

論文の内容の要旨

論文題目 二次免疫応答の抗体 3B62 の親和性成熟と交差親和性に関する構造生物学的研究

氏名 村瀬 賢

生体内に抗原が侵入すると、免疫系の細胞はその抗原を認識し免疫反応が惹起される。免疫反応は時間経過に伴って増強され、血清中の抗体価が上昇する。この現象は、抗体の親和性の成熟 (affinity maturation) と呼ばれる。

抗体 N1G9 と抗体 3B62 は、マウスにニトロフェノール付加抗原を免疫して得られた、それぞれ一次応答と二次応答の抗体である。抗原に対する親和性は、抗体 N1G9 の 10^5 M^{-1} から抗体 3B62 の 10^7 M^{-1} のオーダーに高まっている。抗体 3B62 の Fv の結晶構造を解析し、既に解析されている抗体 N1G9 の Fab の三次元構造と比較することにより、抗ニトロフェノール抗体の親和性成熟の機構を三次元構造の観点から解明することを研究の目的とした。また、これら抗体は、ニトロフェノールリガンドの 5 位をヨウ素に置換したリガンドに対して、より高い親和性を示す。この交差親和性 (heteroclicity) の機構を抗体 3B62 の Fv の三次元構造に基づいて考察した。

【3B62 Fv の発現系の構築と結合定数の測定】

抗体の V_L と V_H の 2 個のドメインからなる Fv フラグメントを研究の対象とすることにより、結晶性の向上と、解析対象となる原子数およびドメイン数が Fab に比べて半数となる点で、構造生物学的に有利であると考えられる。そこで、マウスハイブリドーマ細胞 3B62 由来の V_L ドメインに対応する cDNA と V_H ドメインに対応する cDNA とを *Pichia pastoris* メタノール資化酵母の同一ゲノム内に導入し、 α -factor シグナルペプチドにより V_L と V_H の二本鎖が会合した Fv が分泌される発現系を構築した。ニトロフェノールをリガンドとするアフィニティカラムにより 7 L の培養上清から 30 mg の Fv を精製した。MALDI-TOF 質量分析によ

り V_L と V_H に付加したシグナルペプチドが想定したように除去されていることを確認した。

Fv の結合定数を, 抗体 3B62 および N1G9 の Fab を対照として蛍光消光法により測定した。NP-Cap (*N*-(4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl)-6-aminocaproic acid), NIP (4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenyl acetic acid), および NP (4-hydroxy-3-nitrophenyl acetic acid) をリガンドとする各抗体フラグメントの結合定数を表 1 に示す。3B62 の Fv は Fab と同じオーダーの結合定数を有している。従って, この Fv の三次元構造は, 抗体 3B62 の親和性成熟および交差親和性の機構の解明に供することができると考えられる。また, Fv における V_L と V_H のドメインの会合について, マウス λ タイプの L 鎖をもつこの Fv と, 比較的多く構造が解析されている κ タイプの L 鎖をもつ Fv の三次元構造から, タイプとドメインの会合の関係を検討する基盤になりうる。

表 1. リガンドに対する抗体フラグメントの結合定数

	K_a (M^{-1})		
	3B62 Fv	3B62 Fab	N1G9 Fab
NP-Cap	2.4×10^8	5.0×10^7	8.1×10^5
NP	5.0×10^5	2.1×10^5	—
NIP	6.4×10^7	1.4×10^7	8.1×10^5

at 25°C, pH 7.0

【X 線結晶構造解析と全体構造の比較】

Fv のネイティブ体, Fv と NP との複合体, および Fv と NIP との複合体の結晶を, ポリエチレングリコール 6000, 0.1 M HEPES-Na 緩衝液 (pH 7.0 – 7.5) を結晶化剤として, 蒸気平衡拡散法により析出させた。これらの結晶の空間群は $P2_1$, 格子定数は $a = 46.5 \text{ \AA}$, $b = 34.9 \text{ \AA}$, $c = 77.4 \text{ \AA}$, $\beta = 100.9^\circ$ であり, 非対称単位中に Fv が 1 分子存在する。これらの結晶から $CuK\alpha$ 線を X 線源として回折強度データを収集した。抗体 N1G9 Fab と NP との複合体の三次元構造から初期モデルを得て分子置換法を適用し, 結晶学的構造精密化を行った (表 2)。

