

2012A1068

BL38B1

## 抗パクリタキセルモノクローナル抗体の抗原認識メカニズムの解析 Analysis of the Antigen Recognition Mechanism of Anti-paclitaxel Monoclonal Antibody

田畑 香織<sup>a</sup>, 新井 栄揮<sup>b</sup>, 田中 宏幸<sup>a</sup>, 玉田 太郎<sup>b</sup>, 森元 聡<sup>a</sup>, 黒木 良太<sup>b</sup>  
Kaori Tabata<sup>a</sup>, Shigeki Arai<sup>b</sup>, Hiroyuki Tanaka<sup>a</sup>, Taro Tamada<sup>b</sup>, Satoshi Morimoto<sup>a</sup>, Ryota Kuroki<sup>b</sup>

<sup>a</sup>九州大学 薬学研究院, <sup>b</sup>日本原子力研究開発機構

<sup>a</sup>Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, <sup>b</sup>Japan Atomic Energy Agency

抗パクリタキセルモノクローナル抗体のパクリタキセル認識メカニズムの解明を目的として、抗パクリタキセル Fab (Fragment antigen-binding : 断片抗原結合) とパクリタキセルとの複合体の結晶を調製し、続いて X 線回折実験を行った。SPRING-8 BL38B1 にて X 線回折実験を行った結果、9 Å の分解能までの低角域に数点の回折点を得ることができたものの、結晶構造を解析することはできなかった。

**キーワード：** パクリタキセル、モノクローナル抗体

### 背景と研究目的：

パクリタキセルは *Taxus brevifolia* から単離された重要な抗癌剤として知られる天然物である<sup>[1]</sup>。パクリタキセルならびにタキソテールは重要な抗癌剤として知られており、天然化合物から調製されるこれら抗癌剤の有効活用が望まれている。我々は、パクリタキセル高含有品種の作製を目的として、育種のスクリーニングに有用なイムノアッセイ (免疫測定法) 用に抗パクリタキセルモノクローナル抗体を自製している<sup>[2]</sup>。本抗体は、パクリタキセルのみならず重要な抗癌剤の一つであるタキソテールに対しても反応性を有する特徴を有することを確認している。我々が作製した抗パクリタキセルモノクローナル抗体は様々な応用研究に利用できるツールと考えており、本抗体とパクリタキセルの結合様式が解明できれば、抗パクリタキセル抗体の高機能化などの研究を進める上で、有用な情報を得ることができると考えている。

今回、*Taxus brevifolia* の育種研究やパクリタキセルやタキソテールの血中モニタリングなどに応用できるユニークな特徴を有する本抗体について、抗原との結合様式を明らかにするために、抗パクリタキセル Fab (Fragment antigen-binding : 断片抗原結合) とパクリタキセルとの結晶化を実施した。

### 実験：

#### 抗パクリタキセル Fab の調製

抗パクリタキセルモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを 10%e 牛胎児血清(Thermo Fisher

Scientific 社製, MA)含有 e-RDF 培地 (極東製薬社製) を用いて大量に培養した<sup>[2]</sup>。培養後、培養上清を Hi Trap Protein G HP カラム (GE ヘルスケア・ジャパン社製) に付し、抗パクリタキセルモノクローナル抗体を精製した。次に、抗パクリタキセルモノクローナル抗体を材料として Pierce<sup>TM</sup> Fab Preparation Kit (Thermo Fisher Scientific 社製, MA)を用いてメーカー記載のマニュアルに従い Fab を調製した。

#### 抗パクリタキセル Fab とパクリタキセルの複合体の調製

抗パクリタキセル Fab 溶液 (15 mg/ml) とパクリタキセルをモル比 1 : 3 となるように混合し、PEG/ION screen (Hampton Research 社製)を用い、蒸気拡散法による結晶化スクリーニングを行った。20°C で 11 日間インキュベートを行った後、4°C に結晶化プレートを移動した。

