

変性して小さくなる蛋白質の発見: SEC-SAXS 法による抗体の変性構造の解析

今村比呂志¹, 大石郁子², 本田真也²

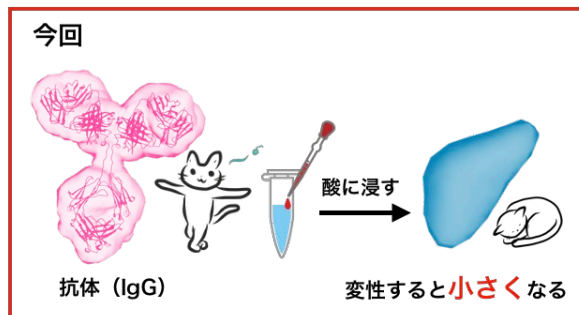
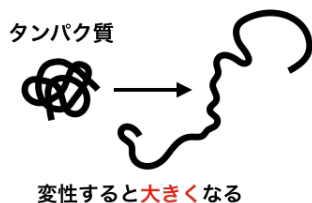
¹長浜バイオ大学バイオサイエンス学部, ²産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門

近年普及が進んでいる抗体医薬品の薬効はその立体構造に依存する。変性や凝集は薬効の低下につながり、副作用の可能性も懸念されている。製造工程では酸処理による変性・凝集物の発生は避けられず、これらを取り除くことが必須である。また、製造工程で充分除去できたとしても、出荷後の輸送、保管、調剤の過程で、再度凝集体が発生する可能性がある。根本的な解決のために抗体凝集のメカニズムの解明が望まれる。発表者らはサンプルとして IgG1 抗体を用い、酸変性および中和後の凝集成長の *in situ* 観測を試みてきた。そして、ブラウン凝集モデルで中和後の凝集挙動を説明することができた[1]。本研究では凝集化プロセスの最初期過程である酸性溶液 (pH 2) に曝露した際の構造変化に着目した。

酸性溶液中では凝集体がゆっくりと形成するため、これを取り除き、単量体のみを構造を観測するため、ゲルろ過クロマトグラフィー (SEC) -小角 X 線散乱 (SAXS) 法を用いた[2]。酸変性した IgG1 の SEC 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 が天然構造よりも 25%減少していることを見つけた。また無次元 Kratky プロットのピーク位置は $(qR_g, (qR_g)^2 I(q)/I(0)) = (1.73, 1.10)$ を示しており、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。また $q = 0.16 \text{ \AA}^{-1}$ の Kratky ピークの減弱は、Fc-Fab 間、Fc/Fab 内部のドメイン間の相関の消失を示していた[3]。天然状態と違ってリガンドとの結合を示さず機能を失っていることから、変性[4]している。また、CD、赤外分光スペクトルは天然構造と異なっていた。二次構造解析から、 β シート含量は多くが残されているものの、ねじれ方などに変化があることがわかった。

これまでの文献データから、変性すると必ず蛋白質のサイズは大きくなることが示されており[5,6]、その描像は教科書の図にも描かれるように広く受け入れられている。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 (サイズは増加する) との常識に反するものであるといえる。そのメカニズムや意義についても議論を行う。

これまでの教科書的イメージ



[1] 今村比呂志, 本田真也, 生物物理 59, 147-150, 2019.

[2] H. Imamura, A. Ooishi, S. Honda, *J. Phys. Chem. Lett.* 14, 3898, 2023.

[3] H. Imamura, S. Honda, *Int. J. Mol. Sci.* 24, 12042, 2023.

[4] 'denaturation' in *IUPAC Compendium of Chemical Terminology*, 3rd ed., 2006.

[5] A. N. Uversky, A. L. Fink, *FEBS Letters* 515, 79 (2002)

[6] P. Shih et al., *J. Phys. Chem. B* 119, 5437 (2015)