

論文の内容の要旨

論文題目 長鎖 DNA (6-4)光産物の三次元構造と抗体による認識機構

氏 名 横山 英志

DNA は紫外線の照射により様々な損傷を受け、損傷が突然変異や細胞の癌化を生ずる。そのような損傷 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している(Fig. 1)。そして高い突然変異の誘発能を持ち生体に重篤な影響を及ぼす損傷 DNA であるにも関わらず、ジヌクレオチド dT(6-4)T のみならず(6-4)光産物を内包する長鎖の DNA に関する

三次元構造の知見はほとんど得られていなかった。

(6-4)光産物を認識するマウス由来の抗体 64M-2 と 64M-5 はそれぞれ IgG2a (κ)と IgG1 (κ)のサブクラスに属し、(6-4)光産物に対し 64M-5 の方が約 100 倍高い親和性を示す。抗体の抗原結合フラグメント Fab は可変領域 V_L と V_H と定常領域 C_L と C_H1 の 4 つのドメインからなる。修士課程で抗体

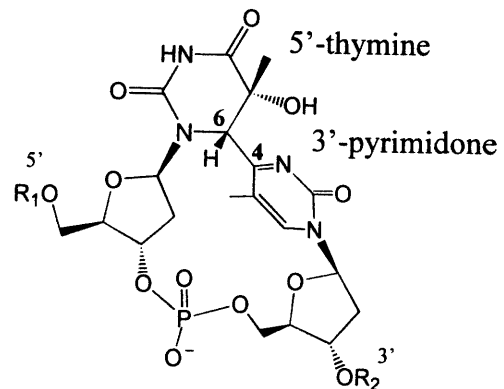


Fig. 1. T(6-4)T光産物

64M-2 の Fab と dT(6-4)T のとの複合体構造を明らかにしたが⁽¹⁾, これらの抗体は dT(6-4)T だけでなく, T(6-4)T 部位を含む長い DNA 鎖, および二本鎖 DNA とも結合する。

長鎖 DNA (6-4)光産物の三次元構造と, 抗体による認識機構の解明を目的として T(6-4)T 部位を内包するテトラヌクレオチド dTT(6-4)TT, および二本鎖 DNA について抗体 Fab との複合体の X 線結晶構造解析を行った。

【X線結晶構造解析】

64M-2 Fab の dT(6-4)T との複合体に基づいて, dTT(6-4)TT との複合体⁽²⁾ の構造を解析した (Table 1)。二本鎖(6-4) DNA と 64M-5 Fab との複合体については, 結晶化剤液として 12%ポリエチレングリコール 3350, 0.1 M 酢酸マグネシウム, 10 mM [Co(NH₃)₆]Cl₃, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 を用いることで, 平板状の結晶が得られた。64M-5 Fab を初期構造とする分子置換法により複合体構造を決定した (Table 1)。

Table 1. X線回折データ収集と結晶構造の精密化

	dTT(6-4)TT 64M-2 Fab	二本鎖(6-4)DNA 64M-5 Fab
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	<i>P</i> 4 ₃ 2 ₁ 2
Cell parameters	<i>a</i> = 73.6 Å, <i>b</i> = 137.3 Å, <i>c</i> = 49.6 Å	<i>a</i> = 68.5 Å, <i>c</i> = 243.6 Å
Resolution range (Å)	10.0-2.4	12.0-3.0
Reflections observed / unique	89,848 / 17,570	91,948 / 12,271
<i>R</i> merge (<i>I</i>) / Completeness	0.077 / 0.920	0.097 / 0.988
<i>R</i> (<i>R</i> _{free})	0.21 (0.27)	0.28 (0.36)

