

抗体をピンポイントで修飾する 新しいキメラ架橋酵素

九州大学 大学院工学研究院 応用化学部門
未来化学創造センター バイテクノロジー部門
教授 神谷 典穂

2023年10月12日

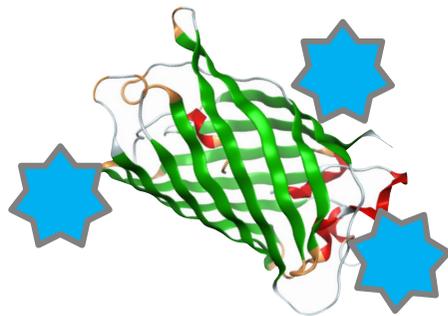
タンパク質のピンポイント修飾技術

従来技術とその問題点



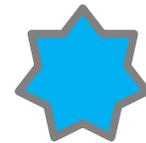
タンパク質：親水性高分子

化学修飾は反応点の制御が困難



ランダムな修飾は、機能低下を招く。

+



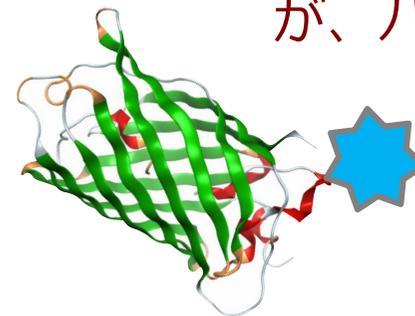
多様な溶媒と物性に対応可能な技術が好ましい。

修飾分子：様々な分子量・物性



VS.