Fv の全体構造を図 1 に示す。Fv-NP 複合体と Fv-NIP 複合体の各結晶では, 相補性決定領域(CDR) の L1, L3, H1, H2, H3 ループから形成される抗原結合部位のポケット内に, それぞれのリガンドの明瞭な電子密度が認められた (図 2)。ネイティブ体結晶では, ポケット内に結晶化剤の成分である HEPES 分子および水分子に相当する明瞭な電子密度が認められた。3B62 Fv-NIP 複合体と N1G9 Fab-NP 複合体の Fv 領域との主鎖原子での根二乗平均変移 (rmsd) は 1.08 \AA であり, 抗体 3B62 と抗体 N1G9 との間にアミノ酸残基の差異や欠失が認められる H1, H2, H3 ループでの主鎖の構造の違いが著しい。最近結晶構造が得られた 3B62 Fab-NP 複合体の構造と比較すると, Fv 領域での主鎖原子の rmsd は 0.47 \AA

表 2. 結晶学的構造精密化

	Fv ネイティブ体	Fv-NP 複合体	Fv-NIP 複合体
分解能	30–1.85 \AA	30–2.0 \AA	30–1.8 \AA
総反射数	56,436	45,887	101,878
独立な反射数	19,616	13,307	21,737
観測可能な反射数に対する割合	0.933	0.789	0.945
R_{merge} (I)	0.067	0.069	0.067
蛋白質原子数	1,673	1,662	1,697
水分子数/リガンド原子数	63/12 ^a	71/14	83/15
R (R_{free})	0.193 (0.227)	0.192 (0.235)	0.186 (0.211)

^a 結合している HEPES 分子の原子数

抗体 3B62 では Trp 33H が保存されたまま、 V_H の germ-line V186.2 の配列に対して 12 残基が変異し、1 残基が欠失している。抗体 3B62 のアミノ酸残基の変異と欠失のある H1 ループと H2 ループが抗体 N1G9 とは異なる三次元構造を形成することで、抗原結合部位の Trp 33H, His 35H, Arg 50H のリガンドに対する相対配置に影響を与えている。

図 4 に 3B62 Fv-NIP 複合体と N1G9 Fab-NP 複合体の抗原結合部位の三次元構造を示す。N1G9 Fab では、Trp 33H の ζ_3 位 H 原子がリガンドの C4 原子を向いており、

C_{ζ_3} 原子と C4 原子との距離が 3.2 Å と近接している。この距離は、水素原子のファンデルワールス (vdW) 半径を考慮した C_{ζ_3} 原子と C4 原子の安定距離より 0.5 Å 小さい。3B62 Fv では、H2 ループと H3 ループとから形成される溝に Trp 33H のインドール環が位置し、その配向は N1G9 の構造と比べて χ_2 角で 116° 異なって、ほぼ反転している。リガンドと最も近接している Trp 33H の C_{δ_1} 原子とリガンドの O2 原子とは 3.3 Å の距離にある。この距離は安定距離の和より 0.2 Å 大きく、エネルギー的に安定な vdW 相互作用を生じている。

3B62 の CDR H3 を N1G9 に移植した抗体では、ニトロフェノールリガンドに対する親和性が上昇しないことが報告されている。N1G9 Fab の三次元構造で、Trp 33H に 3B62 Fv の χ_2 角を仮定すると、 C_{δ_1} 原子とリガンドの O2 原子との距離は 5 Å 以上離れることになり、リガンドとの相補性が損なわれる。抗体 3B62 では、アミノ酸配列に変異と欠失を伴う H1 ループと H2 ループが、V-D-J 接続部に位置し抗体間のアミノ酸配列に多様性のある H3 ループと協調して Trp 33H インドール環の配向に違いをもたらし、その周囲でのリガンドとの狭あい性の緩和に寄与して高い親和性を獲得している。