【64M-2 Fab と dTT(6-4)TT との複合体構造】

dTT(6-4)TT の 4 つの thymidine を 5'末端から T1, T2, T3, T4 と示す。T(6-4)T 部位は 5'-thymine 塩基 (T2)と 3'-pyrimidone 塩基 (T3)とが(6-4)結合して環状の構造をとっている(Fig. 2)。T2 塩基は半いす型, T3 塩基はほぼ平面状のコンフォメーションをとっている。これら 2 つの塩基がつくる平面は 77°とほぼ直交している。このような特徴は 64M-2 Fab と dT(6-4)T (以下 d2mer)との複合体構造⁽¹⁾でも共通して見られる。T(6-4)T 部位の 2 つの塩基はそれぞれ Arg 95H と His 35H の塩基性側鎖と水素結合している。また T2 塩基の近くには Tyr 100iH が位置し, T3 塩基は Trp 33H のインドール環とほぼ平行に位置し van der Waals (vdW) 相互作用している。このような相互作用は d2mer 複合体にも同様な配置で存在する。

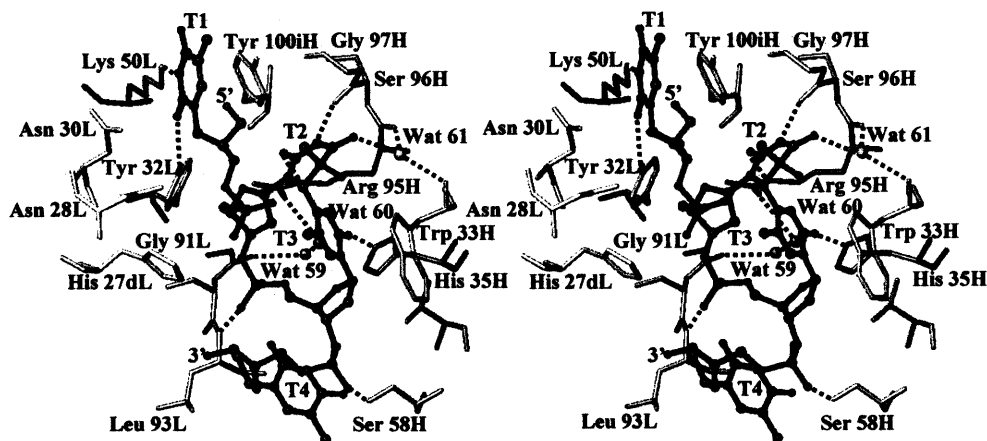


Fig. 2. 64M-2 FabとdTT(6-4)TTの複合体の抗原結合部位 (ステレオ図, 点線は水素結合)

T(6-4)Tの先の5'側のリン酸基には His 27dL が静電相互作用しており, 3'側のリン酸基には Ser 58H が水素結合している。T1 塩基には Tyr 32L と Lys 50L が水素結合し, Tyr 100iH が vdW 接触している。一方, T4 塩基には近傍のアミノ酸残基との密な接触は認められない。64M-2 Fab は, d2mer よりも d4mer に対して高い親和性を示し, T(6-4)T 部位の両端のリン酸基と 5'末端の塩基との相互作用がこの高親和性に寄与している。

【二本鎖(6-4)DNA と Fab との複合体の調製】

紫外線を照射した一本鎖 DNA を抗体 64M-2 の Fab との複合体とする。複合体から 6M urea と熱処理により Fab を除いた後, 相補鎖の DNA を加えて二本鎖(6-4) DNA とする。一本鎖(6-4) DNA と 64M-2 Fab との複合体, および二本鎖(6-4) DNA は, それぞれ DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィーにより目的のピークを分取することで精製した。

14 塩基対と 18 塩基対と 21 塩基対の二本鎖(6-4) DNA と抗体 64M-2 または 64M-5 の Fab との複合体の形成能を DEAE およびゲルろ過クロマトグラフィーなどにより検討したところ, 18 塩基対の二本鎖(6-4) DNA (ds18) と 64M-5 の Fab を用いた場合に複合体が得られることが分かった。そ

Table 2. 調製した二本鎖(6-4) DNAの一部

略称	配列			
	1	8	9 10 11	18
ds18C	5'---	GCGAGTGA (T^T)	ATGGACGG	---3'
	3'---	GCTCACT A A	TACCTGCC	---5'
ds14	GCGTGA (T^T) ATGGAC			
	CGCACT A A TACCTG			
ds18	GCGAGTGA (T^T) ATGGACGG			
	CGCTCACT A A TACCTGCC			