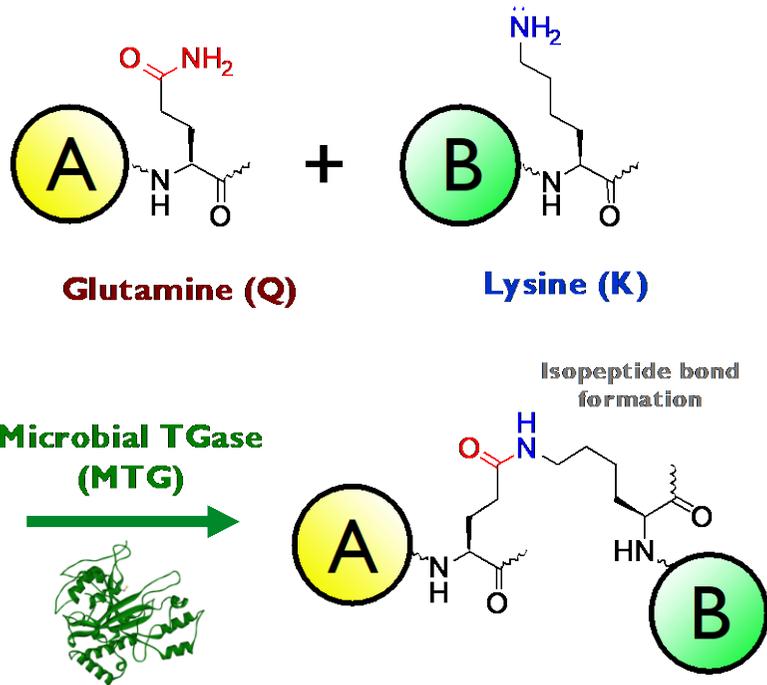
ピンポイント修飾が好ましい。
が、ハードルが高い。



一般的な化学修飾では達成困難。

酵素触媒架橋反応による修飾技術

トランスグルタミナーゼによる架橋様式

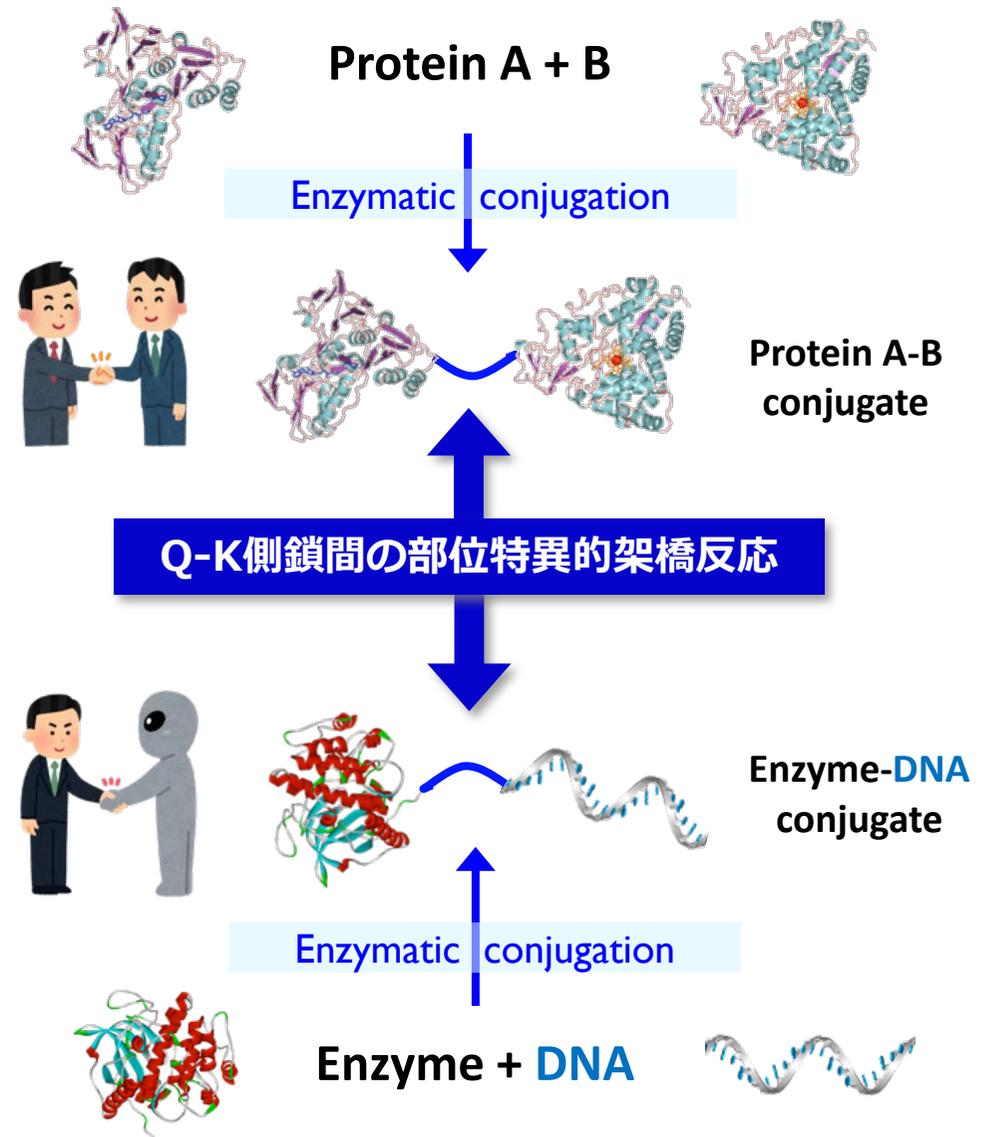


Microbial TGase

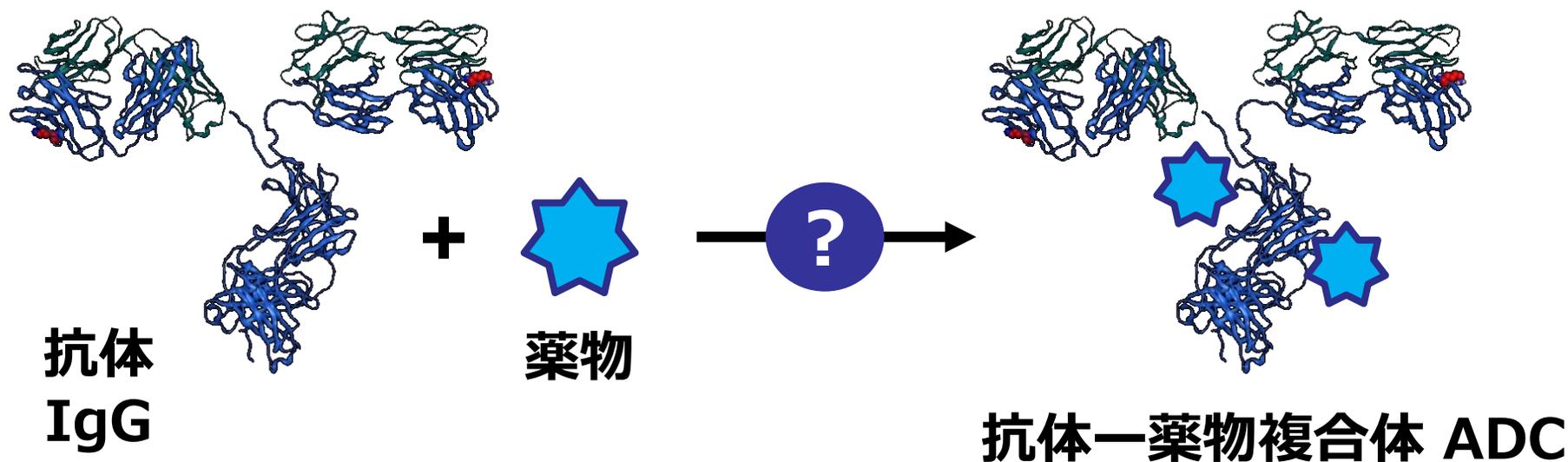
MW: 38 kDa (331aa);
Active site: Cys64;
Working pH: 5~9;
Working temp.: 4-60°C.

A, B = Molecule of interest

分子 A と B の拡張
→ 人工タンパク質設計



抗体をピンポイントで修飾する意義

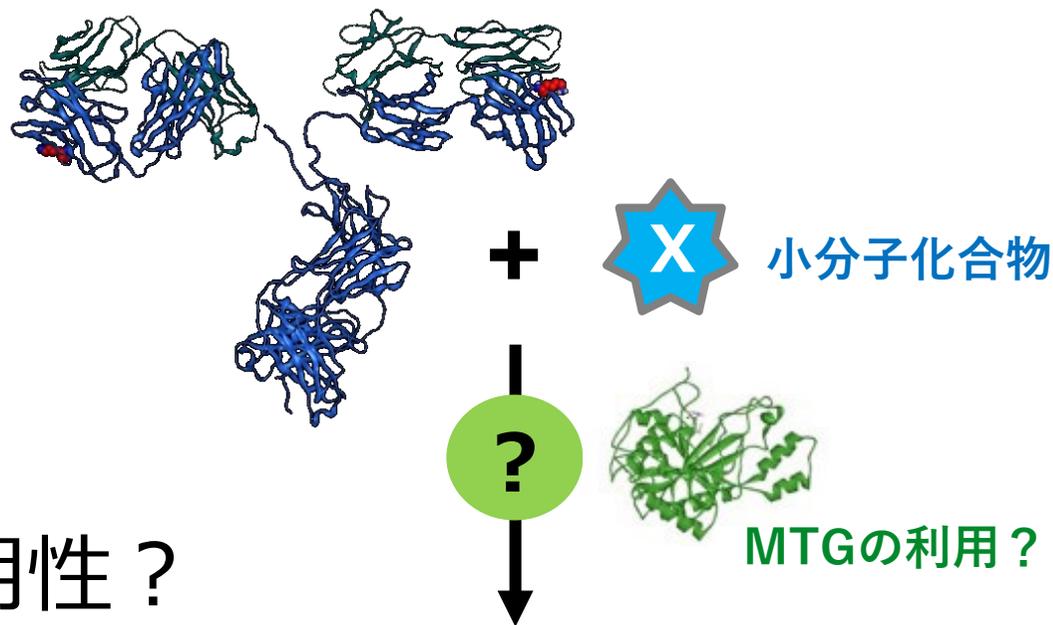


- 高度な分子認識能力と薬理活性を有するタンパク質
- 抗体を認識素子とする診断技術/簡易診断薬の開発
- バイオ医薬品としての抗体の大きなニーズ
- Antibody-Drug Conjugate (ADC) の市場拡大

抗体(1)をピンポイントで修飾(2)する 新しいキメラ架橋酵素(3)

