

Study on improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions

福永, 淳

<https://doi.org/10.15017/1441057>

出版情報：九州大学, 2013, 博士（システム生命科学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

氏 名：福永 淳

論文題目：Study on improving the affinity of an antibody for its antigen via long-range electrostatic interactions (長距離静電的相互作用を利用した抗体分子の高親和性化に関する研究)

区 分：甲

論 文 内 容 の 要 旨

抗原に対して高い特異性と親和性を有する抗体は、標的分子の発現・動態解析あるいはその相互作用分子の同定などに幅広く用いられている。抗体は CDR (complementarity -determining region) といわれる領域を利用して抗原を認識し、その際、抗原と抗体の間には形状相補性が成り立っており、CDR の配列を変化させることで様々な分子を認識して結合することができる。

これまで、抗原に対する親和力を向上させるために CDR のアミノ酸配列を変化させ、その抗原との形状相補性を改善するという試みがなされてきた。特に、進化分子工学的手法 (ファージディスプレイ、イーストディスプレイなど) を活用し、抗体の親和性を向上させた例が多数報告されている。一方、FR (Framework region) は CDR のように直接的に抗原分子表面と相互作用を行う領域ではなく、抗体分子可変領域の立体構造形成を担う領域である。そのため、親和性を向上させるために、FR に変異を導入されることはなかった。

本研究では、FR に変異導入を行うことで親和力を向上させることに着目し、複数の荷電アミノ酸導入による長距離的静電相互作用の効果を図った。クーロン力は水素結合やファンデルワールス相互作用とは異なりそのエネルギーは遠方まで届き、かつ方向性を持たない。そのため、CDR 近傍に荷電アミノ酸を導入することで分子間の衝突を積極的に向上させることが期待された。

実験では対象とする抗原にヒト心筋由来のトロポニン I を選択した。野生型の scFv (A1scFv 及び A2scFv) は、免疫ライブラリーを用いたファージディスプレイ法により取得した。A2scFv は正に帯電したエピトープに結合する特性を有していた。そこで、A2scFv の変異体として、エピトープとは逆の負電荷を持つ Asp を導入した VL 変異体 (L-S56D, L-T63D, L-S65D, L-S67D) 及び VH 変異体 (H-S68D, H-S74D, H-N76D) を作製した。表面プラズモン共鳴分析法によるカイネティクス解析の結果、VL 変異体において 3 倍、VH 変異体において 2 倍、野生型に対し結合速度定数の向上が見られた。また、A1scFv は A2scFv とは逆に負に帯電したエピトープに結合する特性を有していた。そこで、A1scFv については、Arg 及び Lys を VL に複数導入した R 変異体 (L-D60R, L-S63R, L-S65R, L-S67R, L-S70R) 及び K 変異体 (L-D60K, L-S63K, L-S65K, L-S67K, L-S70K) を作製した。表面プラズモン共鳴分析法によるカイネティクス解析の結果、野生型に対し、R 変異体では 170 倍、K 変異体では 220 倍の結合速度定数の向上が見られた。

トロポニン I の異なるエピトープに特異的に結合する 2 種 scFv について、FR に荷電アミノ酸を複数導入することで、結合速度定数/親和性を向上させることができた。しかしながら、いずれの変異体においても野生型に対し T_m 値が低下し、熱力学的安定性が低下した。これまで FR のみに変異導入を加えることで抗原抗体反応を改良させた例はなく、本手法は抗体分子を高親和性化する新たな手段である。