

審査の結果の要旨

氏名 横山 英志

DNA は紫外線の照射によって様々な損傷を受け、損傷した DNA によって突然変異や細胞の癌化が生ずる。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し、突然変異の誘発能が高く、生体に重篤な影響を及ぼす。(6-4)光産物を認識する抗体として樹立されたマウス由来の 64M-2 と 64M-5 の抗体は、損傷部位の T(6-4)T のみならず、T(6-4)T 部位を含む長い一本鎖の(6-4)DNA と二本鎖の(6-4)DNA に結合する。しかしながら、T(6-4)T 部位を内包する長鎖の DNA に関する詳細な三次元構造の知見は全く得られておらず、蛋白質による(6-4)光産物の認識に関する構造知見も得られていなかった。本論文の研究では、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 と抗体 Fab の複合体、および、二本鎖 DNA (6-4)光産物と抗体 Fab の複合体を調製し、X線結晶構造解析によりそれぞれの三次元構造を明らかにしている。

研究では、まず、抗体 64M-2 について、分子量約 4 万 5 千の抗原結合部位フラグメントの Fab を調製し、dTT(6-4)TT との複合体の結晶を得た。その X線解析を行い、以下の構造知見を得た。

T(6-4)T 部位では、5'チミン塩基の 6 位と 3'ピリミドン塩基の 4 位の炭素原子が(6-4)結合を形成し、このジヌクレオチド部分は環状の構造をとっている。5'チミン塩基は半いす型、3'ピリミドン塩基はほぼ平面状のコンフォメーションを示し、これら塩基の近似平面は 77°とほぼ直交している。5'チミン塩基は Arg 95H (L は軽鎖, H は重鎖のアミノ酸残基を示す) の側鎖、3'ピリミドン塩基は His 35H の側鎖とそれぞれ水素結合を形成している。また、5'チミン塩基の近くには Tyr 100iH が位置し、3'ピリミドン塩基は Trp 33H のインドール環とほぼ平行に位置し、van der Waals (vdW) 相互作用が認められる。このような特徴は、先に構造を決定している 64M-2 Fab とジヌクレオチド dT(6-4)T との複合体の構造にも共通することを指摘している。

64M-2 抗体は dT(6-4)T よりも dTT(6-4)TT に対して高い親和性を示す。dTT(6-4)TT 複合体の構造では、T(6-4)T 部位の 5'側のリン酸基と His 27dL との静電相互作用、3'側のリン酸基と Ser 58H との水素結合、5'末端のチミン塩基と Tyr 32L と Lys 50L との水素結合、Tyr 100iH との vdW 接触が存在する。一方、3'末端のチミン塩基については、近傍のアミノ酸残基との密な接触は認められない。そこで、T(6-4)T 部位の両側のリン酸基と 5'末端の塩基との相互作用が dTT(6-4)TT への高親和性に寄与していると考察している。

次に、二本鎖(6-4)DNA と抗体 Fab との複合体の構造解明に向けて、二本鎖(6-4)DNA 複合体試料の大量調製法を開発している。DNA に紫外線を照射して生ずる光産物を、抗体との複合体とすることで、(6-4)光産物を選択的に精製することを可能とした。調製

した様々な鎖長の二本鎖(6-4) DNA と抗体 Fab との複合体の形成能を実験的に検討し、テトラヌクレオチド(6-4)光産物に対して 64M-2 抗体よりも約 100 倍高い親和性を示す 64M-5 抗体の Fab を用いれば、18 塩基対の二本鎖(6-4) DNA との安定な複合体が得られることを見出した。X線解析に適した複合体の結晶を得るため、塩基配列と鎖長が異なる様々な DNA を用いて複合体の結晶化を展開し、17 塩基対の両端にそれぞれ 1 塩基を付加した overhang 配列の二本鎖(6-4) DNA を用いることにより、64M-5 Fab との複合体の結晶を得ている。結晶から X線回折強度データを収集し、64M-5 Fab を初期構造とする分子置換法解析を経て、複合体の結晶構造を明らかにし、以下の知見を得た。

図に示すように、DNA 二本鎖は T(6-4)T 部位の両側で約 90°折れ曲がり、両側の 5'側の 5 塩基と 3'側の 7 塩基は B 型の二本鎖構造を形成している。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、抗体の相補性決定領域 CDR の L1 鎖がループ状になって貫入し、T(6-4)T 部位両隣の塩基が芳香性側鎖が vdW 接触している。抗体 64M-5 による特異的認識には、T(6-4)T 部位両隣の塩基との相互作用と CDR ループの貫入が寄与すると考察している。

抗体の抗原結合ポケットの底部に T(6-4)T 部位が埋もれるように結合し、T(6-4)T 部位と抗体の相互作用として、His 35H と Arg 95H の塩基性側鎖との水素結合、Trp 33H と Tyr 100iH の芳香性側鎖との vdW 接触などが 64M-2 抗体と共通して存在することを見出している。5'チミン塩基と Tyr 97H 側鎖との vdW 接触、リン酸基と His 93L 側鎖との静電相互作用が 64M-5 複合体では認められ、T(6-4)T 部位の両隣のヌクレオチドと抗体の原子間にも密な接触が存在する。その 5'側隣りに位置するリン酸基は His 27dL と静電相互作用し、そのアデニン塩基が Tyr 30L と Tyr 100iH の芳香性側鎖に挟まれながら Tyr 32L 側鎖と水素結合している。3'側隣りのリン酸基は Thr 58H と水素結合し、そのアデニン塩基は His 93L 側鎖とほぼ平行に位置し、vdW 接触している。このような 3'側隣り塩基に相当する相互作用は 64M-2 複合体では見られず、二本鎖(6-4) DNA に対する 64M-5 抗体の高い親和性には、3'側隣りの塩基との相互作用が寄与していると考察している。

本論文の研究は、二本鎖 DNA(6-4)光産物が約 90°折れ曲がり、損傷部位を含む 5 塩基が相補鎖と塩基対を形成せずに二重鎖から外側へ向くことなど、DNA(6-4)光産物の三次元構造を初めて明らかにし、また、抗体による認識の機構も併せて解明し、損傷 DNA と結合する蛋白質の認識機構に関して重要な知見を与えている。よって、本論文は、損傷 DNA と蛋白質の構造生物学および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)の学位の授与に価すると判定した。

