

D-6	アルギニンまたはリジンで構成される 溶解性向上ペプチドタグの蛋白質熱凝集抑制能評価					
	氏名	福谷 星	主査	黒田	副査	中澤・中村 史・篠原・一川

[背景] 近年急速な発展を遂げている蛋白質治療薬の開発において、凝集は重要な課題となっている。製造から投与までに形成されうる蛋白質凝集体によって、蛋白質製剤の安全性や有効性が損なわれる可能性があるためである。多くの場合、非天然状態蛋白質の凝集は不可逆的であるため、蛋白質が変性する条件下において、その凝集を抑制する手法の開発が強く求められている。そこで本研究では、溶解性向上ペプチドタグ(SEP タグ)に着目し、変性条件下におけるその蛋白質凝集抑制能を評価した。蛋白質変性条件の一つとして熱変性を想定し、モデル蛋白質には抗がん剤・抗がん標識分子としての応用が期待される抗 EGFR シングルドメイン抗体(VHH)7D12 を用いた。

[手法] VHH-7D12 の C 末端に、5 または 9 残基のアルギニンまたはリジンから成る SEP タグを付加した 4 種類の変異体 (7D12-C5R、7D12-C9R、7D12-C5K および 7D12-C9K) を作製した。各タグの付加によって 7D12 の発現量・物性・活性にどのような影響があるかを確認した後、熱凝集抑制能を評価した。pH および組成の異なる 4 種類の緩衝液中に野生型および 4 種類の変異体を溶解後、熱ストレスを加えた。上清に残った蛋白質の割合を求めることで、不溶性凝集体形成抑制能を評価した。また、上清画分中に残存した蛋白質の粒子半径を測定することで、可溶性凝集体形成抑制能を評価した。最後に、上清画分に残った蛋白質の物性および活性を確認した。

[結果] SEP タグの付加により、発現量が増大した(Fig.1)。特に 7D12-C5R、C9R、C5K の発現量が顕著に増大し、その発現量は野生型の約 2 倍であった。また、円偏光二色性(CD)スペクトル測定、動的光散乱(DLS)測定、トリプトファン蛍光測定、表面プラズモン共鳴(SPR)測定により、SEP タグの付加は 7D12 本来の物性・活性に影響を及ぼさないことが示された。

タグを付加していない野生型の 7D12 は、75 °C で 45 分間加熱後、4 種類すべての緩衝液中で不溶性の凝集体を生じた(Fig.2)。アルギニンタグつき変異体(7D12-C5R および 7D12-C9R)は、Phosphate Buffer (PB) や PBS 中で沈殿を形成し、上清の蛋白質濃度を最大 45 % 低下させた。一方、リジンタグは PB や PBS を含む全ての緩衝液中において凝集を抑制し、熱ストレスを加えた後も 96~100 % の 7D12-C5K および 7D12-C9K が上清画分に残存した。また、リジンタグは可溶性凝集体形成抑制にも効果を発揮した。さらに、上清画分に残存した各変異体の構造および活性を確認したところ、加熱後も本来の構造・活性を維持していることが確認できた。

[結論] 蛋白質本来の構造や機能に影響を与えることなく、熱凝集抑制能を示す SEP タグは、蛋白質治療薬の凝集を防ぐ有用なツールとなりうる。特に、リジン 5 残基から成るリジンタグは発現量増大および熱凝集抑制の双方において優れた効果を示し、蛋白質治療薬への応用が期待される。

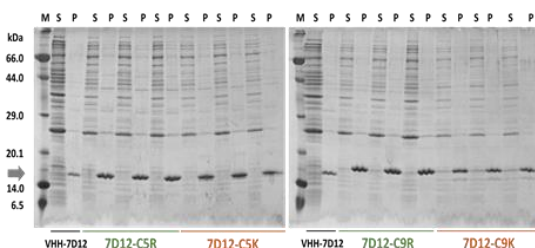


Fig.1 SEP タグによる発現量増大効果

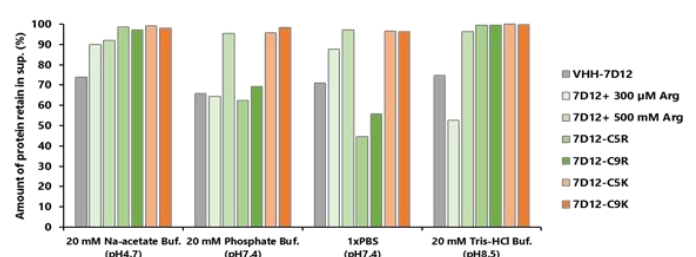


Fig.2 SEP タグによる不溶性凝集体抑制