Requirements

- 修飾部位特異性？
- 修飾効率？
- 修飾ラベル数？
- 修飾対象に対する汎用性？



小分子ラベル化抗体
Antibody-X Conjugate

従来技術とその問題点

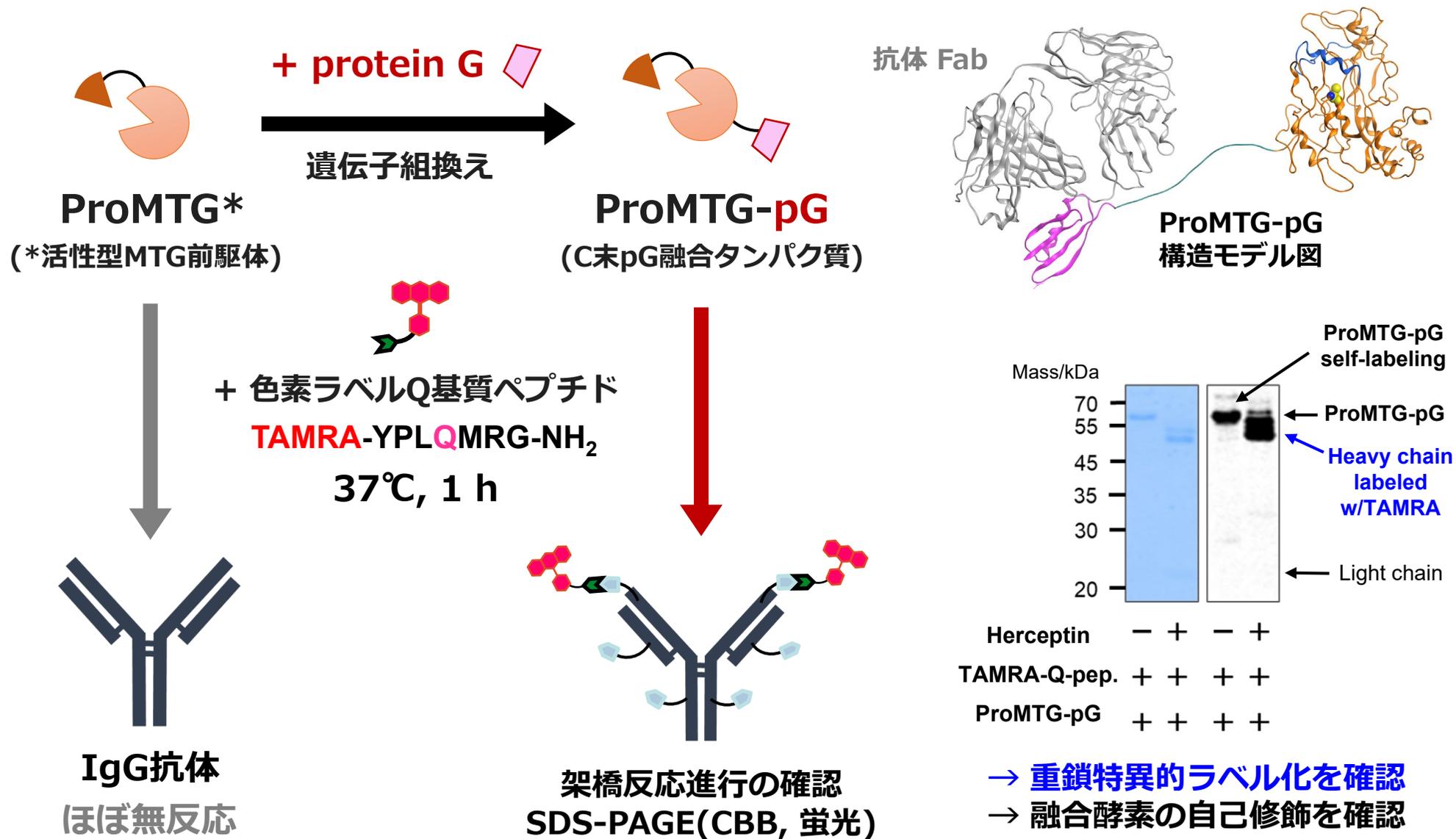
既に実用化されている修飾法は、抗体分子表面の特定の官能基を狙った化学的修飾技術に基づくものが主流であり、

- ・ **修飾における部位特異性と効率の両立**
- ・ **修飾ラベル数の制御と技術の汎用性**

が鍵となることが認識されている。これらの必要条件を満たすために、様々な修飾技術が提案されている状況にある。

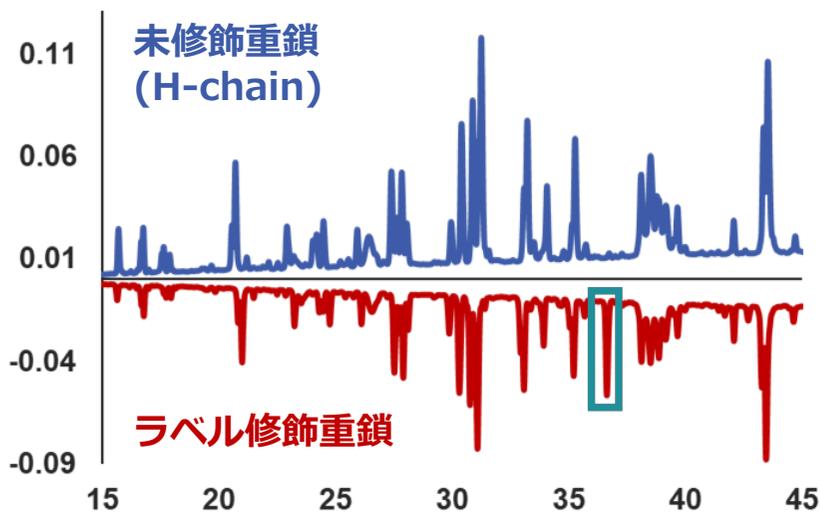
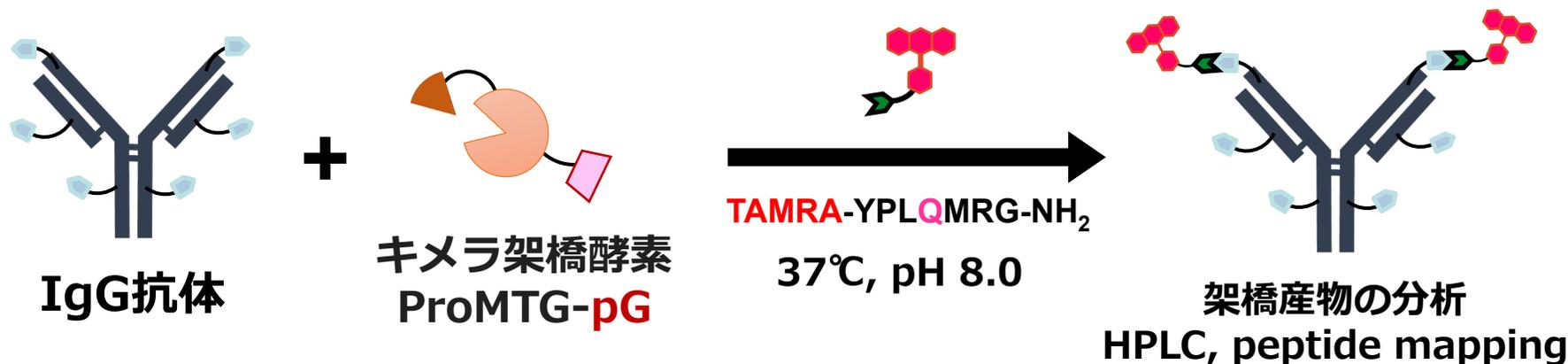
● 部位特異性と修飾効率の両立に向けた試み