して複合体の結晶化用試料を大量に調製するため、Fig.3 のスキームを考案して複合体を調製した。様々な配列、鎖長の DNA を用いて

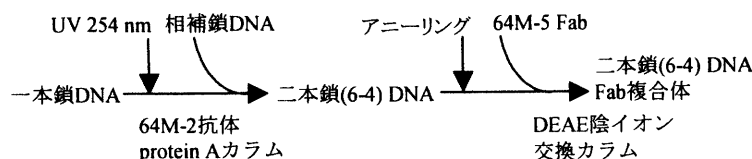


Fig. 3. 複合体調製スキーム

複合体の結晶化を行ったところ、Table 2 の ds18C の配列の二本鎖(6-4) DNA と 64M-5 Fab との複合体サンプルから X線解析に適する結晶が得られた。

【二本鎖(6-4) DNA と Fab との複合体構造】

T(6-4)T 部位を含む中央の 5 塩基とそれらの相補鎖は塩基対を形成しておらず、これら 5 塩基と相補鎖との間に Fab の相補性決定領域 CDR の L1 ループが貫入している (Fig. 4)。DNA 二本鎖はこの部位で約 90°折れ曲がっている。両端側の 5'側の 5 塩基と 3'側の 7 塩基は B 型の二本鎖 DNA 構造を形成している。

T(6-4)T 部位は Fab の結合ポケットの底部に埋もれたように結合している。64M-5 Fab による T(6-4)T 部位の認識には His 35H と Arg 95H の塩基性側鎖による水素結合、および Trp 33H と Tyr 100iH の芳香性側鎖との vdW 接触などが 64M-2 Fab と共通して見られる (Fig. 5)。さらに 64M-5 では、T9 塩基(DNA の numbering は Table 2 参照) と Tyr 97H 側鎖が vdW 接触し、リン酸基と His 93L 側鎖が静電相互作用している。

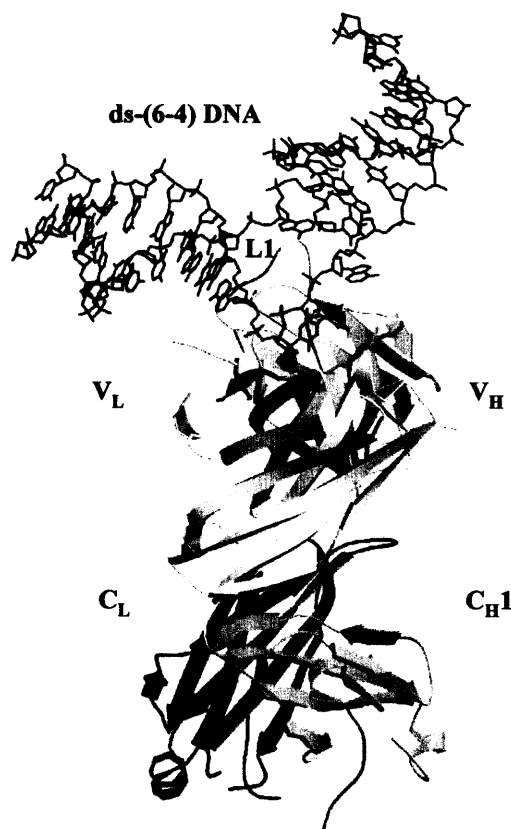


Fig. 4. 二本鎖(6-4) DNA と 64M-5 Fab (リボンモデル)の複合体構造

T(6-4)T 部位の 5'側に存在するリン酸基には His 27dL が静電相互作用し、3'側のリン酸基には Thr 58H が水素結合している。A8 塩基は Tyr 30L と Tyr 100iH の芳香性側鎖に挟まれており、Tyr 32L 側鎖と水素結合している。A11 塩基は His 93L 側鎖とほぼ平行に位置し、vdW 接触している。この A11 に相当する相互作用は 64M-2 では見られない。これら 4 ヌクレオチドのみが Fab と密な原子間接触を成している。

