

審査の結果の要旨

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を惹起する。時間経過に伴って免疫反応が増強され、血清中の抗体価が上昇する現象は、抗体の親和性の成熟 (affinity maturation) とよばれる。本論文は、抗ニトロフェノール抗体での親和性成熟の機構の解明を目的とし、マウス抗体 3B62 の抗原認識の最小の単位である V_L ドメインと V_H ドメインから成る F_v を発現させ、 F_v とニトロフェノール誘導体との複合体の三次元構造を X 線結晶構造解析により明らかにしている。抗体 3B62 はニトロフェノール付加抗原を免疫して得られた二次応答の抗体であり、抗原に対する親和性は一次応答の抗体 N1G9 の $10^5 M^{-1}$ に比して $10^7 M^{-1}$ のオーダーに高まっている。本論文では、これら抗体がニトロフェノールリガンドの 5 位をヨウ素に置換したりリガンドに対してより高い親和性を示す交差親和性 (heteroclicity) についても、得られた三次元構造に基づいて原子レベルで考察している。

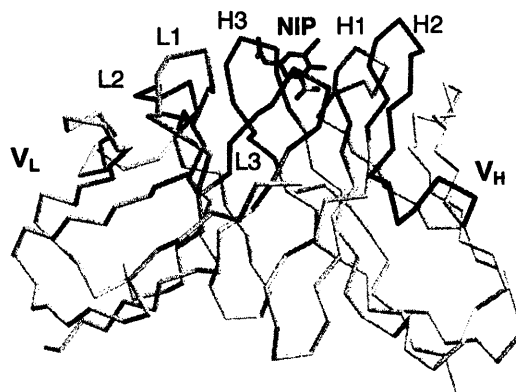
本論文の研究では、抗体の F_v を対象とすればより詳細な三次元構造が得られるものと考え、 F_v の発現系をまず構築した。すなわち、ハイブリドーマ細胞 3B62 由来の V_L (λ タイプ) ドメイン cDNA と V_H ドメイン cDNA とをメタノール資化酵母 *Pichia pastoris* のゲノム内に同時に導入し、 α -factor シグナルペプチドを付加した V_L と V_H の二本鎖が会合して F_v が分泌される高発現系を構築した。付加したシグナルペプチドが得られた V_L と V_H では除去されていることを MALDI-TOF 質量分析により確認し、リガンドと F_v の結合定数を蛍光消光法により測定した。使用リガンドは *N*-(4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl)-6-aminocaproic acid (NP-Cap), 4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenyl acetic acid (NIP) および 4-hydroxy-3-nitrophenyl acetic acid (NP) であり、 F_v は Fab とほぼ同オーダーの結合定数を有することが示された。

F_v のネイティブ体、 F_v と NP との複合体、および F_v と NIP との複合体の結晶をポリエチレングリコール 6000 の結晶化剤により析出させた。結晶は相互に同型で、空間群 $P2_1$ の非対称単位中に F_v が 1 分子存在する。CuK α の X 線源を用いて回折強度データを収集し、分子置換法により初期構造を得て、 F_v ネイティブ体では分解能 1.85 Å, F_v -NP 複合体では 2.0 Å, F_v -NIP 複合体では 1.8 Å で結晶学的構造精密化を行った。

F_v の三次元構造 (図は NIP との複合体) と Fab の比較から、主鎖原子の根二乗平均変位が 0.47 Å と小さく、 F_v でのドメインの配置および主鎖のコンフォメーションは元の抗体とほぼ同一であることを示した。これは研究例が多い κ タイプ軽鎖抗体とは異なる現象である。 λ タイプの抗体でよく保存されているフレームワーク領域の Val 36L, Phe 44L, Phe 87L, Phe 98L, Val 37H, Leu 45H, Tyr 91H と Trp 103H の側鎖が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 の側鎖が水素結合を形成し、 F_v のドメインの解離を低減させ Fab と同程度のリガンド親

和性をもたらすと帰結した。

相補性決定領域の L1, L3, H1, H2 と H3 ループから形成される抗原結合部位のポケット内にリガンドは結合している。ポケットの底には Trp 96L と Tyr 95H, 側面には Tyr 32L, Trp 91L, Trp 33H と Tyr 97H の芳香性側鎖が位置し、リガンドに対する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 acetyl 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 の側鎖の N 原子はニトロ基および水酸基とそれぞれ水素結合を形成している。

一次応答抗体 N1G9 の H 鎖の胚細胞由来遺伝子 germ-line V186.2 の配列中の Trp 33H が、二次応答抗体 3B44 では Leu に変異し、親和性が上昇すると考えられている。しかし、二次応答抗体 3B62 ではこの Trp33H は保存されている。N1G9 では Trp 33H の H_{ε3} 原子がリガンドの phenyl C4 原子を向き、C_{ε3} 原子と C4 原子との距離が 3.2 Å と過度に近接している。3B62 では、H2 と H3 の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 の構造からほぼ反転している。Trp 33H の C_{δ1} 原子は最近接のニトロ基 O2 原子から安定距離の和より 0.2 Å 大きい 3.3 Å の距離にあり、エネルギー的に安定な vdW 相互作用を生じている。3B62 では、germ-line V186.2 の配列に対してアミノ酸残基の変異と欠失を示す H1 と H2 のループが、V-D-J 接続部に位置して抗体のアミノ酸配列に多様性をもたらす H3 ループと協調して Trp 33H インドール環に配向の違いを生じ、その周囲でのリガンドとの狭あい性を緩和して親和性成熟をもたらすと結論している。

Fv-NIP 複合体では、Tyr 97H の C_{ε1} 原子、Trp 91L の C_{ε2} 原子および Arg 50H の N_{η2} 原子が NIP の 5-iodo 原子へ 4.2 Å の距離で近接しており、Tyr 97H の H_{ε1} 原子、Trp 91L の H_{ε2} 原子、Arg 50H の H_{η2} 原子が NIP の 5-iodo 原子へ向いている。そこで、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が 5-iodo 化リガンドに対する交差親和性を生じると結論している。

本論文の研究は、二次免疫応答のマウス抗ニトロフェノール抗体の Fv を 2 本のポリペプチド鎖の蛋白質として高発現させる系を構築し、抗体の親和性成熟と交差親和性の理解に必須とされる Fv 単体とニトロフェノール誘導体複合体の三次元構造を X線解析により詳細に解明している。よって、本論文は、蛋白質の構造生物学と構造化学の面から薬学の進歩に貢献するところが大きく、博士（薬学）の学位の授与に価すると判定した。