抗体結合ドメインの融合による近接効果の導入

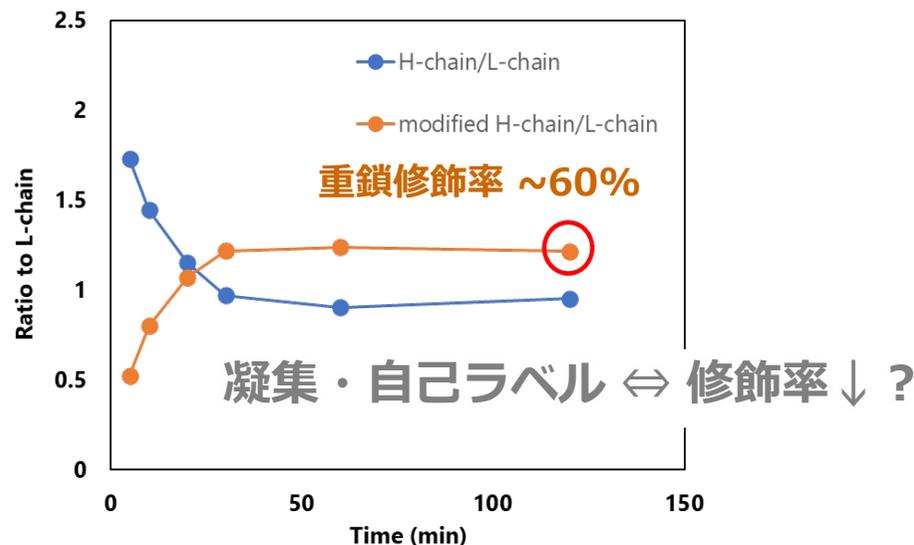


● 部位特異性と修飾効率の両立に向けた試み

キメラ架橋酵素 ProMTG-pG (ver.1) によるIgGのラベル化



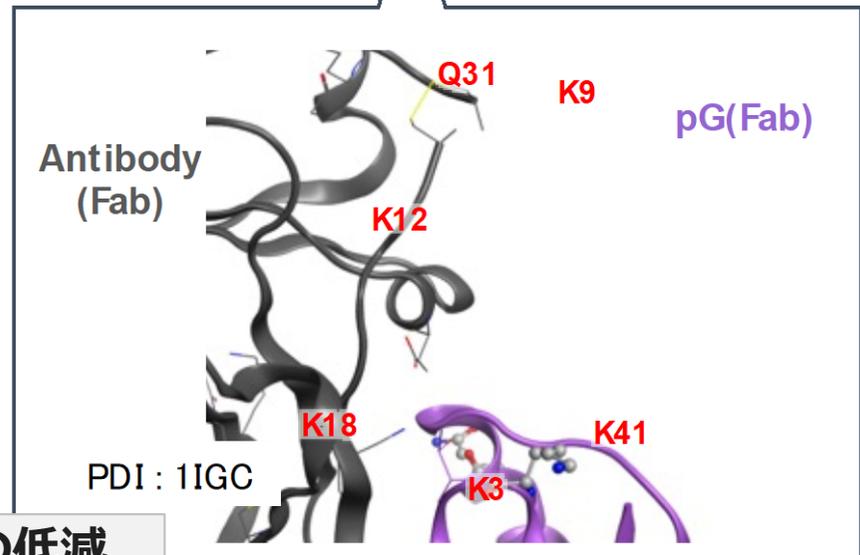
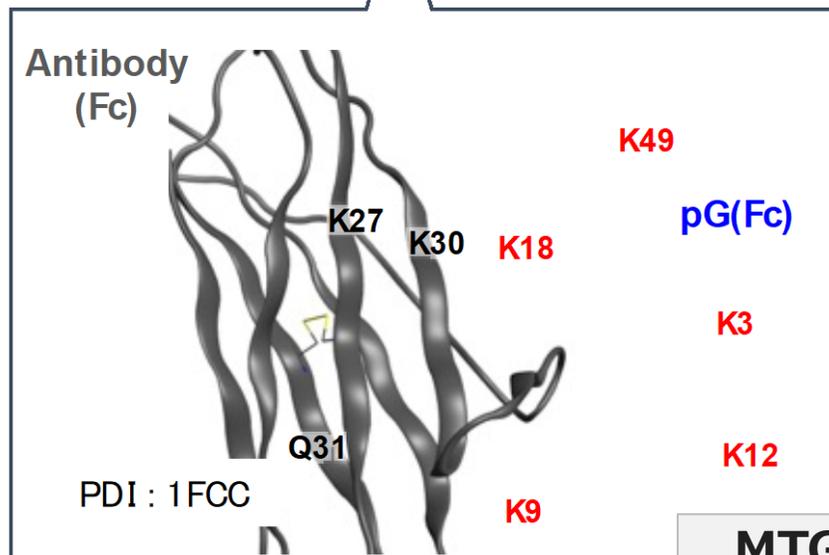
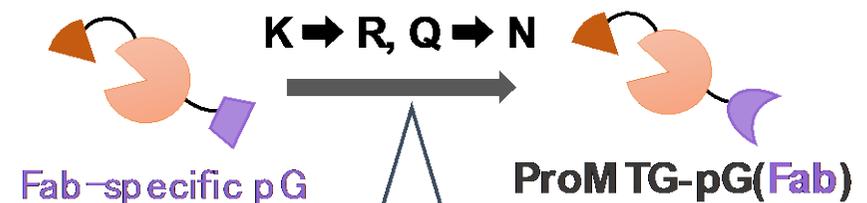
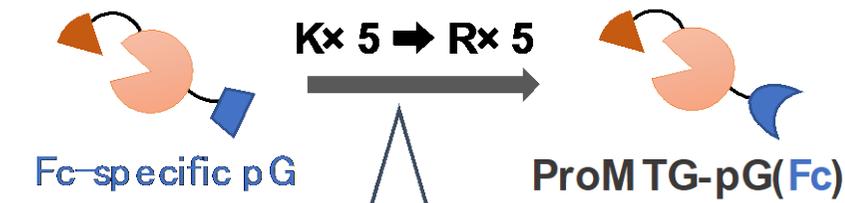
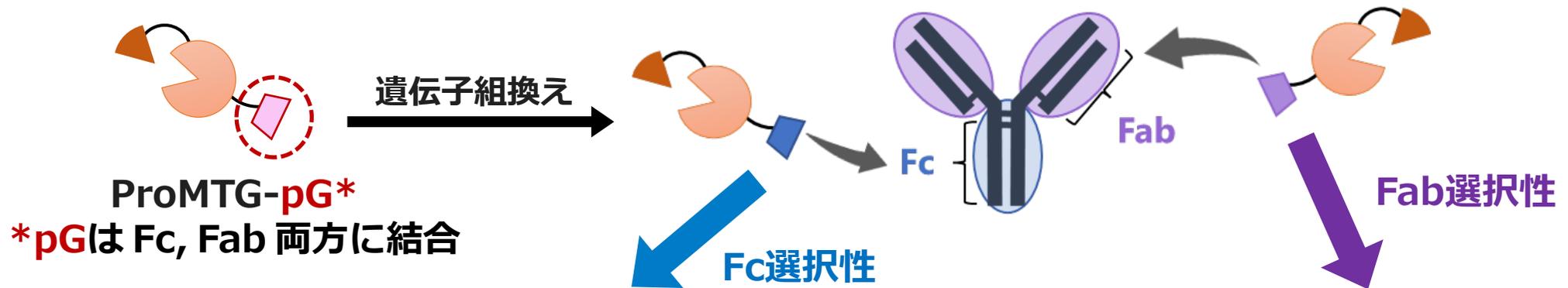
→ 重鎖 K₆₅ 特異的なラベル化を確認



