

論文の内容の要旨

論文題目 NMRを用いた触媒抗体 6D9 のリガンド認識機構の解析

氏名 坂倉 正義

“NMRを用いた触媒抗体 6D9 のリガンド認識機構の解析”と題する本論文は、触媒抗体 6D9 の触媒活性発現の駆動力である、基質と遷移状態に対する親和性の差が生じる要因を、NMRを用いて明らかにした研究成果について記述した論文である。本論文は、全5章から成る。第1章で研究背景、第2章で実験材料と実験方法、第3章で、実験結果、第4章で実験結果に対する考察、第5章で付加的な考察について記述した。

第1章では、まず、触媒抗体が単純化された酵素であり、酵素による反応促進機構を詳細に理解するための解析対象として有用であることを述べた。次に、6D9 の触媒活性は、遷移状態アナログ(TSA)が模倣する四面体型遷移状態を、基質と比較してより強く安定化することにより生じること、これまでに明らかにされている 6D9 と TSA の複合体の結晶構造では、6D9 による反応促進機構の全てを説明することができないことを述べた。

第3章では、第1に、大腸菌を用いた 6D9 の Fv フラグメント(6D9-Fv)の発現系の構築について述べた。大腸菌を用いて、1L 培養あたり 4~8mg の触媒活性を有する 6D9-Fv を得た。第2に、部位特異変異実験を行い、Y58(H)および W100i(H)が、TSA 認識において重要であるが、基質認識には寄与しないことを示した。第3に、ストップフローを用いた 6D9-Fv と TSA の結合反応の速度論解析を行った。この結果、6D9-Fv と TSA の結合反応が、induced-fit 型の反応であることを示した。さらに、Y58(H)A および W100i(H)A 変異体において、6D9-Fv-TSA 複合体の異性化過程が観測されないことから、Y58(H)と W100i(H)が、induced-fit 過程において重要であることを示した。第4に NMR を用いた 6D9-Fv とリガンドの相互作用解析について述べた。まず、安定同位体標識を行った 6D9-Fv を調製し、一連の三重共鳴スペクトルを解析することにより、シグナルの帰属を行った。次に、TSA および基質結合に伴う NMR スペクトルの変化を、それぞれ解析した。TSA 結合に伴う NMR シグナルの変化が観測された残基は、TSA 結合界面およびその周辺領域に広く分布した。一方、基質結合に伴う NMR シグナルの変化が観測された残基は、基質結合界面に局在した。さらに、W100i(H)A 変異体についても同様の解析を行い、リガンド結合に伴う NMR シグナルの変化が観測された残基は、リガンド結合界面に局在することを見出した。

第4章では、まず、6D9-Fv の TSA 認識機構と基質認識機構についてそれぞれ考察し、次に TSA 認識機構と基質認識機構の比較を行った。この結果、TSA 結合状態と基質結合状態との間に、(i)リガンド結合界面残基に由来する NMR シグナルの線幅の違いと、(ii) NMR シグナルが変化した残基の分布の違いが存在することを見出した。(i)から、6D9 と TSA の間において形成される強固な相互作用は、6D9 と基質の間においては形成されず、6D9 と基質の複合体は、不安定な複数の構造の集合体として存在すると考察

した。TSA との間において選択的に相互作用を形成する残基として、これまでに見出されている H27d(L)に加えて、Y58(H)および W100i(H)を見出した。(ii)からは、TSA 結合は 6D9-Fv に対して構造変化を誘起するが、基質結合は構造変化を誘起しないと考察した。TSA 結合に伴う induced-fit により、6D9-Fv と TSA の間において選択的な相互作用が形成され、TSA と基質の親和性の差が生じると考えた。TSA 結合に伴う induced-fit に重要な残基として、Y32(L)および W100i(H)を見出した。以上から、6D9 の触媒活性の駆動力である、TSA と基質に対する安定化エネルギーの差が、Y32(L), Y58(H), W100i(H)が関与する aromatic-aromatic 相互作用、およびに H27d(L)が関与する水素結合に由来すると結論した。最後に、触媒抗体 6D9 と天然の酵素の反応機構を比較し、6D9-Fv において見出した構造変化による遷移状態の安定化機構が、天然の酵素においても反応促進に寄与している可能性を指摘した。

第 5 章では、TSA 結合状態と基質結合状態との違いを生み出す、リガンド側の構造的要因、および、触媒抗体の活性を上昇させるための戦略について記述した。

本研究成果は、触媒抗体の主要な反応促進機構である、遷移状態の安定化機構を高次構造的に明らかにし、これにより、より有用な触媒抗体を得るための構造基盤を提示した。また、本研究成果は、天然の酵素における遷移状態安定化機構を理解する上においても、有用な知見を与えた。