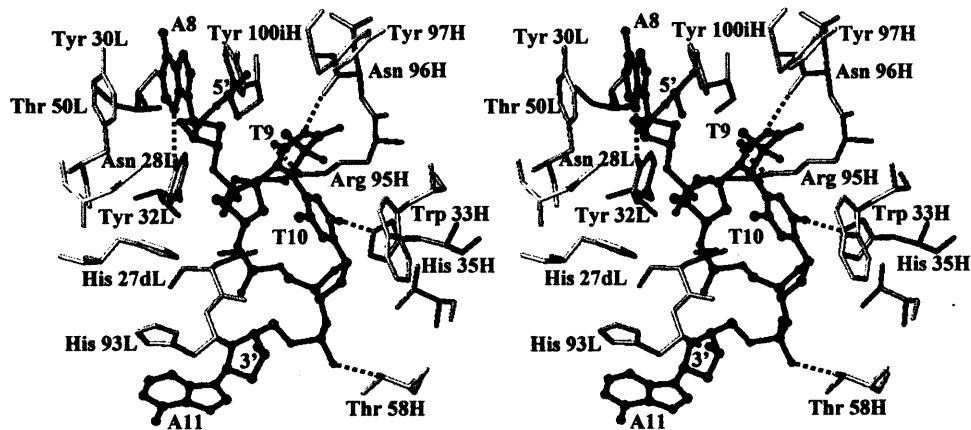


Fig. 5. 64M-5 Fabと二本鎖(6-4) DNAの複合体の抗原結合部位 (ステレオ図)

18塩基対の ds18 二本鎖(6-4) DNA と 64M-5 の Fab の複合体は、ゲルろ過クロマトグラフィーによっても解離しないが、ds18 は 64M-2 Fab から解離して溶出された。64M-2 には存在しない 64M-5 での T(6-4)T 部位の 3'側の A 塩基 (A11)との相互作用が、長鎖の二本鎖(6-4) DNA に対する 64M-5 の高い親和性に寄与していると考えられる。

14塩基対の ds14 二本鎖(6-4) DNA に Fab を加えてゲルろ過クロマトグラフィーを行うと、各々の Fab から相補鎖が解離し、一本鎖(6-4) DNA と Fab との複合体と相補鎖が溶出される。これは、14塩基対長では T(6-4)T 部位を含む 5塩基の両端側で形成される塩基対数が少なく、二本鎖としての会合が弱いためだと考えられる。二本鎖(6-4) DNA の T(6-4)T 部位両隣の塩基 (A8 と A11)は 64M-5 Fab の芳香性側鎖と vdW 接触し、それらと相補鎖の塩基間での相互作用が弱められる。抗体 64M-5 による長鎖 DNA の損傷部位の特異的認識には、ループの挿入と芳香性側鎖による T(6-4)T 部位両隣の塩基との相互作用が重要であると考えられる。

抗体 Fab と結合した二本鎖(6-4) DNA は、二本鎖 DNA が約 90°折れ曲がっていること、および損傷部位を含む 5塩基が相補鎖と塩基対を形成せず DNA 二重鎖の外側を向いていること、など特徴的な構造を示している。この DNA モデルを DNA 修復酵素 photolyase の予想される結合部位に仮想的に当てはめてみると、photolyase の予想される結合部位は分子内部にあるため、このように特徴的な構造の DNA では photolyase と立体障害を起こすことなく DNA は結合できると考えられる。

- (1) Yokoyama, H., Mizutani, R., Satow, Y., Komatsu, Y., Ohtsuka, E. & Nikaido, O. (2000). *J. Mol. Biol.* **299**, 711-723.
- (2) Yokoyama, H., Mizutani, R., Satow, Y., Sato, K., Komatsu, Y., Ohtsuka, E. & Nikaido, O. *submitted*.