

論文内容の要旨

論文題目 抗体結合能の付与による抗体プローブの利用
ーリボヌクレアーゼ・Fab 複合体の X 線解析と受容体への応用ー

氏 名 野田 展生

生命活動を理解するためには蛋白質の機能を解明することが必須であり、そのためには蛋白質の三次元構造を知ることが重要となる。蛋白質の三次元構造決定の最も強力な手法は、今も昔も X 線結晶構造解析法である。蛋白質の X 線解析は、近年の計算機科学の発達、シンクロトン放射光の利用等により、解析のスピードが飛躍的に向上し、試料の良質な結晶さえ得られればあとはルーチンで構造決定が可能な段階にまで来ている。しかしながら、蛋白質の結晶化の段階だけはいまだ試行錯誤に頼った、時間と労力のかかる過程であり、三次元構造決定への大きな足かせとなっている。この結晶化の過程を迅速に、効率良く行なう新しい方法論の開発を目的として、蛋白質試料に化学的に抗体結合能を付与することにより、既存の高親和性抗体の Fab フラグメントとの複合体を調製し、複合体として結晶化を行った。抗体結合能を付与するモデル蛋白質としてリボヌクレアーゼ(RNase) U_2 を、また抗体として抗ダンシル抗体および抗ニトロフェノール抗体を用いた。

【化学抗原化と複合体の調製】 ダンシル(DNS, 1)化合物に対して $10^6 \sim 10^8 M^{-1}$ の親和性を持つ抗ダンシル抗体をプローブとして活用するため、RNase U_2 の N 末端に DNS クロライドを反応させた。陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製後、MALDI-TOF 質量分析により DNS に相当する RNase U_2 の分子量の増大を確認した。ゲルろ過クロマトグラフィーによる抗ダンシル抗体の Fv フラグメントとの複合体形成を調べたところ、安定な会合は認められなかった。

4-hydroxy-3-iodo-5-nitrophenylacetic acid (NIP) に対して 10^6 および $10^8 M^{-1}$ の親和性を持つ抗

ニトロフェノール抗体 N1G9 および 3B62 をプローブとして活用するため、RNase U₂ の N 末端にスクシンイミドを利用したカップリング反応により NIP(2a), およびリンカーとしてグリシンとβアラニンを用いた誘導体(2b, 2c)を付加した。陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製後、MALDI-TOF 質量分析によりそれぞれの付加物に相当する RNase U₂ の分子量の増大を確認した。

化学修飾後の RNase U₂ の RNA 切断活性を測定したところ, 80%以上の活性を保持していた。

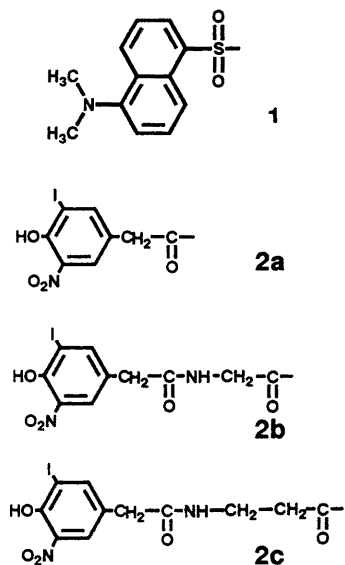


図 1. RNase U₂ に付加させたリガンド

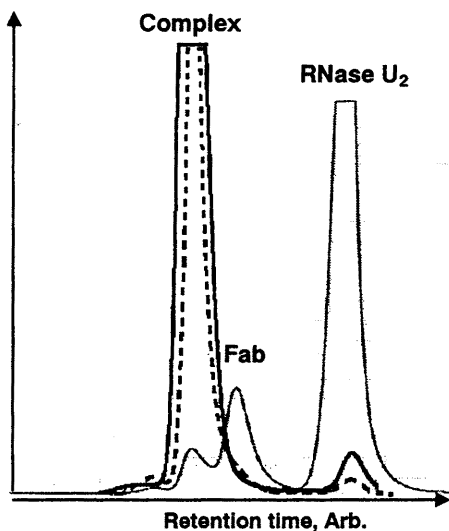


図 2. 3B62 Fab と RNase U₂ の複合体のゲルろ過クロマトグラフィー 細線は 2a, 破線は 2b, 太線は 2c を付加させた RNase U₂ を用いた。

ゲルろ過クロマトグラフィーによると NIP を付加させた RNase U₂ では Fab との会合が弱いですが, グリシンとβアラニンをリンカーとして付加した RNase U₂ では安定な Fab との複合体形成が認められた(図 2)。

