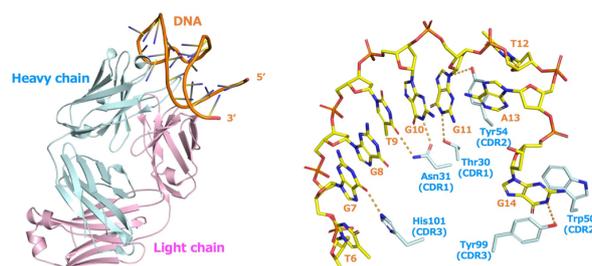


図 1: (左) Fab 断片と DNA アプタマー複合体の全体構造, (右) DNA アプタマーによる CDR1~CDR3 の特異的認識

謝辞

X 線回折強度データの収集にあたり、PF のビームラインスタッフの皆様にご多大のお世話になりました。心より厚く御礼申し上げます。試料調製および結晶化を行なった、轟木堅一郎教授、トン・ジャシインさん（静岡県立大学薬学部）と研究室の皆様にお礼を申し上げます。

参考文献

[1] T Saito et al., *Biosens Bioelectron.* **203** (2022)

* ahishiki@u-shizuoka-ken.ac.jp