

論文内容の要旨

論文題目

抗Ciguatoxin抗体による環状ポリエーテル化合物認識機構に関する研究

氏名

宇井 美穂子

1. 緒言

自然食中毒の一つとして知られるシガテラは、主に熱帯・亜熱帯海域のサンゴ礁周辺に生息する魚介類の摂食によって起こり、世界中で年間およそ 50,000 人の罹患者がいる。近年では、温暖化とともに中毒発生海域が北上し、これまでは見られなかった本州各地でもシガテラが確認されるようになってきている。しかし、未だシガテラに対する有効な治療法や診断法、毒魚の検出法等は確立されていない。神経毒性の発現メカニズムを分子レベルで解明し、有効な予防・治療法の開発に繋げていくことは急務となっている。

このシガテラの原因物質は **ciguatoxin(CTX)** と呼ばれ、環状ポリエーテルを基本骨格に持った梯子状の剛直な巨大分子である(Fig. 1)。2003 年、Oguri らによって、この CTX 類の一種である **CTX3C** の検出法が開発された(1)。

この系では、CTX3C を左右から認識する二種類の抗 CTX3C 抗体 10C9 と 3D11 を用い、サンドイッチ型 ELISA 法によって検出限界 5 nM の高感度検出を達成している。10C9 は、CTX3C の断片である ABCDE 環を抗原として得られたマウスモノクローナル抗体であり、ABCDE 環とは解離定数 (Kd) 0.8 nM、全長の CTX3C とは

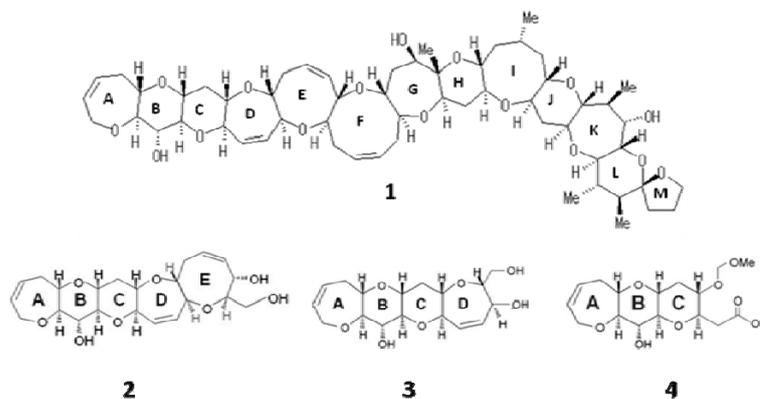


Fig.1 The structures of CTX3C(1), CTX3C-ABCDE(2), CTX3C-ABCD(3), CTX3C-ABC(4).

2.8 nM で結合する。また、他のポリエーテル系毒素である Brevetoxin A, B, Okadaic acid、Maitotoxin には交差反応性を示さず非常に高い特異性を持つ。しかし、10C9 による CTX 類の認識機構はもちろん、環状ポリエーテル化合物と蛋白質との相互作用に関する知見はほとんど得られていない。

本研究では抗 CTX3C 抗体 10C9 と CTX3C との相互作用に焦点を当て、CTX3C が持つ複数のエーテル環構造を如何にして抗体が認識し、特異性が創出されるのかを分子・原子レベルで明らかにすることで、構造生物学的観点から環状ポリエーテル化合物と蛋白質の相互作用に関する情報基盤を構築することを目的とした。抗体は、解析の簡便さを考慮して Fab を用い、抗原は CTX3C の断片構造となる ABC 環、ABCD 環、ABCDE 環の三種類の環状ポリエーテル化合物を用いた(Fig. 1)。さらに、創薬ターゲットスクリーニングにおける熱力学の役割を考察する場として 10C9 を捉え、低分子ライブラリーから熱力学的手法によって選別された低分子化合物を例に、蛋白質-低分子相互作用の熱力学的解析についても議論した。

3. 実験結果および考察

抗 ciguatoxin 抗体 10C9Fab の X 線結晶構造解析

10C9Fab、および抗原となる CTX3C-ABCD、ABCDE との複合体の X 線結晶構造解析を行った結果、それぞれ分解能 2.6、2.4、2.3Å で立体構造を明らかにすることに成功した。10C9Fab は VH-VL 界面に大きな溝状の抗原結合ポケットを形成しており、CTX3C-ABCD、ABCDE はどちらもその抗原結合ポケットに対して A 環を奥に向けた状態で縦に突き刺さるように結合することが明らかとなった(Fig. 2)。このように抗体の変領域の深部まで抗原が入り込む例はあまり知られておらず、10C9Fab によるこれら環状ポリエーテル化合物への結合様式は非常に新規性が高い。