#### X 線回折実験

結晶化母液から  $\phi$  0.1 mm のナイロンループで結晶を拾い上げ、Paratone (Hampton Research 社製, CA) に 30 秒間浸漬した後、100 K の液体窒素気流下、フラッシュ冷却で凍結した。サンプルチェンジャーロボット SPACE を使用し、結晶をマウントした<sup>[3]</sup>。

X 線回折実験は、SPring-8 BL38B1 にて実施した。波長 1.0 Å、20 sec の露光時間、振動角は 1°とし回折像を測定した。検出器は ADSC Quantum 315r CCD detector を用いた。測定操作プログラムは Beam line scheduling software BSS<sup>[4]</sup>および D-Cha<sup>[3]</sup>を使用した。 $\phi$  range は 0°、90°とした。

#### **結果：**

調製した抗パクリタキセル Fab とパクリタキセルを用いて、複合体の結晶化を試みた。20°C で 11 日間インキュベートを行ったが、結晶が得られなかったため、4°C でインキュベートしたところ 4 日後に PEG/ION screen 96 条件中 10 条件で沈殿が観察され、0.2 M magnesium nitrate、20%PEG3350 (PEG/ION I-16)において微小な針状結晶が析出した (図 1)。

得られた結晶を用いて、SPring-8 BL38B1 にて X 線回折実験を実施した。その結果、9 Å の分解能までの低角域に数点の回折点を得ることができたものの、結晶構造を解析することはできなかった。

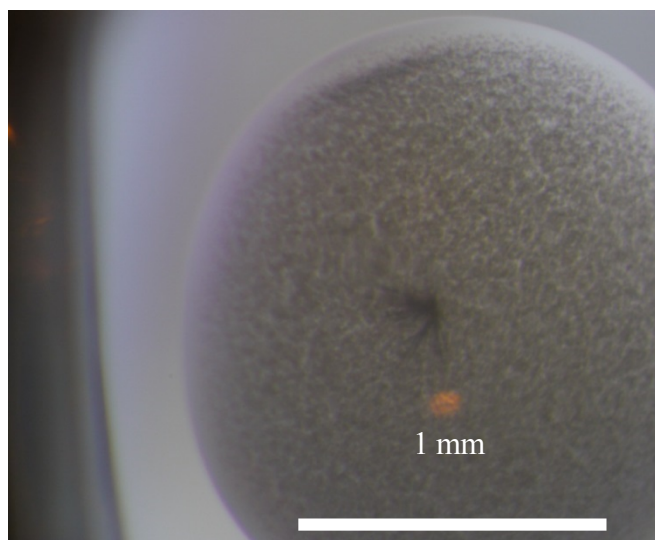


図1. X線回折実験に供した結晶

**今後の課題：**

今後は、抗パクリタキセルモノクローナル抗体の抗原認識メカニズムの解明が進められる良質な結晶を得るために、Crystal Screen I,II、Wizard I,II、Synergy キットなどを活用して、より高純度、高濃度のサンプルの調製並びに結晶化の最適化を進めて行く計画である。

**謝辞：**

本研究は、JSPS 科研費 19590119 基礎研究 (C)、武田科学振興財団研究助成の薬学系研究奨励金を受けたものです。ここに感謝の意を表します。

**引用文献：**

- [1] Wani, M. C., Taylor, H.L., Wall, M.E., Coggon, P., McPhail, A.T., *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325-2327 (1971).
- [2] Chao, Z., Tan, M., Paudel, M.K., Sakamoto, S., Ma, L., Sasaki-Tabata K., Tanaka, H., Shoyama, Y., Xuan, L., Morimoto, S., *J. Nat. Med.*, **67**, 512-518 (2013).
- [3] Okazaki, N., Hasegawa, K., Ueno, G., Murakami, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., *J. Synch. Rad.*, **15**, 288-291 (2008).
- [4] Ueno, G., Kanda, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., *J. Synch. Rad.*, **12**, 380-384 (2005).

©JASRI

(Received: June 16, 2016; Early edition: September 26, 2016;  
Accepted: December 12, 2016; Published: January 31, 2017)