

NMRを用いた抗原認識部位の動的立体構造解析

篠 葉 信 久

## 学 位 論 文

NMRを用いた抗原認識部位の動的立体構造解析

東京大学大学院薬学系研究科  
機能薬学専攻

指導教官

嶋田一夫

平成7年度進学

榛葉信久

1998年1月

## 目次

### 第1章 序論

1-1.	序	1
1-2.	NMR 解析	2
1-3.	抗体の高次構造	3
1-4.	抗体の活用	5
1-5.	本研究の目的	5

### 第2章 実験材料と実験方法 ~ 抗 DNS-Fv ~

2-1.	抗 DNS 抗体と $\epsilon$ -dansyl-L-lysine	9
2-2.	抗体産生細胞の培養	9
2-3.	抗体の精製	9
2-4.	Fv フラグメントの調製	10
2-5.	NMR 測定	10
2-6.	ストップフロー測定	11
2-7.	蛍光測定	12
2-8.	Fv の X 線結晶構造解析	12

### 第3章 抗 DNS-Fv の動的立体構造と結合活性に関する研究

3-1.	序	13
3-2.	NMR による抗原結合部位の動的構造解析	20
3-3.	ストップフロー蛍光法による DNS-Lys 認識機構の解析	31
3-4.	考察	37
3-5.	結論	44
3-6.	付録	44

#### 第4章 実験材料と実験方法 ~ 触媒抗体 6D9 ~

4-1.	触媒抗体 6D9 と TSA (III), substrate (IV)	48
4-2.	抗体産生細胞の培養	48
4-3.	抗体の精製	49
4-4.	Fab フラグメントの調製	49
4-5.	NMR 測定	49

#### 第5章 NMR を用いた触媒抗体の抗原結合部位の解析

5-1.	序	53
5-2.	substrate 結合部位、TSA 結合部位の同定	64
5-3.	抗原結合部位の構造多形性	73
5-4.	抗原結合部位に存在する His27d(L)の微視的環境	83
5-5.	考察	106
5-6.	結論	107

#### 第6章 総括

参考文献	110
------	-----

## 第1章 序論

### 1-1. 序

生体内で起こる種々の現象を原子レベルで理解することが可能になり、その知見が創薬をはじめさまざまな分野において活用されている。生体分子の分離精製技術の向上とともに、その分析技術の進歩によるところが大きく、中でもX線結晶構造解析やNMR<sup>1</sup>などの高次構造解析法が有用な手法として頻繁に用いられている。しかしながら、難攻不落な系も未だに数多く存在するため、各系ごとに創意工夫を凝らす必要があり、解析戦略や方法論の充実が望まれている。このような背景のもと、本研究では、解析手段としてNMRを、解析対象として抗体を取り上げ、抗体分子の特異な性質に対して一層理解を深め、また、抗体の活用範囲をさらに押し広げていくことに主眼を置いた。具体的には、まず、「抗ダンシル(DNS)抗体」を用いて抗体特有の分子認識機構について解析し、続いて、「触媒抗体 6D9」を用いて抗体の有効利用に向けた新たな解析戦略を確立することにした。以下に抗体について簡単に紹介するとともに、高次構造解析にNMRを用いる必要性について述べる。

脊椎動物の免疫系は体液性免疫と細胞性免疫の2つに大別され、中でも体液性免疫は、抗体が外来異物を特異的に認識することによって補体系の活性化などが誘起され異物を排除する機構として知られている。したがって、抗体には、ほぼ無限に存在する外来異物を厳密かつ特異的に認識することが必要とされ、それを生み出す機構に関する学説がいくつか提唱されている。抗体の産生については、種々の抗原を特異的に認識するB細胞のクローンがあらかじめ用意されていて、ある特定の抗原刺激でそれに対するクローンが増殖し分化するといった“Burnetのクローン選択説”により説明されている。また、 $10^8 \sim 10^{10}$ にもおよぶ抗体の多様性については、遺伝子レベルの解析<sup>1)</sup>から、抗体のアミノ酸配列をコードする遺伝子の多様性、その遺伝子の組み合わせの多様性、体細胞突然変異などによって生じることが明らかになっている。

一方、ハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体の作製技術の確立<sup>2)</sup>は、抗体を高い親和性と特異性をもった単一のタンパク質として扱うことを可能にし、各抗体ごとに解析を行ったり、抗体の活用範囲を広げるきっかけとなった。例えば、各種モノクローナル抗体の一次配列が決定され、抗体間において保存されている残基が特定されたり<sup>3)</sup>、また、X線結晶構造解析を中心に抗体の立体構造が決定され、抗原認識を司る部位のcanonical structure<sup>4,5,6,7)</sup>が明らかにされるなど、抗体分子の特徴が原子レベルで露にされつつある。さらに、 $10^8 \sim 10^{10}$ にもおよぶ

<sup>1</sup> NMR : nuclear magnetic resonance

多様性をもつ抗体の特色を生かし、さまざまな分野において抗体が活用されたり、もしくは活用に向けた研究が進められている。中でも、任意の化学反応の遷移状態アナログに対して特異的に結合する抗体を作製し、抗体に触媒活性を付与する試みが行われており、抗体を用いて自由自在に酵素を作製できるのではないかと期待されている<sup>8,9)</sup>。

このように、抗原認識の厳密さ・多様性などの興味深い性質やその応用範囲の広さに関心が集まり、抗体分子についてさまざまな構造生物学的研究が行われ、三次元構造に関する理解は深まってきた。しかし、タンパク分子特有の柔軟性（揺らぎ・運動性）に着目して研究を行った例は少なく、抗体分子の動的立体構造に関して知見や解析方法が乏しいのが現状である。抗体に関する理解を一層深く幅広く活用していくためにも、動的構造解析の必要性が認識されはじめ、それを可能にする手段として NMR に期待が寄せられている。

## 1-2. NMR 解析

タンパク質や核酸などの立体構造を決定する手段としては、主に X 線結晶構造解析法や NMR 法が挙げられる。NMR を用いて構造決定を行う場合には対象の分子量に関して制約があり、今のところ 30 ~ 40 KDa 以下の分子に限られている。これは、分子量が大きくなるにつれて、構造決定に必要な NOE<sup>2</sup>情報やカップリング情報を得るのが難しくなるためである。一方、X 線結晶構造解析については NMR 法のような分子量の制約がなく、F<sub>1</sub>-ATPase<sup>10)</sup>や cytochrome c oxidase<sup>11)</sup>などの高分子量タンパク質の構造決定も盛んに行われている。ただし、対象とするタンパク質や核酸などの結晶化については必ずしも成功するとは限らないため、NMR は構造決定に欠かせない手法の一つとして位置づけられている。また、NMR 法の最大の利点の一つとしては、溶液中において高次構造情報を得ることができるが挙げられる。すなわち、NMR スペクトルには、溶液中における分子の高次構造が正確に反映され、静的な構造情報のみならず動的構造に関する情報も含まれているという特長がある。以下に、NMR 解析の歩みと現状を簡単にまとめる。

NMR が生体分子の解析に広く用いられるきっかけとなったのは、Ernst らを中心に成し遂げられたパルス NMR 法の確立<sup>12)</sup>による。COSY をはじめとする 2 次元 NMR 法によって、タンパク分子の各シグナルの連鎖帰属<sup>13)</sup>が可能になり、さらに、その後、distance geometry 法<sup>14)</sup>により低分子量タンパク質(MW ≤ 10,000)の構造決定法が確立されるに至る。1990 年代には Bax らを中心に<sup>15</sup>C や<sup>15</sup>N で標識されたタンパク質を用いて 3 次元、4 次元 NMR 法が次々と開発され、構造決

<sup>2</sup> NOE: nuclear Overhauser effect

定可能な分子量が 20 ~ 30 K 前後にまで飛躍的に広がった<sup>15,16)</sup>。さらに、近年、NOE や scalar coupling から得られる構造情報に加え、dipolar coupling を用いた構造最適化が行われるようになるなど、構造決定法がより洗練されてきている<sup>17)</sup>。

また、NMR 法の特長として動的構造情報が得られるという点が挙げられる。タンパク質の動的構造解析には主に主鎖アミド窒素の各種緩和パラメーターが用いられ、特に、 $T_1$ <sup>3)</sup>、 $T_2$ <sup>4)</sup>、NOE から model-free 解析<sup>18,19)</sup>によりオーダーパラメーター( $S^2$ )を算出する方法は、staphylococcal nuclease<sup>20)</sup>や interleukin-1 $\beta$ <sup>21)</sup>をはじめさまざまなタンパク質に適用されている。 $S^2$ を算出するときには対象タンパク質が等方的な(isotropic)分子であることが仮定されているが、近頃では分子の異方性(anisotropic)も考慮されつつある<sup>22)</sup>。また、種々の緩和パラメーターからスペクトル密度関数  $J(\omega)$  を導出する方法<sup>23,24)</sup>や、 $B_1$ -field を変化させて  $T_{1\rho}$ <sup>5)</sup>を測定し  $\mu$ s ~ ms の運動性を抽出する方法<sup>25,26)</sup>も報告されている。

結合水(bound water)の運動性についても数々の研究が行われている。特に Nuclear Magnetic Resonance Dispersion (NMRD)法により、ns ~  $\mu$ s の滞在時間をもつ水分子が BPTI に結合していることが報告されるなど<sup>27,28,29)</sup>、結合水の滞在時間に関する詳細が明らかになってきている。また、易動性プロトンが重水素と置き換わる速度を見積もる H-D 交換実験<sup>30)</sup>や、易動性プロトンの  $T_1$  から溶媒である水との交換速度を算出する方法<sup>31)</sup>なども確立され、水素結合や運動性などに関する研究に役立っている。

### 1-3. 抗体の高次構造

免疫グロブリン(immunoglobulin: Ig)は、免疫系において中心的な役割を果たす糖タンパク質であり、その物理化学的および免疫化学的性質からいくつかのクラス、サブクラスに分類されている。本研究で用いたのは中でも代表的な IgG であり、その模式図を Fig. 1-1 に示してある。Ig のクラスには、この他に IgM、IgA、IgE、IgD が存在し、さらに、これらのクラスはサブクラスである、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 などへと分類することができる。本研究で用いた抗 DNS 抗体は IgG2a、触媒抗体 6D9 は IgG1 に分類される。

分子量約 50 K の H 鎖(heavy chain)と、約 25 K の L 鎖(light chain)が s-s 結合(disulfide bond)によりヘテロダイマーを形成し、それがさらに s-s 結合により 4 量体になったものが、IgG の基本構造である。IgG 分子は多ドメイン構造をとっており、それぞれのドメインはおおよそ 110 個のアミノ酸から構成されている。各ドメインは、いずれも 2 枚の  $\beta$  シートが向き合った、“immunoglobulin fold” と呼ば

<sup>3)</sup>  $T_1$ : spin-lattice relaxation time

<sup>4)</sup>  $T_2$ : spin-spin relaxation time

<sup>5)</sup>  $T_{1\rho}$ : spin-lattice relaxation time in the rotating frame

れる基本構造<sup>32)</sup>をとり、H鎖およびL鎖を形成するドメインは、それぞれV<sub>H</sub>、C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>、V<sub>L</sub>、C<sub>L</sub>と呼ばれる。そのうちN末端側に位置するV<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>ドメインが抗原認識を司り、これら2つのドメインから形成されるフラグメントはFvと呼ばれている。また、C<sub>H1</sub>とC<sub>H2</sub>ドメインをつなぐ領域をヒンジと呼び、パパインなどの酵素感受性が高いことが知られている。パパイン消化によって得られるFabフラグメントとはV<sub>H</sub>、C<sub>H1</sub>、V<sub>L</sub>、C<sub>L</sub>ドメインにより、Fcフラグメントとは2つずつのC<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>ドメインにより構成されたものを指す。

抗原結合を担うV<sub>H</sub>、V<sub>L</sub>ドメインは、個々の抗体ごとにアミノ酸配列が異なるため可変領域と呼ばれ、3箇所ずつ存在するループ領域(H1~H3、L1~L3)を有している。抗体は、主にこの領域のアミノ酸配列やその長さを変化させることにより $10^8 \sim 10^{10}$ におよぶ多種多様な抗原を認識することができ、この多様性に富んだループ領域は相補性決定領域(complementarity determining region: CDR)と呼ばれている。一方、それ以外のドメイン(C<sub>H1</sub>、C<sub>H2</sub>、C<sub>H3</sub>、C<sub>L</sub>)は、定常領域と呼ばれる。

抗体は、“immunoglobulin fold”と呼ばれる基本構造をとりつつも、CDRループのアミノ酸配列や長さを変化させて多様な抗原結合ポケットを構築しているという特徴をもつ。また、認識する抗原への特異性については抗原抗体間の高い相補性によって生じていることが知られている。抗原非存在下と存在下における抗体のX線結晶構造解析により、複合体形成にあたって抗体と抗原に構造変化が引き起こされる例がいくつか報告され、この構造変化が相補性の向上に役立っていると考えられている<sup>33,34,35)</sup>。以下に今までに行われた研究例をいくつか紹介する。

抗 haemagglutinin 抗体の Fab フラグメントとそのエピトープである9残基のペプチドとの複合体の結晶構造<sup>36)</sup>では、ペプチド添加前後においてH3ループのコンフォメーションが変化しており、“induced fit”型の抗原抗体反応の存在が裏付けられている。また、抗 progesterone 抗体とそれに結合する種々のステロイドとの複合体の立体構造<sup>37)</sup>からは、抗体に複数の抗原結合ポケットが用意されているために、cross-reactivityが生じることが示唆されている。さらに、抗 hen egg white lysozyme (HEL)抗体の解析<sup>38)</sup>など、抗原抗体間に水分子が介在し相補性が高められている例も報告されている。

また、熱量測定やストップフロー法によって巨視的な観点から抗体の抗原認識機構を解析した研究結果も報告されている。熱力学的解析からは、抗 p185<sup>HER2-ECD</sup> 抗体<sup>39)</sup>をはじめエンタルピー的に抗原抗体反応が進行する例がいくつか見だし、ファンデアワールス相互作用、静電相互作用、水素結合などが結合の推進力になっていることが示されており、この結果から抗原抗体間の相補性の高さが窺われる。また、ストップフロー法を用いて抗 2-phenyl-5-oxazolone 抗体<sup>40)</sup>の抗原結合スキームを速度論的に示した結果から、抗原非存在下において構造異性化が起こっていたり、抗原結合後にコンフォメーション変化が起こる抗



体が存在することなどが明らかになっている。

#### 1-4. 抗体の活用

現在、(1) 体外診断薬および一般分析、(2) 生理活性物質の精製、(3) 治療および体内診断薬、(4) 触媒抗体、などの分野で抗体を利用することが考えられている。しかし、実質的な抗体利用は(1)に限られ、他の分野は一部実施されているか、あるいは将来の課題である。そのため、それぞれの分野において実用化に向けたさまざまな研究が進められている。本研究では、その中でも触媒抗体について取り上げる。

望んだ化学反応に対する触媒を自由自在に作製することができれば、種々の化合物の合成が容易になり創薬などに役立つ。高い特異性と触媒作用をもつ酵素の特徴としては、反応の場を提供するという点が挙げられ、この特徴を参考にしてさまざまな触媒分子の作製が試みられている。中でも抗体は、抗原結合部位に  $10^8 \sim 10^{10}$  にもおよぶ多様な組み合わせを有し、さまざまな化学反応の場として機能するのではないかと期待されている(Fig 1-2)。

初めて触媒活性をもった抗体(触媒抗体)を報告したのは、Lerner と Schultz の 2 つのグループである<sup>8,9)</sup>。彼らが用いたのはリン酸エステル体の特異的に認識する抗体で、エステル結合の加水分解反応の触媒として機能した。これは、リン酸エステルがエステル加水分解反応の遷移状態である四面体構造と類似した構造をとっていることに基づいている。その後、2 分子反応<sup>41,42)</sup>、ペリ環状反応<sup>43)</sup>、酸化還元反応<sup>44)</sup>、脱離反応<sup>45)</sup>などさまざまな反応に対する触媒抗体や、活性部位の周囲の環境を巧みに調整した高活性の触媒抗体<sup>46)</sup>が作製されるなど、触媒抗体の設計や実用化のためにいろいろな工夫が凝らされてきた。しかし、天然の酵素に比べて触媒効率の悪い抗体が多いことは否めず<sup>47)</sup>、更なる改良を目指して試行錯誤が繰り返されている。高次構造を解き明かし、触媒活性を向上させたり触媒機構を解明する試みもその一端を担う。

触媒抗体の構造決定については、1994 年に Wilson らのグループによって報告されたのが最初である<sup>48)</sup>。彼らは、遷移状態アナログ存在下においてコリスミ酸ムダーゼ活性をもつ抗体の結晶構造を明らかにし、天然の酵素に比べて触媒抗体の活性が低い理由について論じている。また、Knossow らのグループは、エステル加水分解反応に対する触媒抗体を用いることによって、遷移状態アナログと基質アナログ存在下における立体構造を初めて両方解き、その比較から触媒機構が説明できることを示している<sup>49)</sup>。

#### 1-5. 本研究の目的

抗原結合部位を構成している CDR ループのアミノ酸配列を巧みに変化させることにより、抗体は抗原との間に高い相補性を確保し高い親和性や特異性を獲得する。ただし、“immunoglobulin fold”と呼ばれる基本構造の枠組みを崩さずに抗原結合ポケットの形や大きさを変化させる。このような巧妙に構築された抗原結合ポケットは、どのような性質をもち、どのように機能しているのかという問題を抗 DNS-Fv を用いて動的立体構造の観点から解き明かす。

また、 $10^8 \sim 10^{10}$  にもおよぶ数の豊富さ、高い親和性と特異性などの抗体の特徴を生かし、抗体はさまざまな分野で活用されたり、活用に向けて研究の対象になっている。中でも触媒抗体としての活用は、さまざまな化学反応に対する酵素を自由自在に作製することを可能にしたり、化学反応の触媒機構の解明に役立つといった点で着目されている。そこで、エステル加水分解反応を触媒する抗体 6D9 を題材にして、抗体がどのように触媒としての機能を発現しているのかについて、抗体分子の運動性を考慮に入れながら解明する。

さらに、抗体の抗原結合部位の解析に付随させて、NMR を用いた新たな解析方法・解析戦略を確立する。NMR による動的構造解析はさまざまなタンパク質を対象として行われているが、タンパク質に存在する揺らぎがどのように機能発現と関わっているのかを具体的に明らかにした例はない。そこで、抗 DNS-Fv を題材として NMR によって検出される運動性と機能との関係を解明するための新たなアプローチ方法を開発する。また、触媒抗体 6D9 の解析に用いる Fab フラグメントの分子量は約 50 K であり、NMR 解析には難しい対象である。しかし、通常 IgG を酵素消化して得られる最小の抗原結合フラグメントは Fab であり、さまざまな抗体の解析に NMR を用いていくためには分子量 50 K の Fab から有用な高次構造情報を得ることができるようになる必要がある。そこで、NMR のハルス技術を駆使して、高分子量タンパク質の解析に幅広く用いることができるような方法論を 6D9 を用いて開拓する。

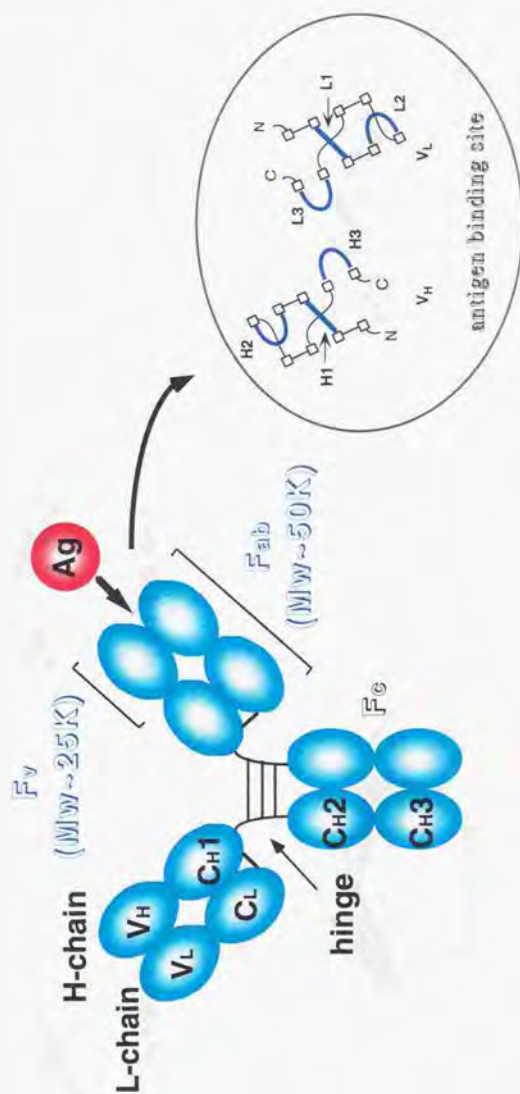


Fig.1-1 Immunoglobulin G の模式図

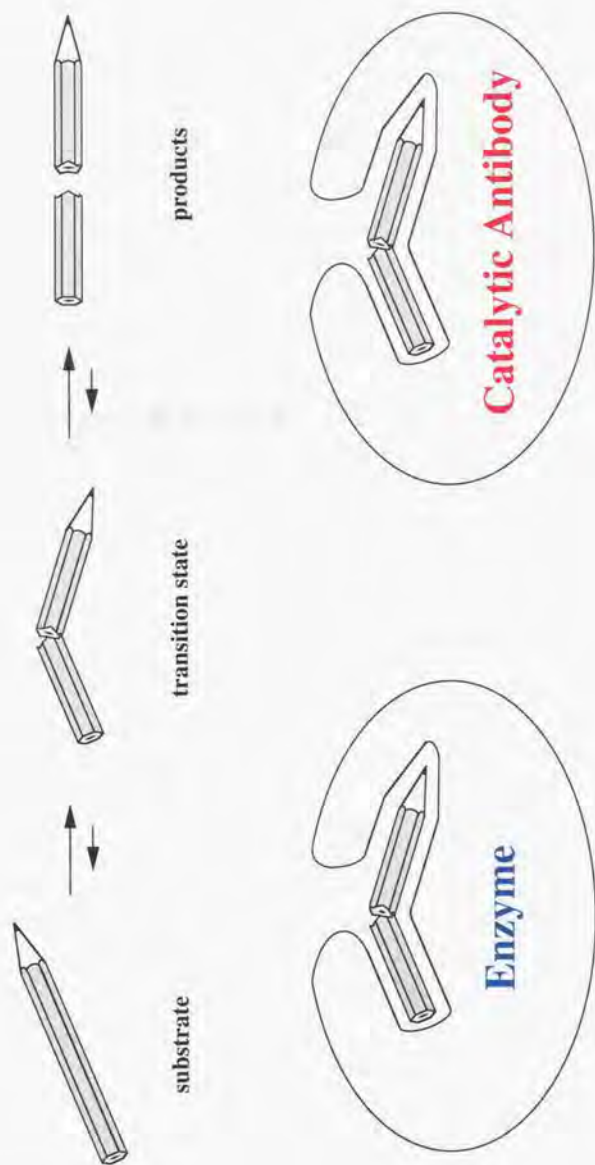


Fig. 1-2 触媒抗体の概念

# 抗 DNS-Fv の動的立体構造と結合活性に関する研究

## 第2章 実験材料と実験方法 ~ 抗 DNS-Fv ~

### 2-1. 抗 DNS 抗体と $\epsilon$ -dansyl-L-lysine

DNS 基に対して特異性をもつ、スイッチバリエーション抗体を産生するマウス細胞株 (ハイブリドーマ) については、スタンフォード大学 L.A. Herzenberg 教授から戴いた。本研究で用いた細胞株は、27-1B10.7 (IgG2a(s)産生株)である。IgG2a(s)とは IgG2a の C<sub>H1</sub> ドメインが欠落した変異体を指す<sup>21)</sup>。また、リガンドとして用いた  $\epsilon$ -dansyl-L-lysine (DNS-Lys)については、Sigma から購入した。

### 2-2. 抗体産生細胞の培養

必要に応じてアミノ酸を加えた、低濃度の血清存在下(1~2% FCS) の NYSF404 培地を用いて抗体産生細胞を培養した<sup>22)</sup>。培養については、CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37°C にて、1~4 リットルのスケールで行った。また、安定同位体標識抗体については、非標識アミノ酸を標識アミノ酸に置き換えた培地中で抗体産生細胞を培養することにより作製した。

用いた標識アミノ酸を以下に示す。

1. L-[3',5'-<sup>13</sup>C] Tyr
2. L-[2',6'-d<sub>2</sub>] Tyr
3. L-[3',5'-d<sub>2</sub>] Tyr
4. L-[2',3',5',6'-d<sub>4</sub>] Tyr
5. L-[2',3',4',5',6'-d<sub>5</sub>] Phe
6. L-[ $\alpha$ ,2',4'-d<sub>3</sub>] His
7. L-[2',4',5',6',7'-d<sub>5</sub>] Trp
8. L-d<sub>8</sub>-Val

1, 8についてはCIL から、4, 5についてはICON Services Inc.から購入した。2,3,6,7については文献<sup>31)</sup>に従って合成したものを使用した。

### 2-3. 抗体の精製

抗体産生細胞を CO<sub>2</sub> インキュベーター中で2~3週間培養し、完全に死滅させた後、細胞を含む懸濁液を遠心(4°C, 7,000rpm, 40min)して、上清を回収する。これを、限外濾過装置(Millipore Minitan)を用いて約 50ml まで濃縮し、等量の PBS (10 mM リン酸ナトリウム, 150 mM NaCl, pH 7.3) で希釈した後、プロテイン A アフィニティーカラムに吸着させる。本実験に用いた IgG2a(s)は、酢酸緩衝液(50 mM 酢酸ナトリウム, 150 mM NaCl, pH 4.3) を elution buffer として用いて溶出さ

せた。

## 2-4. Fv フラグメントの調製

IgG2a(s)をクロストリパインで限定分解することにより Fv の調製を行った<sup>4)</sup>。精製した抗体溶液をクロストリパイン消化用緩衝液 (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) に溶媒置換した後、抗体濃度を 5 mg/ml に調整し、5 mM Dithiothreitol (DTT) およびクロストリパイン (Sigma: 酵素-基質比(S/E)=100) 存在下において、37 °C で約 7 時間インキュベートした。その後、最終濃度が 30 mM となるように、ヨード酢酸アミドを加え反応を停止させた (遮光下、4 °C、20 min)。得られた限定分解産物については、MonoQ (Pharmacia) 用緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) に対し透析し、MonoQ カラムにより精製した後、MonoS (Pharmacia) カラムによりさらに精製した。