【5 位ヨウ素化リガンドに対する交差親和性】

3B62 Fv-NP 複合体と Fv-NIP 複合体の三次元構造を比較すると、抗原結合部位でのアミノ酸残基の側鎖の配置がほぼ同一である。Fv-NIP 複合体では、NIP の 5-iodo 原子が Tyr 97H の C_{ϵ_1} 原子、Trp 91L の C_{ζ_2} 原子および Arg 50H の N_{η_2} 原子と 4.2 Å の距離で近接している(図 3)。Tyr 97H の ϵ_1 位 H 原子、Trp 91L の ζ_2 位 H 原子、Arg 50H の η_2 位 H 原子は、NIP の 5-iodo 原子の方を向いており、これら正の部分電荷をもつ水素原子とリガンドの 5-iodo 原子との間に vdW 相互作用や静電相互作用が形成され、ニトロフェノール抗体の 5 位ヨウ素化リガンドに対する交差親和性に寄与していると考えた。

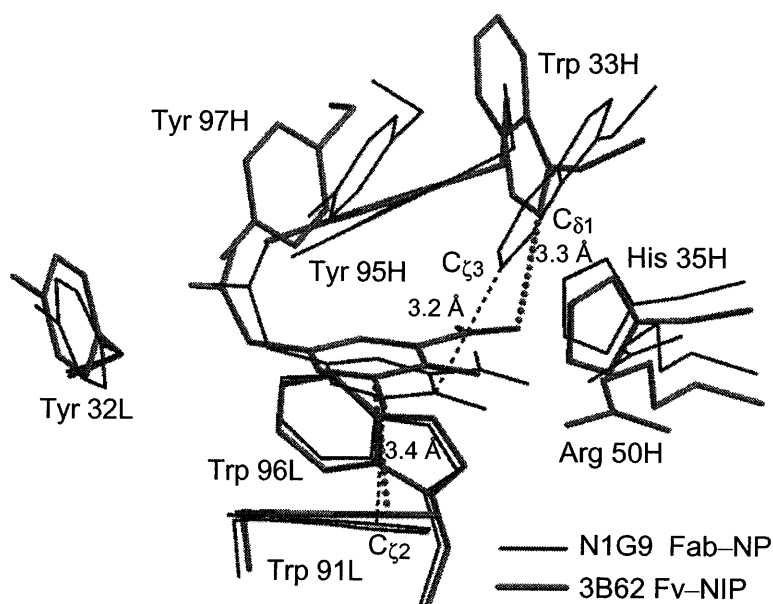


図 4. 3B62 Fv-NIP 複合体と N1G9 Fab-NP 複合体の抗原結合部位。注目する原子同士を点線で結び、それらの間の距離を示す。

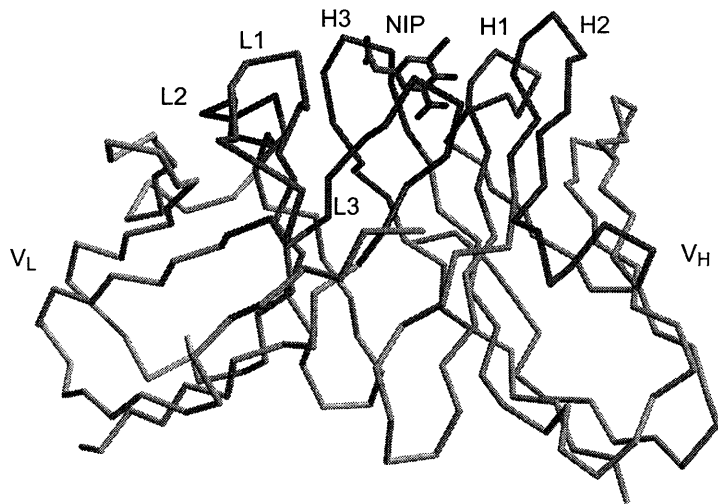


図 1. Fv-NIP 複合体の C α モデル

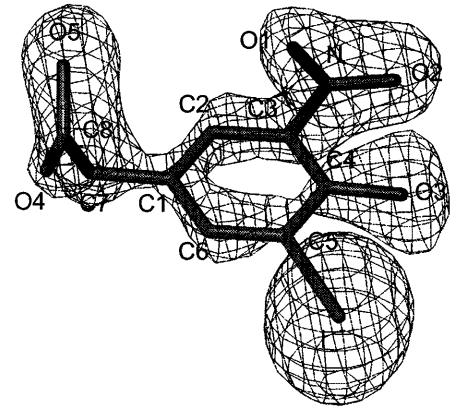


図 2. NIP 分子の電子密度と構造

と小さく、Fv 化によってドメイン配置および主鎖のコンフォメーションに大きな変化を生じていない。L2 ループと H3 ループ、および L3 ループと H2 ループの残基は V_L ドメインと V_H ドメインとの境界面に位置している。