

スーパー抗体酵素 #7TR を用いた最適精製法の確立

(大分大院工¹・大分大研究機構²・九州先端研³) 佐土原 万実¹・野中 玲実²・
○宇田 泰三^{2,3}・一二三恵美²

Establishment of the most optimal purification method using super-catalytic antibody #7TR
(¹Graduate School of Engineering, Oita University, ²Research promotion Institute, Oita University, ³Nanotechnology Laboratory, ISIT) Mami Sadohara,¹ Tamami Nonaka,² ○Taizo Uda,^{2,3} Emi Hifumi²

Many natural catalytic antibodies, including their subunits, have been produced since 1989. Their catalytic activities often depend on the preparation conditions. Eliciting the intrinsic catalytic activity of the antibodies requires knowledge of the preferred generally applicable preparation methods and conditions. Based on this view, systematical experiments were performed using typical catalytic antibody light chain, #7TR. The catalytic activity of the light chain was lost or lowered when prepared under an acidic condition. In contrast, intrinsic catalytic activity could be detectable following preparation at pH 7.5-8.0. The presence of NaCl enhanced the catalytic activity. Under these conditions, the #7TR light chain completely cleaved Amyloid-beta peptide. In addition, another catalytic antibody, H34, which was purified under the preferable condition, could markedly degrade a PD-1 peptide.

Keywords : Super catalytic antibody; Light chain; Purification condition

【目的】1989 年以来、天然型抗体酵素が数多く開発されてきた。多くの酵素で見られる様に、演者らが見出したスーパー抗体酵素に於いても高性能かつ高再現性を持たせるためには適切な条件下で精製する事が重要である。そこで本研究ではトリプシン様活性を示す抗体酵素#7TR¹⁾を取り上げて、精製法を系統的かつ詳細に調べ、抗体酵素精製の最適な条件をまとめたので報告する。

【実験手法】ヒト型抗体酵素遺伝子(#7TR & H34)は、これまでの様に²⁾, pET20b(+)に組み込み大腸菌 BL21(DE3)pLysS で発現させ、培養上清の可溶性画分を回収後、下記に示すそれぞれの条件下で精製した。酵素活性は合成基質 Arg-pNA では 405nm の吸収波長を、FRET-Aβおよび FRET-PD-1 では蛍光波長(λ_{ex} = 325 nm, λ_{em} = 394 nm)を用いて測定することにより評価した。

【結果と考察】3 種類の精製法 (Ni-NTA カラムクロマト、陽イオン交換クロマト、サイズ排除クロマトグラフィー)に加えて、pH 変化、NaCl の有無等、系統的に 8 種類の精製条件(route 1~8)を試した。その結果、塩基性条件下(pH 7.5-8.0)で調製した場合には酵素活性が検出されたが、逆に、酸性条件下で調製すると酵素活性は失われるか、あるいは、低下した。また、NaCl の存在は酵素活性を高める方向に働いた。以前、一部で言われていた「酸ショック」は悪い方向に作用した。上記の好適な条件下で精製した抗体酵素 #7TR はアミロイドベータペプチドを切断し、さらには、同条件下で調製した別の抗体酵素 H34 は PD-1 ペプチドを分解した。

1) E. Hifumi, et al., *FASEB Bioadvances*, 1(2), 93-104(2018). 2) E. Hifumi et al., *Science Advances*, 6(13), eaay6441(2020).