## 2-5. NMR 測定

### 2-5-1. NMR 試料の調製

Fv 溶液を PBS (5 mM リン酸ナトリウム, 200 mM NaCl, 3 mM  $\text{NaN}_3$  /  $\text{D}_2\text{O}$ ) に溶媒置換した後、pH 7.3 に調整して NMR 試料とした。NMR 測定には 5 mm 試験管 (液量約 400  $\mu\text{l}$ )、またはマイクロセル (液量約 210  $\mu\text{l}$ ) を使用し、Fv 濃度については 1.0 ~ 1.5 mM とした。

また、DNS-Lys を PBS (5 mM リン酸ナトリウム, 200 mM NaCl, 3 mM  $\text{NaN}_3$  /  $\text{D}_2\text{O}$ ) に溶解し 8 mM DNS-Lys 溶液を調製した。この溶液を上記の Fv 試料に加え pH 7.3 に調整、または、加えた後濃縮してから pH 7.3 に調整することにより、DNS-Lys 存在下の Fv 試料を作製した。DNS-Lys 溶液の定量には、335 nm におけるモル吸光係数  $\epsilon = 4250$  を使用した。

### 2-5-2. 測定方法および測定条件

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY<sup>5,6)</sup>測定には、Bruker DRX600 または Bruker DMX600 または JEOL Alpha-500 スペクトルメーターを使用した。NOE 混合時間 (mixing time:  $\tau_m$ ) については、化学交換ピーク強度の NOE 混合時間依存性を追跡した実験では、 $\tau_m = 10, 20, 40, 80, 110, 150, 250$  ms、その他の実験では、 $\tau_m = 40$  または 45 ms とした。一方、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY<sup>7)</sup>測定には JEOL JNM-GSX500 スペクトルメーターを使用し、ROE 混合時間を  $\tau_m = 25$  ms とした。スペクトル幅を 7,000 ~ 10,000 Hz、データポイントを  $t_2$  方向に 2K、 $t_1$  方向に 256 ~ 512 とし、States または States-TPPI の方法に従い取り込みを行った<sup>8)</sup>。



$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC<sup>9)</sup>および $^{13}\text{C}$  edited ROESY 測定には Bruker AMX400 スペクトルメーターを使用した。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC 測定については、 $^1\text{H}$  方向のスペクトル幅を 6,000 Hz、データポイントを 1K、 $^{13}\text{C}$  方向のスペクトル幅を 420 Hz、データポイントを 128 とした。 $^{13}\text{C}$  edited ROESY 測定については、スペクトル幅を 6,000 Hz、データポイントを  $t_2$  方向に 1K、 $t_1$  方向に 128 とした。両測定ともに、TPPI 法に従い取り込みを行った<sup>10)</sup>。

また、すべての測定にわたり、繰り返し時間を 1.0 s、測定温度を 30 °C とした。

### 2-5-3. データ処理

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY スペクトルの処理には nmrPipe<sup>11)</sup>を、その他のスペクトルの処理には、各装置に付属のソフトウェアを用いた。各データの  $t_1$  ポイントに対し、2 倍程度のゼロフィリングを行い、 $t_2$  方向にはガウス関数、 $t_1$  方向にはガウス関数または sine-square 関数を乗じ、フーリエ変換を行った。

## 2-6. ストップフロー測定

### 2-6-1. ストップフロー測定試料の調製

Fv 溶液を PBS (5 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl、3 mM  $\text{NaN}_3/\text{H}_2\text{O}$ ) に溶媒置換した後、50 ~ 200  $\mu\text{M}$  まで濃縮し pH 7.3 に調整した。この溶液を同じ組成の PBS (pH 7.3) を用いて希釈することにより、Fv 濃度を 225 nM に調整し測定試料とした。

また、DNS-Lys については PBS (5 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl、3 mM  $\text{NaN}_3/\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.3) に溶解し、3 ~ 5 mM の DNS-Lys 溶液を調製した。この溶液を同じ組成の PBS で希釈し、1 ~ 15  $\mu\text{M}$  の希釈系列を作製した。

### 2-6-2. 測定方法および測定条件

測定には、Applied Photophysics ストップフロー装置を用いた。225 nM に調整した Fv 溶液と、Fv に対し過剰量 (少なくともモル比 4 ~ 5 倍量) の DNS-Lys 溶液を混合し反応させた。このとき、Fv と DNS-Lys の反応過程を追跡するために、285 nm を励起し、335 nm のカットオフフィルターを通して放出される蛍光の強度変化を観測した。データの取り込み時間については 100 ms、データポイントについては 400 とした。また、S/N<sup>6)</sup>を改善するために、10 ~ 15 回の測定結果を平均し、データ処理を行った。測定温度については、活性化エネルギーを見積もるために

<sup>6)</sup> S/N: signal to noise ratio



行った実験を除き、30 °Cとした。

### 2-6-3. データ処理

得られたデータをソフトウェア KaleidaGraph を用いて double exponential にフィッティングすることにより、見かけの速度定数  $k_{fast}$ ,  $k_{slow}$  を決定した。また、反応経路モデルおよび真の速度定数の導出については、3-6 節の「付録」に記した手順に従い行った。このとき、標準偏差が付記された真の速度定数については、6 回の測定から得られた平均値を用いている。

### 2-7. 蛍光測定

Fv 溶液を PBS (5 mM リン酸ナトリウム, 200 mM NaCl, 3 mM  $\text{NaN}_3$  /  $\text{H}_2\text{O}$ ) に溶媒置換した後、50 ~ 200  $\mu\text{M}$  まで濃縮し pH 7.3 に調整した。この溶液を同じ組成の PBS (pH 7.3) を用いて希釈することにより、Fv 濃度を 225 nM に調整し測定試料とした。

DNS-Lys についても同様に、まず、PBS (5 mM リン酸ナトリウム, 200 mM NaCl, 3 mM  $\text{NaN}_3$  /  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 7.3) に溶解し、3 ~ 5 mM の DNS-Lys 溶液を調製した。この溶液を同じ組成の PBS で希釈することにより、DNS-Lys 濃度を 12  $\mu\text{M}$  に調整し蛍光測定に使用した。

蛍光測定には、Shimadzu RF-5000 spectrofluorophotometer を用いた。Fv 溶液 1500  $\mu\text{l}$  に DNS-Lys 溶液を 3  $\mu\text{l}$  ずつ適定し、各適定後ごとに、335 nm を励起し、500 nm に放出される蛍光の強度変化を観測した。測定温度については、30 °C とした。

### 2-8. Fv の X 線結晶構造解析

Fv の X 線結晶構造解析は、東京大学大学院薬学系研究科タンパク構造生物学教室において行われている。DNS-Lys 非存在下における Fv については、結晶化に 2.0 M と 2.8 M の硫酸アンモニウムを用いた 2 種類の結晶構造が解かれており、本研究ではその preliminary な結果を使わせていただいた。

### 第3章 抗 DNS-Fv の動的立体構造と結合活性に関する研究

#### 3-1. 序

##### 3-1-1. 抗 DNS 抗体

抗 DNS 抗体については、抗原認識の最小単位である Fv へとフラグメント化する方法<sup>1)</sup>が確立しており、NMR を用いた抗体の抗原結合部位の解析に最も適した系の一つと考えられる。これは、通常 IgG 分子の酵素消化によって得られる抗原結合フラグメントが Fab であるのに対し、抗 DNS 抗体については IgG2a の C<sub>H</sub>1 ドメインが欠落した変異体 (IgG2a(s)) が存在しており、それをクロストリパイン消化することによって Fv の作製が可能であることによる。ただし、抗原結合フラグメントの小型化により NMR シグナルの数や核緩和などの点で NMR 解析が容易になったとはいえ、Fv を各種安定同位体 (<sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N) を用いて標識することは、NMR シグナルの重複を回避したり帰属を行うために必須な手段である。

抗 DNS-IgG2a(s) など、抗体を産生する細胞株 (ハイブリドーマ) を用いて安定同位体標識された抗体を作製するときには、培地成分の各種アミノ酸をそれぞれ標識体に置き換える必要がある。このとき、一部アミノ酸を除き、用いた標識アミノ酸がそのまま取り込まれるため、アミノ酸選択的に標識された抗体を作製することが可能である。例えば、窒素を <sup>15</sup>N 標識した Tyr を用いると、Tyr 残基の主鎖アミド窒素が <sup>15</sup>N 標識された抗体が得られる。このようにアミノ選択的に標識された抗体を作製し用いることにより、NMR スペクトル上に観測されるシグナルの数が減り、シグナル検出や帰属などに要する時間や労力を軽減することができる。ただし、これは、標識したアミノ酸残基由来のシグナルを利用して解析するときに限られたことであり、もし、立体構造決定など、全シグナルを用いて解析を行う必要がある場合には、すべてのアミノ酸残基の炭素や窒素を <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N で標識する方が望ましい。

このような背景のもと、当研究室ではさまざまな抗 DNS-Fv の標識体を作製し NMR 解析を進めている。以下にその一部を簡単にまとめる。

主鎖アミド窒素を <sup>15</sup>N 標識したタンパク質を用いると、<sup>15</sup>N 核の緩和速度やアミドプロトンの交換速度を求めることができ、動的構造や水素結合などに関する情報を引き出すことが可能である。そのため、抗 DNS-Fv についても各種アミノ酸残基の主鎖アミド窒素の <sup>15</sup>N 標識体が作製され、NH シグナルを指標とした解析が行われてきた。NH シグナルの帰属に関しては、二重標識法、再構成法、連鎖帰属法が併用して行われ、Trp、Phe、Tyr、His、Ile、Ala、Val、Met、Leu、Lys、Thr 残基についてはほぼ完了している<sup>2)</sup>。この帰属結果をもとに、各残基の主鎖アミド窒素の T<sub>2</sub> が測定され、H3 ループを中心に構造多形性が存在していることや、

DNS-Lys 非存在下と存在下においてその運動性が異なっていることが示されている<sup>3)</sup>。また、H-D 交換実験により DNS-Lys 非存在下、存在下におけるアミドプロトンの交換速度が求められ、DNS-Lys 結合部位や運動性などについて論じられている<sup>4)</sup>。

さらに、一部アミノ酸残基 (Tyr, Phe, Trp, His など) については側鎖由来のシグナルの帰属も行われており、その結果は DNS-Lys 結合部位の同定に利用されている。DNS-Lys 存在下の Fv において DNS 環のプロトンシグナルと Val2(H)、Phe27(H)、Tyr96(H)、Tyr104(H)の側鎖由来のシグナルの間に NOE が観測され、これらの残基が位置している H 鎖 N 末端、H1 ループ、H3 ループに囲まれた領域によって DNS-Lys 結合部位が構築されていることが明らかになっている (Fig. 3-3)<sup>3,6)</sup>。

### 3-1-2. 動的構造解析について

NMR を用いたタンパク質の動的構造解析には、主に主鎖アミド窒素シグナルの緩和パラメーターが用いられている。中でも主鎖アミド窒素の  $T_1$ 、 $T_2$ 、NOE から model-free 解析<sup>7,8)</sup>によりオーダーパラメーター ( $S^2$ ) を算出する方法<sup>9,10)</sup>は多くのタンパク質に対して適用されており、得られた  $S^2$  は ps ~ ns の運動性を表す指標になる。一方、 $\mu\text{s}$  ~ ms の運動性を表すパラメーターは、 $T_2$  に化学交換項 ( $R_{ex}$ ) として含まれており、 $S^2$  を算出する過程で導出される。また、さまざまな B<sub>1</sub>-field において測定された  $T_{1\rho}$  から、 $R_{ex}$  を見積もることも可能である<sup>11,12)</sup>。さらに、種々の緩和パラメーターからスペクトル密度関数  $J(\omega)$  を導き出すこともでき、さまざまな例が報告されている<sup>13,14)</sup>。このように、運動の速度については各種パラメーターに的確に反映される反面、NMR 法だけでは動きの方向性や振幅の大きさなどに関する情報を得ることは難しい。そのため、NOE、scalar coupling、dipolar coupling などの構造情報と矛盾のないように、平衡状態にある複数の立体構造を導き出す試み<sup>15,16)</sup>などが行われているが、Molecular Dynamics (MD) 計算への依存度が高いなど、課題が残っている。

以上示したように、NMR を用いてタンパク質の動的構造に関するさまざまなアプローチ方法が提唱され実行されてきたが、観測された運動性と機能との関係についてはほとんど明らかになっていない。そのため、動的構造と活性や安定性などを結び付ける方法論の確立が望まれている。

NMR を用いて微視的な観点から動的構造に関する知見が得られている一方で、巨視的な観点から構造多形性の存在を示す方法も提唱されている。中でも、タンパク質とリガンド、タンパク質とタンパク質、タンパク質と核酸、などの2分子反応の場合には、ストップフロー法による速度論的解析が有用な手段として挙げられる。

構造多形性の提示は、ストップフロー法を用いて2分子反応過程を追跡し、

その結果と矛盾のないモデルを立てることによって行われている。観測されるコンフォメーション間の交換速度は、ストップフロー装置のサンプリング速度に限界があることから、 $\mu\text{s} \sim \text{ms}$  よりも遅い時間域に限られている。また、ストップフロー法を用いることの利点として、構造多形性と結合活性の関係を、得られた結合スキームと各ステップの交換速度から定量的に示せることが挙げられる。しかしながら、通常「矛盾のないモデル」が複数存在し特定することが困難なことや、個々のコンフォメーションの構造情報を把握することができないことなど、問題点も存在し、これらの点を克服することが望まれている。

### 3-1-3. 研究概要

3-1-1 節に示したように、当研究室において抗 DNS-Fv の NMR 解析が精力的に進められてきた。しかし、Fv の抗原結合部位に存在する運動性が抗原認識にどのように関わっているのかについては未だ明らかになっていない。さらに、Fv に限らずさまざまなタンパク質についても動的構造と機能の相関を明確に示した例が存在しないため、アプローチ方法の開拓も必要な状態である。このような背景のもと、本章では、NMR とストップフロー法を用いて Fv の動的立体構造解析を行い、構造多形性と結合活性の関係を明らかにすることを目的とした。

#### (1) NMR による抗原結合部位の動的構造解析

DNS-Lys 存在下における NOE 実験より、H3 ループに存在する Tyr96(H) と Tyr104(H) が DNS-Lys 近傍に位置していることが示されている。そこで、DNS-Lys 結合部位の動的構造を解析するために、Tyr 残基側鎖 3',5'プロトンのみが観測可能な標識 Fv を調製し、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY 測定を行った。その結果、DNS-Lys 非存在下において、13 個の Tyr 残基中 4 残基 (Tyr91(H)、Tyr96(H)、Tyr97(H)、Tyr104(H)) に由来する化学交換ピークが観測された。一方、DNS-Lys 存在下では Tyr96(H)、Tyr97(H)、Tyr104(H) 由来の化学交換ピークが消失した。Tyr96(H)、Tyr97(H)、Tyr104(H) は、DNS-Lys 結合部位を構成している H3 ループに存在していることから、(1) DNS-Lys 非存在下において、DNS-Lys 結合部位には少なくとも 2 種類のコンフォマーが存在し、交換していること、(2) DNS-Lys 存在下では、その構造多形性が消失すること、が判明した。次に、各コンフォマー由来のシグナル強度および化学交換ピーク強度の混合時間依存性よりコンフォマー間の交換速度定数を求めたところ、 $30.0 (\text{s}^{-1})$ 、 $2.1 (\text{s}^{-1})$  であることが示された。また、DNS-Lys 濃度を Fv に対してモル比 0.5 の条件下で測定した NOE 実験より、2 つのコンフォマーのうち一方が DNS-Lys 結合に関与していることが判明した。

#### (2) ストップフロー蛍光法による DNS-Lys 認識機構の解析

ストップフロー蛍光法により DNS-Lys と Fv の結合反応を解析したところ、2 相性を示した。さらに、この 2 分子反応速度の DNS-Lys 濃度依存性から、DNS-

Lys 非存在下において構造異性化が起きていることが示された。また、ストップ  
トフロー蛍光法により得られたコンフォーマー間の交換速度定数は NMR により求  
められたものと一致した。

以上、抗 DNS-Fv の抗原結合部位を解析することにより、DNS-Lys 非存在下で  
はミリ秒オーダーで交換する 2 つのコンフォーマーが存在し、その一方のコンフォ  
マーに DNS-Lys が結合することが判明した。これらの結果をもとに、抗体の抗原  
結合部位に存在する構造多形性の意義に関して考察する。

# 略語一覧

[3',5'-<sup>1</sup>H-Tyr] Fv :

Tyr 残基の 2',6'位、Phe 残基の 2',3',4',5',6'位、His 残基の $\alpha$ ,2',4'位、Trp 残基の 2',4',5',6',7'位の水素を <sup>2</sup>H 標識した Fv

[2',6'-<sup>1</sup>H-Tyr] Fv :

Tyr 残基の 3',5'位、Phe 残基の 2',3',4',5',6'位、His 残基の $\alpha$ ,2',4'位、Trp 残基の 2',4',5',6',7'位の水素を <sup>2</sup>H 標識した Fv

[2'-<sup>1</sup>H-His] Fv :

Tyr 残基の 2',3',5',6'位、Phe 残基の 2',3',4',5',6'位、His 残基の $\alpha$ ,4'位、Trp 残基の 2',4',5',6',7'位の水素を <sup>2</sup>H 標識した Fv

[3',5'-<sup>13</sup>C-Tyr] Fv :

Tyr 残基の 3',5'位の炭素を <sup>13</sup>C 標識した Fv

[2',6'-d<sub>2</sub>-Tyr] Fv :

Tyr 残基の 2',6'位の水素を <sup>2</sup>H 標識した Fv

[2',6'-d<sub>2</sub>-Tyr, d<sub>8</sub>-Val] Fv :

Tyr 残基の 2',6'位と Val 残基のすべての水素を <sup>2</sup>H 標識した Fv

Tyr91(H)-2',6'-H :

Tyr91(H)の 2',6'位のプロトン

Tyr91(H)-3',5'-H :

Tyr91(H)の 3',5'位のプロトン

Tyr96(H)-2',6'-H :

Tyr96(H)の 2',6'位のプロトン

Tyr96(H)-3',5'-H :

Tyr96(H)の 3',5'位のプロトン

Tyr97(H)-2',6'-H :

Tyr97(H)の 2',6'位のプロトン

Tyr97(H)-3',5'-H :

Tyr97(H)の 3',5'位のプロトン

His98(H)-2'-H :

His98(H)の 2'位のプロトン

Tyr99(H)-2',6'-H :

Tyr99(H)の 2',6'位のプロトン

Tyr104(H)-3',5'-H :

Tyr104(H)の 3',5'位のプロトン

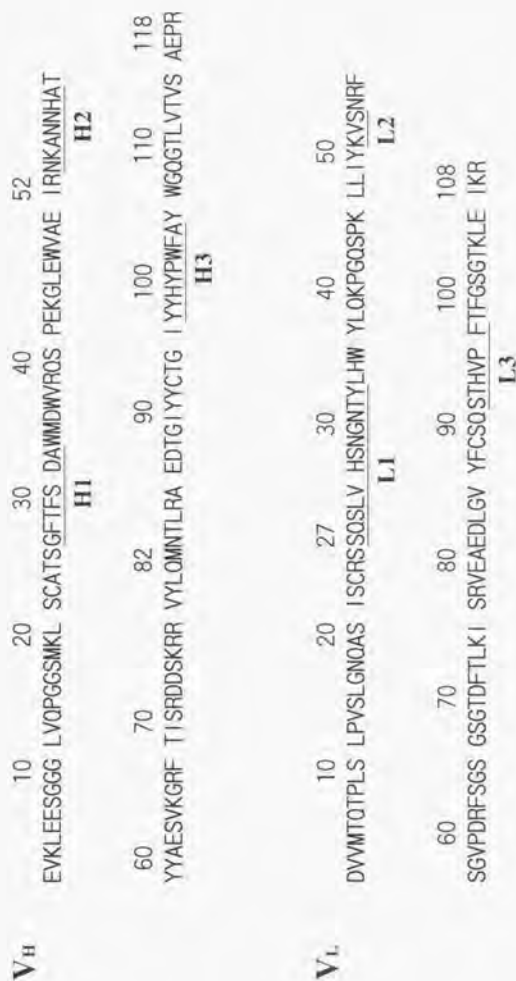


Fig.3-1 抗DNS-Fvのアミノ酸配列。



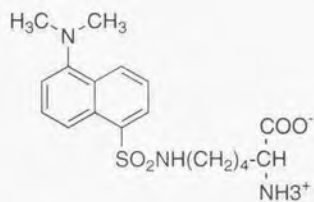


Fig.3-2 ε-dansyl-L-lysine ( DNS-Lys )



### 3-2. NMR による抗原結合部位の動的構造解析

#### 3-2-1. 抗原結合部位の構造多形性

##### (1) 構造多形性の存在

[3',5'-<sup>1</sup>H-Tyr] Fv の <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY スペクトル上に、いくつかの負の交差ピークが観測されている(Fig.3-4a)。<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY スペクトルでは、化学交換ピークと対角ピークは負、ROE ピークは正の符号のシグナルを与えることから<sup>17)</sup>、負の交差ピークの存在は、DNS-Lys 非存在下において Fv 中のいくつかのプロトンが 2 つの状態間を交換していることを示している。このように 1 種類の原子由来のシグナルが異なる 2 つの化学シフト ( $\omega_A$  と  $\omega_B$ ) をもつとき、その間の交換速度定数は、

$$k_{AB}, k_{BA} < \delta\omega \quad (3.1)$$

と表される。ただし、 $\delta\omega = |\omega_A - \omega_B|$  であり、 $k_{AB}$  は状態 A から B へ、 $k_{BA}$  は状態 B から A への移行速度定数を示す ((3.5) 参照)。

また、すでに帰属の完了している Tyr の 3',5' 位のプロトンの化学シフトに対応させることにより、観測された化学交換ピークの帰属を行い、その結果を Fig 3-4a に付記した。さらに、[2',6'-<sup>1</sup>H-Tyr] Fv または [2'-<sup>1</sup>H-His] Fv を用いて <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H ROESY スペクトルを測定し、化学交換ピークを与えるプロトンを特定した。以下に化学交換ピークを与えるプロトンを列記する。

- 1) Tyr91(H)-2',6'-H
- 2) Tyr91(H)-3',5'-H
- 3) Tyr96(H)-2',6'-H
- 4) Tyr96(H)-3',5'-H
- 5) Tyr97(H)-2',6'-H
- 6) Tyr97(H)-3',5'-H
- 7) His98(H)-2'-H
- 8) Tyr99(H)-2',6'-H
- 9) Tyr104(H)-3',5'-H

このうち、Tyr91(H)は、Fv 分子内部において  $\beta$ -strand を形成している残基であるのに対し、Tyr96(H)、Tyr97(H)、His98(H)、Tyr99(H)、Tyr104(H)は、DNS-Lys 結合部位の一部である H3 ループに位置している残基である。

##### (2) 各コンフォーマーの存在比

各状態のシグナル強度比は、それらの存在比に対応している。そこで、各状態の存在比を見積もるために [3',5'-<sup>13</sup>C-Tyr] Fv の <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC スペクトルを測定したところ、H3 ループに位置している Tyr96(H)由来のシグナルが 2 つ観測された

(Fig. 3-5a). それぞれのシグナルを Tyr96(H)と Tyr96(H)\*と名付けると、シグナル強度比より存在比 ( $[\text{Tyr96(H)}] / [\text{Tyr96(H)*}]$ ) を  $14.5 \pm 0.5$  と見積もることができた。尚、存在比および標準偏差の算出には、2回の測定から得られた Tyr96(H)と Tyr96(H)\*のシグナル強度比を用いている。また、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルに存在比率の低い方と思われる Tyr97(H)と Tyr104(H)由来のシグナルも観測されているが、もう一方のシグナルとの化学シフト差が小さく  $^{13}\text{C}$  edited ROESY 測定 (Fig. 3-5b)により帰属を行えなかったため、存在比率を算出するための指標としては用いなかった。

Tyr96(H)の 3',5'位由来の2つのシグナル強度は、その比率が  $14.5 \pm 0.5$  と、大きく異なる。また、Tyr97(H)や Tyr104(H)の 3',5'位由来のシグナルに関しても同様な傾向が見られた。さらに、 $[2',6'\text{-}^1\text{H-Tyr}] \text{Fv}$  の 1D スペクトルから、Tyr96(H)-2',6'-H、Tyr99(H)-2',6'-H、Tyr104(H)-2',6'-H 由来の2つずつのシグナルも異なる強度をもつことが判明した。これは、芳香環のゆっくりとした回転(slow flip-flop motion)により 3'位と 5'位のプロトンが別々に観測されているのではなく、2つのコンフォマーが存在していることを示している。さらに、Tyr96(H)、Tyr97(H)、Tyr99(H)、Tyr104(H)と同じ H3 ループに位置する His98(H)において 2'位のプロトンに化学交換現象が観測されることから、2つのコンフォマーの存在が支持される。以上の結果より、Tyr96(H)、Tyr97(H)、His98(H)、Tyr99(H)、Tyr104(H)については、存在比の異なる2つのコンフォマー間を交換していることが明らかになった。また、Tyr96(H)、Tyr97(H)、His98(H)、Tyr99(H)、Tyr104(H)は H3 ループに存在している残基であることから、H3 ループが2つのコンフォメーションをとっていることが示唆された。

一方、 $\beta$ -strand に位置する Tyr91(H)の 3',5'位由来の2つのシグナル強度はほぼ等しく、slow flip-flop motion により 3'位と 5'位のプロトンが別々観測されていると考えられる<sup>5)</sup>。この場合にもゆっくりとした芳香環の回転によって 3'位と 5'位のプロトンは化学交換しているため、ROESY スペクトル上に負の交差ピークを与える。また、同様な現象が Tyr91(H)の 2',6'位においても観測されている。

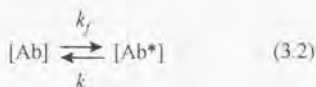
### (3) 交換速度定数の算出

各コンフォマー間の交換速度定数を定量的に見積もるため、さまざまな混合時間における  $[3',5'\text{-}^1\text{H-Tyr}] \text{Fv}$  の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY スペクトルを測定し、化学交換ピークの強度変化を追跡した。混合時間に対し、Tyr96(H)-3',5'-H の化学交換ピーク強度をプロットした結果を Fig. 3-6 に示す。

2つのコンフォマーを  $[\text{Ab}]$  と  $[\text{Ab}^*]$  とし交換速度定数を  $k_f$  と  $k_r$  とすると、交換過

<sup>5)</sup> DNS-Lys 非存在下における Fv の2つのコンフォマーのうち、存在比の高い方を  $[\text{Ab}]$ 、低い方を  $[\text{Ab}^*]$  とする。また、Fv と DNS-Lys の複合体については、 $[\text{Ab-Ag}]$  と表記する。