各 Fab と, リンカーをグリシンとβアラニンとした NIP 誘導体を付加した RNase U₂ の組み合わせで, 計 4 種類の複合体を調製し, 結晶化サ

ンプルとして用いた。

【X 線結晶構造解析】 結晶化条件のスクリーニングの結果, NIP-βアラニンを付加した RNase U₂ と N1G9 Fab の複合体について, ポリエチレングリコール(PEG)8000 を沈殿剤として, pH 7.0 で六方晶系の結晶 (I 型) が得られた。また, PEG400 を沈殿剤として, 50 mM CdCl₂ 存在下 pH 4.6 で斜方晶系の結晶 (II 型) が得られた。銅 K α 線を用いて X 線回折強度データを収集し, N1G9 の Fab と RNase U₂ それぞれの結晶構造を初期構造モデルとして分子置換法を適用し, プログラ

表 1. 結晶学的データと精密化

	N1G9 Fab-RNase U ₂ (I型)	N1G9 Fab-RNase U ₂ (II型)	3B62 Fab	3B62 Fab-NP
空間群	<i>P</i> 6 ₁ 22	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁	<i>P</i> 2 ₁
格子定数	<i>a</i> = 80.5 Å <i>c</i> = 437.4 Å	<i>a</i> = 88.8 Å <i>b</i> = 212.4 Å <i>c</i> = 82.4 Å	<i>a</i> = 64.9 Å <i>b</i> = 63.8 Å <i>c</i> = 59.2 Å β = 107.6°	<i>a</i> = 61.8 Å <i>b</i> = 63.0 Å <i>c</i> = 59.3 Å β = 106.6°
分解能	3.2 Å	3.0 Å	2.1 Å	1.8 Å
観測反射数 / 独立反射数	67,185 / 14,013	61,952 / 27,194	124,492 / 27,146	151,666 / 38,317
観測した反射の完全性	0.926	0.866	0.998	0.954
<i>R</i> / <i>R</i> _{free}	0.282 / 0.349	0.239 / 0.303	0.194 / 0.233	0.210 / 0.245

△ *CNS*を用いて結晶学的構造精密化を行った。非対称単位あたり、I型は N1G9 Fab と RNase U₂ を 1 分子ずつ含み、II 型はそれぞれ 2 分子ずつ含む。

3B62 Fab 単独では PEG6000 を沈殿剤として、pH7.0 で単斜晶系のネーティブ体結晶が得られた。ネーティブ体については 277K で、4-hydroxy-3-nitrophenylacetic acid (NP) をソーキングした複合体結晶については 100 K で銅 *K*α線を用いて回折強度データを収集し、抗体 N1G9 の Fab をモデル分子として分子置換法により解析を進めた。以上の結果を表 1 にまとめて示す。

【複合体構造とその考察】 I 型、II 型結晶の結晶格子内での分子充填を図 3 に示す。距離 3.5 Å 以内の原子間接触が、I 型では Fab 分子間が 38 ケ所、Fab-RNase 分子間が 12 ケ所、RNase 分子間が 1 ケ所であるのに対し、II 型結晶では Fab 分子間が 66 ケ所、Fab-RNase 分子間が 46 ケ所、RNase 分子間が 30 ケ所存在する。すなわち II 型結晶は、N1G9 Fab と RNase U₂ の双方ともに密に隣

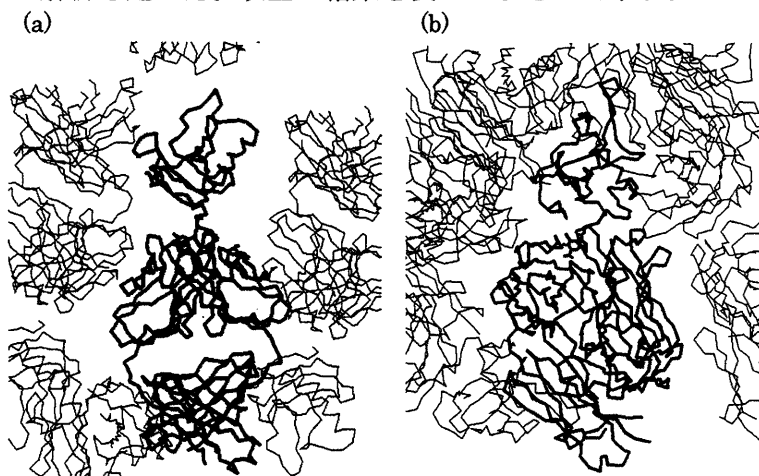


図 3. N1G9 Fab - RNase U₂ 複合体結晶の分子充填
(a) I 型, (b) II 型

接分子と接触しているのに対し、I 型結晶の分子充填には主に Fab が関わっており、RNase 周辺には広い空間が存在している。I 型結晶の Fab の分子充填の間隙は、*a-c* 面内に 35 × 45 Å² という広さで、その垂直方向に伸びた空間を形成し、RNase はこの空間に収納されている。II 型結晶の分子充填はこの複合体固有と考えられるが、I 型結晶の分子充填は Fab の性質に依存するところが大きい。すなわち、難結晶性の蛋白質に関しても、Fab の結晶性を利用することができると考えられる。

