

審査の結果の要旨

氏名 野田 展 生

抗原に対する免疫によって得られる抗体の分子認識能は広範に利用されている。本論文は、特定の抗原リガンドに対する高親和性を有する抗体について、リガンドを化学修飾により標的の蛋白質に付加し、抗体への結合能を付与する新たな概念を提供している。

蛋白質のX線結晶構造解析による構造生物学では、シンクロトン放射光の利用や近年の計算機科学の発達などにより、解析の精度とスピードが飛躍的に向上している。しかしながら、蛋白質の結晶化の段階は未だ試行錯誤に頼る、時間と労力を要する過程に留まっている。本論文の研究では、この結晶化を迅速かつ効率的に行う新しい方法の開発を目指して、蛋白質の化学修飾による抗体結合能の付与を達成し、高親和性抗体のFabフラグメントとの複合体を調製し、複合体の結晶化とX線解析を行った。さらに、この概念を発展させ、7回膜貫通型受容体のリガンドと抗原ハプテンとを連結することにより、受容体を特定の抗体に結合させる方法を展開した。

抗体への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、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ている。まず、ダンシル (DNS) 化合物に対して $10^6 \sim 10^8 M^{-1}$ の親和性を持つマウス抗ダンシル抗体をプローブとして活用するため、RNase U_2 のアミノ末端に DNS クロライドを反応させてダンシル化 RNase U_2 を得た。しかし、抗ダンシル抗体のFvフラグメントについては安定な複合体の形成は認められなかった。これは、RNase U_2 と DNS の間にリンカーを必要とするため、また、Fv のドメインが解離し易いためと考えられる。

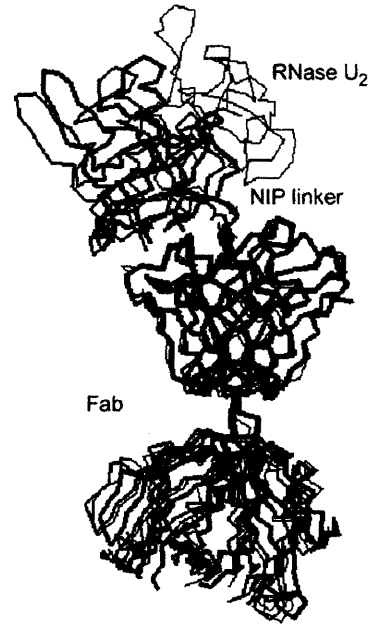
マウス抗ニトロフェノール抗体は 4-hydroxy-3-iodo-5-nitrophenylacetic acid (NIP) に対して $10^6 \sim 10^8 M^{-1}$ の親和性を示す。スクシンイミドを利用したカップリング反応により NIP を、さらに、NIP にリンカーとしてグリシンとβアラニンを導入した各誘導体を RNase U_2 のアミノ末端に付加した。これら化学修飾 RNase U_2 の RNA 切断活性を測定し、80%以上の活性を保持することを示した。ゲルろ過クロマトグラフィーにより、NIP 付加 RNase U_2 では抗体 Fab との会合が弱い、NIP-グリシン付加 RNase U_2 と NIP-βアラニン付加 RNase U_2 では Fab との安定な複合体が得られることを示した。

抗体 Fab と付加体 RNase U_2 の複合体の結晶性と結晶構造を検討するため結晶化条件を広く探索し、一次応答 N1G9 抗体 Fab と NIP-βアラニン付加 RNase U_2 との複合体について、ポリエチレングリコール (PEG) 8000 の結晶化剤による六方晶系の結晶 (I 型) と、PEG400 の結晶化剤による斜方晶系の結晶 (II 型) を得た。銅 $K\alpha$ 線を用いて X 線回折強度データを収集し、N1G9 Fab と RNase U_2 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、結晶学的構造精密化を行った。I 型は非対称単位あたり複合体 1 分子、II 型は複合体を 2 分子含み、併せて 3 種の複合体の構造が得られた。また、高親和性を示す二次応答 3B62 抗体 Fab について単斜晶系の結晶を得た。この結晶に

4-hydroxy-3-nitrophenylacetic acid (NP) をソーキング法で導入した NP 複合体結晶を調製し、これら結晶も分子置換法により解析を行っている。その結果、二次応答抗体での高親和性を三次元構造に基づいて検討することが可能となった。

I型とII型の結晶の結晶格子内での分子充填を見ると、I型結晶の分子充填には主に Fab が関わり、RNase U₂ 周辺に広い空間が存在しているのに対し、II型結晶では Fab と RNase U₂ の双方ともに密に隣接分子と接触している。そこで、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く、難結晶性の蛋白質に関しても、Fab の結晶性を利用できると結論している。

図は I 型の構造を細線で、II 型の 2 構造を太線と中太線で表し、Fab のアミノ酸残基で重ね併せたものである。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、リンカー部のβアラニンの柔軟なコンフォメーションに由来すると考察している。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ことも判明した。さらに、3B62 抗体 Fab の結晶構造の比較により、NP ハプテン単体の認識様式と、本来の免疫源であるハプテン付加蛋白質に対する認識様式の違いを考察している。



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連結した双官能性リガンドを作製できれば、その蛋白質を抗体に結合させることが可能となる。この双官能性リガンドは既知の蛋白質のみならず、未知の蛋白質に対してもリガンドを介した抗体による探索などにも適用可能であり、プローブとしての抗体の適用範囲を広げる。研究ではこの概念を提案するとともに、酵母 *Pichia pastoris* を用いるヒトβ₂アドレナリン受容体の大量発現系を構築し、実際にアンタゴニスト Alprenolol と NIP をリンカーで連結した双官能性リガンドと抗体 3B62 を用いて、抗体を受容体へのプローブ化できることを示した。これは、受容体の三次元構造の解明に向けた構造生物学的な研究を大いに進展させるものと期待される。

本論文の研究は、抗原リガンドを化学修飾により標的の蛋白質に付加し、リガンドへの高親和性を有する抗体への結合能を付与する新たな概念を提供し、化学修飾蛋白質と抗体 Fab の複合体の結晶化と X 線解析により概念を実証し、その有用性を示している。さらに、ヒトβ₂アドレナリン受容体の大量発現系を構築し、抗体への結合能を双官能性リガンドにより受容体に付加させている。したがって、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）の学位の授与に値すると判定した。