程を、



と図示することができ、このとき、化学交換ピーク強度(1)は混合時間( $\tau_m$ )と交換速度定数( $k_f$ ,  $k_r$ )を用いて、

$$I(\tau_m) \propto \exp[-(R_f + k_{av})\tau_m] \sinh(k_{av}\tau_m) \quad (3.3)$$

と表される<sup>18,19)</sup>。ただし、 $R_f$ はスピン格子緩和速度であり、 $[\text{Ab}]$ と $[\text{Ab}^*]$ において等しいと仮定してある。また、

$$k_{av} = (k_f + k_r) / 2 \quad (3.4)$$

である。これらは、Jeener らによって  $k_f = k_r$  を仮定して導出された関係式であるため、 $k_f \neq k_r$  の場合にも成り立つことを証明し、その結果については(付録1)に記述した。

混合時間に対する Tyr96(H)-3',5'-H の化学交換ピーク強度のプロットに、式(3.3)を最小二乗法を用いてフィッティングしたところ、平均の交換速度定数  $k_{av} = 16 \pm 3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$  が得られた。同様に、Tyr97(H)-3',5'-H、Tyr104(H)-3',5'-H についても、それぞれ  $k_{av} = 22 \pm 2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$  と  $k_{av} = 15 \pm 2 \text{ (s}^{-1}\text{)}$  と算出された。Tyr96(H)-3',5'-H、Tyr97(H)-3',5'-H、Tyr104(H)-3',5'-H を指標として得られたそれぞれの交換速度定数はほぼ等しく、各残基が同期して交換していることを示している。したがって、H3 ループにミリ秒オーダーで交換するコンフォメーション平衡が存在していると結論した。

さらに、3-2-1 (2)「各コンフォマーの存在比」において記述したように、Tyr96(H)-3',5'-H の化学交換ピークを指標にして 2 つのコンフォマーの存在比が  $[\text{Ab}] / [\text{Ab}^*] = 14.5 \pm 0.5$  と見積もられている。そこで、この結果と Tyr96(H)-3',5'-H における平均の交換速度定数  $k_{av} = 16 \pm 3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$  をもとに、 $k_f = 2.1 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ 、 $k_r = 30 \text{ (s}^{-1}\text{)}$  を算出した。尚、得られた  $k_f$  と  $k_r$  については、式(3.1)の関係も満たしていることも確認できる。

#### (4) DNS-Lys 存在下

DNS-Lys 存在下における構造多形性についても検討するために、DNS-Lys 存在下において  $[3',5'\text{-}^1\text{H-Tyr}] \text{ Fv}$  の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY スペクトルを測定した。その結果、Tyr96(H)-3',5'-H、Tyr97(H)-3',5'-H、Tyr104(H)-3',5'-H 由来の化学交換ピークが DNS-Lys 添加に伴い消失することがわかった(Fig.3-4b)。また、同様に Tyr96(H)-2',6'-H、Tyr97(H)-2',6'-H、His98(H)-2'-H、Tyr99(H)-2',6'-H 由来の化学交換ピークも DNS-Lys 存在下においては観測されなかったことから、DNS-Lys 存在下における H3 ループにはミリ秒オーダーで交換するコンフォメーション平衡が存在しな

いことが明らかになった。以上の結果より、Fv の H3 ループに存在している 2 形は DNS-Lys 添加に伴い 1 形に収束すると結論した。

一方、Tyr91(H)-3',5'-H に観測された化学交換ピークは、DNS-Lys を添加後も観測されている (Fig. 3-4b)。また、Tyr91(H)-2',6'-H についても同様な結果が得られた。したがって、Tyr91(H) の slow flip-flop motion は DNS-Lys 添加によって影響を受けないことがわかった。

### 3-2-2. 構造多形と結合活性

H3 ループに存在する構造多形性と結合活性の関連について検討した。Fv と DNS-Lys のモル比を 1:0.5 としたとき、NMR スペクトル上には、抗原非存在下における 2 つのコンフォマーと DNS-Lys 複合体 (DNS-Lys 存在下の Fv) 由来のシグナルがそれぞれ別々に観測される。Tyr96(H)-3',5'-H を例にとると、6.6 ppm に [Ab]、5.4 ppm に [Ab\*]、5.2 ppm に DNS-Lys 複合体由来のシグナルが観測される。そこで、[Ab] または [Ab\*] と DNS-Lys 複合体間の交換によって生じる化学交換ピークを検出するため、DNS-Lys を 0.5 当量添加した [3',5'-<sup>1</sup>H-Tyr] Fv を作製し <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY スペクトルを測定した (Fig. 3-7)。Tyr96(H)-3',5'-H のシグナルについては、[Ab] と DNS-Lys 複合体由来のシグナル間に交差ピークが観測される一方で、[Ab\*] と DNS-Lys 複合体由来のシグナル間には観測されていない。これは、[Ab] と [Ab\*] のうち、[Ab] のみに DNS-Lys が結合することを示している。したがって、抗原非存在下において H3 ループに存在する 2 形のうち一方のみに DNS-Lys が結合すると結論した。

3-2-1 節、3-2-2 節より得られた結果をまとめて Fig. 3-13a に図示した。抗原非存在下において Fv の H3 ループが 2 つのコンフォメーションをとり、その間の交換速度定数が  $k_f = 2.1 \text{ (s}^{-1}\text{)}$  と  $k_r = 30 \text{ (s}^{-1}\text{)}$  であること、および、2 つのコンフォマーのうち一方が DNS-Lys と結合することが明らかになった。

### 3-2-3. 各コンフォメーションの特徴

抗原非存在下において H3 ループがとるコンフォメーションの特徴について検討した。

[Ab] 由来の Tyr96(H)-3',5'-H の化学シフトは 6.6 ppm、[Ab\*] 由来の Tyr96(H)-3',5'-H の化学シフトは 5.4 ppm である。一方、テトラペプチド (Gly-Gly-Tyr-Ala) における Tyr 残基の 3',5' 位の化学シフトについては 6.86 ppm と報告されている<sup>20)</sup>。したがって、[Ab\*] 由来の Tyr96(H)-3',5'-H の化学シフトが大きく低磁場シフトしていることがわかる。このような大きなシフトについては、芳香族アミノ酸が近傍に存在することにより生じる環電流効果 (ring current shift) に起因することから、

[Ab\*]由来の Tyr96(H)の近傍には芳香族アミノ酸が存在していると考えられる。

さらに、Tyr96(H)-3',5'-H からの残基間 NOE ピークを検出することによって各コンフォメーションを特徴づけるために、[2',6'-d<sub>2</sub>-Tyr] Fv の <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY スペクトルを測定した(Fig.3-8a)。このとき、2',6'位のプロトンを重水素化した Fv を用いることにより、双極子相互作用による 3',5'プロトンの緩和が抑制され NOE が観測しやすくなる。その結果、[Ab\*]由来の Tyr96(H)-3',5'-H からは2つの残基間 NOE ピークが観測されたが([5.4, 1.6 ppm], [5.4, 1.9 ppm])、[Ab]由来の Tyr96(H)-3',5'-H からは残基間 NOE ピークが1つも観測されなかった。さらに、[2',6'-d<sub>2</sub>-Tyr, d<sub>α</sub>-Val] Fv の <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY スペクトルと比較することにより、[Ab\*]由来の Tyr96(H)-3',5'-H から観測された残基間 NOE ピークのうち一方(5.4, 1.6 ppm)は、Val 残基との間の NOE ピークであることが判明した。

以上の結果より、[Ab\*]由来の Tyr96(H)は芳香族アミノ酸と Val 残基に囲まれていることが明らかになった。一方、[Ab]由来の Tyr96(H)は溶媒に露出していると推察される。

3-2-1 ~ 3-2-3 節より、[Ab]では、Tyr96(H)が溶媒に露出し結合ポケットが開かれるため DNS-Lys が結合可能となり、[Ab\*]では、Tyr96(H)が結合ポケットを塞ぎ DNS-Lys が結合できなくなると考えられる。したがって、Fig.3-8b に示すように [Ab]を open フォーム、[Ab\*]を close フォームとして特徴づけることができる。

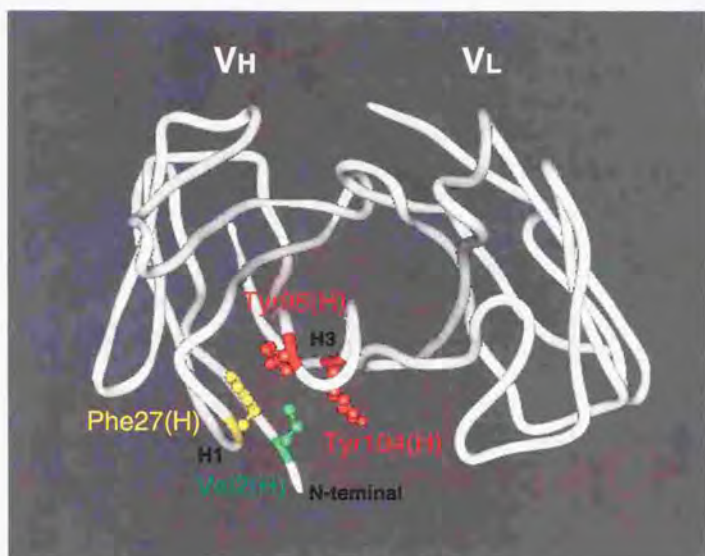


Fig.3-3 抗DNS-Fv の結晶構造. DNS-LysのプロトンからNOEが観測される残基 (Val2(H), Phe27(H), Tyr96(H), Tyr104(H)) に側鎖を表示した。

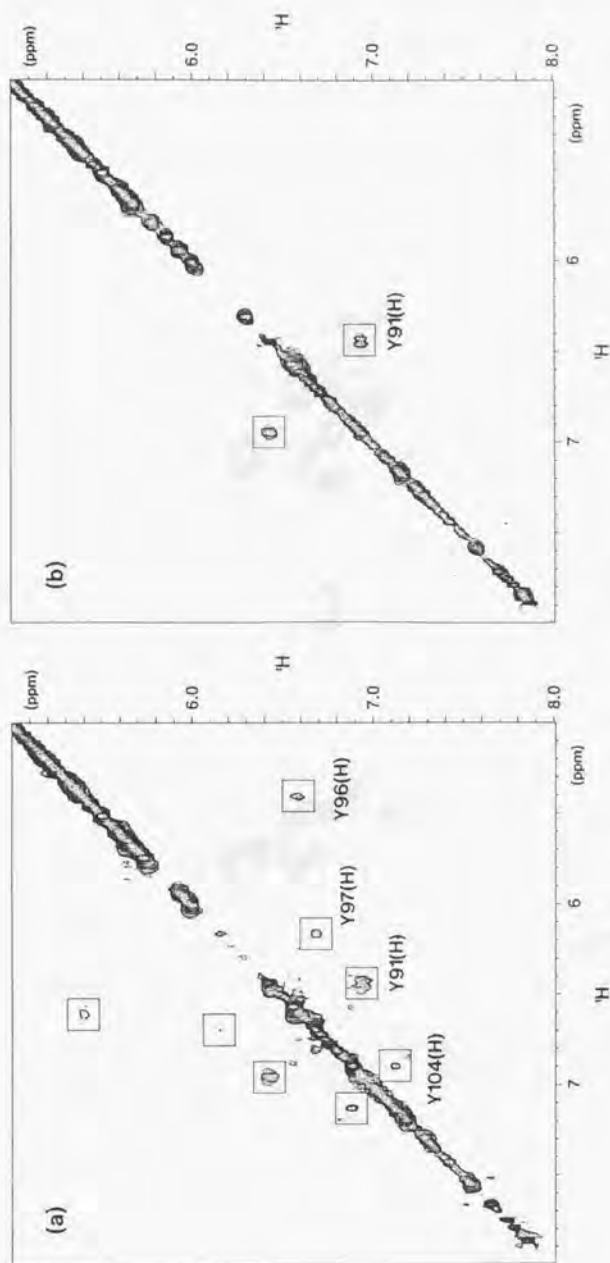


Fig. 3.4  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY spectra of  $[3,5\text{-}^{14}\text{C}\text{-Tyr}] \text{Fv}$ .  
 (a) in the absence of DNS-Lys.  
 (b) in the presence of DNS-Lys.

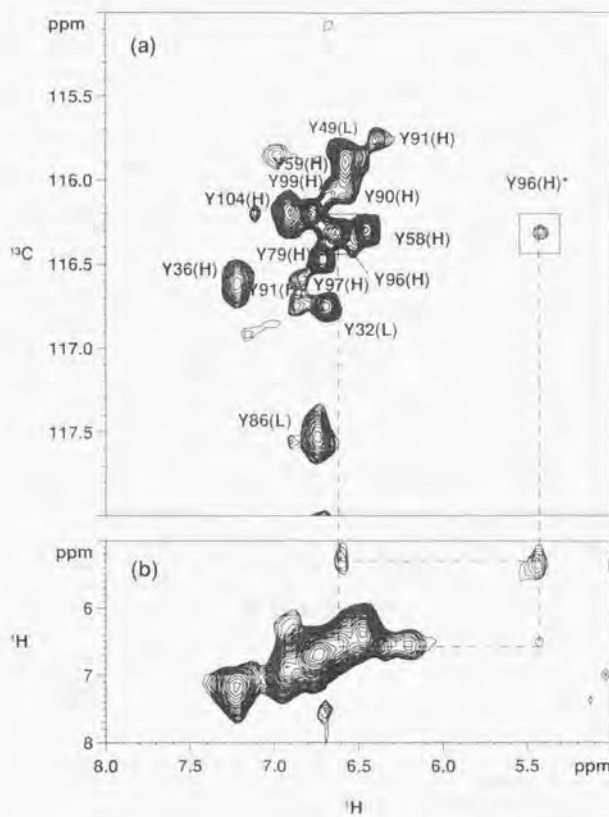


Fig. 3-5 (a)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of  $[3',5'\text{-}^{13}\text{C}\text{-Tyr}]$  Fv in the absence of DNS-Lys.  
 (b)  $^{13}\text{C}$ -edited ROESY spectrum of  $[3',5'\text{-}^{13}\text{C}\text{-Tyr}]$  Fv in the absence of DNS-Lys.  
 ROE mixing time = 15 (ms)



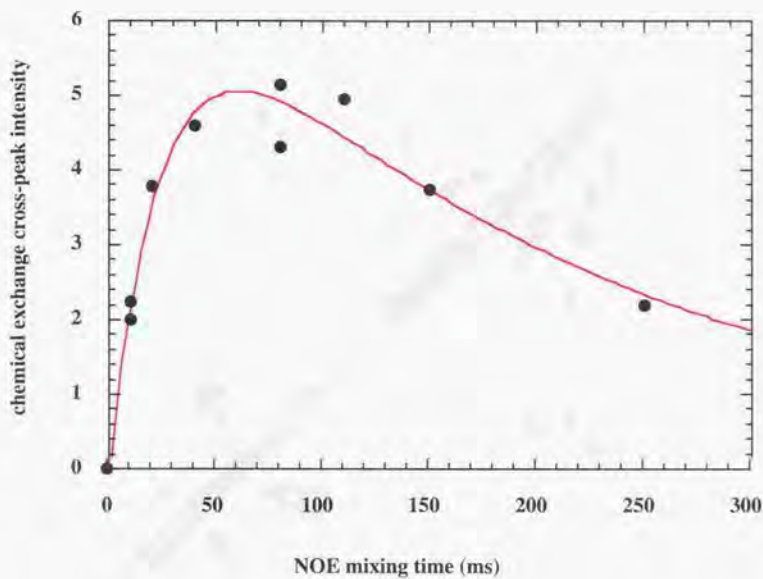


Fig.3-6 Plot of chemical exchange cross-peak intensities vs. NOE mixing time for the exchange of Tyr96(H)-3',5'-H between two conformational isomers. The curve represents a best fit to these data generated using eq.3.3. NOESY spectra with mixing times of 10, 20, 40, 80, 110, 150 and 250 ms were used for the analysis.

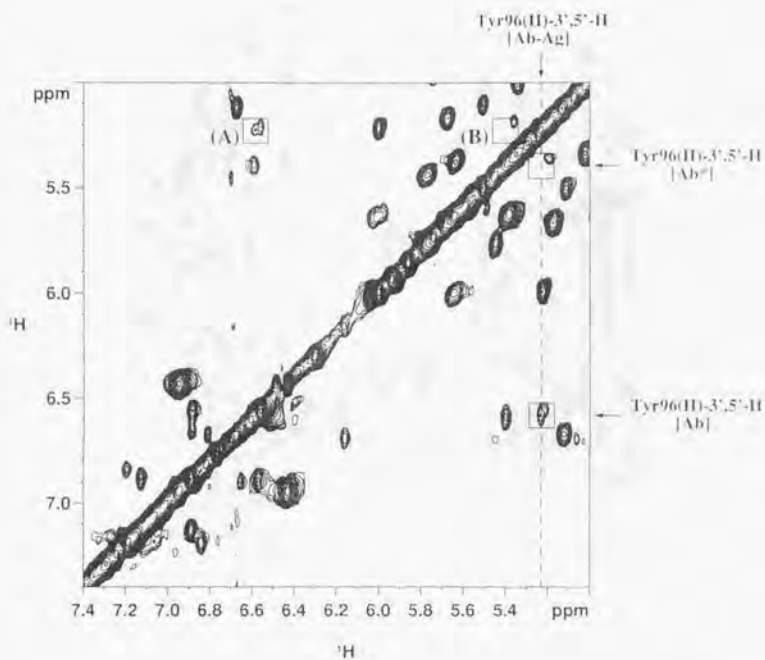


Fig.3-7 40-ns NOESY spectrum of  $[3',5'\text{-}^2\text{H-Tyr}] \text{Fv}$  in the presence of half molar of DNS-Lys. The boxes correspond to the chemical shifts for the chemical exchange cross-peaks between Tyr96(H)- $3',5'\text{-}^2\text{H}$  of Ab and Ab-Ag (A), and those of Ab\* and Ab-Ag (B), respectively. Only one pair of the cross-peaks represented by (A) is observed.

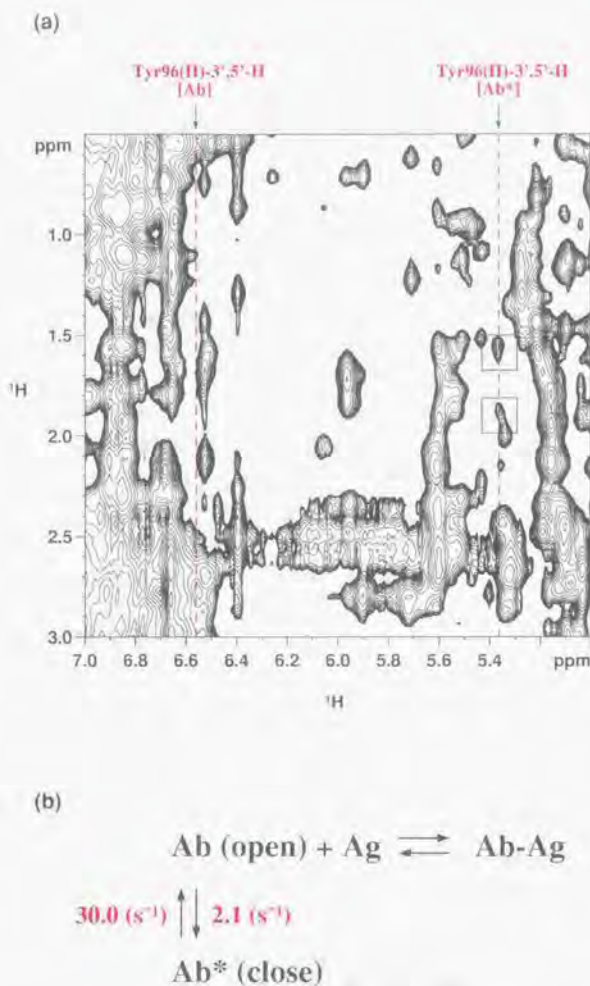


Fig.3-8 (a) 45-ms NOESY spectrum of [2',6'-d-Tyr] Fv in the absence of DNS-Lys. Dotted lines show the chemical shifts for Tyr96(H)-3',5'-H of Ab and Ab\*, respectively. Interresidue NOE cross-peaks given by Tyr96(H)-3',5'-H of Ab\* are boxed. (b) DNS-Lys binding scheme of Fv.

### 3-3. ストップフロー蛍光法による DNS-Lys 認識機構の解析

#### 3-3-1. DNS-Lys 結合過程

Fv と結合した DNS-Lys は、335 nm の励起に対し約 500 nm に極大波長をもつ強い蛍光を発する。しかし、使用したストップフロー装置には 320 nm と 335 nm のカットオフフィルターしか用いることができないため、335 nm の励起を行えない。そこで、280 nm を励起し Fv の Trp 残基の発する蛍光（極大 335 nm）によって DNS-Lys が蛍光を発することを利用し、DNS-Lys 結合過程を追跡した。

Fig 3-9 に Fv へ DNS-Lys が結合することに伴う蛍光強度変化を追跡した結果を示す。得られた曲線を single exponential へフィッティングすると、体系的にデータポイントとフィッティング曲線が外れるため、結合過程は 2 相性であると判断した。

次に、2 相性を示す結合過程である Mechanism I と Mechanism II（付録 2 参照）を識別するため、遅い相(slow phase)の見かけの速度定数  $k_{slow}$  の DNS-Lys 濃度依存性を追跡したところ(Fig 3-10b)、測定に用いた DNS-Lys 濃度を高くするにつれて  $k_{slow}$  の値が徐々に低下し、一定値に収束していくことが判明した。この結果は、Mechanism II を支持し、Mechanism I とは相容れない。したがって、抗原非存在下において Fv は 2 形をとり、そのうち一方に DNS-Lys が結合することが示された。

#### 3-3-2. 真の速度定数の算出

見かけの速度定数( $k_{fast}$ ,  $k_{slow}$ )などを用いて真の速度定数( $k_{-1}$ ,  $k_{-2}$ ,  $k_1$ ,  $k_2$ )を算出した。算出方法の詳細については（付録 2）に記してある。

測定に用いた DNS-Lys 濃度に対して  $[k_{fast} + k_{slow}]$  と  $[k_{fast} \times k_{slow}]$  をプロットしたところ比例関係が成り立ち(Fig 3-11)、それぞれの傾きより  $k_{-1} = (7.8 \pm 0.8) \times 10^7$  ( $M^{-1}s^{-1}$ ) と  $k_{-1} \times k_{-2} = (2.1 \pm 0.3) \times 10^9$  ( $M^{-1}s^{-2}$ ) が算出された。また、この結果より  $k_{-2} = 27.6 \pm 1.7$  ( $s^{-1}$ ) と見積もることができた。さらに、切片の値より  $k_{-1}$  と  $k_{-2}$  を求めることが可能だが、複数回測定を行ったときのばらつきが大きく切片の値を用いるのは適切でないと判断した。

そこで、 $k_{-1}$  と  $k_{-2}$  を求めるため、DNS-Lys 大過剰のときの速い相と遅い相の振幅、および結合定数を利用した。速い相と遅い相の振幅の比は、DNS-Lys 濃度を増加させると一定値に収束し、 $[Ab]$  と  $[Ab^*]$  の比に等しくなる。そこで、速い相と遅い相の振幅の比を DNS-Lys 濃度に対しプロットし、振幅比の増加が横ばいになったポイントから  $[Ab] / [Ab^*] = 13.7$  を得、この結果より  $k_{-2} = 2.0 \pm 0.2$  ( $s^{-1}$ ) と見積もった。また、蛍光測定より結合定数  $Ka = (3.8 \pm 0.6) \times 10^7$  ( $M^{-1}$ ) が得られ、この値を式(3.29)に代入することにより、 $k_{-1} = 4.5 \pm 0.4$  ( $s^{-1}$ ) を算出した。

以上、3-3-1 節、3-3-2 節より得られた DNS-Lys 結合過程および各速度定数をまとめて Fig.3-13b に示した。

### 3-3-3. エネルギー変化

遷移状態理論<sup>21)</sup>にもとづき、DNS-Lys 結合過程における各ステップの自由エネルギー変化を見積もった。その結果については、自由エネルギー反応経路プロファイルとして Fig.3-14 に示してある。

また、15、20、25、30、34、37、41 °C において  $k_{-1}$  を測定し、それぞれの  $k_{-1}$  の値を  $1/T$  (K) に対しプロットしたところ、直線関係が成り立ち、活性化エネルギー  $E_A = 4.6$  (kcal/mol) が算出された (Fig.3-12)。このような小さな活性化エネルギー (3~5 kcal/mol) は、DNS-Lys 結合速度 ( $k_{-1}$ ) が拡散律速によって規定されていることを意味する。したがって、[Ab] に DNS-Lys が結合するときには、コンフォメーション変化などのエネルギー障壁がないと考えられる。

尚、自由エネルギー変化と活性化エネルギーの計算方法および  $K^{\ddagger}$  の詳細については、(付録 3) に記述してある。

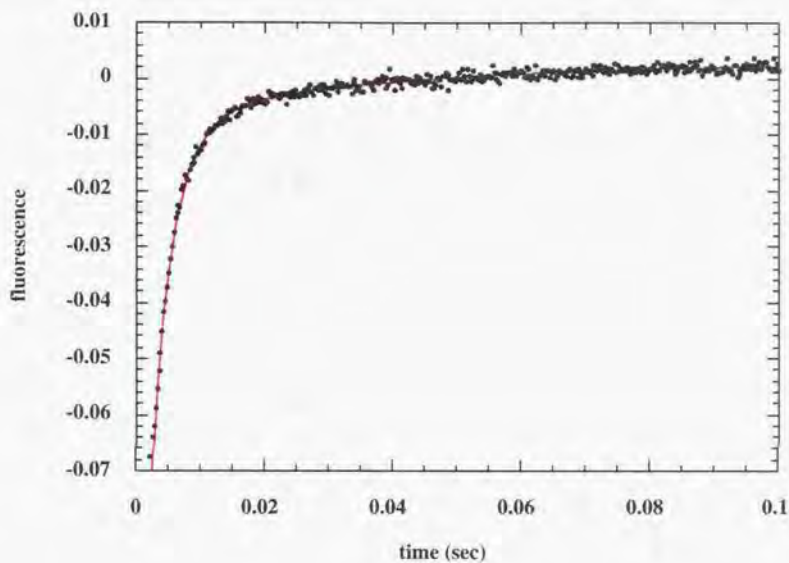


Fig.3-9 Complex kinetics in the reaction of Fv with DNS-Lys.  
 The solid line represents an attempted least-squares fit to the equation :  

$$F = A \exp(-k_{fast} \times t) + B \exp(-k_{slow} \times t) + C$$
  
 where  $t$  is time and  $F$  is fluorescence, respectively.

