

アスパラギン酸からなる負電荷ペプチドタグ付き抗 EGFR-VHH 抗体の作製と物性・相互作用評価		
黒田研究室	学籍番号：19261037	氏名：嶋武 優香子

[背景・目的]

VHH はラクダ由来の重鎖一本鎖抗体の可変領域のみを取り出したシングルドメイン抗体である。全長モノクローナル抗体(mAb)の分子量が約 150kDa であるのに対して VHH は 15kDa ほどと分子量が小さいことが大きな特徴である。分子量の小さな抗体は大腸菌を用いて発現することが可能で生産コストがかからないこと、また小さい故に細胞への浸潤性が高いことなどがメリットとして挙げられ、創薬やワクチン開発の分野での応用が期待されている。

当研究室ではがん細胞に大量発現する EGFR に結合する VHH (抗 EGFR-VHH 抗体、以下 7D12) を研究対象としており、結合力の増強を試みている。本研究では、がん細胞表面が負電荷を帯びていることに着目し、静電的相互作用によって EGFR との結合を増強させた 7D12 変異体を設計している。先行研究で 7D12 の C 末端にアルギニンやリジンの正電荷ペプチドタグを付加した変異体を作製し、それが野生型より EGFR に強く結合し、細胞増殖抑制作用が観測された。本研究ではそのコントロールとして、同抗体にアスパラギン酸からなる負電荷タグを付加した変異体を新たに作製した(図 1)。またタグの電荷数と長さを比較するための変異体も同時に作製した。一連の実験によって、電荷を付したタグの付加が静電的相互作用による親和性制御に関与しているのを裏付けるのを目的とする。

[手法]

VHH-7D12 の C 末端にアスパラギン酸からなる負電荷ペプチドタグを付加した変異体(7D12-C5D4R 及び 7D12-C9D)、リンカー付きリシンからなる変異体(7D12-GSlinker+C5K)を作製し、タンパク質精製を行った。円偏光二色性(CD)測定、熱安定性(T_m)測定、トリプトファン蛍光測定、動的光散乱(DLS)測定を行い、野生型と各変異体の物性評価を行った。さらに表面プラズモン共鳴(SPR)測定によって EGFR 細胞外ドメインとの相互作用解析を行った。

[結果・考察]

各種物性測定によって二次構造(図 2)、三次構造、粒子半径、熱安定性の解析を行い、いずれも野生型と比較して大きな変化が見られなかった。よってタグの付加はタンパク質の物性に影響を及ぼさないことが示された。SPR 測定の結果(図 3)、7D12-C9D は野生型と比較して結合能がわずかに減少したがその効果は限定的だった。これはタグの静電的反発が一因と考えられる。7D12-GSlinker+C5K は 7D12-C5K と同程度の解離定数で、7D12-C9K とは違いがみられた。相互作用にはタグの電荷数が重要であることが示された。また 9 残基の正電荷タグは十分な長さをもってリガンド表面に到達していることが示唆された。

[結論]

本研究によって電荷を付したタグの付加が静電的相互作用による親和性制御に関わっていることが示唆された。今後 MTT アッセイによる細胞実験を行うことにより、負電荷ペプチドタグとがん細胞表面間の静電的相互作用が結合能に及ぼす影響について更なる検討を行いたい。

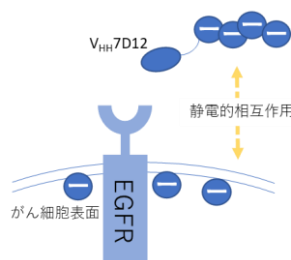


図 1. 研究のイメージ

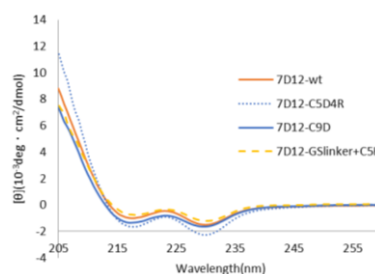


図 2. CD 測定の結果

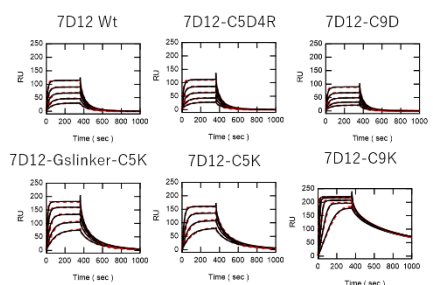


図 3. SPR 測定の結果