

論文の内容の要旨

論文題目 抗 DNA (6-4) 光産物抗体 64M-5 の dT(6-4)T の認識に
関する構造生物学的研究

氏 名 林 田 直 樹

DNA は紫外線の照射により様々な損傷を受け、細胞死や突然変異、皮膚癌の原因となることが知られている。中でも、254 nm の紫外線の照射を受けることにより生じる (6-4) 光産物は突然変異能が高く、疾病との関連でも注目されている。64M-5 はこの (6-4) 光産物に対して樹立された抗体であり、癌化や突然変異の研究において (6-4) 光産物の検出や定量に用いられている。

現在、(6-4) 光産物の認識機構に関する知見はまだ少ない。本研究は X 線結晶構造解析の手法により、第一に 64M-5 の認識機構を (6-4) 光産物 2 量体 dT(6-4)T をリガンドとして明らかにし、第二に、その過程において発見された同抗体におけるイソアスパラギン酸の生成と、64M-5 の dT(6-4)T に対する結合定数の低下の機構について考察した。

1 64M-5 Fab 画分の調製

マウスハイブリドーマを約 1 ヶ月間培養した後、その培養上清から Protein A カラムを用いたアフィニティ精製により 64M-5 IgG を得た。次に、酵素パパイニンによって IgG を限定切断し、この切断産物から陰イオン交換カラム Mono Q によって Fab を得た。続いて陽イオン交換カラム Mono S、ゲルろ過カラム Superdex 75 によって Fab の精製は行われ

たが、Mono S による精製段階において、64M-5 Fab は 2 つの主要な画分 Fr. 1 と Fr. 2 として得られた。

これら 2 つの画分は、その Mono S による溶出時間の違いから化学的性質の異なることが考えられ、その性質を明らかにするために実験を行った。まず、Fr. 2 をハイブリドーマ培養時と同じ 37 °C、pH 7.5 の生理的条件下にてインキュベートし、その変化を Mono S を用いて調べたところ、Fr. 1 相当の画分を生じることがわかった。また、その生成量は経時的に増加し、インキュベート後 31 日では約 60 % が Fr. 1 に変化していた。このことから、Fr. 1 は Fr. 2 が自己触媒的な反応によって変化した画分であることが考えられた。

2 isoAsp 28L の同定

生理的条件下で自己触媒的に進む反応として、タンパク質中のアスパラギン (Asn) がその側鎖の脱アミド化によってスクシンイミドと呼ばれる環状構造へと変化し、さらに水分子が付加することによってイソアスパラギン酸 (isoAsp) を生じる反応が知られている。このため、Fr. 1 と Fr. 2 における isoAsp の有無を、イソアスパラギン酸メチル基転移酵素の特異的反応を利用して調べたところ、Fr. 1 からは isoAsp が検出されたが Fr. 2 からは検出されなかった。

次に、相補性決定領域 (CDR) において Asn 残基が isoAsp に変化し易いと考えられる Asn 28L-Gly 29L の配列が存在したため、この部位における isoAsp の同定を目的としてペプチドマッピングを行ったところ、この配列を含む分子量 3,029 のペプチド断片が得られた。また、Fr. 1 に由来するこのペプチド断片から isoAsp が検出された。さらにこの Fr. 1 由来の断片をエドマン分解したところ、28L 部位においてその反応サイクルが停止した。これらのことから、Fr.1 において isoAsp 28L が存在することが明らかとなった。

Fr. 1 CDR において isoAsp 28L が同定されたため、そのイソアスパラギン酸の生成と抗体の親和性との関係を調べることを目的として、dT(6-4)T をリガンドとして結合定数の測定を行ったところ、Fr. 1 は $5.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、Fr. 2 は $9.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ の値を示し、Fr. 1 の結合定数は Fr. 2 の約 20 分の 1 であることが明らかとなった。このことから、CDR におけるイソアスパラギン酸の生成により、抗体の結合定数の低下が生じていることが考えられた。

3 X線結晶構造解析

次に、64M-5 による (6-4) 光産物の認識機構の解明、および抗体の構造と結合定数に及

ばすイソアスパラギン酸の生成の影響を考察することを目的とし、X線結晶構造解析を行った。また、Fr.1にはイソアスパラギン酸が含まれる一方、Fr.2には含まれないことから、Fr.1を *Isoaspartate form*、Fr.2を *Native form* とした。それぞれの画分についてリガンド結合体と非リガンド結合体の結晶構造解析を行ったため、合計4種類の構造解析が行われた。リガンドには dT(6-4)T が用いられた。