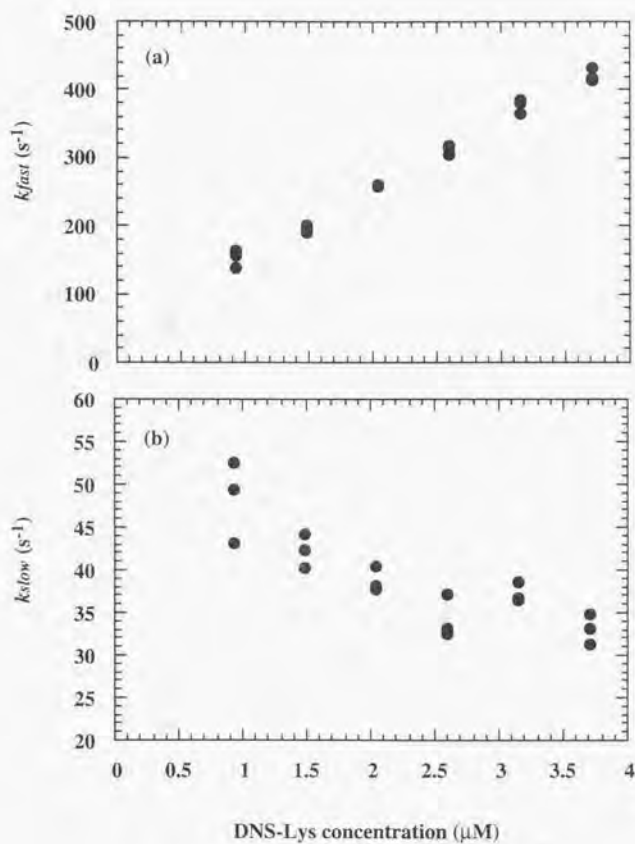


Fig.3-10 Dependence of (a)  $k_{\text{fast}}$  and (b)  $k_{\text{slow}}$  on total DNS-Lys concentration.

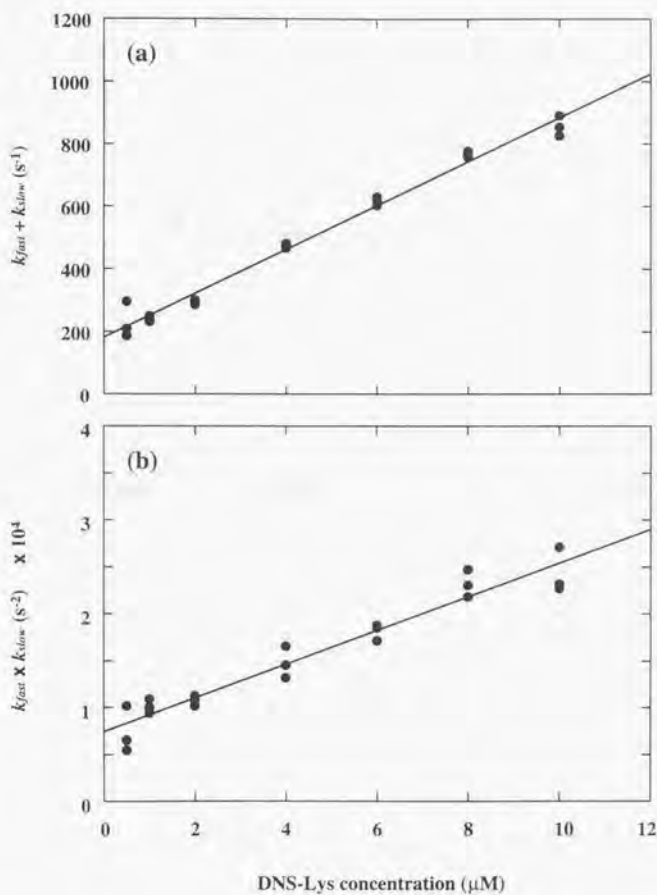


Fig.3-11 Dependence of (a)  $[k_{\text{fast}} + k_{\text{slow}}]$  and (b)  $[k_{\text{fast}} \times k_{\text{slow}}]$  on total DNS-Lys concentration. The solid lines are least-squares fits to straight lines.



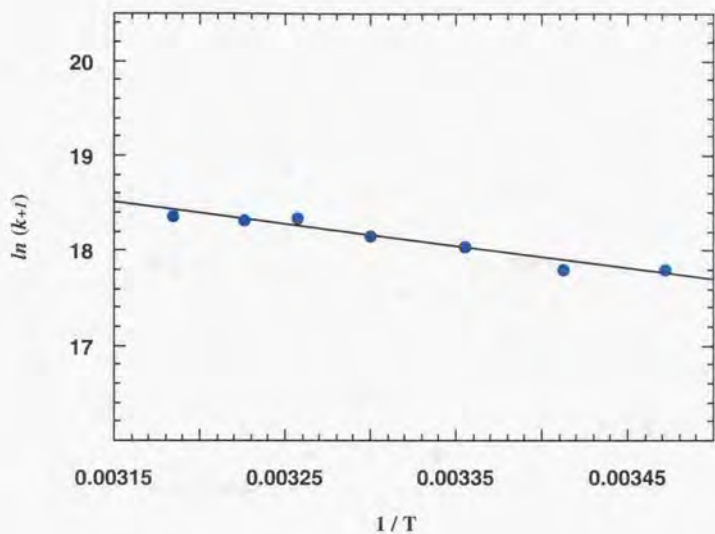


Fig.3-12  $k_{+1}$  ( $\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ) の温度依存性 (Arrhenius plot).  
温度については  $T$  (Kelvin: K) で表してある。

### 3-4. 考察

Mechanism II は、ストップフロー法より得られたデータを矛盾なく説明する最も簡単なスキームである。しかしながら、NMR を用いた解析から示された DNS-Lys 結合スキームが、ストップフロー法によって得られたデータと一致しているため、Mechanism II は適切であると判断した。さらに、このことは、DNS-Lys 非存在下において存在する 2 つのコンフォメーション間の交換速度定数が一致していることによっても支持されている。以上の結果より、FvへDNS-Lys が結合するときの自由エネルギー反応経路は、Fig.3-14 に示すように表される。

Fig.3-14 は、DNS-Lys 非存在下において、エネルギー差が 1.6 (kcal/mol)である 2 つのコンフォマーが存在していることを示している。このコンフォメーション平衡は H3 ループの構造多形性に由来することが ROESY 実験よりわかっている。また、Ab と Ab\*の間には、高いエネルギー障壁がある。これは、2 つのコンフォマーの高次構造に大きな差異があることを示唆し、NMR 解析を行ったときに、Ab\* 由来の Tyr96(H)-3',5'-H から残基間 NOE が観測されたのに対し、Ab 由来の Tyr96(H)-3',5'-H からは NOE ピークが観測されなかったことに対応している。

さらに、Ab 由来の Tyr96(H)-3',5'-H が、テトラペプチド中の Tyr 残基の 3',5'プロトンとほぼ等しい化学シフトを示すことや残基間 NOE ピークを与えないことから、Ab では Tyr96(H)が溶媒に露出し、DNS-Lys と結合できるように抗原結合ポケットを開いたコンフォメーションをとっていることが推察される。これは、Ab と DNS-Lys の結合が拡散律速で起こることを示したストップフロー実験によっても支持される。一方、Ab\*のコンフォメーションが、結合フォームである Ab と大きく異なることから、Ab\*は DNS-Lys と結合できないと考えられる。

DNS-Lys 結合に伴う、H3 ループに存在するコンフォメーション平衡の消失は、負のエントロピー変化を引き起こすため、エントロピー的には反応の進行を妨げている。しかし、熱力学的解析(Fig.3-15)から<sup>22)</sup>、負のエントロピー変化を負のエントルピー変化が大きく上回ることが示されているため、構造多形性の消失という結合に対する負の要素を、相互作用形成という正の要素が打ち消し、結合が引き起こされると考えられる。

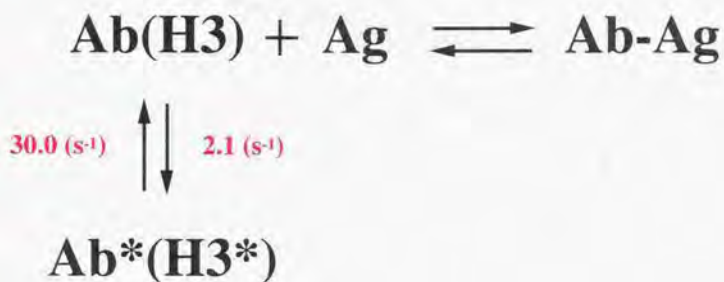
また、DNS-Lys 非存在下の Fv については、結晶化に 2.0 (M)と 2.8 (M)の硫酸アンモニウムを用いた 2 種類の結晶構造が解かれている。それぞれの H3 ループのコンフォメーションは異なり、あたかも Ab と Ab\*に対応しているような立体構造が得られている。各構造の抗原結合部位を Fig.3-16 に、その H3 ループに存在する残基については Ramachandran プロットを Fig.3-17 に示した。Tyr97(H)、His98(H)については、異常な  $\phi$  または  $\psi$  値を示しており、安定なコンフォメーションではないことがわかる。このように、X 線結晶構造解析からも、H3 ループの構造多形性の存在が示唆されている。

抗 DNS-Fv を抗 fluorescein 抗体と比べると、可変領域のアミノ酸配列の相同性が約 84 % と高いが、それぞれの抗原結合部位の位置は大きく異なる<sup>23,24)</sup>。抗 DNS-Fv の DNS-Lys 結合部位は、H 鎖 N 末端、H1 ループ、H3 ループに囲まれた領域によって構成されているのに対し、抗 fluorescein 抗体の fluorescein 結合部位は、V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> ドメインの界面に位置している。これを Fig 3-3 に示した抗 DNS-Fv の結晶構造を用いて比べると、DNS-Lys は H3 ループの左側、fluorescein は H3 ループの右側に結合していることになる。このことを考慮に入れると、抗 DNS-Fv において Ab\* は、Tyr96(H) が結合ポケットを塞ぎ DNS-Lys が結合できなくなる close フォームであると述べたが、一方で V<sub>H</sub>、V<sub>L</sub> ドメインの界面の位置に新たなリガンド用の結合ポケットを有している可能性がある。

Wilson らのグループは、5 種類のステロイド存在下における抗 progesterone 抗体の結晶構造を解き、cross-reactivity について報告している<sup>25)</sup>。その結果、異なる抗原結合ポケットに化学構造の異なるステロイドが入り込み、それぞれ高親和性を獲得していることが判明した。このように、複数の抗原結合ポケットを用意し、それに応じた数の抗原と結合する抗体が存在していることが示唆されている。また、Milstein らのグループは、ストップフロー蛍光法を用いて抗 2-phenyl-5-oxazolone (Ox) 抗体の速度論的解析を行い、さまざまな抗原結合スキームを提唱している<sup>26)</sup>。得られた 40 種類の抗 Ox 抗体のうち 3 種類において 2 相性または 3 相性の Ox 結合過程が観測されたため、彼らは、これらの抗体について構造異性化が起こっていると結論した。また、この構造異性化により認識可能な抗原の数を増やしているのではないかと考察している。

抗 DNS-Fv については、Ab と Ab\* で示される 2 つのコンフォマーが存在し、そのうち Ab のみに DNS-Lys が結合することが明らかになった。ただし、Ab\* は DNS-Lys 以外のリガンドと結合可能なコンフォマーである可能性があることから、抗 DNS 抗体は、Ab と Ab\* の 2 つのコンフォメーションを予め用意して複数の抗原を認識する多機能抗体であると考えられる。このように、抗体の抗原結合部位が複数のコンフォメーションをとることにより認識可能な抗原の数が増え、CDR ループのアミノ酸配列やその長さを変化させることにより獲得していた抗原認識の多様性を補っているのではないかと考えている。

(a)



(b)

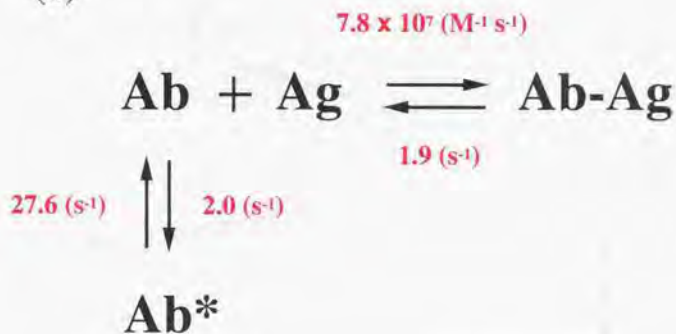


Fig.3-13 DNS-Lys binding schemes of Fv and the rates for each step obtained by (a) NMR and (b) stopped-flow experiments.

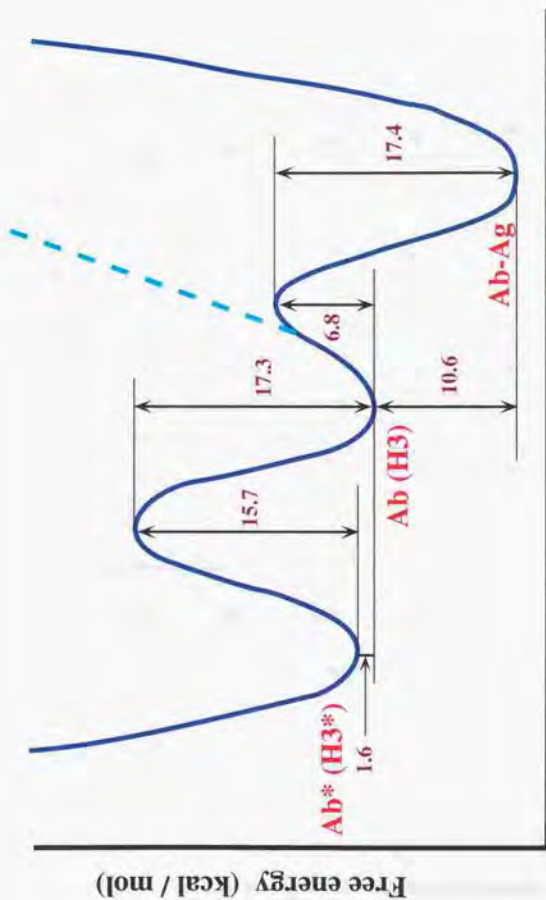


Fig.3-14 Free energy reaction pathway profile for the binding of DNS-Lys to Fv according to the transition state theory.

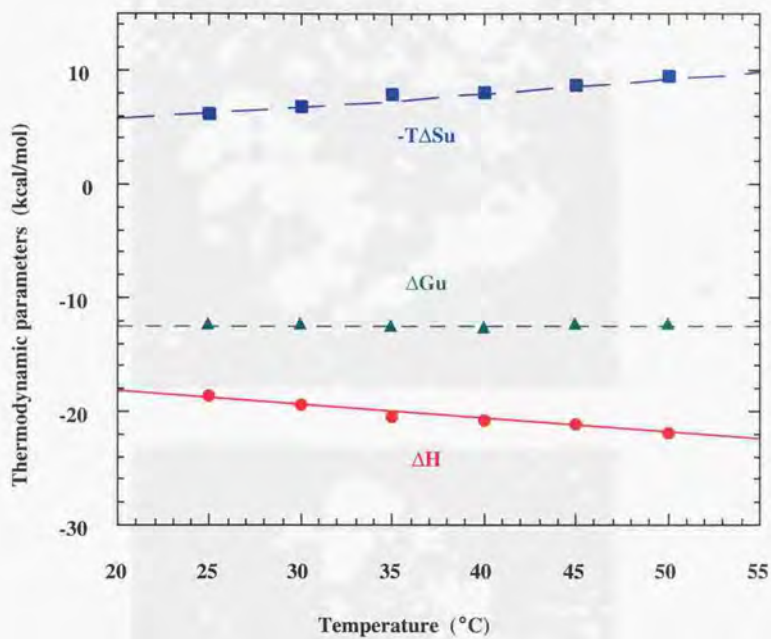


Fig.3-15 Thermodynamic parameters plotted against temperature for the binding of DNS-Lys to Fv.

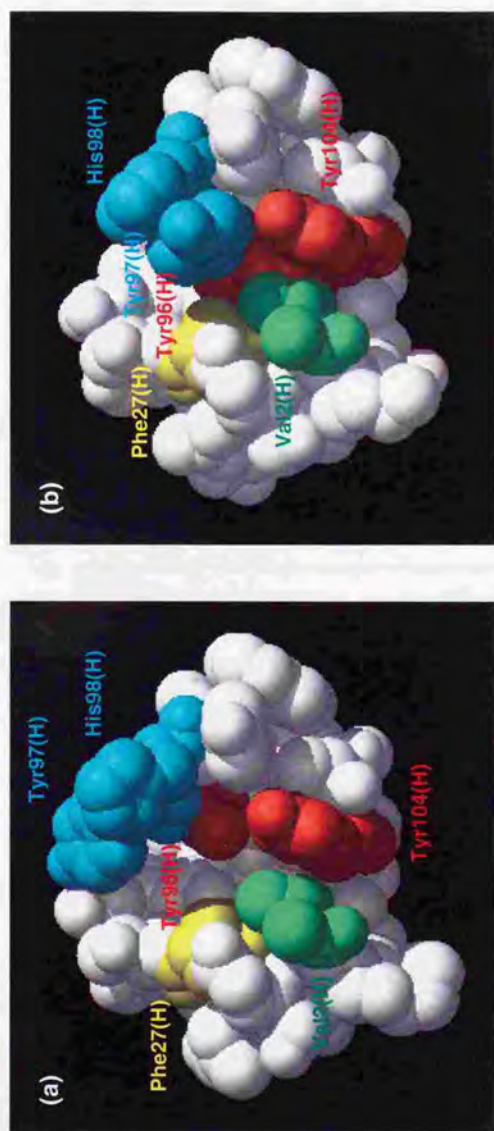


Fig.3-16 異なる条件で作製された抗DNS-Fvの結晶を用いて得られた抗原結合部位の三次元構造。  
(a) 2.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (b) 2.8 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

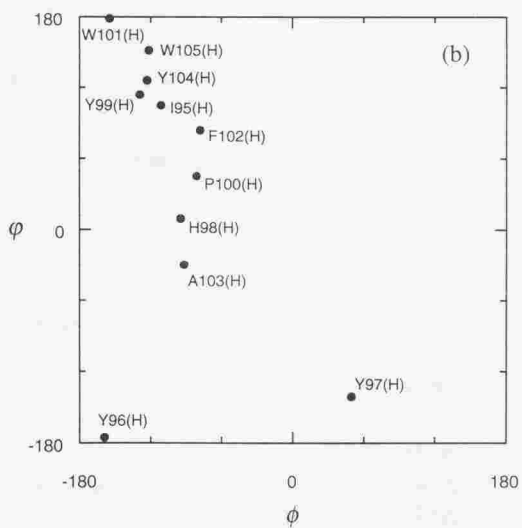
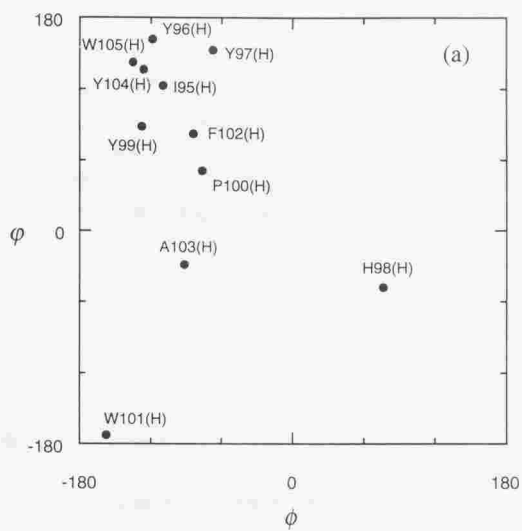


Fig.3-17 Ramachandran plot. (a) 2.0M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (b) 2.8M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$



### 3-5. 結論

NMR およびストップフロー法を用いて抗 DNS-Ev を解析した結果、抗原結合部位には2つのコンフォーマーが存在し、そのうち的一方が DNS-Lys と結合可能なフォームであることが明らかになった。また、各コンフォーマー間の交換速度定数や DNS-Lys 結合速度定数を決定することに成功した。以上の結果より、抗体の構造異性化によって抗原認識の多様性が補われている可能性を示唆することができた。

### 3-6. 付録

#### (付録 1) 化学交換ピーク強度と NOE 混合時間

化学交換過程を



と仮定する。このとき、交換速度定数  $k_{AB}$  と  $k_{BA}$  は、A と B のモル数  $x_A$  と  $x_B$  を用いて、

$$k_{AB} = x_B k, \quad k_{BA} = x_A k \quad (3.6)$$

と表すことができる。ここで、各スピンの緩和速度を  $R_{1A}$ ,  $R_{1B}$ , A と B の双極子緩和速度を  $R_D$  とすると、化学交換ピーク強度  $I_{AB}(\tau_m)$ ,  $I_{BA}(\tau_m)$  は、

$$I_{AB}(\tau_m) = I_{BA}(\tau_m) = -x_A x_B (R_D / D) \exp(-\sigma \tau_m) \sinh(D \tau_m) \quad (3.7)$$

と表される<sup>18)</sup>。ただし、

$$\sigma = (R_{AA} + R_{BB}) / 2 \quad (3.8)$$

$$\delta = (R_{AA} - R_{BB}) / 2 \quad (3.9)$$

$$D = (\delta^2 + x_A x_B R_C^2)^{1/2} \quad (3.10)$$

$$R_{AA} = R_{1A} + 2x_B R_D + x_B k \quad (3.11)$$

$$R_{BB} = R_{1B} + 2x_A R_D + x_A k \quad (3.12)$$

$$R_C = R_D - k \quad (3.13)$$

である。ここで、2 状態を交換している1つのスピンを考える。ただし、 $R_{1A} = R_{1B} = R_1$  と仮定する。また、Jeener らが仮定した関係  $x_A = x_B = 1/2$  を用いずに、 $x_A \neq x_B$  として扱う。

2 状態を交換している 1 つのスピンの場合には、その間に双極子緩和が働かないので、 $R_D = 0$  となる。その結果、

$$R_{AA} = R_{1A} + x_B k = R_1 + k_{AB} \quad (3.14)$$

$$R_{BB} = R_{1B} + x_A k = R_1 + k_{BA} \quad (3.15)$$

$$R_C = -k \quad (3.16)$$

$$\sigma = (k_{AB} + k_{BA} + 2R_1) / 2 \quad (3.17)$$

$$\delta = (k_{AB} - k_{BA}) / 2 \quad (3.18)$$

$$D = (k_{AB} + k_{BA}) / 2 \quad (3.19)$$

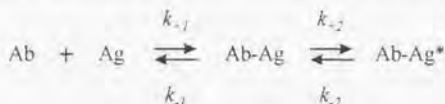
が成り立ち、それぞれを式(3.7)へ代入すると、

$$I_{AB}(\tau_m) = I_{BA}(\tau_m) = x_A x_B / (x_A + x_B) \exp \{ -\{R_1 + (k_{AB} + k_{BA}) / 2\} \tau_m \} \\ \times \sinh \{ \{(k_{AB} + k_{BA}) / 2\} \tau_m \} \quad (3.20)$$

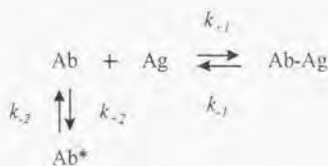
と導かれる。

## (付録 2) 速度論的解析について

2 分子の結合過程が 2 相性を示す場合、以下の 2 つの機構が考えられる。



### Mechanism I



### Mechanism II

Mechanism I は、2 分子が結合した後、片方もしくは両方の分子に構造変化が起こり、より安定な複合体になるモデルであり、Mechanism II は、コンフォメーション平衡が予め存在し、その一方のコンフォメーションにのみリガンドが結合するモデルである。ストップフロー測定において観測されるのは、各ステップに

おける真の速度定数  $k_{+1}$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_{+2}$ ,  $k_{-2}$  を組み合わせた見かけの速度定数  $k_{fast}$  と  $k_{slow}$  である。ここで、 $k_{fast}$  とは観測される速い相の速度定数を、 $k_{slow}$  とは観測される遅い相の速度定数を指す。また、Mechanism I では Ag 濃度を上げたときに  $k_{slow}$  の値が増大し、Mechanism II では Ag 濃度を上げたときに  $k_{slow}$  の値が減少するため、 $k_{slow}$  の Ag 濃度依存性を追跡することにより、これらの 2 つの機構を区別することが可能である。

## (2-1) $k_{+1}$ , $k_{-2}$

Mechanism II では、見かけの速度定数は真の速度定数によって、

$$k_{fast} = [L + (L^2 + 4M)^{1/2}] / 2 \quad (3.21)$$

$$k_{slow} = [L - (L^2 + 4M)^{1/2}] / 2 \quad (3.22)$$

$$L = k_{+1}(C_b + C_g) + k_{-1} + k_{+2} + k_{-2} \quad (3.23)$$

$$M = k_{-1}(k_{+2} + k_{-2}) + k_{+1}[k_{+2}C_b + k_{-2}(C_b + C_g)] \quad (3.24)$$

と関係づけられる。ここで、 $C_b$  と  $C_g$  はそれぞれ Ab と Ag の濃度である。真の速度定数を求めるために、式(3.21)と式(3.22)を変形すると、

$$k_{fast} + k_{slow} = L \quad (3.25)$$

$$k_{fast} \times k_{slow} = M \quad (3.26)$$

となる。したがって、 $[k_{fast} + k_{slow}]$  と  $[k_{fast} \times k_{slow}]$  を Ag 濃度に対しプロットすると、それぞれの傾きより  $k_{+1}$  と  $k_{-2}$  の値が得られる。

## (2-2) $k_{+2}$

$C_g$  を大過剰にしたときの速い相と遅い相の振幅を用いることにより、Ab と Ab\* の存在比を求めることができる。 $C_g$  が大過剰 ( $k_{+1}C_g \gg k_{+1}C_b + k_{-1}$ ;  $[1 + \{C_g / (C_b + Ka^{-1})\}] \gg k_{+2} / Ka$  は結合定数) のとき、式(3.21)と式(3.22)を、

$$k_{fast} = k_{+1}C_g \quad (3.27)$$

$$k_{slow} = k_{-2} \quad (3.28)$$

と表すことができる。このとき、速い相は、予め存在する Ab と Ag の結合により生じる複合体 Ab-Ag 形成に対応する。一方、遅い相は、Ab\* が Ab に変化した後、複合体 Ab-Ag が形成される過程に対応する。したがって、 $C_g$  の値が増加するにつれて速い相と遅い相の振幅値の比が一定値に収束し、この比が Ab と Ab\* の存在比になる。Ab と Ab\* の存在比は  $k_{-2}$  と  $k_{+2}$  の比に対応しているので、(2-1)の結果を踏まえ、 $k_{+2}$  の値が得られる。

