

審査の結果の要旨

氏名 林 田 直 樹

紫外線の照射によって生ずる損傷 DNA の 1 つである(6-4)光産物は、隣接する 2 つのピリミジン塩基の C6 位と C4 位が共有結合した特異な化学構造を有する。抗体は体液性免疫における主要な構成因子であり、その高い特異性は医薬でも利用され、損傷 DNA の検出にも用いられている。本論文の研究では、突然変異の誘発能が高い DNA の(6-4)光産物を特異的に認識するマウスの抗体 64M-5 について、ジヌクレオチド光産物 dT(6-4)T との複合体の三次元構造を X 線結晶構造解析により解明した。さらに、この抗体ではアスパラギンがイソアスパラギン酸（以下では isoAsp と記す）へ変化してリガンドとの結合定数が低下することを見だし、isoAsp を含む抗原結合部位の構造と結合定数の低下との関連を三次元構造に基づいて考察している。

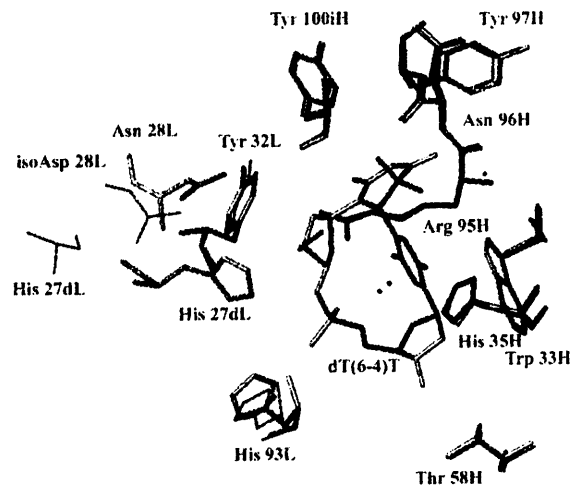
研究では、抗体 64M-5 を産生するハイブリドーマを約 1 月間培養した後、分子質量約 45 kDa の抗原結合部位フラグメント Fab を調製し、精製した。陽イオン交換カラム Mono S よる精製段階において、Fab は 2 つの主要な画分 Fr. 1 と Fr. 2 として得られた。これら画分の性状を調べたところ、Fr. 1 においては、相補性決定領域 CDR の L1 鎖に存在する Asn 28L（L は軽鎖、H は重鎖のアミノ酸残基を示す）が isoAsp に変化していることが明らかになった。さらに、dT(6-4)T に対する結合定数を蛍光消光法によって調べ、Fr. 1 の結合定数は $5.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、Fr. 2 のそれは $9.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ と、isoAsp 28L を生じた Fr. 1 の結合定数が Fr. 2 の約 1/20 に低下することを示した。

抗体 64M-5 による dT(6-4)T リガンドの認識の機構と、結合定数の低下の機構を解明するため X 線結晶構造解析を進めた。Fr. 1 の Isoaspartate 型と Fr. 2 の Native 型の試料それぞれについて、dT(6-4)T と結合したりガンド結合体とリガンド非結合体の結晶を得て、分子置換法によりこれら 4 種類の結晶構造を解析している。

Native 型リガンド結合体の構造から、抗原結合部位は CDR の L1, L3, H1, H2, H3 によって構築され、ポケット様の構造を有することが明らかになった。図（太線の構造は Native 型、細線の構造は Isoaspartate 型、丸印は dT(6-4)T リガンドと抗体の原子の間で水素結合している水分子を表す）に示すように、そのポケットの底部は Arg 95H と His 35H、側壁の一方は His 27dL, Tyr 32L と His 93L、他方は Trp 33H, Thr 58H, Tyr 97H と Tyr 100iH の側鎖によって形成され、その内部には水 2 分子が、側壁近傍には水 1 分子が存在し、リガンドとの相互作用に関わっている。リガンドの認識には、5' deoxyribose と Tyr 32L の側鎖、3' pyrimidone 塩基と Trp 33H の側鎖との間の van der Waals 相互作用、リン酸基と His 93L の側鎖ならびに主鎖との間、3' pyrimidone と His 35H の側鎖との間、3' deoxyribose と Thr 58H の側鎖との間、水分子を介した 5' pyrimidine 塩基と Trp 33H の主鎖との間の水素結合、リン酸基と His 27dL の側鎖との間の静電相互作用が主に寄与している。

Native 型と Isoaspartate 型のリガンド結合体の抗原結合部位を比較すると、CDR の L3,

H1, H2, H3 に存在する残基の構造はほぼ同一であるが, Native 型の L1 の His 27dL 側鎖は dT(6-4)T のリン酸基と静電相互作用しているのに対して, Isoaspartate 型では側鎖の配向が異なったものとなり, 有意な相互作用は存在しない。



Native 型と Isoaspartate 型のリガンド非結合体において, CDR L1 に含まれるアミノ酸残基の主鎖の二面角値は大きく異なり, Val 27cL, His 27dL, Ser 27eL の側鎖は互いに反対の方向となっている。また, 主鎖間で形成される水素結合が, Native 型では His 27dL と Gly 29L および Tyr 30L の間の 2 本であるのに対して, Isoaspartate 型では Ser 27eL と Tyr 30L の間の 2 本となっている。Native 型に認められる Asn 27aL の側鎖と Asn 28L の側鎖が形成する 3 本の水素結合は, Isoaspartate 型では存在しない。Isoaspartate 型の isoAsp 28L はカルボキシル基の酸性の側鎖を有している。isoAsp 28L は, Asn 28L の側鎖でのデアミデーションから環状のスクシンイミドの中間体が生じ, スクシンイミドの加水分解による環の開裂を経由して生じると考えられる。この過程で, スクシンイミド中間体の形成によって, Asn 28L の側鎖が関与する水素結合, そして His 27dL と Gly 29L の主鎖の間の水素結合が失われて L1 の構造が不安定となり, 次に, スクシンイミドの開裂によって Val 27cL, His 27dL と Ser 27eL の側鎖の向きが反転し, 最終的に Ser 27eL と Tyr 30L の主鎖の間に水素結合が形成され, isoAsp 28L を含んでいる L1 の構造が安定なものになると提唱している。これらのことから, Isoaspartate 型での結合定数の低下は, His 27dL の配向の変化を伴う, L1 での isoAsp 28L の生成に起因すると結論している。

本論文の研究では, 抗 DNA (6-4)光産物抗体 64M-5 において, Fab でのイソアスパラギン酸の生成と, Isoaspartate 型 Fab の dT(6-4)T リガンドに対する結合定数の低下を見だし, さらに, Native 型と Isoaspartate 型それぞれのリガンドとの結合体と非結合体の三次元構造を詳細に解析した。その結果, 抗体による(6-4)光産物の認識機構と, イソアスパラギン酸への変化による親和性の低下を三次元構造に基づいて明らかにできた。抗体におけるイソアスパラギン酸生成に関する知見は, モノクローナルまたはリコンビナントの抗体医薬で生じうる変性と結合定数の低下などの可能性を指摘している。よって, 本論文は, 蛋白質と損傷 DNA の構造生物学および蛋白質工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。