また、フレームワーク領域の Val 36L, Phe 44L, Phe 87L, Phe 98L, Val 37H, Leu 45H, Tyr 91H, および Trp 103H の側鎖はドメインの境界面で疎水的なクラスターを、Glu 38L と Gln 39H, および His 42L と Tyr 91H の側鎖は水素結合を形成している。マウスλタイプの抗体ではこれら相互作用に関わる残基が多く保存されており、このことが、3B62 Fv のドメインの解離を低減させ、かつ Fab と同程度のリガンド親和性をもたらしていると考えた。

【親和性成熟の機構】

Fv-NIP 複合体の抗原結合部位の三次元構造を図 3 に示す。このポケットの底に位置する Trp 96L, Tyr 95H, 側面に位置する Tyr 32L, Trp 91L, Trp 33H, Tyr 97H の芳香性側鎖はリガンドに対して疎水的な壁を形成している。Tyr 95H の側鎖 O 原子と Gly 98H の主鎖 N 原子はリガンドの O5 原子に近接し、それぞれ水素結合を形成している。

His 35H と Arg 50H の塩基性側鎖の N 原子はリガンドのニトロ基および水酸基の O 原子に、それぞれ水素結合を形成している。これら塩基性側鎖のアミノ酸残基は、N1G9 Fab と共通しており、リガンドのニトロ基および水酸基への特異的な認識に深く関わっている。

二次応答の抗体 3B44 では、H 鎖の胚細胞由来遺伝子 germ-line V186.2 の配列に由来する Trp 33H が Leu に変異することが親和性上昇の要因と考えられている。一方、

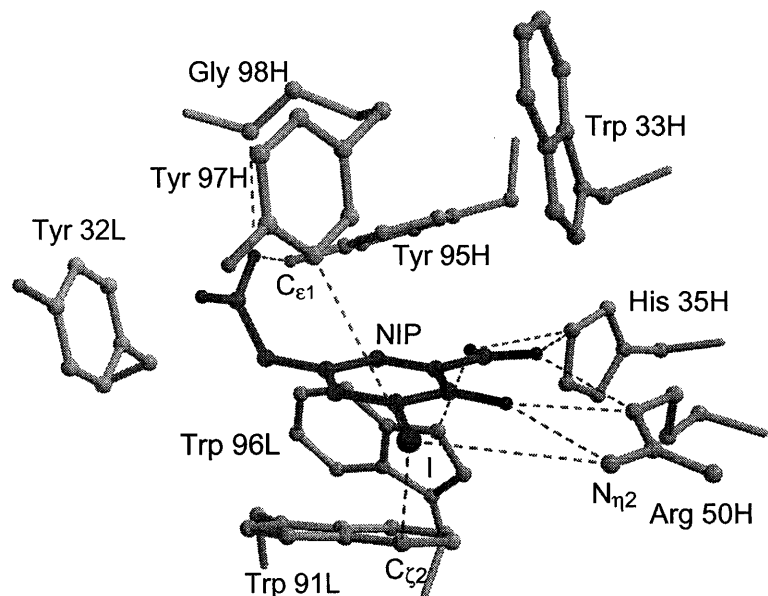


図 3. Fv-NIP 複合体の抗原結合部位。静電相互作用に関わる主な原子間を点線で結んでいる。