## (2-3) $k_{-1}$

Mechanism II において結合定数 Ka は以下のように表される

$$K_a = k_{+1} / \{ k_{-1} (1 + k_{+2} / k_{-2}) \} \quad (3.29)$$

したがって、すでに決定された  $k_{+1}$ 、 $k_{-1}$ 、 $k_{+2}$  と結合定数  $K_a$  の値から、 $k_{-1}$  の値を求めることができる。

### (付録 3) 熱力学的パラメーターの算出方法について

遷移状態理論<sup>21)</sup>によると、遷移状態  $[S^\ddagger]$  と基底状態  $[S]$  の間に平衡が存在し、その平衡定数  $K^\ddagger$  を

$$K^\ddagger = [S^\ddagger] / [S] \quad (3.30)$$

と記述することができる。さらに、速度定数  $k_f$  については、温度  $T$  (K)、ボルツマン定数  $k_B$ 、プランク定数  $h$  を用いて、

$$k_f = (k_B T / h) K^\ddagger \quad (3.31)$$

と表される。したがって、 $[S]$  と  $[S^\ddagger]$  の間の自由エネルギー差  $\Delta G$  は、

$$\Delta G = -RT \ln K^\ddagger = -RT \ln (k_f h / k_B T) \quad (3.32)$$

となり、速度定数  $k_f$  より、 $\Delta G$  を算出することができる。ただし、 $R$  は気体定数である。また、エンタルピー変化  $\Delta H^\ddagger$  および活性化エネルギー  $E_A$  については、

$$d(\ln K^\ddagger) / d(1/T) = -\Delta H^\ddagger / R \quad (3.33)$$

$$d(\ln k_f) / d(1/T) = -E_A / R \quad (3.33)$$

$$E_A = \Delta H^\ddagger + RT \quad (3.34)$$

が成り立つため、 $(1/T)$  に対し  $(\ln k_f)$  をプロットし、その傾きより  $E_A$  を導き出すことが可能である。

# NMR を用いた触媒抗体の抗原結合部位の解析

## 第4章 実験材料と実験方法 ~ 触媒抗体 6D9 ~

### 4-1. 触媒抗体 6D9 と TSA (III)、substrate (IV)

触媒抗体 6D9 を産生するマウス細胞株 (ハイブリドーマ)、および chloramphenicol phosphonate (transition state analogue : TSA (III)) と substrate (IV) (Fig 5-2) については、生物分子工学研究所、藤井郁雄博士から戴いた。

### 4-2. 抗体産生細胞の培養

2-2 節に記した手順に従い抗体産生細胞の培養を行った。また、用いた標識アミノ酸を以下に示す。

#### 2-<sup>15</sup>N 標識アミノ酸

1. L-Alanine
2. L-Arginine
3. L-Histidine
4. L-Isoleucine
5. L-Methionine
6. L-Phenylalanine
7. L-Tyrosine
8. L-Tryptophan
9. L-Valine

#### 1-<sup>13</sup>C 標識アミノ酸

10. L-Alanine
11. L-Histidine
12. L-Isoleucine
13. L-Leucine
14. L-Lysine-HCl
15. L-Methionine
16. L-Threonine
17. L-Valine
18. L-Phenylalanine
19. L-Tryptophan
20. L-Tyrosine
21. Glycine

#### その他

22. L-[u-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] Histidine
23. L-[u-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, <sup>15</sup>N<sub>3</sub>] Histidine

各種標識アミノ酸については、Isocommerz GmbH または CIL または ICON Services Inc.から購入した。また、標識アミノ酸を用いた培養法の詳細については、文献を参考にした<sup>1)</sup>。

#### 4-3. 抗体の精製

抗体産生細胞を CO<sub>2</sub> インキュベーター中で 2~3 週間培養を行い、完全に死滅させた後、細胞を含む懸濁液を遠心(4 °C, 7,000rpm, 40min)して、上清を回収する。これを、限外濾過装置を用いて約 50ml まで濃縮し、等量の Binding buffer (1 M Glycine, 1.5 M NaCl, pH 8.95) で希釈した後、プロテイン A アフィニティーカラムに吸着させる。本実験に用いた IgG1 の溶出は、elution buffer として酢酸緩衝液 (50 mM 酢酸ナトリウム, 150 mM NaCl, pH 4.3) を用いて溶出させた。

#### 4-4. Fab フラグメントの調製

IgG1 抗体を還元アルキル化後ババインで限定分解することにより、Fab の調製を行った。

精製した抗体溶液を還元アルキル化用緩衝液 (1.5 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH 8.5) に溶媒置換し濃縮する。DTT を加えて、抗体 10 mg/ml、DTT 10 mM となるように調整し、37 °C で 1 時間反応を行い、S-S 結合を還元する。その後、22 mM ヨード酢酸アミドを加え、4 °C で 20 分、遮光条件下でアルキル化した。また、10 mM DTT を加えることにより反応を停止させた。

さらに、還元アルキル化された抗体溶液を PBS (10 mM リン酸ナトリウム, 150 mM NaCl, pH 7.3) に溶媒置換し濃縮する。これに、L-Cysteine-HCl-H<sub>2</sub>O、ハバイン(Sigma)を加えて、抗体 5 mg/ml、L-Cysteine-HCl-H<sub>2</sub>O 2 mg/ml、ハバイン(S/E = 500)となるように調整し、37 °C で 4 時間反応を行った。その後、30 mM になるように N-エチルマレイミド(NEM)溶液を添加し、反応を停止させた。

上記で得られた限定分解産物については、MonoQ 用緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) に対し透析し、MonoQ カラムにより精製した後、MonoS カラムによりさらに精製した。

#### 4-5. NMR 測定

##### 4-5-1. NMR 試料の調製

Fab 溶液を PBS (5 mM リン酸ナトリウム, 200 mM NaCl, 3 mM NaN<sub>3</sub>) に溶媒置換し、NMR 試料とした。NMR 測定には 5 mm 試験管 (液量約 400μl)、または

マイクロセル (液量約 210  $\mu$ l) を使用し、Fab 濃度については 1.0 ~ 1.5 mM とした。

また、TSA (III) を PBS (5 mM リン酸ナトリウム、200 mM NaCl、3 mM  $\text{NaN}_3$  /  $\text{D}_2\text{O}$ ) に溶解し 5 mM TSA 溶液を調製した。この溶液を上記の Fab 試料に加え pH を調整、または、加えた後濃縮してから pH を調整することにより、TSA (III) 存在下の Fab 試料を作製した。

一方、substrate (IV) については  $d_6$ -DMSO に溶解させ、100 mM の substrate 溶液を調製した。この溶液を Fab 試料に 4 ~ 12  $\mu$ l 添加した後、速やかに pH を調整し、substrate (IV) 存在下の Fab 試料とした。

#### 4-5-2. 測定方法および測定条件

NMR 測定には、Bruker DRX600 または Bruker DRX400 または Bruker AMX400 スペクトルメーターを使用した。また、すべての測定にわたり繰り返し時間を 1.0 s とした。

##### (1) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ shift correlation

特に断らない限り、3-9-19 パルス系列<sup>2)</sup>または選択的  $^1\text{H}$  パルス<sup>3)</sup>を用いた WATERGATE スキームをパルス系列に組み込み、水シグナルを抑制した。また、 $^1\text{H}$  方向のスペクトル幅を 7,000 ~ 10,000 Hz、データポイントを 1K、 $^{15}\text{N}$  方向のスペクトル幅を 800 ~ 1,800 Hz、データポイントを 32 ~ 256 とし、TPPI または States-TPPI 法に従い取り込みを行った。各パルス系列ごとに用いたパラメーターについては以下に記す。

##### (1-1) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC (Fig.4-1)

$\tau = 2.0$  ms

##### (1-2) HN(CO) (Fig.4-2)<sup>4)</sup>

$\tau = 2.0$  ms、 $\Delta = 5.5$  ms、 $T = 6.0 \sim 8.0$  ms

##### (1-3) $t_1$ -decoupled HSQC (Fig.5-10a)<sup>5)</sup>

$\tau = 1.85$  ms、 $\Delta = 2.0$  ms

##### (1-4) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ shift correlation with cross-polarization (CP) (Fig.5-10b)

$B_1$ -field : 5.6 kHz、time : 7.77 ms

##### (1-5) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HMQC with 1-1 echo sequence (Fig.5-16)<sup>6)</sup>

$\zeta = 57$   $\mu$ s、 $\Delta = 3.2$  ms

水シグナルの抑制には、1-1 echo パルス系列のみを用いた。

##### (2) $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ shift correlation

特に断らない限り、3-9-19 パルス系列<sup>2)</sup>または選択的  $^1\text{H}$  パルス<sup>3)</sup>を用いた WATERGATE スキームをパルス系列に組み込み、水シグナルを抑制した。また、



$^1\text{H}$  方向のスペクトル幅を 7,000 ~ 10,000 Hz、データポイントを 1K、 $^{13}\text{C}$  方向のスペクトル幅を 1,000 ~ 4,500 Hz、データポイントを 32 ~ 128 とし、TPPI または States-TPPI 法に従い取り込みを行った。各パルス系列ごとに用いたパラメーターについては以下に記す。

(2-1)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Fig.4-1)

$$\tau = 1.1 \sim 1.3 \text{ ms}$$

軽水サンプルの NMR 測定には WATERGATE を、重水サンプルの NMR 測定には presaturation を用いて、水シグナルを抑制した。

(2-2)  $\text{H}(\text{N})\text{CA}^{(4)}$

$$^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}, ^{15}\text{N} \rightarrow ^1\text{H} \text{ の分極遅延時間 : 3.8 ms}$$

$$^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}\alpha, ^{13}\text{C}\alpha \rightarrow ^{15}\text{N} \text{ の分極遅延時間 : 24 ms}$$

(2-3)  $\text{H}(\text{NCO})\text{CA}^{(4)}$

$$^1\text{H} \rightarrow ^{15}\text{N}, ^{15}\text{N} \rightarrow ^1\text{H} \text{ の分極遅延時間 : 4.0 ms}$$

$$^{15}\text{N} \rightarrow ^{13}\text{C}', ^{13}\text{C}' \rightarrow ^{15}\text{N} \text{ の分極遅延時間 : 12 ms}$$

$$^{13}\text{C}' \rightarrow ^{13}\text{C}\alpha, ^{13}\text{C}\alpha \rightarrow ^{13}\text{C}' \text{ の分極遅延時間 : 5.0 ms}$$

(2-4)  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CT-HSQC with and without  $J_{\text{C-N}}$  amplitude modulation (Fig.5-22)

$$\tau = 1.2 \text{ ms}, T = 14.3 \text{ ms}$$

(3)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  HOHAHA

スペクトル幅を 7,000 ~ 16,000 Hz、データポイントを  $t_2$  方向に 1K、 $t_1$  方向に 400 ~ 800 とし、States または States-TPPI 法に従い取り込みを行った。各パルス系列ごとに用いたパラメーター等については以下に記す。

(3-1)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY with and without  $^{13}\text{C}$  decoupling (Fig.5-17)<sup>(6)</sup>

$$\zeta = 57 \mu\text{s}$$

水シグナルの抑制には、1-1 echo パルス系列のみを用いた。

(3-2)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  HOHAHA<sup>(7)</sup>

混合時間には MLEV17 コンボジットパルスを、また、その前後に 2.5 ms のトリムパルスを使用した。また、rf 磁場を 8.9 kHz、混合時間を 37.6 ms として測定を行った。

#### 4-5-3. データ処理

各データの  $t_1$  ポイントに対し、2 倍程度のゼロフィリングを行い、 $t_2$  方向にはガウス関数、 $t_1$  方向にはガウス関数または sine-square 関数を乗じ、フーリエ変換を行った。

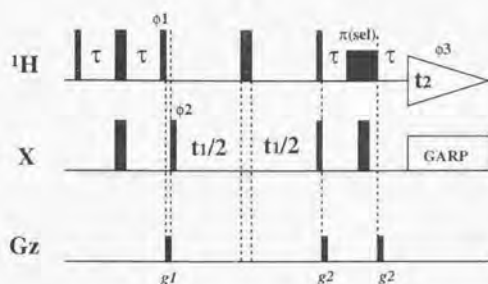


Fig.4-1 Pulse sequence for the  $^1\text{H}$ -X ( $^{13}\text{C}$  or  $^{15}\text{N}$ ) HSQC experiments. Narrow and wide bars denote  $\pi/2$  and  $\pi$  pulses, respectively, and unless indicated the phase is  $x$ . Phase cycling :  $\phi1 = y$ ,  $\phi2 = x$ ,  $-x$ ,  $\phi3 = x$ ,  $-x$ .

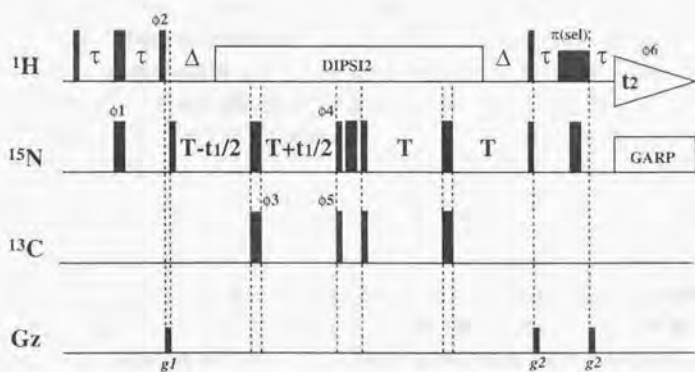


Fig.4-2 Pulse sequence for the HNC0 experiments. Phase cycling :  $\phi1 = x$ ,  $-x$ ,  $\phi2 = y$ ,  $-y$ ,  $\phi3 = 4(x)$ ,  $4(y)$ ,  $4(-x)$ ,  $4(-y)$ ,  $\phi4 = 2(x)$ ,  $2(-x)$ ,  $\phi5 = x$ ,  $-x$ ,  $\phi6 = 2(x)$ ,  $4(-x)$ ,  $2(x)$ .

## 第5章 NMRを用いた触媒抗体の抗原結合部位の解析

### 5-1. 序

#### 5-1-1. 触媒抗体 6D9

chloramphenicol phosphonate (transition state analogue; TSA (III)) と Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH) を縮合させた抗原を用いて免疫することにより、chloramphenicol monoester (I) を chloramphenicol (II) へと加水分解する、6種類の触媒抗体が得られている (Fig. 5-2)<sup>(2,3)</sup>。それぞれの抗体について、アミノ酸シーケンス、触媒活性、結合活性などがすでに報告されており、Fig. 5-1, Fig. 5-3, Table 5-1 にその一部を記載してある。6種類のうち5種類の抗体 (6D9, 9C10, 3G6, 4B5, 8D11) については、 $V_H$  において 70~80%、 $V_L$  において 89~95% の高いアミノ酸相同性が見られ、また、そのうち4種類の抗体 (6D9, 9C10, 4B5, 8D11) については、substrate (IV) と TSA (III) の結合活性の比 ( $K_{TSA}^7 / K_S^8$ ) と反応加速 ( $k_{cat}^9 / k_{uncat}^{10}$ ) が等しいことが明らかになっている。本研究で用いた 6D9 は得られた6種類の触媒抗体の一つであり、その特徴としては、触媒活性が最も高い点が挙げられる。また、生成物による阻害をほとんど受けないことや、反応速度 ( $k_{cat}$  と  $k_{uncat}$ ) が溶媒の水酸化物イオン濃度に比例して増加することが実証されている。

Fig. 5-4 は、触媒抗体非存在下または存在下における反応経路を模式的に示したものである。触媒抗体非存在下では基質 S が高いエネルギー障壁  $S^\ddagger$  を経て生成物になるのに対し、触媒抗体存在下では基質 S が複合体 Ab-S を形成してからエネルギー障壁 (Ab-S) $^\ddagger$  を乗り越え生成物になることを、この模式図は表している<sup>(4)</sup>。このとき、

$$-RT \ln(K_S) - RT \ln(k_{uncat} h / k_B T) = -RT \ln(K_{S^\ddagger}) - RT \ln(k_{cat} h / k_B T) \quad (5.1)$$

が成り立つことから、

$$k_{cat} / k_{uncat} = K_{TSA} / K_S \quad (5.2)$$

を満たす系については、遷移状態の安定化エネルギー「 $-RT \ln(K_{S^\ddagger})$ 」を遷移状態アナログの結合エネルギー「 $-RT \ln(K_{TSA})$ 」に置き換えて考えることが可能である。

得られた6種類の触媒抗体のうち4種類 (6D9, 9C10, 4B5, 8D11) については、 $k_{cat} / k_{uncat}$  と  $K_{TSA} / K_S$  がほぼ等しく、遷移状態の安定化エネルギーを TSA (III) の結合エネルギーによって説明できる系である。一方、 $k_{cat} / k_{uncat} = K_{TSA} / K_S$  が成り立たない、残りの2種類の触媒抗体 (3G6, 7C8) については、遷移状態の安定

<sup>7</sup>  $K_{TSA}$ : association constant for TSA (III).

<sup>8</sup>  $K_S$ : association constant for substrate (IV).

<sup>9</sup>  $k_{cat}$ : first-order rate constant of the hydrolysis reaction with antibody.

<sup>10</sup>  $k_{uncat}$ : first-order rate constant of the hydrolysis reaction without antibody.

化エネルギーと TSA (III)の結合エネルギーが異なることから、四面体中間体の安定化の他に、水酸化物イオンの求核性やアルコールの脱離のしやすさなどを向上させる機能が付加されていると考えられる。

さらに、6D9 についてはさまざまな部位特異変異体が作製されており、それぞれに関して  $k_m^{11}$ 、 $k_{cat}$ 、 $K_{TSA}$ 、 $K_S$  が決定されている<sup>5)</sup>。中でも His27d(L)を Ala へと置換した変異体では、substrate (IV)に対する結合能がほとんど変化しないのにもかかわらず、TSA (III)に対する結合能が著しく低下し、触媒活性が失われている。この結果より、6D9 の触媒活性には His27d(L)が重要な役割を担っていることが明らかになっている。野生型と、His27d(L)を Ala へ置換した変異体に関して測定された各パラメーターについては Table 5-2 にまとめてある。

以上、酵素化学的・分子生物学的研究により明らかになった 6D9 の特色についてまとめる。

- (1) 一連の触媒抗体の中で最も高い活性を示すこと
- (2) 生成物による活性阻害を受けないこと
- (3) 反応速度  $k_{cat}$  が溶媒の水酸化物イオン濃度に比例して増加すること
- (4) substrate (IV)と TSA (III)の結合活性の差によって触媒活性を説明できること
- (5) His27d(L)が活性発現に重要な残基であること

#### 5-1-2. 基質存在下における NMR 測定

酵素に結合した基質が遷移状態を経る時間は極めて短く、また、生成物に変化すると直ちに酵素から離れるため、NMR により遷移状態や生成物結合状態を検出することはできない。したがって、基質存在下において酵素の NMR 測定を行うと、最初は酵素と基質の複合体が観測されるが、徐々に酵素単独の分子数が増え、最終的には酵素単独を観測していることになる。しかしながら、反応が進行しても常に酵素に基質が結合した状態が保たれるように、基質を酵素に対し過剰量添加しておく、基質と酵素の複合体の NMR スペクトルを得ることが可能になる。ただし、ある程度の時間が経過すると基質がすべて生成物へと変化してしまうため、添加した基質の量と反応時間を考慮して NMR の測定時間を設定する必要がある。

触媒抗体 6D9 については、その特徴として生成物による活性阻害を受けないことや反応速度  $k_{cat}$  が溶媒の水酸化物イオン濃度に比例して増加することが挙げられる。したがって、生成物と 6D9 の複合体が形成されることはなく、また、低い pH 域においては substrate (IV)と 6D9 の複合体の状態が比較的長く保たれるため、6D9 へ substrate (IV)を添加後直ちに NMR 測定を行えば、substrate (IV)と 6D9 の複

<sup>11)</sup>  $K_m$  : Michaelis constant

合体の高次構造情報を得ることが可能になる。ただし、測定時間を極力短縮する必要があることにはかわりはなく、以下に短時間の NMR 測定を可能にしたポイントについて簡単に記述する。

#### アミノ酸選択的な安定同位体標識法の適用

本研究では、6D9 を限定分解することにより抗原結合フラグメント Fab を作製し、それを用いて NMR 測定を行っている。Fab にはアミドプロトンだけでもおよそ 440 個存在し、その数の多さからシグナルに重なりが生じてしまう。それを回避するために分解能を向上させたり多次元化(3D、4D)を行うこともできるが、測定に要する時間が長くなる。そこで、アミノ酸選択的に  $^{13}\text{C}$  または  $^{15}\text{N}$  標識した Fab を用いて、観測されるシグナルの数を大幅に減らし、短時間の NMR 測定を可能にした。

#### 技術の進歩

NMR 装置の高磁場化やデジタルフィルターの導入など、技術の進歩に伴い NMR スペクトルの S/N が格段に向上した。また、 $^{13}\text{C}$  や  $^{15}\text{N}$  での編集実験や水シグナルの抑制にグラディエントパルスを利用することも S/N の向上に役立っている。その結果、以前に比べて積算回数を減らすことができ、短時間で NMR 測定を行うことが可能になった。

#### 5-1-3. substrate と TSA

遷移状態アナログである chloramphenicol phosphonate (III) を特異的に認識する触媒抗体 6D9 により、chloramphenicol monoester (I) は、chloramphenicol (II) へと加水分解される (Fig. 5-2)。しかし、触媒活性や結合活性の測定には、chloramphenicol monoester (I) の C-1 位と C-3 位の間で異性化が起こることを避けるため、substrate (IV) と chloramphenicol phosphonate (III) が用いられている。そこで、NMR 測定においても、substrate (IV) と chloramphenicol phosphonate (III) を用いることにした。また、substrate (IV) にはカルボキシル基が付加されているため、chloramphenicol monoester (I) に比べ水への溶解度が高いという利点もある。尚、カルボキシル基が付加されている位置は、chloramphenicol phosphonate (III) で KLH を縮合させていた位置に対応しており、結合にはほとんど関与していないと考えられている。以下、chloramphenicol phosphonate (III) については TSA、substrate (IV) については substrate と記述する。

#### 5-1-4. 研究概要

触媒抗体の高次構造解析は、より高い活性をもつ触媒抗体を作製するために有用な知見を与えるのみならず、化学反応における触媒機構の解明にも役立つ。し

かしながら、今までに触媒抗体の抗原結合部位の動的立体構造に関する研究例はなく、その反応機構の知見は乏しい。そこで、本章では、NMR を用いて 6D9 の抗原結合部位の動的立体構造および活性発現機構を明らかにすることを目的とした。

#### (1) substrate 結合部位、TSA 結合部位の同定

ハプテン非存在下における 6D9 およびその substrate 複合体、TSA 複合体の NMR 測定を行った。NMR シグナルの経時変化より、短時間 (2~3 時間程度) の NMR 測定中には substrate が加水分解されないことがわかった。したがって、NMR により substrate 複合体の高次構造情報を得ることができると判断した。さらに、substrate または TSA 添加に伴う化学シフト変化より、substrate および TSA の結合部位はともに  $V_H$ 、 $V_L$  ドメインの界面であると結論した。

#### (2) 抗原結合部位の構造多形性

His 残基の主鎖アミド窒素を  $^{15}\text{N}$  標識した 6D9 の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定したところ、ハプテン非存在下と substrate 存在下においては H3 ループに位置する His97(H)由来のシグナルが観測されなかったが、TSA 存在下においては観測された。HSQC スペクトルにおいてシグナルが観測されない一つの要因として、化学交換によるシグナル強度の減少が挙げられる。そこで、cross-polarization<sup>6)</sup>を用いて  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  シフト相関スペクトルを測定したところ、新たに His97(H)由来のシグナルが観測された。同様な現象は、Tyr100j(H)と Tyr32(L)由来のシグナルについても見られた。したがって、substrate 存在下においては H3 ループを中心に構造多形性が存在しているが、TSA 存在下ではその多形が消失することが示された。

#### (3) 抗原結合部位に存在する His27d(L)の微視的環境

##### His27d(L)の相互作用様式

His27d(L)のアミド窒素シグナルの pH 依存性を解析したところ、substrate 存在下における  $\text{pK}_a$  についてはハプテン非存在下のものと同じ値を示したのに対し、TSA 存在下では  $\text{pK}_a$  が大きく低下することが明らかになり、substrate 存在下と TSA 存在下において His27d(L)が異なる相互作用様式をとることが示された。また、His 残基の側鎖イミダゾール環の窒素を  $^{15}\text{N}$  標識した 6D9 を調製し側鎖 NH シグナルの検出を試みたところ、7 個存在する His 残基のうち定常領域に位置する His199(H)のみがハプテン非存在下および substrate 存在下において観測されたのに対し、TSA 存在下では新たに His27d(L)の側鎖 NH シグナルが観測された。したがって、TSA 存在下において His27d(L)の側鎖 NH は水素結合を形成していることが示された。

##### His27d(L)の互変異性の解析

中性付近における TSA 複合体の His27d(L)のイミダゾール環については、その

pKa 値(<4.3)より deprotonation フォームをとることが明らかである。しかしながら、His 残基の deprotonation フォームには、1 位にプロトンが結合した N1 互変体と 3 位にプロトンが結合した N3 互変体が混在している。そこで、C4-H シグナルが C4 と N の間のカップリングにより強度変調を受けることを利用して、His 残基の互変体を決定するための新たな測定法を開発し、TSA 存在下の 6D9 に適用した。その結果、His27d(L)のイミダゾール環については N3 互変体をとることが判明した。したがって、TSA 存在下において His27d(L)のイミダゾール環が水素結合を形成するときには、互変体間の平衡が N3 互変体に偏っていることが明らかになった。

以上、NMR を用いて触媒抗体 6D9 の抗原結合部位を解析することにより、substrate 存在下における H3 ループを中心とした構造多形性が TSA 存在下において消失することが判明した。また、TSA 存在下において His27d(L)のイミダゾール環が N3 互変体を取り水素結合を形成することが明らかになった。これらの結果をもとに、触媒抗体の活性発現機構について考察する。

## 略語一覧

[ $^{15}\text{N}$ -His] 6D9-Fab :

His 残基の主鎖アミド窒素を  $^{15}\text{N}$  標識した 6D9 の Fab フラグメント

[ $^{15}\text{N}$ -Tyr] 6D9-Fab :

Tyr 残基の主鎖アミド窒素を  $^{15}\text{N}$  標識した 6D9 の Fab フラグメント

[ $^{15}\text{N}$ -His, 1- $^{13}\text{C}$ -Val] 6D9-Fab :

His 残基の主鎖アミド窒素を  $^{15}\text{N}$  標識し、Val 残基のカルボニル炭素を  $^{13}\text{C}$  標識した 6D9 の Fab フラグメント

[u- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -His,  $^{15}\text{N}$ -Val] 6D9-Fab :

His 残基のすべての炭素と窒素を  $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  標識し、Val 残基の主鎖アミド窒素を  $^{15}\text{N}$  標識した 6D9 の Fab フラグメント

[u- $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -His] 6D9-Fab :

His 残基のすべての炭素と窒素を  $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  標識した 6D9 の Fab フラグメント

[u- $^{13}\text{C}$ -His] 6D9-Fab :

His 残基のすべての炭素を  $^{13}\text{C}$  標識した 6D9 の Fab フラグメント



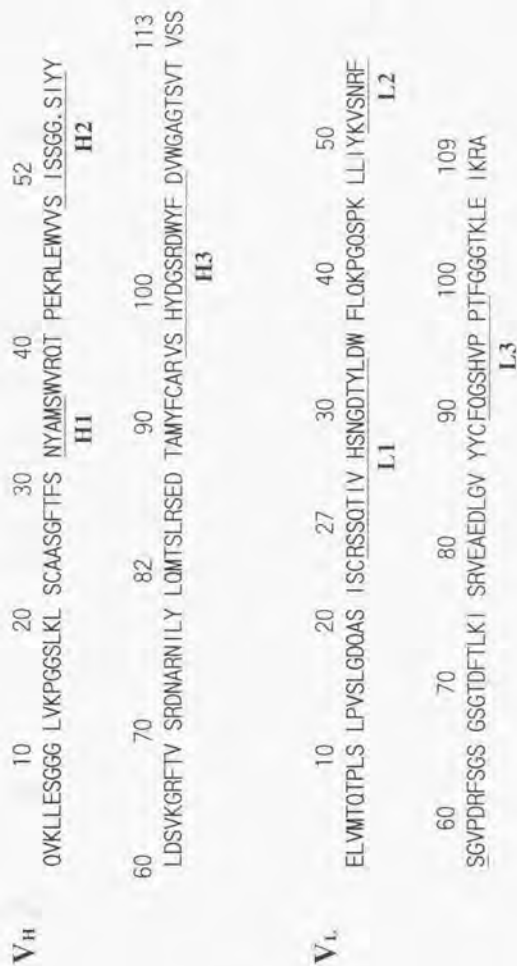
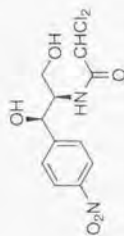
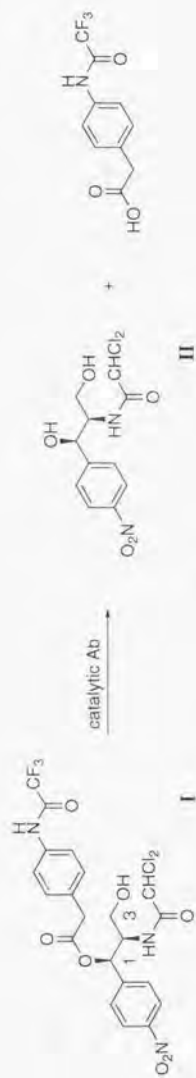
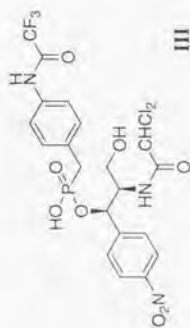


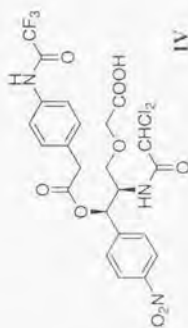
Fig. 5-1 6D9の可変領域のアミノ酸配列.