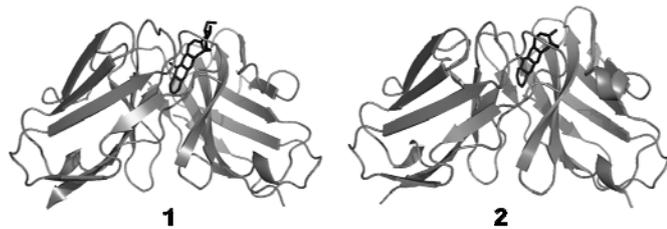


Fig.2 The structures of variable region of 10C9fab in complex with CTX3C-ABCDE(1) or CTX3C-ABCD(2).

抗原抗体相互作用には、主に水素結合とファンデルワールス相互作用が機能していると推測され、二種の複合体の間では相互作用に明確な差は見られなかった。しかし、10C9Fab・CTX3C-ABCDE 複合体では H-Asn58 の方向性が制御されることで抗体分子内に水素結合ネットワークが生じ、抗体の構造をより安定化させている可能性が示唆された。

また、抗原結合前後で立体構造を比較すると、どちらの複合体でも抗原結合に伴って変領域に抗原を回転軸とした分子運動を生じることが示唆された。この運動性は特に 10C9Fab・CTX3C-ABCD 複合体で大きく、定常領域でも CTX3C-ABCD 結合により顕著な構造変化が認められた。このことから、10C9Fab は抗原の長さに応じた誘導適合を生じ、その影響は変領域のみならず定常領域にまで達することが示唆された。さらに、10C9Fab 重鎖の温度因子の算出により、抗原結合に伴う CDR ループの安定化が確認できた。しかし、定常領域の安定化には 2 種の抗原で大きな違いがあり、CTX3C-ABCDE では構造を安定化する一方、CTX3C-ABCD では逆に揺らぎの大きな状態へ導くことが示唆された。

抗原抗体相互作用の熱力学的解析

10C9 Fab の抗原認識に伴う熱力学的パラメータを算出するため、等温滴定型熱量測定による解析を行った。最も全長が短い CTX3C-ABC では、明らかな反応熱は確認できなかった。抗原 CTX3C-ABCD、ABCDE では、いずれも抗原抗体反応に特徴的なエンタルピー駆動型の反応を示し、1:1 の化学量論比で結合することが確認できた。エンタルピーの値は、CTX3C-ABCD、ABCDE がそれぞれ -45.7 、 -68.4 kJmol^{-1} であり、CTX3C-ABCDE 認識ではエンタルピー得の寄与が特に大きいことが示された。また、エントロピーの値は、CTX3C-ABCD、ABCDE でそれぞれ -15 、 $-76 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ であった。両者の間で水と水の数に差がないことから、CTX3C-ABCDの方が、ある程度分子の自由度が高い状態であることを示していた。結合定数 K の値は、CTX3C-ABCD、ABCDE がそれぞれ 1.5×10^7 、 $9.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ であり親和性には 6 倍程度の差が見られ、CTX3C-ABCDE はエンタルピー的寄与により 10C9Fab と有利に結合することが明らかとなった。

次に、抗体の熱安定性への抗原の影響を検討するため、示差走査型熱量測定を行った。Fig.3 には、10C9Fab 単独、10C9Fab・CTX3C-ABCD、ABCDE 複合体の測定結果を示す。抗体単独での変性温度は 78°C 付近であったが、複合体形成により、CTX3C-ABCD ではおよそ 0.8°C 、CTX3C-ABCDE ではおよそ 10°C もの熱安定化が得られた。この結果は、CTX3C-ABCDE の結合によって 10C9Fab の立体構造の大きな安定化が得られたことを意味する。10C9Fab・CTX3C-ABCD 複合体では、温度因子から明らかとなった定常領域の不安定化が熱安定性に影響していると考えられる。

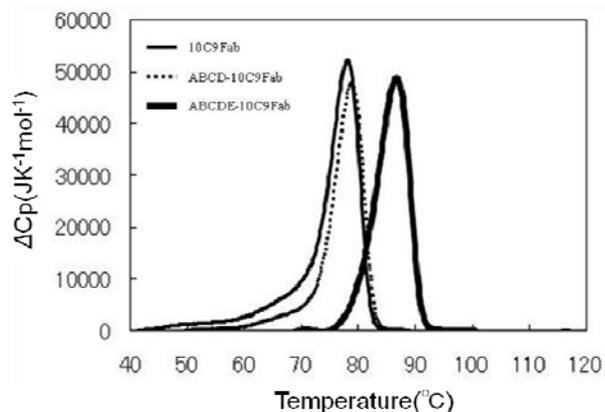


Fig.3 Partial molar heat capacity with a transition midpoint at T_m .