4 CDR L1 の構造変化

Native form と *Isoaspartate form* を非リガンド結合体、リガンド結合体ごとに V ドメインで主鎖を重ねあわせたところ、6つの CDR のうち、L1において構造の差異が非リガンド結合体、リガンド結合体のいずれにおいても認められ、C α 原子の距離で比較すると、非リガンド結合体では Ser 27eL でもっとも大きく 5.8 Å、リガンド結合体では His 27dL で最も大きく 5.0 Å 離れていた。このことから、イソアスパラギン酸生成によって主鎖構造が変化することが考えられた。

CDR L1 に注目すると、構造が大きく異なっているのは Asn 27aL から Tyr 30L までの 8 アミノ酸残基であった。この部位には Asn 28L と isoAsp 28L がそれぞれ含まれており、電子密度でもその構造が示唆された。*Native form* におけるこの 8 残基の *B-factor* は非リガンド結合体で 22.8 Å²、リガンド結合体で 25.0 Å² であったのに対し、*Isoaspartate form* では 49.4 Å² と 76.3 Å² であった。このことから、イソアスパラギン酸の生成によって構造が不安定化することが示唆された。また、非リガンド結合体の構造を比較すると、*Native form* L1 と *Isoaspartate form* L1 とでは主鎖間で形成される水素結合を担うアミノ酸残基が異なっており、この水素結合様式の変化をとともなう L1 ループの構造変化が、側鎖の方向ならびにアミノ酸残基の位置を変えていることが考えられた。

5 dT(6-4)T の認識機構

Native form リガンド結合体の結晶構造から、64M-5 による (6-4) 光産物の認識機構を考察した。抗原結合部位は CDR L1、L3、H1、H2、H3 によって構成され、ポケット様の構造を持っていた。そのポケットは底部が Arg 95H と His 35H の側鎖、側壁が His 27dL、Tyr 32L、His 93L、Trp 33H、Thr 58H、Tyr 97H と Tyr 100iH の側鎖によって形成され、内部には 2 つの水分子 33 と 48 が、側壁近傍には水分子 93 が存在する。認識は、特徴的な van der Waals 相互作用、水素結合、静電相互作用によって行われ、van der Waals 相互作用

用は Tyr 32L の側鎖と 5'-deoxyribose 間、Trp 33H の側鎖と 3'-pyrimidone 間で、水素結合は His 93L の側鎖ならびに主鎖とリン酸基間、His 35H の側鎖と 3'-pyrimidone 間、Thr 58H の側鎖と 3'-deoxyribose 間、水分子 93 を介して 5'-pyrimidine と Trp 33H の主鎖間で、静電相互作用は His 27dL の側鎖とリン酸基間で形成されている。

非リガンド結合体とリガンド結合体の重ね合わせから、(6-4) 光産物認識にともなう構造変化について考察した。Native form の重ね合わせでは、H 鎖 CDR に変化はほとんどない一方、CDR L1 は Tyr 32L の位置は同じであるが Asn 28L の位置は約 1.0 Å 異なっており、His 27dL の側鎖は約 45° 回転していた。また、His 93L の変化は大きく、 χ_1 角と χ_2 角をそれぞれ約 190°、90° 回転させることによりその側鎖をリン酸基と水素結合可能な位置に変化させていた。Isoaspartate form においても同様の変化が認められるが、CDR L1 に isoAsp 28L が存在することにより、Tyr 32L の側鎖もリガンド結合にともなって約 90° 回転している。このように、64M-5 は主に L 鎖のアミノ酸残基を構造変化させることによりリガンド認識を行っている。

6 dT(6-4)T に対する結合定数の低下の機構

Native form と Isoaspartate form のリガンド結合体の重ね合わせから、Isoaspartate form の結合定数の低下の機構を考察した。CDR L3、H1、H2、H3 に含まれるアミノ酸残基の構造に相違はほとんどない。構造の相違が存在するのは CDR L1 で、Tyr 32L の構造はほぼ同一であるが、Native form においてリガンドリン酸基と静電相互作用している His 27dL が、Isoaspartate form ではリン酸基から離れた位置に存在し、Native form と同一の相互作用は失われている。Isoaspartate form の dT(6-4)T に対する結合定数の低下は、このような His 27dL とリガンドリン酸基間の静電相互作用が失われることにより起こると考えられる。

本研究による 64M-5 の結晶構造の解析は、これまで行われてきた抗体による (6-4) 光産物認識についての研究に重要な知見を与え、すでに報告されたこれらの実験結果の機構についての考察を進展させた。またそのイソアスパラギン酸を含む画分の結晶構造の解析は、イソアスパラギン酸を持つ抗体の結晶構造報告の最初の例であり、抗体におけるイソアスパラギン酸生成によって生じる結合定数の低下の機構を立体構造から考察した点で重要である。