III



III



iv

Fig. 5-2

I : chloramphenicol monoester  
II : chloramphenicol  
III : chloramphenicol phosphonate  
( transition state analogue : TSA )  
IV : derivative of I ( substrate )

antibody	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{cat} / k_{uncat}$	$K_{TSA} / K_S$
6D9	0.145	50	895	900
7C8	0.115	3.8	707	12
8D11	0.037	14.2	254	342
4B5	0.046	5.8	281	381
9C10	0.008	2.5	56	60
3G6	0.010	59.5	66	20

Table 5-1 Kinetic parameters of the anti-TSA (III) antibody-catalyzed hydrolysis of substrate (IV).  
 $K_m$  : Michaelis constant  
 $k_{cat}$  : first-order rate constant of the hydrolysis reaction with antibody  
 $k_{uncat}$  : first-order rate constant of the hydrolysis reaction without antibody  
 $K_S$  : association constant for substrate (IV)  
 $K_{TSA}$  : association constant for TSA (III)

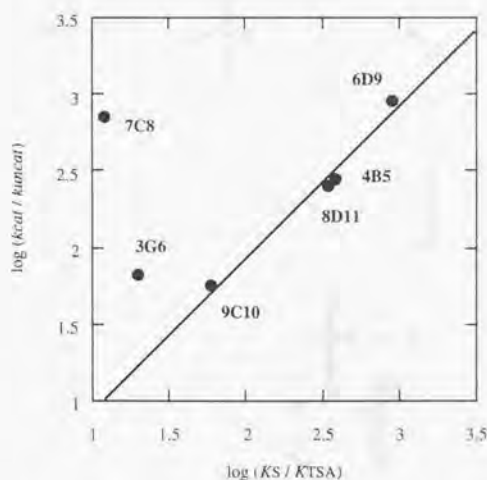


Fig.5-3 Plot of  $\log (K_S / K_{TSA})$  versus  $\log (k_{cat} / k_{uncat})$  for catalytic antibodies generated against TSA(III). A linear relationship was obtained for antibodies 6D9, 4B5, 8D11 and 9C10 ; slope = 0.99,  $R^2 = 0.98$ .

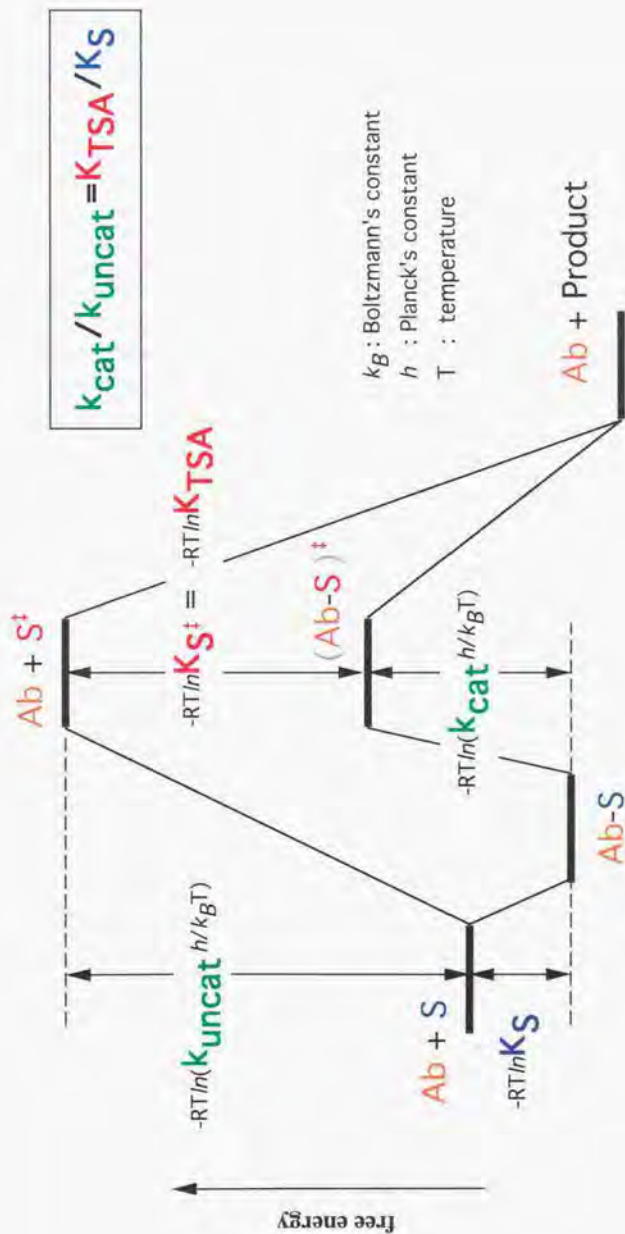


Fig.5.4 無触媒下と触媒下の反応座標

protein	$K_m$ ( $\mu M$ )	$k_{cat}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_{TSA}$ ( $M^{-1}$ )	$K_s$ ( $M^{-1}$ )
6D9	50	0.145	$1.8 \times 10^7$	$1.7 \times 10^4$
6D9 (His27d(L)→Ala)	n.d.	n.d.	$5.0 \times 10^5$	$1.4 \times 10^4$

Table 5-2 Kinetic constants for hydrolysis and binding affinities of 6D9 and its mutant.  
The "His-27d(L)-Ala" mutant had no detectable catalytic activity (n.d.).

## 5-2. substrate 結合部位、TSA 結合部位の同定

### 5-2-1. NMR 測定

#### (1) substrate を用いたときの NMR 測定時間の設定

短時間の NMR 測定中には substrate の加水分解反応が進行せず、substrate 複合体の高次構造情報が得られることを確認した。 [ $^{13}\text{N-Tyr}$ ] 6D9-Fab に対し substrate をモル比で3倍量添加した後、直ちに pH 6.0 に調整し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの連続測定を行った。1回の測定には40分を要し、測定温度を37°Cとした。その結果、substrate 添加直後、40分後、80分後に測定が開始された3つのスペクトルについては各シグナルの化学シフトが全く変化しなかった。したがって、pH 6.0、37°Cにおいては、少なくとも80分以内に NMR 測定を完了させれば、substrate の加水分解反応による影響が現われず、substrate 複合体の NMR スペクトルが得られると判断した。

また、pH や温度などの条件が異なる場合には、その都度測定時間の検討を行ったり、測定後に加水分解反応が進行していないことを確認した。

#### (2) ハプテン非存在下、substrate 存在下、TSA 存在下における NMR スペクトル

His 残基の主鎖アミド窒素を  $^{15}\text{N}$  標識した 6D9-Fab を調製し、6D9-Fab 単独と、6D9-Fab に対しモル比3倍量の substrate または等モルの TSA を添加した試料について、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの測定を行った(Fig.5-7)。その結果、substrate または TSA 添加に伴い His27d(L)と His93(L)由来のシグナルに同じような化学シフト変化が観測された。また、ハプテン非存在下や substrate 存在下において観測されなかった His97(H)由来のシグナルが、TSA 存在下において観測されることが明らかになった。同様に、Ala、Arg、Met、Ile、Phe、Trp、Tyr、Val 残基の主鎖アミド窒素を  $^{15}\text{N}$  標識した 6D9-Fab についても、ハプテン非存在下、substrate 存在下、TSA 存在下における  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定し、比較を行った。

5-2-2 節において、各シグナルの帰属方法について示す。

### 5-2-2. NMR シグナルの帰属

主鎖 NH シグナルの帰属には、(1) 同じサブクラス間の比較、(2)  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  二重標識法<sup>7)</sup>、(3) 連鎖帰属法<sup>8)</sup>、(4) 再構成法、を併用した。ここでは、His 残基の帰属を例にとり各方法について簡単に触れる。

### (1) 同じサブクラス間の比較

定常領域のアミノ酸配列が同一である 6D9、9C10、3G6、7C8 に関しては、 $C_H1$  と  $C_L$  ドメイン由来のシグナルの化学シフトが等しくなる。これを利用し、可変領域 ( $V_H$ 、 $V_L$  ドメイン) と定常領域 ( $C_H1$ 、 $C_L$  ドメイン) 由来のシグナルを識別した。

TSA 存在下において [ $^{15}\text{N}$ -His] 6D9-Fab の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定したところ、7 個存在する His 残基由来のシグナルがそれぞれ分離して観測された (Fig. 5-5a)。便宜上各シグナルを Ha-g と名付け、Fig. 5-5a に付記してある。また、同様に [ $^{15}\text{N}$ -His] 9C10-Fab、[ $^{15}\text{N}$ -His] 3G6-Fab、[ $^{15}\text{N}$ -His] 7C8-Fab においても  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定したところ、Fig. 5-5a において観測された 7 個のシグナルのうち Ha、Hc、Hd、Hf については、すべてのスペクトルにわたり観測された。 $C_H1$  ドメインと  $C_L$  ドメインには 2 個ずつ計 4 個の His 残基が存在する。したがって、各抗体の HSQC スペクトルにおいて同様に観測された Ha、Hc、Hd、Hf は、定常領域由来のシグナルであることが判明した。

### (2) $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$ 二重標識法

隣接するカルボニル炭素とアミド窒素を配列特異的にそれぞれ  $^{13}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$  標識し、 $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  ガップリング ( $J_{C-N}$ ) を検出することにより位置特異的な帰属を行った。 $J_{C-N}$  の検出には、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC または HN(CO) を用いた  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルでは  $J_{C-N}$  による NH シグナルの分裂が観測され、HN(CO) スペクトルでは  $J_{C-N}$  をもつ NH シグナルを選択的に観測することができる。

Fig. 5-5b は、His 残基の主鎖アミド窒素の  $^{15}\text{N}$  標識に加え Val 残基のカルボニル炭素を同時に  $^{13}\text{C}$  標識した 6D9-Fab の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルである。Hd と Hg のシグナルには、 $^{15}\text{N}$  軸方向に  $J_{C-N}$  ( $\sim 15$  Hz) による分裂が観測されている。したがって、Hd と Hg は、6D9-Fab に 2 箇所存在する Val-His 配列に対応し、His27d(L) と His164(H) 由来のシグナルであることが判明した。

### (3) 連鎖帰属法

H(N)CA と H(NCO)CA を併用することにより、帰属の完了した NH シグナルから隣接する残基の NH シグナルを帰属することができる。

6D9-Fab の可変領域には Ser-His 配列が 2 箇所存在するため、二重標識法では一義的な帰属を行うことができない。そこで、これらの His 残基が隣接する C 端側の残基は異なり、配列が Ser-His93(L)-Val と Ser-His97(H)-Tyr であることを利用し、H(N)CA と H(NCO)CA による帰属を行った。Fig. 5-6 に、 $[\text{u-}^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}\text{-His}, ^{15}\text{N}\text{-Val}]$  6D9-Fab の H(N)CA、H(NCO)CA スペクトルを示す。6D9-Fab には His-Val 配列が

1箇所しか存在しないため、H(NCO)CA スペクトルには Val94(L)のアミドプロトンと His93(L)のアルファ炭素の相関ピークしか観測されていない。さらに、得られた His93(L)のアルファ炭素の化学シフトを指標に、H(N)CA スペクトルから His93(L)のアミドプロトンの帰属が完了した。

#### (4) 再構成法

ドメイン間の s-s 結合を還元アルキル化により切断された Fab は、非共有結合によりヘテロダイマーを形成している。そこで、標識したアミノ酸残基の異なる 2 種類の Fab の H 鎖と L 鎖を組み替え、NMR 測定を行い、H 鎖と L 鎖由来のシグナルを識別した。

#### 5-2-3. substrate 結合部位、TSA 結合部位

各種アミノ酸の主鎖アミド窒素を  $^{15}\text{N}$  標識した 6D9-Fab について、ハプテン非存在下、substrate 存在下、TSA 存在下における  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを比較した。各状態における、His 残基と Tyr 残基の帰属結果については、Table 5-3 にまとめている。また、その他の残基のうち一義的に帰属が完了しているものについては、substrate または TSA 添加に伴い化学シフトが変化した残基または変化しなかった残基として、6D9 の三次元構造モデル上に赤色または青色で示してある (Fig.5-9、後述)。

substrate または TSA 添加に伴い主鎖 NH シグナルの化学シフトに変化が観測された残基を指標に、substrate 結合部位と TSA 結合部位を同定することが可能である。6D9 の三次元構造モデル (Fig.5-9) 上に、各リガンド結合によってアミドプロトンシグナルの化学シフトが 0.1 ppm 以上またはアミド窒素シグナルの化学シフトが 0.5 ppm 以上変化した残基を赤色で示した。また、化学シフトがほとんど変化しなかった残基を青色で示した。さらに、触媒活性に重要な役割を担う His27d(L) については黄色で表した。ただし、両リガンドの結合に伴い His27d(L) 由来のシグナルには変化が観測されており、His27d(L) は赤色で分類される残基の一つである。

以上の結果より、substrate 結合部位と TSA 結合部位がともに  $V_H$ 、 $V_L$  ドメインの界面に位置していること、His27d(L) が substrate 結合部位と TSA 結合部位を形成している残基に含まれていることが判明した。



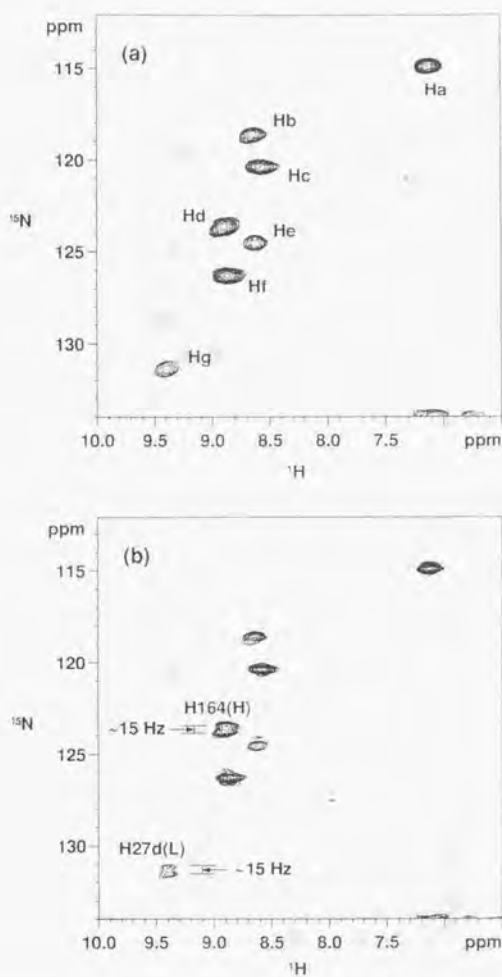


Fig. 5-5  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  NISQC spectra of (a)  $^{15}\text{N}$ -His 6D9-Fab, and (b)  $^{15}\text{N}$ -His,  $^{13}\text{C}$ -Val 6D9-Fab in the presence of TSA. pH 6.0, 37  $^\circ\text{C}$ .

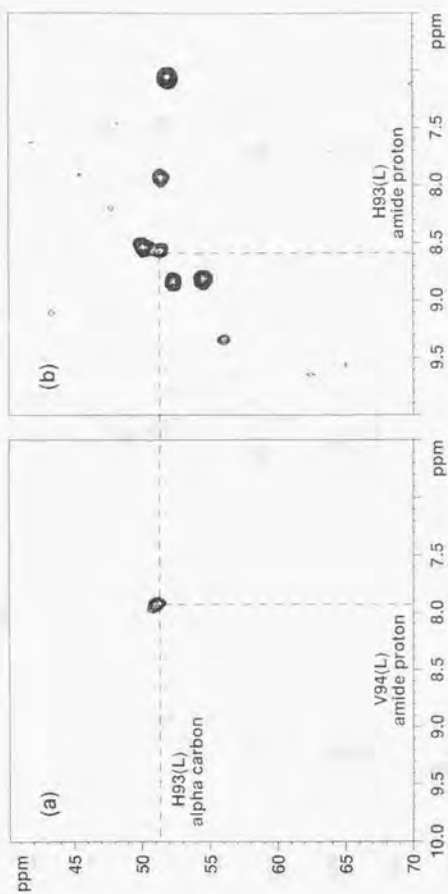


Fig. 5.6 (a)  $\text{H}_2\text{NCO}_2\text{CA}$  and (b)  $\text{H}_2\text{NCA}$  spectra of  $[\text{h-}^{13}\text{C}, \text{N-}^{15}\text{N}, \text{His-}^{15}\text{N-Val}]$  dD9-Fab in the presence of TSA, pH 6.5, 45 °C

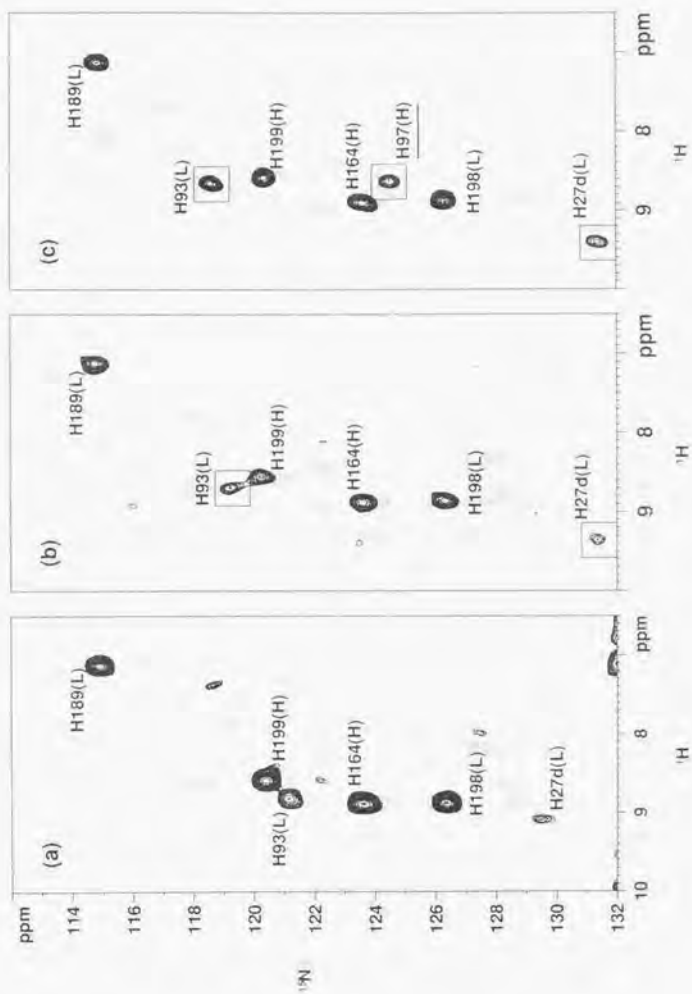


Fig. 5.7  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $[^{15}\text{N}]$ -His(6D9) Fc: (a) free; (b) +substrate; (c) +TSA, pH 6.0,  $37^\circ\text{C}$ .

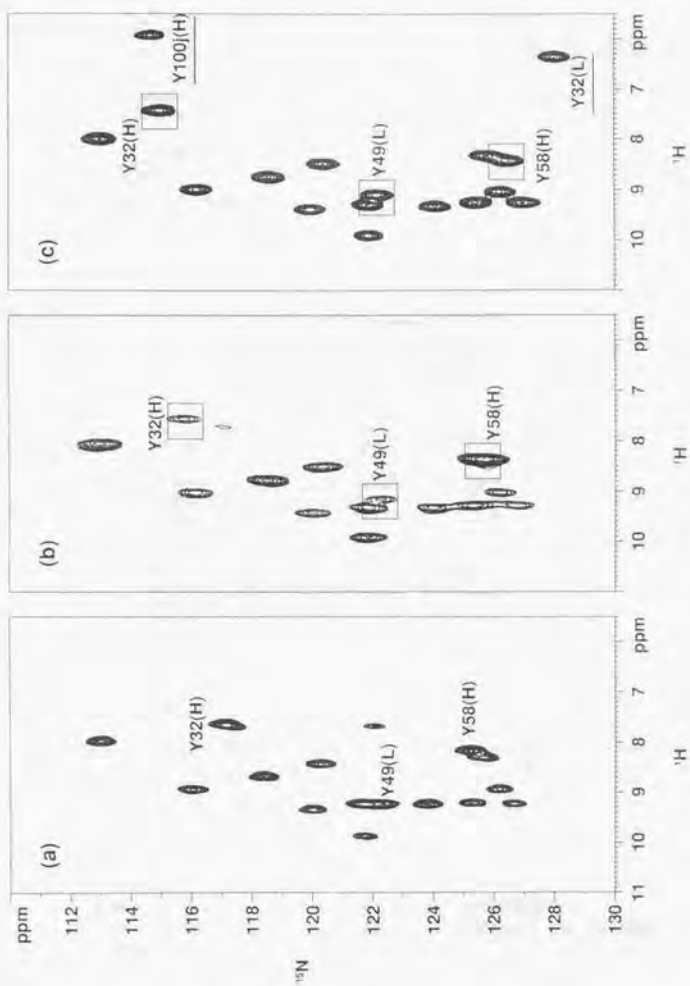


Fig. 5.8  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectra of  $^{15}\text{N}$ -Tyr(6D)-Fab: (a) free; (b) + substrate  $\alpha$ ; (c) + TSA  
pH 6.0,  $-37^\circ\text{C}$

	free		+substrate		+TSA	
	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N
H27d(L)	9.10	129.6	9.38	131.3	9.40	131.3
H93(L)	8.83	121.2	8.71	119.2	8.66	118.8
H97(H)	—	—	—	—	8.63	124.6

	free		+substrate		+TSA	
	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N	<sup>1</sup> H	<sup>15</sup> N
Y32(L)	—	—	—	—	6.44	128.0
Y49(L)	9.28	122.4	9.15	122.3	9.16	122.2
Y86(L)	9.02	126.2	9.02	126.1	9.08	126.3
Y87(L)	9.94	122.0	9.91	121.9	9.95	122.0
Y32(H)	7.75	117.2	7.56	115.9	7.48	115.1
Y58(H)	8.25	125.3	8.36	125.6	8.47	126.3
Y59(H)	8.78	118.5	8.76	118.5	8.76	118.8
Y79(H)	9.32	124.0	9.32	123.9	9.37	124.2
Y90(H)	9.30	126.8	9.28	126.8	9.30	126.9
Y98(H)	—	—	—	—	—	—
Y100j(H)	—	—	—	—	6.05	114.9

Table 5-3 可変領域に位置する His, Tyr 残基の主鎖NHシグナルの帰属結果。  
ただし、HSQCスペクトル(Fig.5-7, Fig.5-8)において観測されなかった残基については、  
—で示した。  
単位 (ppm). pH 6.0. 37 °C