→ 反応1時間で修飾率は約6割

● 部位特異性と修飾効率の改善

pGドメインの改変による性能向上



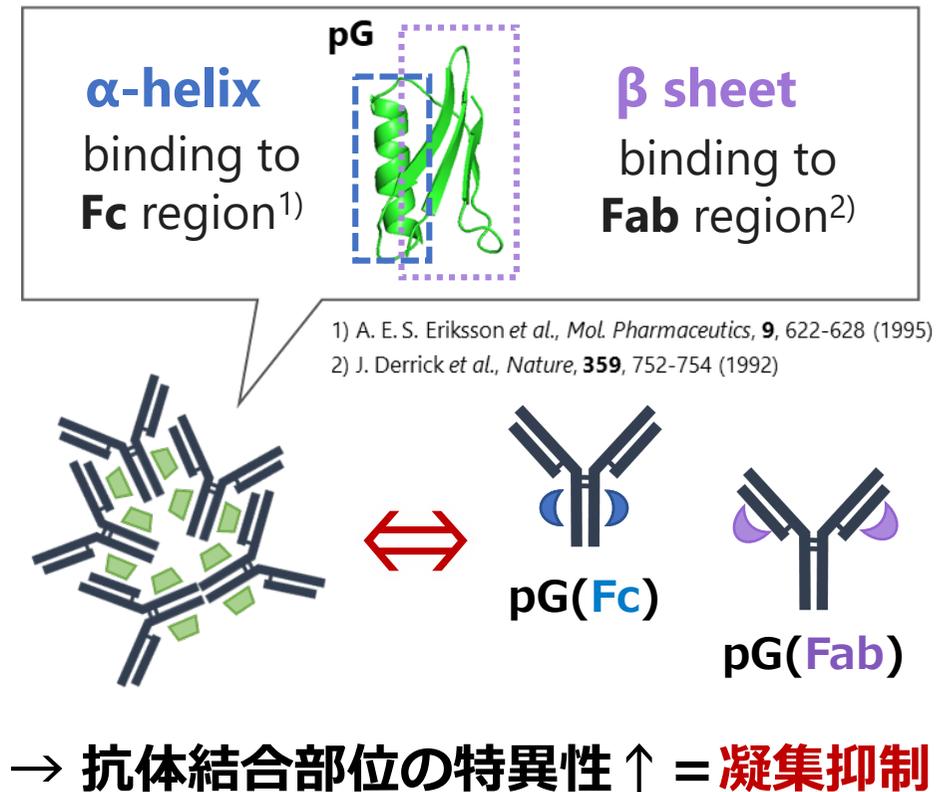
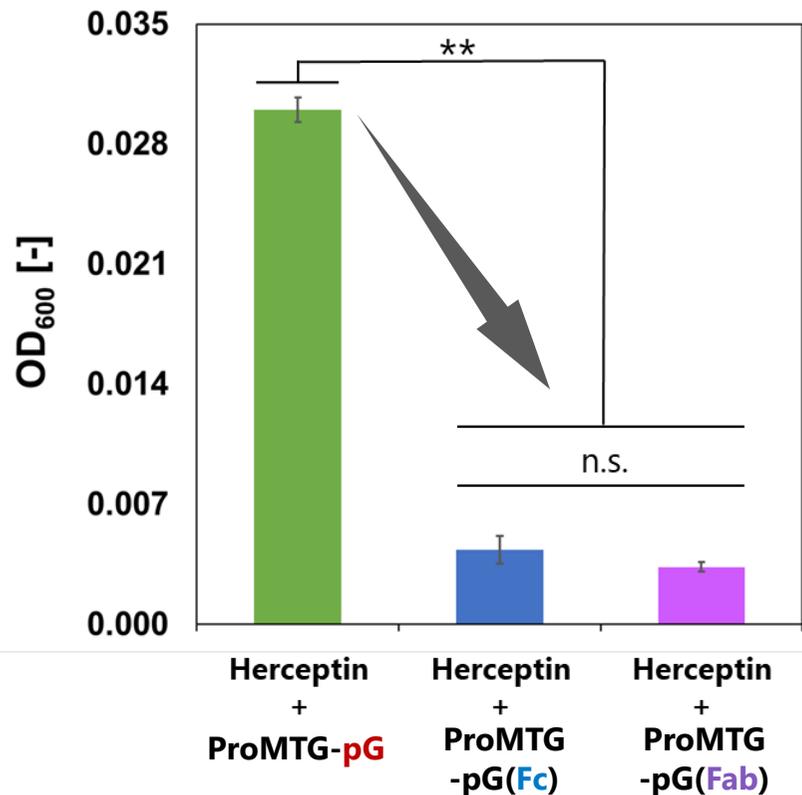
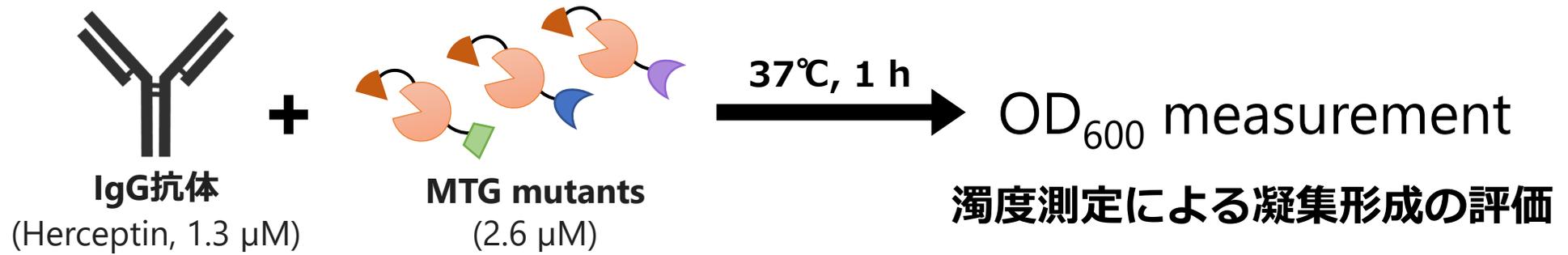
MTG反応性の低減
→ Lys/Glnの置換

