

IgG1 抗体の酸変性構造の SEC-SAXS 解析

SEC-SAXS analysis of acid-denatured IgG1 antibodies

今村比呂志^{1,*}, 本田真也²

¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部, 〒526-0829 滋賀県長浜市田村町 1266

²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

Hiroshi IMAMURA^{1,*} and Shinya HONDA²

¹Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, Department of Biological Data Science,
1266 Tamura, Nagahama 526-0829, Japan

²National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki
305-8566, Japan

1 はじめに

抗体はバイオ医薬品の中で最もポピュラーな分子である。物理化学的ストレスによる抗体構造の変化は薬効低下を招くだけでなく、副作用も懸念される。本研究では抗体を製造する際にかかるストレスとして酸 pH の効果に着目し、その抗体構造への影響を調べた。小角 X 線散乱 (SAXS; small angle X-ray scattering) は溶液中の構造を調べるのに適している。抗体は酸ストレスによって凝集するため、単量体の変性構造を通常の SAXS で捉えることは困難である。そこで、ゲルろ過クロマトグラフィー (SEC; size-exclusion chromatography) と SAXS を組み合わせた SEC-SAXS 法で変性単量体分子を分離して解析した [1]。

2 実験

リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に溶解しているヒト化モノクローナル抗体 (免疫グロブリン G1, IgG1) を、0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.0) を用いて 4 °C で透析した [1]。SEC-SAXS 測定は BL10C のビームラインで行った [2]。X 線の波長は 0.12 nm、カメラ長は 2 m とし、ベヘン酸銀の散乱パターンを用いて校正した。HPLC システム (Nexera-i, Shimadzu Co.) に 11 mg/mL の IgG1 溶液を 100 μL 注入し、ゲルろ過カラム (Superdex200 (10/300) GL, GE Healthcare UK Ltd., Amersham, England) で分離した。溶出液は 0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (0.2 M NaCl, pH 2.0)、流速は 0.2 mL/min とした。X 線散乱は、PILATUS3 2M (DECTRIS Ltd., Switzerland) で検出した (露光 20 秒)。BL10C の SAXS-UV 同時測定システム [3] を利用し、UV のクロマトグラムを得た。サンプルセルホルダは 25.0 °C に保った。

3 結果および考察

SEC の酸変性 IgG1 の単量体由来のピークにおける SAXS プロファイルから、 R_g が $40.5 \pm 0.4 \text{ \AA}$ であり、天然構造よりも 25% 減少していることがわかった。無次元 Kratky 解析を行ったところ、ピーク位置 (qR_g 、

$(qR_g)^2 I(q)/I(0) = (1.73, 1.10)$ から、酸変性した IgG1 が密にフォールドした球状構造であることがわかった。 $q = 0.16 \text{ \AA}^{-1}$ の Kratky ピーク強度が天然構造に比べ減弱しており、Fc-Fab 間、Fc/Fab 内部のドメイン間の相関の消失が明らかとなった [4]。

4 まとめ

本研究の IgG1 抗体が示した酸変性によるコンパクト化は、蛋白質が変性すれば鎖が広がる (サイズが増加する) との常識に反するものであった。可変領域の配列が異なる IgG1 でも同様のコンパクト化が確認され [1]、IgG1 抗体の特性として着目すべき非標準の構造であると思われる。

謝辞

SEC-SAXS 実験のサポートをいただきました小角 X 線散乱ビームラインの皆様には感謝いたします。本研究は JSPS 科研費 課題番号 JP21K06503 (H.I.), JP22K06575 (S.H.) の支援を受けて行われました。

参考文献

- [1] H. Imamura, A. Ooishi, S. Honda, *J. Phys. Chem. Lett.* **14**, 3898 (2023).
- [2] N. Shimizu *et al.*, AIP Conf. Proc. **2054**, 060041 (2019).
- [3] P. Bernadó *et al.*, Biochim. Biophys. Acta **1862**, 253 (2018).
- [4] H. Imamura, S. Honda, *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 12042 (2023).

成果

1. 「タンパク質が変性して小さくなることを発見」
長浜バイオ大・産総研共同プレスリリース
https://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2023/pr20230424/pr20230424.html

*

h_imamura@nagahama-i-bio.ac.jp