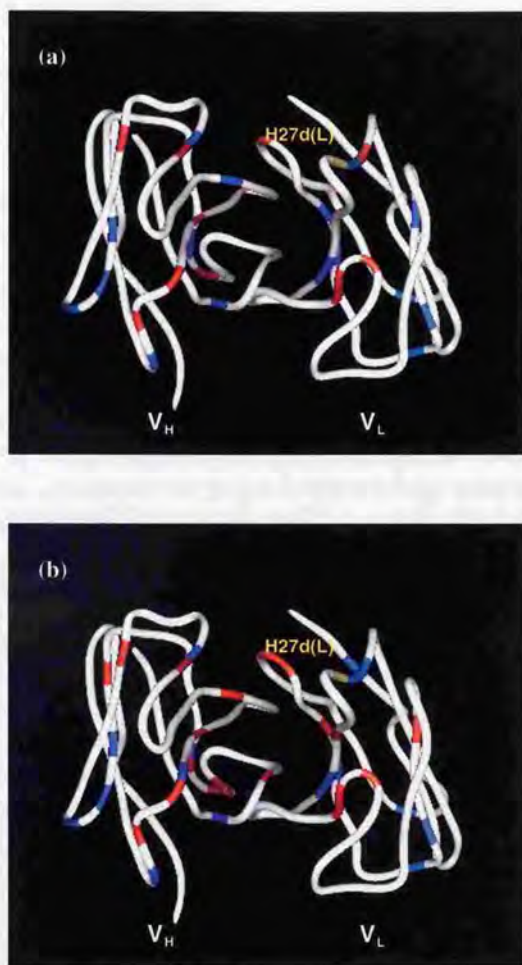


Fig.5-9 6D9の変領域の三次元構造モデル。  
 (a) substrate または (b) TSA 添加に伴い、主鎖NHシグナルが $^1\text{H}$ 軸方向に0.1ppm以上、  
 または、 $^{15}\text{N}$ 軸方向に0.5ppm以上変化した残基については赤色で、それ以下の変化しか  
 観測されなかった残基については青色で示した。  
 また、His27d(L)については黄色で示した。

### 5-3. 抗原結合部位の構造多形性

#### 5-3-1. 化学交換現象の検出

##### (1) シグナルの広幅化

7個存在するHis残基のうちH3ループに位置するHis97(H)由来のシグナルは、ハブテン非存在下とsubstrate存在下の $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルでは観測されていないのに対し、TSA存在下では観測されている(Fig. 5-7)。そこで、His97(H)由来のシグナルがsubstrate複合体とTSA複合体の高次構造の違いを反映する指標になると考え、シグナルが広幅化する要因について解析を行った。

HSQC スペクトルにおいてシグナルが観測されない一つの要因として、化学交換によるシグナル強度の減少が挙げられる。化学交換現象の存在を立証するためには、しばしば $T_2$ や $T_{1\rho}$ の測定が行われるが、強度が著しく低下しているシグナルについては適用できない。そこで、広幅化しているシグナルについては、cross-polarization (CP)を用いて $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  シフト相関スペクトルを測定することによって、化学交換現象の存在を確認できるのではないかと考え、検討を行った。

##### (2) CPを用いた測定法と化学交換

##### (2-1) $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ shift correlation with CP と $t_1$ -decoupled HSQC

Fig. 5-10 に  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation with CP と  $t_1$ -decoupled HSQC のパルス系列を示す。

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation with CP では、 $^1\text{H}$  に  $\pi/2$  パルスをかけた後 Hartmann-Hahn の共鳴により磁化分極移動が起こり、 $^{15}\text{N}$  に磁化が移行する。 $^{15}\text{N}$  に磁化が移ったところで $t_1$ 期を設け、その後、再び磁化を戻し $^1\text{H}$ 検出を行う。 $^{15}\text{N}$  に磁化が移ったポイントと $^1\text{H}$ に磁化を戻したポイントに $\pi/2$ -(gradient pulse)- $\pi/2$ 系列を組み込んだのは、不要な磁化成分を完全に排除するためである。また、水シグナルを抑制するため、 $t_2$ 検出期の前に3-9-19パルス系列を用いたWATERGATEスキームを組み込んである<sup>9)</sup>。このパルス系列では、磁化移動の期間に核スピニングがロックされているため、化学交換による磁化の減少は抑制される。

一方、 $t_1$ -decoupled HSQC では、磁化移動に要する $2\tau$ 期と $2\Delta$ 期に化学交換が起こると、核スピンの位相の広がり引き起こされ、シグナル強度が減少する。

したがって、化学交換しているシグナルに関しては、 $t_1$ -decoupled HSQC 測定よりも $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation with CP 測定から得られたスペクトルにおいて強度が増大する。そのため、著しく広幅化したシグナルについて化学交換現象の存在を証明するときには、CPを用いた方法は適していると考えられる。

## (2-2) 測定方法の検証と測定条件の検討

抗 DNS-Fv の H3 ループに存在する残基由来のシグナルについては、化学交換現象が見られることが明らかになっているため、抗 DNS-Fv を用いて測定方法の検証と測定条件の検討を行った。

Tyr 残基の主鎖アミド窒素を  $^{15}\text{N}$  標識した Fv を作製し、それを用いて  $t_1$ -decoupled HSQC 測定と  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation with CP 測定を行った。ただし、 $t_1$  展開を行わずに測定し、得られた 1 次元スペクトルについてシグナル強度を比較した。測定には Bruker DRX600 スペクトルメーターを用い、測定温度を 30 °C とした。また、 $t_1$ -decoupled HSQC では  $\tau = 1.9$  ms、 $\Delta = 2.125$  ms、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation with CP では  $B_1$ -field : 3.6 kHz、time (DIPS12) : 8.05 ms とした。このとき、 $2\tau + 2\Delta = \text{time (DIPS12)}$  とし、両測定において磁化移動時間が等しくなるように配慮してある。結果を Fig.5-11 に示す。\*印をつけたシグナルについては、CP を用いることによってシグナルの強度が増大している。これらは、Tyr96(H)、Tyr97(H)、Tyr99(H)、Tyr104(H)由来のシグナルであり、 $t_1$ -decoupled HSQC 測定では化学交換によってシグナルが広幅化することがわかっている。一方、\*印を除くシグナルの強度については、CP を用いてもほとんど変わらないか、もしくはやや減少している。この結果から、CP を用いても化学交換現象が存在しないシグナルについては強度が増大しないことを示すことができた。また、CP を用いることによって強度がやや減少するシグナルが存在する理由については、水シグナルを抑制するために用いた WATERGATE スキームの間における  $^1\text{H}$  の緩和によると考えられる。

## (3) 6D9-Fab への適用

ハプテン非存在下において [ $^{15}\text{N}$ -His] 6D9-Fab の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation with CP 測定と  $t_1$ -decoupled HSQC 測定を行い、シグナル強度の比較を行った。測定には Bruker DRX400 スペクトルメーターを用い、測定温度を 43 °C とした。また、 $t_1$ -decoupled HSQC では  $\tau = 1.85$  ms、 $\Delta = 2.0$  ms、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation with CP では  $B_1$ -field : 5.6 kHz、time (DIPS12) : 7.7 ms とした。Fig.5-12 にノイズレベルを等しく設定したそれぞれのスペクトルを示してある。

$t_1$ -decoupled HSQC spectrum では 6 個のシグナルしか観測されていないのに対し、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation spectrum with CP では 6D9-Fab に存在する 7 個の His 残基由来のシグナルがすべて観測されている。 $t_1$ -decoupled HSQC spectrum において観測された 6 個のシグナルについては、すでに帰属が完了しており、His97(H)由来のシグナルが観測されていないことが明らかになっている。したがって、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation spectrum with CP において新たに観測されたシグナルについては、H3 ループに存在する His97(H)と帰属した。



また、各シグナルの強度比を比較したところ、His97(H)を除く他の残基については、ほぼ1もしくは1以下であり、化学交換現象が見られないことが判明した(Fig.5-13a)。一方、His97(H)については、CPを用いることにより有意にシグナル強度が増大し、化学交換が存在していることが明らかになった。尚、シグナル強度を比較するにあたり、 $t_1$ -decoupled HSQC spectrumにおけるHis97(H)については、ノイズレベルにおいて弱く観測されたピークの強度を採用している。

substrate存在下の $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルにおいてもHis97(H)由来のシグナルについては広幅化しており、CPを用いて測定することによってシグナル強度が増大することが期待される。しかし、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation with CP測定や $t_1$ -decoupled HSQC測定には、ある程度の積算回数が必要のため、substrateの加水分解反応時間内に測定を完了することは難しい。これは、Fig.4-1に示した通常の $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCに比べ、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation with CPや $t_1$ -decoupled HSQCでは磁化移動に要する時間が長く、高分子量タンパク質を対象とする場合には緩和によるS/Nの低下が避けられないことによる。例えば、ハプテン非存在下において行った各測定には、それぞれ約6時間を要している。以上の理由から、substrate存在下については、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation spectrum with CPと $t_1$ -decoupled HSQC spectrumの比較を行うことができなかった。しかしながら、ハプテン非存在下において化学交換現象の存在が確認されたことから、substrate存在下においても同様の理由でHis97(H)由来のシグナルが広幅化していると考えられる。

一方、TSA存在下については、ハプテン非存在下における測定と同じ条件のもと、 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation spectrum with CPと $t_1$ -decoupled HSQC spectrumを測定し、各シグナル強度の比較を行った。その結果、His97(H)を含むすべてのHis残基由来のシグナルに有意な強度差は見られなかった(Fig.5-13b)。したがって、TSA存在下では、すべてのHis残基に化学交換現象が観測されないことが判明した。

### 5-3-2. His以外のアミノ酸残基について

ハプテン非存在下、substrate存在下の $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQCスペクトルにおいては観測されずに、TSA存在下において観測されるシグナルとしては、His97(H)の他に、Tyr残基に2個、Phe残基に1個、計3残基は少なくとも存在することが確認された。尚、プローブとした残基は、Ala、Arg、Met、Ile、Phe、Trp、Tyr、Valの9種類である。これらのシグナルのうち、2個のTyr残基については二重標識法によってTyr100j(H)とTyr32(L)であることが明らかになったが、重複配列のためにPhe残基については二重標識法により一義的な帰属を行うことができなかった。ただし、Phe91(H)とPhe100k(H)の一方であることはわかっている。

以上の結果より、ハプテン非存在下とsubstrate存在下においてHis97(H)、Tyr100j(H)、Tyr32(L)由来のシグナルを指標に観測された化学交換現象がTSA存

在下において消失することが判明した。また、同様な現象が、Phe91(H)またはPhe100k(H)由来のシグナルにおいても見られることが明らかになった。これらの残基のうち His97(H)、Tyr100j(H)、Phe100k(H)はH3 ループに存在していることから、ハプテン非存在下と substrate 存在下において化学交換現象が観測される部位はH3 ループを中心とした領域であることがわかった(Fig.5-14)。

### 5-3-3. 化学交換現象と構造多形性

$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルにおいて観測される広幅化したシグナルから、化学交換現象が見られる残基を特定することができた。このとき観測されている広幅化には、 $^1\text{H}$  と  $^{15}\text{N}$  の両方の核の化学交換が反映されている。また、CP を用いて広幅化によるシグナル強度の減少を抑制したときにも、両方の核の影響が現われている。

$^{15}\text{N}$  の化学交換現象は構造多形性を反映するのに対し、 $^1\text{H}$  の化学交換現象は構造多形性と水との交換を反映する。そこで、そのどちらの影響によって化学交換現象が観測されたのかを明らかにするため、測定温度を変化させて  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルの測定を行った。測定温度を高くすると交換が速くなるため、構造多形性が反映されている場合にはシグナルが尖鋭化し、水との交換が反映されている場合にはシグナルがさらに広幅化することが予想される。

温度を変化させてハプテン非存在下の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定したところ、37 °C では His97(H)、Tyr100j(H)、Tyr32(L)由来のシグナルは観測されなかったが、43 °C や 45 °C にすると弱いながらもピークが観測された。したがって、観測された化学交換現象は、構造多形性を反映していると判断した。

### 5-3-4. 本節のまとめ

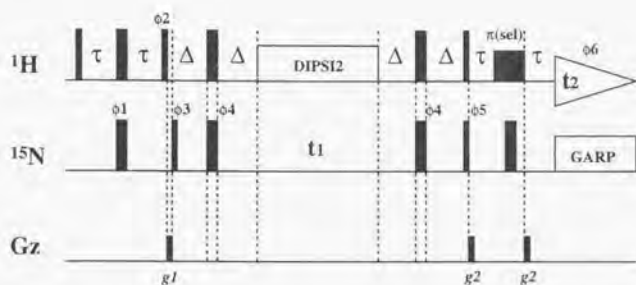
$^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation spectrum with CP と  $t_1$ -decoupled HSQC spectrum を比較することにより、化学交換現象について検討することが可能になった。このとき、両測定において磁化移動時間が等しくなるように  $2\tau + 2\Delta = \text{time (DIPSI2)}$  とする方が望ましい。測定条件については、CP を用いることによって一部のシグナルの強度が増大し、それ以外のシグナル強度が変化しなければ問題は無いが、もし、 $T_2$  や  $T_{1\rho}$  の測定などにより化学交換に関して既知のタンパク質を用いて予め条件を検討することができれば、より好ましい。このようなタンパク質として、本研究では抗 DNS-Fv を用いている。

この方法をハプテン非存在下の [ $^{15}\text{N}$ -His] 6D9-Fab に適用したところ、His97(H)由来のシグナルが化学交換により広幅化していることが判明した。また、ハプテン非存在下と同様に substrate 存在下においても  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトル上に His97(H)由来のシグナルが観測されなかったことから、substrate 存在下における

His97(H)にも化学交換現象が見られることが明らかになった。さらに、ハブテン非存在下と substrate 存在下において観測された化学交換現象は、構造多形性を反映していることが示された。一方、TSA 存在下における His97(H)由来のシグナルには広幅化が認められなかったことから、ハブテン非存在下と substrate 存在下においては His97(H)に構造多形性が存在しているが、TSA 存在下ではその構造多形性が消失することがわかった。

さらに、ハブテン非存在下と substrate 存在下において Tyr100j(H)や Tyr32(L)由来のシグナルを指標に観測された化学交換現象が TSA 存在下において消失することが判明した。したがって、ハブテン非存在下と substrate 存在下においては、Tyr100j(H)と Tyr32(L)にも構造多形性が存在していることが明らかになった。また、同様な現象が Phe91(H)または Phe100k(H)においても観測されたため、ハブテン非存在下と substrate 存在下においては H3 ループを中心に構造多形性が存在しているが、TSA 存在下ではその構造多形性が消失すると結論した。

(a)



(b)

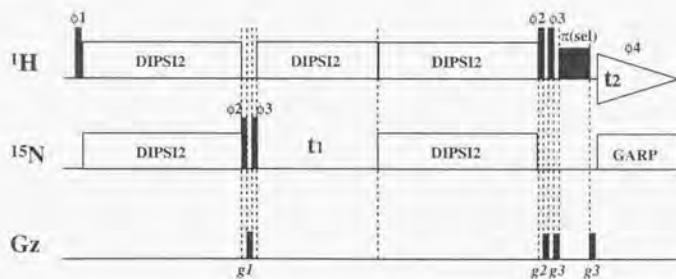


Fig.5-10 (a) Pulse sequence for the  $t_1$ -decoupled  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC experiments.

Phase cycling:  $\phi_1 = 4(x), 4(-x), \phi_2 = y, \phi_3 = x, -x, \phi_4 = 8(x), 8(-x),$

$\phi_5 = 2(x), 2(-x), \phi_6 = x, -x, -x, x.$

(b) Pulse sequence for the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation experiments with CP.

Phase cycling:  $\phi_1 = 2(x), 2(-x), \phi_2 = -y, \phi_3 = y, \phi_4 = x, -x, -x, x$

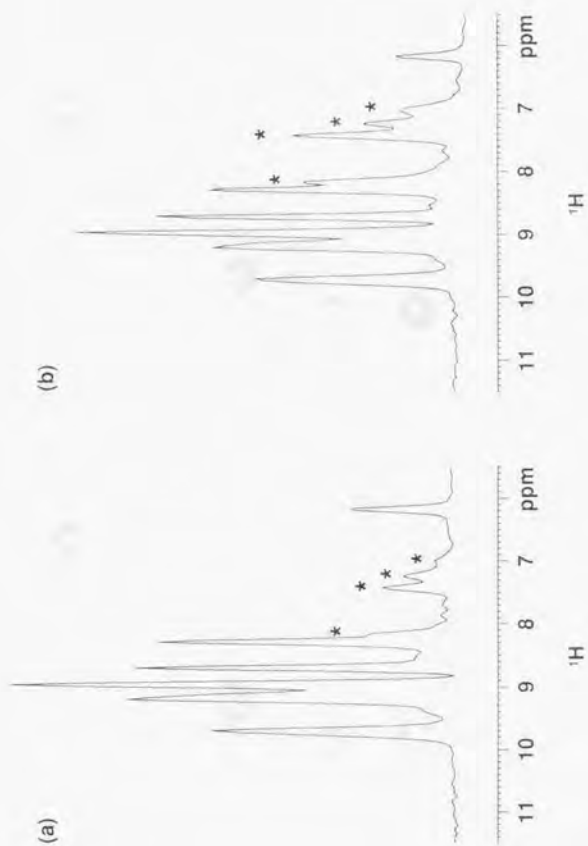


Fig. 5.41  $[^{15}\text{N}\text{-Tyr}]$  anti-DNS-Fv, pH 5.5, 30 °C  
 (a) 1D-decoupled  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum  
 (b)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation spectrum with (C)

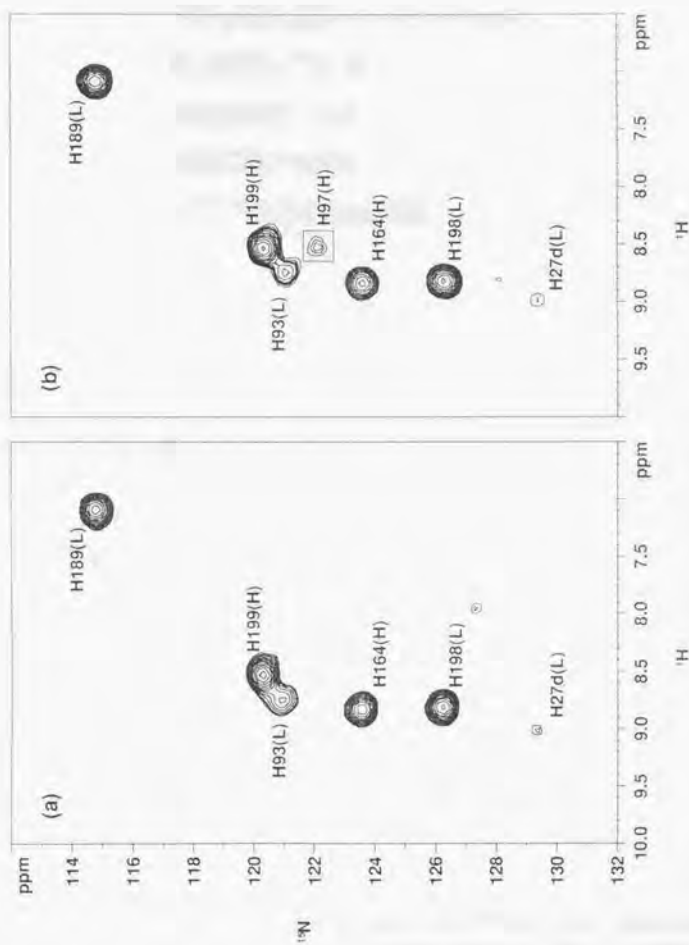


Fig. 5.12  $^{15}\text{N}$ - $^1\text{H}$  (a)  $\text{H}_2\text{O}$ -decoupled  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum, (b)  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation spectrum with  $\text{CP}$ .

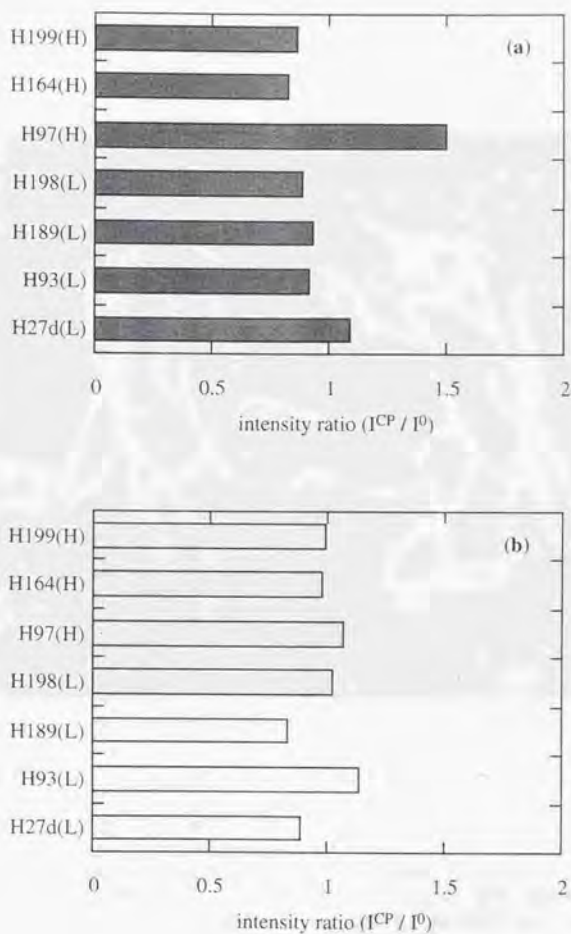


Fig.5-13 Intensity ratio ( $I^{CP} / I^0$ ) of the cross peaks, where  $I^{CP}$  and  $I^0$  are the cross peak intensities in the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  shift correlation spectrum with CP and t1-decoupled  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum. (a) free (b) +TSA

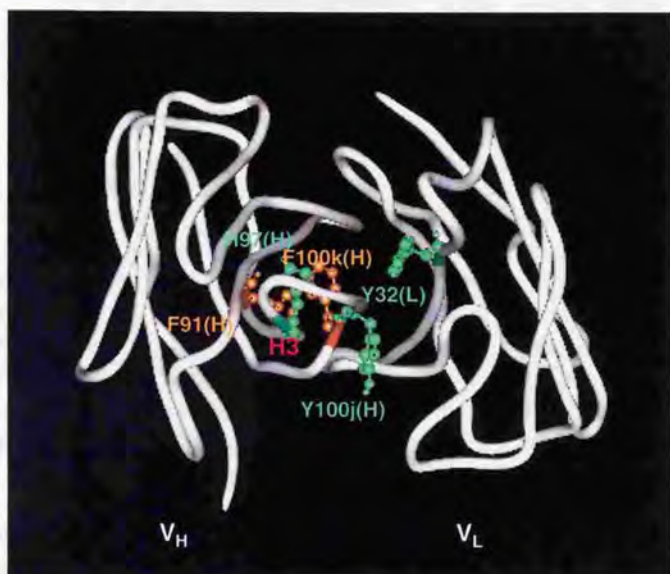


Fig.5-14 6D9 の可変領域の三次元構造モデル。  
 substrate存在下において観測される化学交換現象が、TSA存在下において消失する残基 (H97(H), Y100j(H), Y32(L)) については、緑色で側鎖を表示した。また、F91(H)またはF100k(H)の一方にも同様な現象が観測されたため、F91(H)とF100k(H)についてはオレンジで側鎖を表示した。



#### 5-4. 抗原結合部位に存在する His27d(L)の微視的環境

##### 5-4-1. His27d(L)の相互作用様式

6D9 の His27d(L)を Ala へと置換した変異体については、substrate 結合能がほとんど変化しなかったにもかかわらず TSA 結合能が大きく低下し、触媒活性が失われていた。そこで、substrate と TSA の識別に His27d(L)が重要な役割を担っていると考え、substrate 存在下と TSA 存在下における His27d(L)の相互作用様式について NMR を用いて解析を行った。

##### (1) His 残基の pKa

まず、ハプテン非存在下、substrate 存在下、TSA 存在下における His27d(L)の解離状態を明らかにするために、さまざまな pH において [ $^{15}\text{N}$ -His] 6D9-Fab の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC スペクトルを測定し、得られた窒素シグナルの化学シフト変化から pKa を決定した。このとき、pKa の決定については、主鎖アミド窒素の化学シフトを

$$\delta_{\text{obs}} = (\delta_{\text{His}} + \delta_{\text{His}^+} \times [\text{H}^+] / K_a) / (1 + [\text{H}^+] / K_a) \quad (5.3)$$

に従ってフィッティングすることにより行っている (Fig. 5-15)。ただし、 $\delta_{\text{obs}}$  は観測される化学シフト、 $\delta_{\text{His}}$  は deprotonation フォームの化学シフト、 $\delta_{\text{His}^+}$  は protonation フォームの化学シフトである。この結果より、ハプテン非存在下と substrate 存在下については、His27d(L)の pKa がそれぞれ 5.3 と 5.1 であることが判明した。また、TSA 存在下については、pH 4.3 ~ 7.5 の範囲において His27d(L)の化学シフトに変化が見られず、pKa < 4.3 であることがわかった。この pH 域において deprotonation フォームをとっていることについては、5-4-2 (5)「解離状態の識別への応用」にて確認を行っている。以上の結果より、中性条件下の His27d(L)については、各状態ともに deprotonation フォームをとっていることが判明した。また、substrate 存在下における pKa についてはハプテン非存在下のものとほぼ同じ値を示したのに対し、TSA 存在下では pKa が大きく低下することが明らかになり、substrate 存在下と TSA 存在下において His27d(L)が異なる相互作用様式をとることが示唆された。

##### (2) His 残基の側鎖 NH シグナルの検出

NMR スペクトル上に易動性プロトン由来のシグナルを観測することができるのは、溶媒との交換が NMR の時間スケールにおいて遅い場合に限られる。例えば、9.4 ~ 14.1 テスラ ( $^1\text{H}$  の核磁気共鳴周波数、400 ~ 600 MHz) の装置を用いた場合には、交換速度がおおよそ  $1 \times 10^3 (\text{min}^{-1})$  より小さい場合にのみ観測可能である。His 残基の側鎖 NH シグナルについては、水素結合を形成したりすることによ

で交換速度が低下している場合に限り観測されることが知られている。

6D9 の His27d(L)については、substrate 存在下と TSA 存在下において相互作用様式が異なることが示唆され、その違いが側鎖 NH の交換速度にも反映されていることが期待される。そこで、[ $u$ - $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -His] 6D9-Fab を調製し、ハブテン非存在下、substrate 存在下、TSA 存在下について His27d(L)の側鎖 NH シグナルの検出を試みた。このとき、検出されたシグナルについて帰属が可能なように、His 残基の窒素のみならず炭素にも安定同位体標識( $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ )を施してある。また、His 残基の側鎖 NH と水との交換速度をできる限り低下させるために、NMR の測定温度を 10 °C に設定した。

10 °C において分子量約 50 K のタンパク質(6D9-Fab)を測定する場合には、緩和による磁化の減衰が深刻な問題となる。そこで、磁化の減衰を最小限にとどめるために、水シグナルの抑制に用いていた選択的  $^1\text{H}$  パルスやグラディエントパルスを取り除いたパルス系列(Fig.5-16)を使用した。また、照射された水シグナルからのスピン拡散によって NH シグナルの強度が減少してしまう恐れがあるため、水シグナルの抑制には 1-1 echo 系列のみを用いた。