→ Fc部位選択性の向上

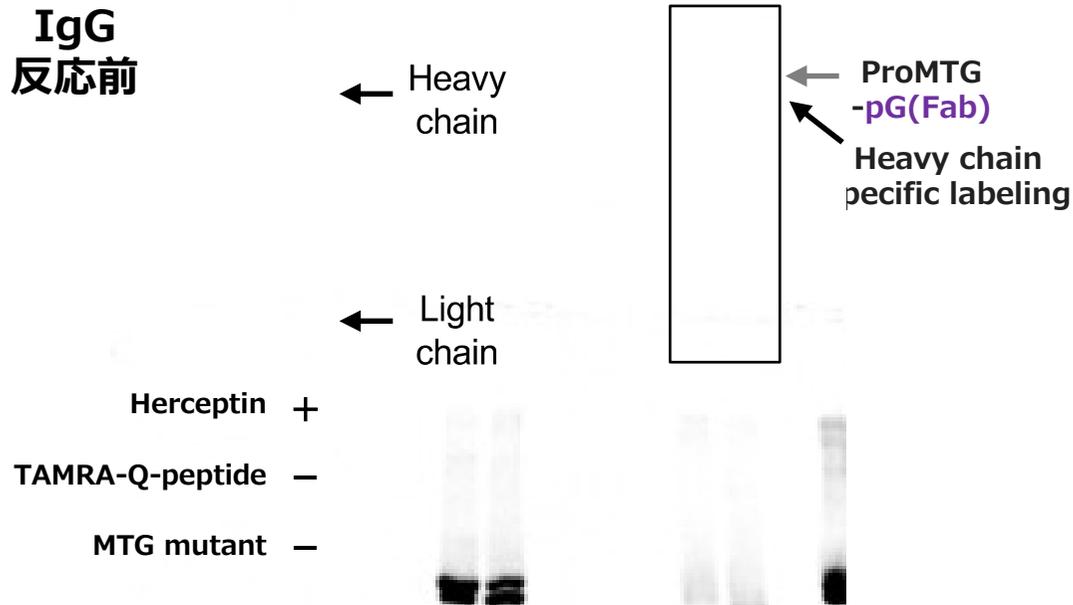
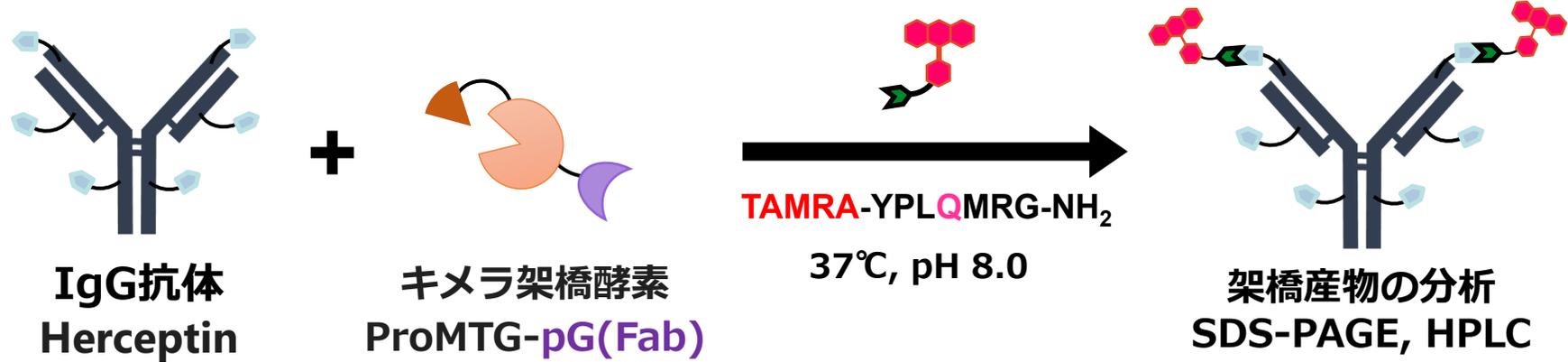
→ Fab部位選択性の向上

● 部位特異性と修飾効率の改善

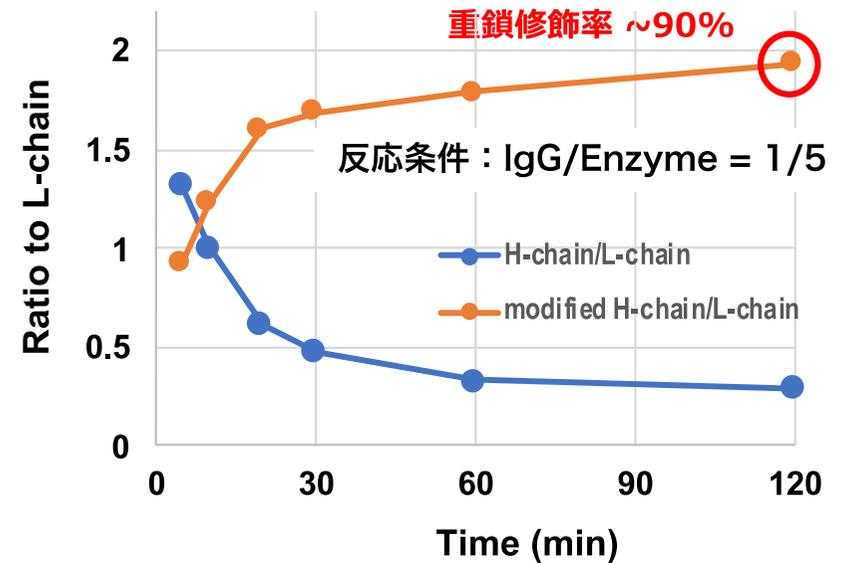
pGドメインの改変による反応時の凝集の抑制



● 部位特異性と修飾効率の両立の達成

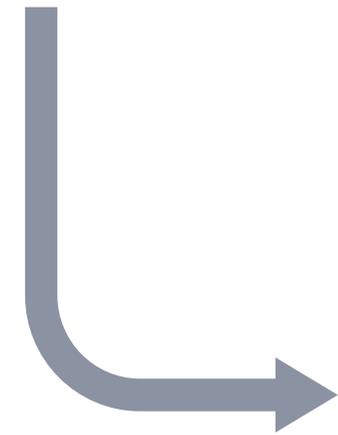
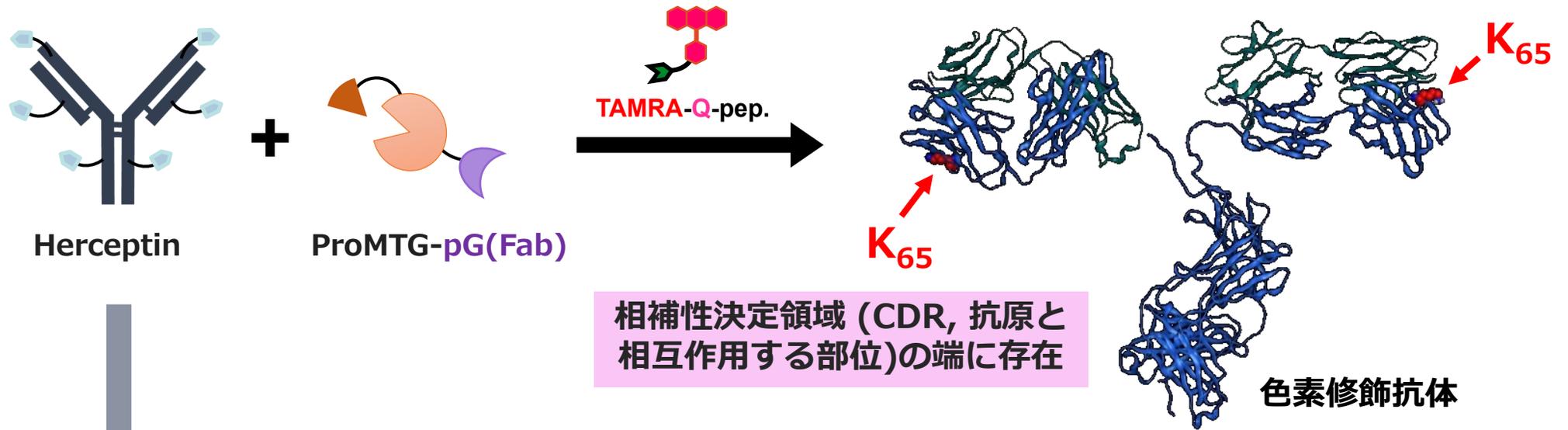