II 型の 2 つの複合体構造と、I 型の複合体構造を抗原結合に関わる Fab のアミノ酸残基で重ねた結果を図 4 に示す。II 型の構造間では、RNase U₂ の向きはほぼ同じで、相互に主鎖α炭素の位置が 2 ~ 7 Å 異なる。I 型では、Fab と RNase 間の相対配置が II 型と比較すると、RNase U₂ の向きは約 74° 回転し、重心の並進位置が 15 Å と 17 Å 異なる。この相対配置の差異は、リンカー部βアラニンのフレキシブルなコンフォメーション

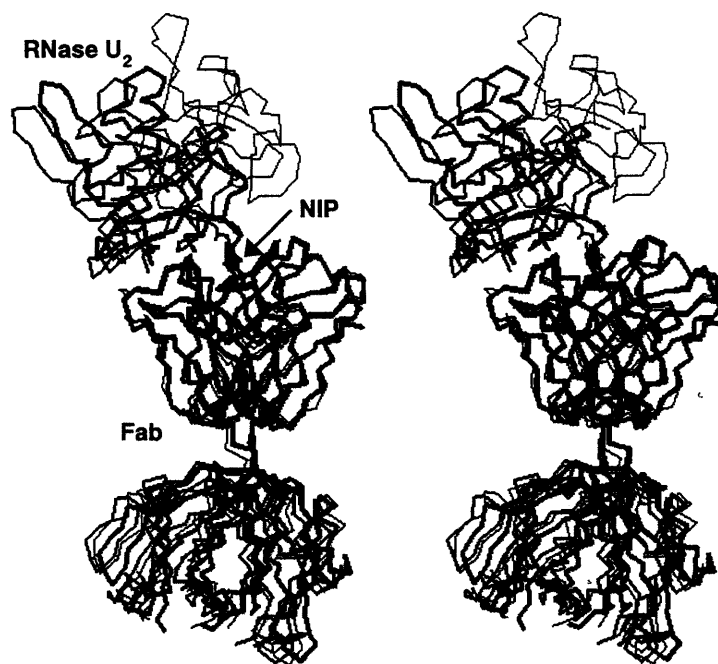


図 4. 複合体の全体構造のステレオ図。細線は I 型、太線と中線は II 型の 2 つの構造を表す。抗原結合に関わる Fab のアミノ酸残基で重ねた。

に帰結される。

NIP- β アラニン部分とその差フーリエ合成電子密度を図5に示す。NIP部分はFabの抗原結合部位のポケットに入り込み、密なvan der Waals接触と6本の水素結合を形成している。一方、 β アラニンとそれに続くRNase部分はFab原子との接触が少なく、先に述べた結晶系の違いに応じた異なるコンフォメーションを可能にしている。

また、3B62 Fabの結晶構造とRNase U₂-N1G9 Fabの複合体構造を比較することで、抗ニトロフェノール抗体のハプテン単体に対する認識様式と、本来の免疫源である、ハプテンを付加した蛋白質に対する認識様式の違いを考察した。

【今後の展望】 化学修飾による抗体結合能の付与は、実際に適用できる蛋白質に制限がある。一方、薬物受容体など、親和性の高いリガンドが存在する蛋白質に関しては、リガンドと抗体のハプテンを化学的に結合させることで、その蛋白質と抗体の両方に結合するbi-functionalなリガンドを作製することが可能である。このbi-functionalリガンドは既知の蛋白質のみならず、リガンドしか知られていない未知の蛋白質に対しても適用可能であり、プローブとしての抗体の適用範囲を広げる。そこで、bi-functionalなリガンドの適用を試みるため、*Pichia pastoris*を用いてヒト β_2 アドレナリン受容体を大量に発現させ、受容体の三次元構造の解明に向けて研究を進めた。ハプテンNIPとヒト β_2 アドレナリン受容体のアンタゴニストAlprenololをリンカーでつなげた化合物NBCCAについて、bi-functional能の有無を調べた。抗体3B62と受容体の混合液についてNBCCAの存在下、非存在下でゲルろ過クロマトグラフィーを行い、挙動に及ぼす影響を調べた結果、NBCCA存在下では両者間の相互作用が示唆された。



図5. NIP- β アラニン部分の電子密度と主鎖Ca原子のトレース。NIPの結合に関わるFab(細線)のアミノ酸残基の側鎖をスティックモデルで、RNase U₂を太線で示す。