10C9Fab の変異体解析

抗原 CTX3C-ABCDE の認識に必須となる抗体 10C9Fab の特性を明らかにするため、抗原結合部位周辺のアミノ酸残基に対するアラニンスキャニングを行い、各アミノ酸残基の抗原認識への寄与を表面プラズモン共鳴分析法によって評価した。その中で、H-His35a-A は、 k_{off} で 200 倍程度の著しい増大を示し、抗原抗体複合体としての安定性が著しく低下していた。また、H-Trp47-A では、抗原への親和性が 1000 分の 1 以下程度にまで低下することが確認された。これらの残基はいずれも抗原と特に密接に相互作用はしておらず、これら親和性の低下が変異導入箇所における直接的相互作用の欠落に起因するとは考えにくい。結晶構造解析から、この 2 つの残基を含めた 4 つの残基 H-Trp47、H-His35a、H-Asp95、L-Arg46 が抗原不在下および存在下で水素結合ネットワークを形成し、抗原結合ポケットの内壁を構築していることが明らかとなっている。H-His35a および L-Trp47 残基の Ala 置換体ではこの水素結合ネットワークが形成されず、抗原結合部位の抗原に対する形状相補性が著しく失われると推察される。以上の結果は、CTX3C-ABCDE の認識には抗体側の形状相補性が最も重要であるということ、また、各アミノ酸残基との相互作用は付加的な貢献をすることを強く示唆する。

低分子スクリーニング

低分子創薬における熱力学情報の重要性が再認識されつつある昨今、リード化合物の同定および構造の最適化においては、等温滴定型熱量測定(ITC)に基づいた定量的構造活性相関の重要性に注目が集まっている。本研究では、ITC 測定により、低分子ライブラリーから 10C9IgG との相互作用で発熱が得られる化合物を抽出することが

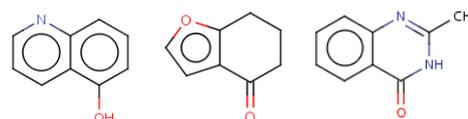


Fig. 4 Compounds that bind to 10C9IgG driven by favorable enthalpy.

できた(Fig. 4)。これらの分子は、本来の抗原である ciguatoxin と共通した構造的特徴を保持していた。つまり、いずれも連結した環状分子であること、複素環であること、また、特定の位置に水素結合が可能となる水酸基あるいはケトン基を持っていることが明らかとなった。これは、熱力学解析により標的蛋白質と特異的に結合可能な分子の構造学的特徴を見出すことが可能であることを示唆している。

4. 結言

本研究で対象とした抗体 10C9 は、剛直な巨大分子である CTX3C を認識するため VH-VL 界面に巨大な抗原結合ポケットを用意し、さらに、CDR 領域の自由度を保った特徴的な構造を持つ。抗原認識には、抗原抗体間の直接的な相互作用だけではなく、分子運動による広範囲な誘導適合と構造の安定化が寄与しており、また、抗原認識部位の形状相補性が重要であることが明らかとなった。環状ポリエーテル化合物と蛋白質との相互作用という分子生物学的観点からも、本結果は非常に意義深い。さらに、低分子探索における熱力学的解析は、特に標的蛋白質との特異的結合に寄与する構造的特徴の抽出に非常に有用であることを示すことができた。

今回の結果は、剛直な巨大分子抗原に対する抗体の認識機構の基礎情報を与え、また、それらの抗原を標的とした有効な予防・治療薬、種々の分析試薬、また触媒試薬開発に向けた有用な知見となり得る。

参 考 文 献

1) Oguri et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 7608-7612 (2003).

Tsumoto K, Yokota A, Tanaka Y, Ui M, Tsumuraya T, Fujii I, Kumagai I, Nagumo Y, Oguri H, Inoue M and Hiramama M, *J. Biol. Chem.*, **283**, 12259-12266 (2008).

Mihoko Ui, Yoshikazu Tanaka, Takeshi Tsumuraya, Ikuo Fujii, Masayuki Inoue, Masahiro Hiramama, and Kouhei Tsumoto, *J. Biol. Chem.*, **283**, 19440-19447 (2008).