→ K₆₅ 特異的ラベル, 自己ラベルの抑制

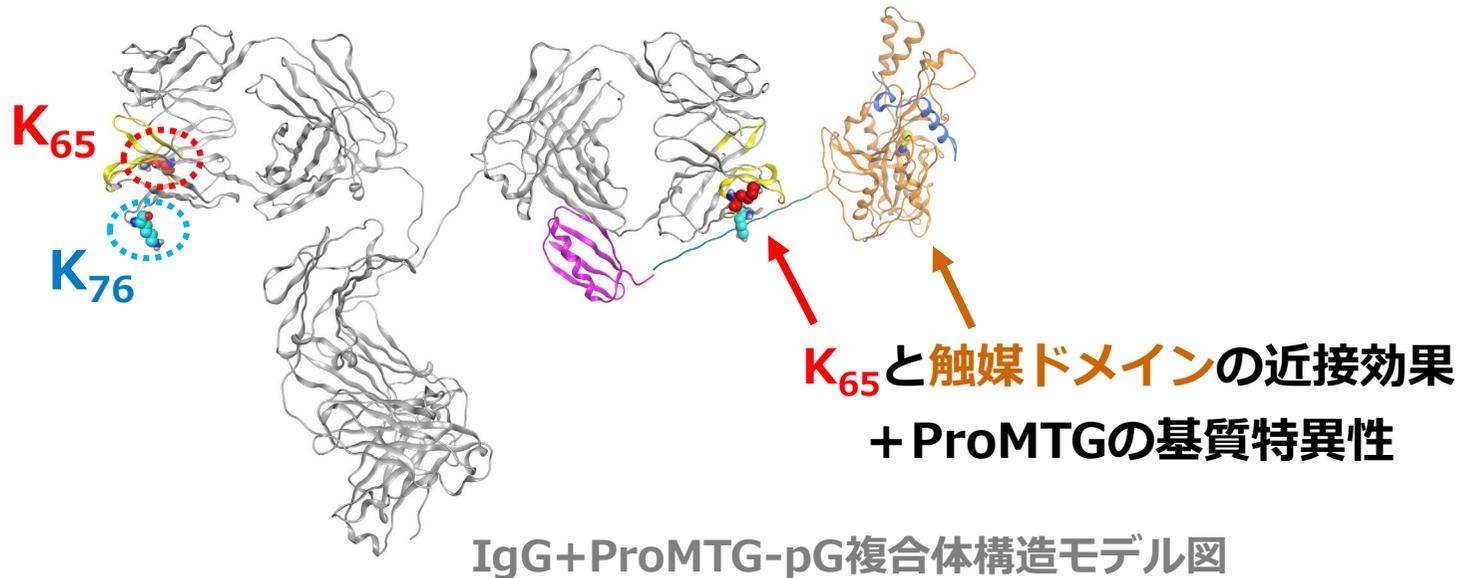


→ 反応2時間で修飾率は約9割

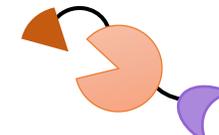
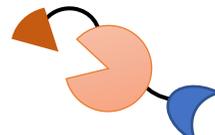
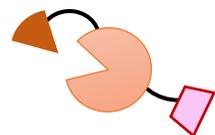
● 架橋部位(K₆₅)の構造情報と近接効果



-NIK₃₀DT--
--SVK₆₅GR--
---TSK₇₆NT--



抗体ラベル化試薬 としての性能比較



設計したキメラ架橋酵素 : ProMTG-pG

ProMTG-pG(Fc)

ProMTG-pG(Fab)

抗体修飾効率

○

○

○

自己修飾の抑制

×

△

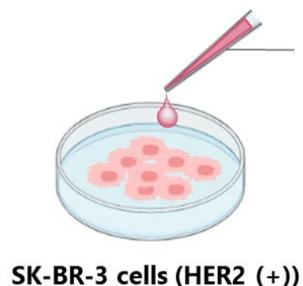
○

反応時の凝集抑制

×

○

○



蛍光修飾抗体
(Herceptin)

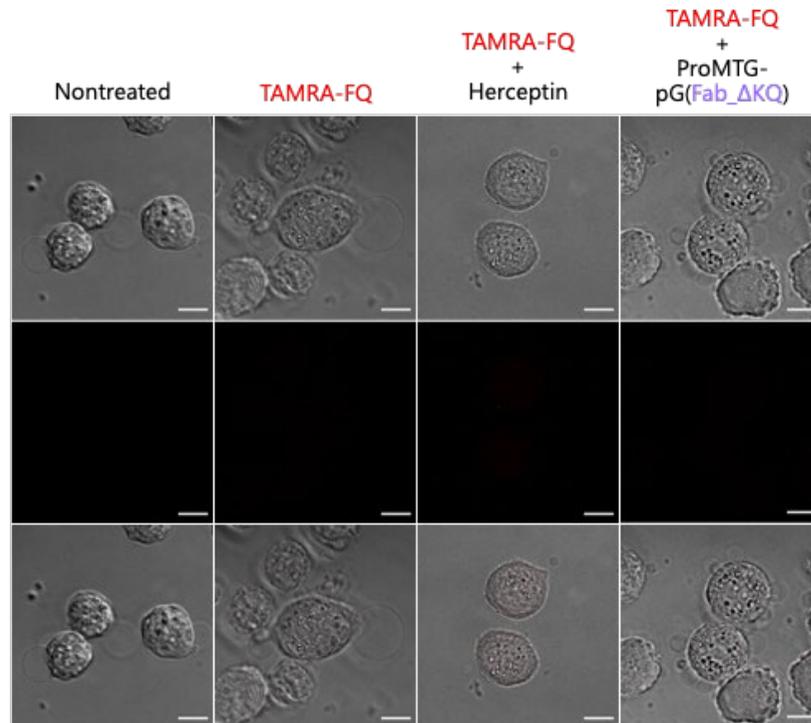
SK-BR-3 cells (HER2 (+))

