

261

抗RNaseA single chain Fv(sFv)を用いた抗原-抗体反応の解析

(阪大・工・応生) 小林英二、熊本孝博、大政健史、片倉啓雄、
藤山和仁、塩谷捨明、○菅 健一

抗原-抗体反応はその特異性および親和性が非常に高いことから物質の分析、同定並びに分離精製等に広く利用されている。しかし、抗原を動物に免疫することにより得られる抗体は必ずしも目的に適した特性を持つとは限らない。従って、この様な問題を解決するためには、抗原-抗体反応について基礎的な知見を得る必要がある。これまでに抗原-抗体反応は、抗体の可変領域VH,VLに存在する6つの超可変領域と抗原との相互作用に起因することが知られている。しかし、この相互作用の決定因子については幾つかの抗原-抗体反応をモデルとし、結合部位のX線解析やアミノ酸置換等を用いて解析が行われてきているものの、その一般性を見出す迄には至っていない。本研究では、抗RNaseA抗体のVH,VLドメインをリンカーペプチドで連結したsingle chain Fv (sFv)を構築し、これを用いて本抗原-抗体反応の特性、特に親和定数に及ぼすアミノ酸残基の影響を検討した。

抗RNaseA 3A21モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから調製したtotal RNAよりPCR法を用いて本抗体のV領域をコードするcDNAをクローニングした。次に、これらcDNAのシーケンス結果と3A21抗体のH,L鎖のN末端部分のプロテインシーケンスの結果から、VH,VL領域のアミノ酸配列を決定した。この配列をChotiaら¹⁾のデータと比較した結果、本抗体の超可変領域には荷電性のアミノ酸残基としてpKa値を4.0~5.0にもつAsp,Glu残基が比較的多く存在することが分かった。また、3A21抗体の親和定数がpH5.0~4.0の間で大きく低下すること、さらに抗原であるRNaseAのLys残基をアセチル化すると、3A21抗体との反応性が低下すること、及び、RNaseAの等電点が9.5~9.6と高いことから、本抗原-抗体反応において抗体側の負に荷電するAsp,Glu残基と抗原側の正に帯電するLys残基等が結合に関与しているものと推定した。

そこで、抗原-抗体反応をアミノ酸残基レベルにおいて解析するため、3A21抗体のVHドメインのC末端と、VLドメインのN末端側をリンカーペプチド (-Gly)₄-Ser-₃により一本鎖に連結したsingle chain Fv (sFv)を構築し、これをpCANTAB5 vectorに導入することによりphage antibodyとして発現させた。このようにして発現させたsFv-3A21 ($K=2.1 \times 10^7$ (1/M), pH7.2)は、3A21抗体 ($K=9.6 \times 10^7$ (1/M), pH7.2)とほぼ同程度のRNaseAに対する親和性を保持していた。

さらに、部位特異的変異法を用いて、これまでに抗体の結合活性への寄与が大きいと報告されているVHドメインについて、結合部位に存在する酸性アミノ酸残基であるAsp₃₁、Asp₁₀₀を疎水性のAlaにアミノ酸置換したphage antibodyを構築し、それにより得られた変異sFvの親和定数が、もとのsFv-3A21と比較してどのように変化するかを解析した。その結果、Asp₃₁→Alaの場合、 $K=5.3 \times 10^6$ ((1/M),pH7.2), Asp₁₀₀→Alaの場合は $K=7.4 \times 10^6$ ((1/M),pH7.2)へと、それぞれnativeなsFv-3A21に比較して1/4および1/3に低下した。この結果、抗体側に存在するAsp(-)残基の荷電性が抗原-抗体反応に関与している可能性が示唆された。

1) Chotia, C. and Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987)

The analysis of antigen- antibody binding using anti-RNase A single chain Fv-3A21
E. Kobayashi, T. Kumamoto, T. Omasa, Y. Katakura, K. Fujiyama, S. Shioya and K. Suga
(Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University)