37°C, 1 h

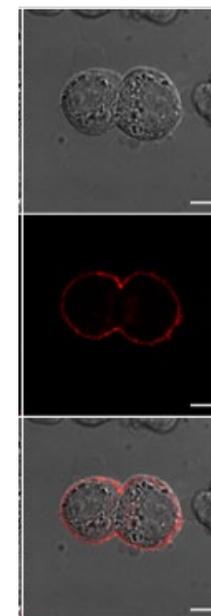
4% PFA

CLSM観察

細胞膜抗原認識能の確認



TAMRA-Herceptin
(K₆₅ modified)
+
ProMTG-pG(Fab_ΔKQ)



新技術の特徴・従来技術との比較

- 修飾部位特異性と修飾効率の両立に対して、酵素反応を利用することで解決できた。
- MTGを用いた従来法では、抗体の脱糖鎖処理により露出するアミノ酸 (Gln残基) に限られていたが、抗体への近接効果の導入により、天然抗体の特定のアミノ酸 (Lys残基) の修飾が可能となった。
- 反応 2 時間で修飾率 9 割以上を達成した。

想定される用途

- 本技術は、薬物修飾抗体の迅速・簡便な調製の面でメリットを見出せる可能性あり。
- 基質の設計の自由度が高いことから、薬物以外の多様な分子の修飾への適用可能性も期待される。
- ヘルスケア分野における抗体(+抗体様結合タンパク質)の用途拡大に資するピンポイント修飾技術となることが期待される。

実用化に向けた課題

- 現在、モデル化合物による天然抗体表面Lys残基の部位特異的修飾を達成済み。しかし、実用的に使えるラベル化剤を用いた検証はこれからの課題である。
- 今後、修飾効率の向上・修飾部位の拡大について更なる検討を進め、抗体のピンポイント修飾技術としての汎用性を高める。
- 実用化に向けて、修飾抗体の精製技術の確立も課題となる。

企業への期待

- 薬理活性を有する化合物の合成技術を有する企業様との産学連携研究の可能性。
- 抗体ラベルを試みたい化合物シーズを有する企業様との共同研究開発の可能性。
- 抗体の利用を中心としたヘルスケア製品を開発中の企業様、新規化合物を用いた診断薬や医療分野への展開をお考えの企業様は本技術の導入を是非ご検討下さい。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：微生物由来トランスグルタミナーゼ融合体
- 出願番号：特願2023-076790
- 出願人：九州大学
- 発明者：神谷 典穂、南畑 孝介、木村 道夫



本研究は AMED (JP21ae0121004) の支援を受けて実施されました。

酵素触媒架橋反応を用いた脂質修飾抗真菌酵素製剤の設計

- 発明の名称：抗真菌剤組成物、化合物及び抗真菌剤
- 出願番号：特願2020-151325
- 出願人：九州大学、琉球大学
- 発明者：神谷 典穂、平良東紀

産学連携の経歴

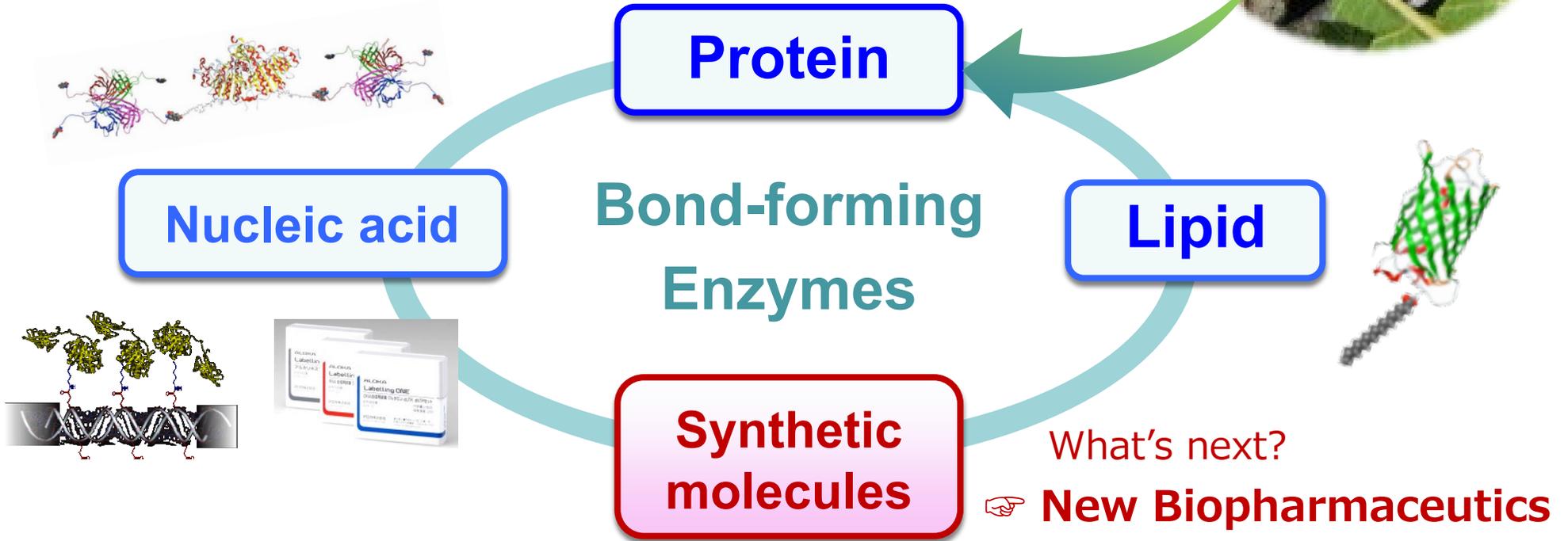
- 2008-2010年 JST重点地域研究開発推進プログラム
(徳島大学、アロカ株式会社との共同研究、診断薬の実用化)
- 2009-2012年 NEDOバイオマスエネルギー先導技術研究開発
(神戸大学、豊田中央研究所、トヨタ自動車株式会社との共同研究)
- 2012年 JST研究成果最適展開支援プログラム A-STEP
(日立アロカメディカル株式会社との共同研究)
- 2015-2017年 JST-START (本学内・農工異分野共同研究)
- 2018年4月～ **KAICO株式会社** 起業 (発起人・現アドバイザー)
- 2023年10月～ JST A-STEP (本格型、分担)
(株式会社 かつろ・バイオテクノロジーズ、金沢工業大学との共同研究)

その他、複数の企業様と個別の共同研究の経験があります。
お気軽にお声掛け、ご相談頂けると幸いです。

産学連携の可能性



On-demand Manufacturing of
High-quality Customized Proteins



昆虫バイオリファイナーの提案

'Sustainable' biomolecular engineering platform!

お問い合わせ先

九州大学

オープンイノベーションプラットフォーム
サイエンスドリブンチーム

T E L 092-400-0494

e-mail transfer@airimaq.kyushu-u.ac.jp

ご静聴有難うございました。