Fig.5-16 に示したパルス系列を用いて、ハブテン非存在下、substrate 存在下、TSA 存在下における [ $u$ - $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -His] 6D9-Fab の  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC スペクトルを測定し、Fig.5-20 にその低磁場領域を示した。ハブテン非存在下と substrate 存在下については、7 個存在する His 残基のうち定常領域に位置する His199(H)由来のシグナルのみが観測されているのに対し、TSA 存在下については、それに加えて His27d(L)由来のシグナルも観測されている。したがって、TSA 存在下における His27d(L)の側鎖 NH の交換速度は、substrate 存在下に比べて低下していることが明らかになった。以上の結果より、TSA 存在下における His27d(L)の側鎖 NH は、substrate 存在下に比べて強固な水素結合を形成していると考えられる。

観測された側鎖 NH シグナルの帰属方法については、(3)において示す。

### (3) His 残基の側鎖由来のシグナルの帰属

観測された側鎖 NH シグナルについては、(3-1) 同じサブクラス間の比較、(3-2) pKa 値の照合、(3-3) C2-H からの NOE、の手順に従って帰属を行った。まず、9C10-Fab と 3G6-Fab を用いて可変領域 ( $V_H$ ,  $V_L$ ) と定常領域 ( $C_H1$ ,  $C_L$ ) 由来のシグナルを識別する。この結果を鑑みながら、主鎖アミド窒素と C2-H をプローブとして決定された pKa 値を照らし合わせ、C2-H シグナルの帰属を完了する。その後、C2-H シグナルから観測される NOE によって側鎖 NH シグナルの帰属を行った。

#### (3-1) 同じサブクラス間の比較

[ $u\text{-}^{13}\text{C}\text{-His}$ ] 6D9-Fab, [ $u\text{-}^{13}\text{C}\text{-His}$ ] 9C10-Fab, [ $u\text{-}^{13}\text{C}\text{-His}$ ] 3G6-Fab の  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルを測定し C2-H シグナルを比較したところ、すべてのスペクトルにおいて、等しい化学シフトを示すシグナルが4個ずつ観測されたため、これらを定常領域に存在する His 残基由来のシグナルと帰属した。同様に C4-H シグナルについても、可変領域と定常領域由来のシグナルを識別することができた。

また、[ $u\text{-}^{13}\text{C},^{15}\text{N}\text{-His}$ ] 9C10-Fab, [ $u\text{-}^{13}\text{C},^{15}\text{N}\text{-His}$ ] 3G6-Fab を調製し、TSA 存在下において  $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$  HMQC スペクトルを測定したところ、[ $u\text{-}^{13}\text{C},^{15}\text{N}\text{-His}$ ] 6D9-Fab において観測された2個のシグナル(Fig.5-20c)のうち一方の化学シフトには、常にシグナルが観測され、このシグナルについては定常領域の His 残基に由来することが明らかになった。

### (3-2) pKa 値の照合

TSA 存在下の [ $u\text{-}^{13}\text{C}\text{-His}$ ] 6D9-Fab を調製し、さまざまな pH において  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HSQC スペクトルの測定を行った。その結果、7個存在する His 残基のうち6残基については C2-H シグナルが観測され、それぞれを指標に各残基の pKa を決定することができた。決定された pKa 値については、Fig.5-18 に示した  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル上に付記してある。この結果を、主鎖アミド窒素の化学シフトを指標にして決定された pKa 値と照らし合わせ、His97(H)を除く C2-H シグナルの帰属が完了した。

His97(H)由来のシグナルについては、37 °C で測定された  $^1\text{H}\text{-}^{13}\text{C}$  HSQC スペクトル(Fig.5-18b)では観測されていないが、45 °C においては観測される (Fig.5-25 参照)。そこで、45 °C において 5-4-2 (6) 「pKa 値の算出」に示した方法を適用したところ、得られた pKa ~ 6.0 が His97(H)の主鎖アミド窒素を指標にして決定された pKa = 6.0 と等しいことが確認された。以上の結果、His97(H)を含む、すべての His 残基の C2-H シグナルの帰属を完了することができた。

また、帰属された C2-H シグナルをもとに、 $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$  HOHAHA および HCN 測定<sup>10)</sup>を併用して、C4-H シグナルについても帰属を完了させた。帰属結果については、Fig.5-23 に示したスペクトルに付記してある。

### (3-3) C2-H からの NOE

TSA 存在下において [ $u\text{-}^{13}\text{C},^{15}\text{N}\text{-His}$ ] 6D9-Fab の  $^1\text{H}\text{-}^1\text{H}$  NOESY スペクトルを測定したところ、His27d(L)の C2-H and/or C4-H\* シグナルと 12.5 ppm に観測される側鎖 NH シグナルの間に NOE ピークが観測された(Fig.5-19a)。8.0 ppm に観測されるシグナルが His 残基の C2-H and/or C4-H であることについては、Fig.5-17b のバル

\* His27d(L)の2'位のプロトンと4'位のプロトンの化学シフトは、ほぼ等しい。

ス系列を用いて $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY スペクトルを測定したときに、NOE ピークがスピン結合( $J_{\text{C-H}}$ )により分裂することを利用し確認してある(Fig.5-19b)。以上の結果、TSA 添加に伴い新たに観測される側鎖 NH シグナルについては、His27d(L)と帰属でき、また同様に、もう一方の側鎖 NH シグナルについては、His199(H)と帰属された。

#### 5-4-2. His27d(L)の互変異性の解析

中性付近における TSA 複合体の His27d(L)については、その pKa 値(< 4.3)より deprotonation フォームをとることが明らかになった。しかし、deprotonation フォームには 1 位にプロトンが結合した N1 互変体と 3 位にプロトンが結合した N3 互変体が存在しているために、His27d(L)の側鎖の状態を決定するには至っていない。そこで、His 残基の互変体を決定する方法を開発して、TSA 存在下の 6D9-Fab に適用し、His27d(L)の微視的構造を露にすることを目指した。

##### (1) His 残基の互変異性

His 残基のイミダゾール環の存在状態には protonation フォームと deprotonation フォームがあり、さらに、deprotonation フォームについては N1 互変体と N3 互変体が存在する(Fig.5-21)。monomeric histidine については、塩基性条件下における $^{13}\text{C}$  NMR 測定により、N1 互変体に比べて N3 互変体の存在比率が高いことが報告されているが<sup>11)</sup>、タンパク分子内の His 残基については残基ごとに存在比率が異なる。これは、互変体間の平衡状態が周囲の残基との相対配置等によって規定されているためである。

##### (2) 測定法

今までは、HMQC<sup>12,13,14)</sup>、HMBC<sup>15,16)</sup>、HSMQC<sup>17,18)</sup>測定を行い、隣接していない核間のスピン結合 ( $^2J_{\text{N-H}}$  と  $^3J_{\text{N-H}}$  = -11 ~ -2 Hz) の違いを検出することにより、互変体を決定していた。しかしながら、絶対値の小さな  $^2J_{\text{N3-H}}$  や  $^3J_{\text{N1-H}}$  を使って磁化移動を行うときには 50 ~ 100 ms の分極遅延時間が必要とされるため、30 ~ 40 KDa 以上の高分子量タンパク質の場合には、スペクトル上に交差ピークが観測されず、互変体を決定することができなかった。そこで、高分子量タンパク質についても互変体を決定する方法の開発を行った。

monomeric histidine<sup>19)</sup>や N-メチルイミダゾール<sup>20)</sup>を用いた NMR 実験から、1 ~ 3 本の化学結合を隔てた核間のスピン結合定数が、His の各状態ごとに報告されている(Fig.5-21)。従来の方法では、 $^2J_{\text{N3-H}}$  (N3 互変体 : -5.5 Hz, N1 互変体 : -9.0 Hz) に比べて  $^3J_{\text{N1-H}}$  (N3 互変体 : -1.7 Hz, N1 互変体 : -3.5 Hz) により連結された核

間のシグナル強度が弱くなることを利用していた。これに対し本研究では、やや絶対値が大きい $^1J_{C4,N3}$  (N3 互変体: -13.4 Hz) と $^2J_{C4,N1}$  (N1 互変体: -4.8 Hz) を用いて $J$ 変調 HSQC 測定を行い、互変体を決定する。Fig.5-22 に、互変体の決定に用いた $^1H$ - $^{13}C$  CT-HSQC with and without  $J_{C,N}$  amplitude modulation のパルス系列を示す。ここで constant-time である 2T に $1/|J_{C4,N3}|$ の倍数を設定すると、 $^1J_{C4,N3}$  によって変調を受けた C4 磁化は 2T 期後に再結像するため、 $^1J_{C4,N3}$  によるシグナルの分裂は観測されなくなる<sup>21)</sup>。さらに、Fig.5-22a では、 $J_{C4,N}$  によって位相変調を受ける C4 磁化が 2T 期間後に再結像するするため、シグナルの強度変調は起こらない。一方、Fig.5-22b では、2T 期間に $J_{C4,N}$ による位相変調が起こるため、シグナルに強度変調が生じる。このとき、位相変調を起こす主な $J_{C4,N}$ は、N3 互変体では $^1J_{C4,N3} = -13.4$  Hz、N1 互変体では $^2J_{C4,N1} = -4.8$  Hz である。2種類の測定から得られるシグナル強度比 $I/I^0$ と各互変体の存在比率は、

$$I/I^0 = \cos\{\alpha \times 2\pi \times 13.4 \times T\} \times \cos\{(1-\alpha) \times 2\pi \times 4.8 \times T\} \quad (5.4)$$

と表される。ただし、 $I$  と  $I^0$  は、 $J_{C4,N}$  による位相変調を受けたときと受けなかったときのシグナル強度、 $\alpha$  は N3 互変体の存在比率である。したがって、 $I/I^0$  値または  $I/I^0$  値から $J_{C4,N}$ を求めることにより、互変体を決定することができる。

シグナル強度比 $I/I^0$ は、設定する 2T の値によって変化し、互変体ごとに計算可能である。各互変体について、2T = 14.3, 28.6, 42.9, 57.2 (ms)のときのシグナル強度比 $I/I^0$ を計算し、Table 5-4 に示した。計算した 2T 値の範囲では、N3 互変体と N1 互変体におけるシグナル強度比 $I/I^0$ の差が、2T 値の増加に伴い徐々に広がっている。したがって、2T を長く設定することにより、互変体の識別は容易になる。しかしながら、2T 期における緩和( $T_2$ )によるシグナル強度の減衰は $\exp(-2T/T_2)$ に従うため、高分子量タンパク質の場合に長い 2T 期を設けるのは適切ではない。その上、2T 期を長くすると、N3 互変体では $^2J_{C4,N1} = +0.5$  Hz、N1 互変体では $^1J_{C4,N3} = +0.9$  Hz の小さなスピン結合による強度変調の影響が大きくなる。したがって、2T = 28.6 ms (=  $2/|J_{C4,N3}|$ )とするのが望ましいと判断した。尚、この場合、小さい方の $J_{C4,N}$ による強度変調は、0.4%以下に抑えられる。

### (3) 互変体の決定

TSA 存在下の $[u-^{13}C, ^{15}N\text{-His}]$  6D9-Fab を調製し、pH 6.0、45 °C にて $^1H$ - $^{13}C$  CT-HSQC with and without  $J_{C,N}$  amplitude modulation 測定を行った。また、測定中に 2 位のプロトンが重水素化されることを防ぐため、溶媒に軽水(90%  $H_2O$ 、10%  $D_2O$ )を用いた。

Fig.5-23 に得られた結果を示す。 $^1H$ - $^{13}C$  CT-HSQC spectrum without  $J_{C,N}$  amplitude modulation では、6D9-Fab に存在する 7 個の His 残基由来のシグナルがすべて観測された(Fig.5-23a)。一方、 $^1H$ - $^{13}C$  CT-HSQC spectrum with  $J_{C,N}$  amplitude modulation では、 $J_{C,N}$ による強度変調により各シグナルの強度が軒並み減少した(Fig.5-23b)。

His97(H), His164(H), His189(H)のイミダゾール環は完全にもしくは部分的に protonation フォームをとっているため除外し、その他の残基についてシグナル強度比  $I/I^0$  を計算し Table 5-5 にまとめた。 $I/I^0 \sim 0.36$  のときには N3 互変体、 $I/I^0 \sim 0.91$  のときには N1 互変体であることを意味する。また、これらの中間の  $I/I^0$  値の場合には、N3 互変体と N1 互変体の平衡状態にあることに対応する。その結果、算出された  $I/I^0$  値から、His27d(L), His93(L), His198(L), His199(H)は、主に N3 互変体をとることが判明した。

#### (4) 互変体間の平衡

互変体間の平衡状態として存在しているために、N3 互変体と N1 互変体にそれぞれ対応する  $I/I^0 = 0.36$  と  $I/I^0 = 0.91$  の中間の値が得られることがある。この場合の  $I/I^0$  値と各互変体の存在比率の関係について記述する。

$2T = 28.6$  (ms) のとき、 $I/I^0$  と N3 互変体の存在比率  $\alpha$  の関係式は、

$$I/I^0 = \cos \{ \alpha \times 2\pi \times 13.4 \times 0.0143 \} \times \cos \{ (1-\alpha) \times 2\pi \times 4.8 \times 0.0143 \} \quad (5.5)$$

と表される。したがって、得られた  $I/I^0$  値を式(5.5)に代入することにより存在比率  $\alpha$  を算出することが可能である。また、Fig 5-24 に、シグナル強度比  $I/I^0$  と N3 互変体の存在比率  $\alpha$  の関係を既知のカップリング定数から計算し、理論曲線として実線で示してある。

測定を行った pH 6.0 において deprotonation フォームをとっている His27d(L), His93(L), His198(L), His199(H)の  $I/I^0$  値と、deprotonation フォームをとっている (pH 8.1 における) monomeric histidine から得られた  $I/I^0$  値を、Fig 5-24 に示した理論曲線上にプロットした。この結果は、monomeric histidine では N3 互変体と N1 互変体がおおよそ 8 対 2 で混在する平衡状態にあることを示している。また、His93(L)と His198(L)については monomeric histidine とほぼ等しい平衡状態で存在しているのに対し、His27d(L)と His199(H)については N3 互変体に平衡が偏っていることが判明した。

以上の結果より、TSA 存在下における His27d(L)のイミダゾール環は、N3 互変体に平衡が偏り水素結合を形成していることが明らかになった。

#### (5) 解離状態の識別への応用

(2), (3)では、 $^1J_{C4,N3}$  または  $^2J_{C4,N1}$  によって強度変調を受ける C4-H シグナルを用いて、His 残基の互変体を決定できることを示した。(5)では、 $^1H$ - $^{13}C$  CT-HSQC with and without  $J_{C,N}$  amplitude modulation 測定により、さらに His 残基の protonation フォームと deprotonation フォームを識別することも可能であることを示す。His 残基の解離状態の識別には、C2-H シグナルが  $^1J_{C2,N1}$  または  $^1J_{C2,N3}$  により強度変調

を受けることを利用する。

$J_{C-N}$  による位相変調を受けたときと受けないときの C2-H シグナル強度比は、

$$I/I^0 = \cos(2\pi J_{C2-N1} T) \cos(2\pi J_{C2-N3} T) \quad (5.6)$$

と表される。そこで、各解離状態において、 $2T = 28.6$  (ms) と設定したときのシグナル強度比  $I/I^0$  を計算する。protonation フォームでは、 $^1J_{C2-N1} = -16.1$  Hz および  $^1J_{C2-N3} = -16.0$  Hz より、 $I/I^0 = 0.016$  となる。一方、deprotonation フォームでは、 $^1J_{C2-N1} = -12.2$  Hz および  $^1J_{C2-N3} = -1.9$  Hz、または、 $^1J_{C2-N1} = -1.9$  Hz および  $^1J_{C2-N3} = -12.2$  Hz より、 $I/I^0 = 0.45 \sim 0.65$  となる (詳細については後述)。

Fig. 5-25 に、 $^1H$ - $^{13}C$  CT-HSQC spectrum with and without  $J_{C-N}$  amplitude modulation の C2-H 領域を示す。得られた C2-H シグナルの強度比  $I/I^0 = 0.68 \pm 0.19$  [His27d(L)],  $0.46 \pm 0.01$  [His93(L)],  $0.49 \pm 0.06$  [His198(L)],  $0.49 \pm 0.01$  [His199(H)] は deprotonation フォームをとっていることに対応し、 $I/I^0 = 0.13 \pm 0.03$  [His189(L)],  $0.008 \pm 0.02$  [His164(H)] は protonation フォームをとっていることに対応する。また、 $I/I^0 = 0.23 \pm 0.05$  [His97(H)] は、deprotonation フォームと protonation フォームの平衡状態にあることを意味する。

すでに、5-4-1 (1) 「His 残基の pKa」において、主鎖アミド窒素の化学シフトを指標に pH 適定実験が行われ、各 His 残基の pKa が決定されている。その結果、pH 6.0 においては、His27d(L) / (pKa < 4.3)、His93(L) / (pKa = 5.6)、His198(L) / (pKa = 3.7)、His199(H) / (pKa < 4.1) は deprotonation フォームをとり、His189(L) / (pKa = 7.3)、His164(H) / (pKa = 7.7) は protonation フォームをとることが明らかとなっている。また、His97(H) / (pKa = 6.0) については deprotonation フォームと protonation フォームの平衡状態にあると考えられる。したがって、化学シフトの pH 依存性から決定した pKa 値が、 $^1J_{C2-N1}$  および  $^1J_{C2-N3}$  を用いて解離状態を識別した結果を支持していることが確認された。

尚、His の C2 に隣接した炭素原子はない。そのため、 $^1H$ - $^{13}C$  CT-HSQC with and without  $J_{C-N}$  amplitude modulation 測定において、 $2T$  を必ずしも  $1/|J_{C4CS}|$  の倍数に設定する必要はなく、測定対象によって  $2T$  を調整することができる。したがって、さらに分子量の大きなタンパク質にまで適用範囲を広げることが可能である。

## (6) pKa 値の算出

deprotonation フォームと protonation フォームにそれぞれ対応する  $I/I^0 = 0.45 \sim 0.65$  と  $I/I^0 = 0.016$  の中間の値が得られたときには pKa 値を算出することが可能である。

deprotonation フォームの存在比率を  $\beta$  とすると、 $I/I^0$  と各解離状態の存在比については、

$$I/I^0 = \cos[2\pi \times T \times \{\alpha \times \beta \times 12.2 + (1-\alpha) \times \beta \times 1.9 + (1-\beta) \times 16.0\}] \\ \times \cos[2\pi \times T \times \{\alpha \times \beta \times 1.9 + (1-\alpha) \times \beta \times 12.2 + (1-\beta) \times 16.1\}] \quad (5.7)$$



と表され、 $I/I^0$ 、 $T$ 、 $\alpha$  から  $\beta$  を決定することが可能である。さらに、 $\beta$  と  $pK_a$  の間には関係式：

$$pK_a = pH - \log \{ \beta / (1 - \beta) \} \quad (5.8)$$

が成り立つので、決定された  $\beta$  から  $pK_a$  が導かれる。

また、式(5.8)を  $\beta$  について解き、式(5.7)へ代入すると、

$$\begin{aligned} I/I^0 = & \cos \{ 2\pi \times T \times [\alpha \times \{ 1 / (10^{[pK_a - pH]} + 1) \} \times 12.2 + (1 - \alpha) \\ & \times \{ 1 / (10^{[pK_a - pH]} + 1) \} \times 1.9 + \{ 10^{[pK_a - pH]} / (10^{[pK_a - pH]} + 1) \} \times 16.0] \} \\ & \times \cos \{ 2\pi \times T \times \{ \alpha \times \{ 1 / (10^{[pK_a - pH]} + 1) \} \times 1.9 + (1 - \alpha) \\ & \times \{ 1 / (10^{[pK_a - pH]} + 1) \} \times 12.2 + \{ 10^{[pK_a - pH]} / (10^{[pK_a - pH]} + 1) \} \times 16.1 \} \} \quad (5.9) \end{aligned}$$

となり、 $I/I^0$  と  $\alpha$  から  $pK_a$  を直接導き出すことが可能になる。Fig. 5-26a に  $\alpha = 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1$  における  $[pK_a - pH]$  と  $I/I^0$  の関係を、Fig. 5-26b に  $2T = 10.0, 20.0, 28.6, 40.0$  (ms) における  $[pK_a - pH]$  と  $I/I^0$  の関係を、図示してある。ただし、それぞれ  $2T = 28.6$  (ms) または  $\alpha = 0.8$  の場合のシミュレーションである。

Fig. 5-26a から明らかなように、 $pK_a$  を算出可能な pH 域 ( $[pK_a - pH]$  が 0 に近いとき) では  $\alpha$  の寄与が小さいため、 $\alpha$  値の設定に関係なくほぼ正しい  $pK_a$  を導出することができる。ただし、C4-H シグナルにおいても同様に  $I/I^0$  と  $\alpha$ 、 $\beta$  の関係式をたて、C2-H シグナルと C4-H シグナルの  $I/I^0$  から  $\alpha$  と  $\beta$  を算出することも可能である。

$[pK_a - pH]$  と  $I/I^0$  の関係を示した理論曲線が正しいことについては、確認することができる。本研究では、monomeric histidine と 6D9-Fab を用いて  $2T = 28.6$  (ms) の場合について実証した。

monomeric histidine については、まず、C2-H の化学シフトの pH 依存性から  $pK_a = 6.2$  を決定し、続いて、さまざまな pH において C2-H シグナルの強度比  $I/I^0$  を測定した。得られた  $I/I^0$  値を  $[pK_a (= 6.2) - pH]$  に対しプロットし、既知のカップリング定数より計算した理論曲線とともに Fig. 5-27 に図示した。このとき、(4)「互変体間の平衡」において示したように  $\alpha = 0.8$  とした。その結果、実測値と理論曲線がほぼ一致し、理論曲線が正しいことが証明された。

また、6D9 についても、主鎖アミド窒素を指標にして得られた各 His 残基の  $pK_a$  値に対し C2-H シグナルの  $I/I^0$  値をプロットし、理論曲線とともに Fig. 5-28 に示した。その結果、6D9-Fab における実測値も理論曲線にほぼ対応していることがわかった。したがって、高分子量タンパク質についても、測定を行う pH が  $pK_a$  に近いときには  $I/I^0$  値から  $pK_a$  を決定できること、および、測定 pH が  $pK_a$  と離れていても deprotonation フォームと protonation フォームを識別することが可能であることが立証された。

His97(H) の C2-H シグナルから得られた  $I/I^0 = 0.23$  は、deprotonation フォームと protonation フォームの平衡状態にあること示している。そこで、一つの例として His97(H) の C2-H シグナルを取り上げ、 $I/I^0$  値から  $pK_a$  を決定する。このとき、 $\alpha$



$\approx 0.8$  と仮定するが、His97(H)における  $I/I^0$  値については、Fig. 28 に示したように  $\alpha$  値の設定にほとんど無関係に正しい  $pK_a$  値を導くことができる。 $I/I^0 = 0.23$  を式(5.7)に代入すると  $\beta = 0.48$  が導かれ、さらに、 $\beta = 0.48$  を式(5.8)に代入することによって  $pK_a = 6.0$  が算出される。この値については、主鎖アミド窒素の化学シフトの pH 依存性から得られた  $pK_a = 6.0$  と等しく、 $I/I^0$  値から  $pK_a$  が正しく導かれることがわかる。

#### (7) 本方法の利点について

化学シフトの pH 依存性を追跡することによって  $pK_a$  を決定できる His 残基については、(1) 指標としたシグナルの化学シフトが deprotonation フォームと protonation フォームで異なること、(2) 指標としたシグナルの化学シフトに、目的の His 残基以外の解離性残基の影響が現れないこと、(3) 用いたタンパク質が広い pH 域で安定に存在できること、などの条件を満たす必要がある。ところが、(1) ~ (3)の条件が満たされない場合でも、本方法を用いると、必ずしも  $pK_a$  を決定できるとは限らないが、少なくとも deprotonation フォームと protonation フォームを識別することが可能である。6D9 の例からも明らかのように、タンパク質にはさまざまな  $pK_a$  をもつ His 残基が存在するため、特に(3)の条件を満たすのは困難な場合が多い。したがって、本方法によって高分子量タンパク質において His 残基の互変異性を解析できるようになったことのみならず、解離状態を解析できる対象 (His 残基) が広がったことが利点として挙げられる。

#### 5-4-3. 本節のまとめ

まず、His27d(L)の解離状態を明らかにするために主鎖アミド窒素シグナルの pH 依存性を解析したところ、ハプテン非存在下、substrate 存在下、TSA 存在下における  $pK_a$  が、それぞれ 5.3、5.1、 $< 4.3$  であることが示され、中性条件下においては各状態ともに deprotonation フォームをとっていることが判明した。また、substrate 存在下における  $pK_a$  についてはハプテン非存在下のものとほぼ同じ値を示したのに対し、TSA 存在下では  $pK_a$  が大きく低下することが明らかになり、substrate 存在下と TSA 存在下において His27d(L)が異なる相互作用様式をとることが示唆された。

さらに、His 残基の側鎖 NH シグナルの検出を試みたところ、7 個存在する His 残基のうち定常領域に位置する His199(H)のみがハプテン非存在下および substrate 存在下において観測されたのに対し、TSA 存在下では新たに His27d(L)の側鎖 NH シグナルが観測された。したがって、TSA 存在下における His27d(L)の側鎖 NH の交換速度は、substrate 存在下に比べて低下することが明らかになった。以上の結果より、TSA 存在下における His27d(L)の側鎖 NH は、substrate 存在

下に比べて強固な水素結合を形成していると考えられる。

解離性残基が水素結合を形成することにより pKa が変化する場合、その pKa の変化量から水素結合エネルギーを概算することが可能である。1.4 (kcal/mol) のエネルギー変化は pKa が 1 単位変化することに対応するため<sup>22)</sup>、substrate 存在下における pKa = 5.1 と TSA 存在下における pKa < 4.3 から、TSA 存在下において形成される水素結合のエネルギーは 1.1 (kcal/mol) 以上であることが示唆される。しかし、化学シフトの pH 依存性から pKa を測定する場合、およそ 2 単位の pH 域にわたり化学シフト変化が観測されることから (Fig5-15 参照)、pH 4.3 ~ 7.5 の範囲で主鎖 NH シグナルの化学シフトに変化が観測されなかった TSA 存在下における His27d(L) については、pKa が 3.3 以下であると考えられる。したがって、substrate から TSA ヘリガンドを変えることによって形成される水素結合エネルギーは、少なくとも 2.6 (kcal/mol) であると思積もることできる。これは、substrate 結合と TSA 結合のエネルギー差である 4.0 (kcal/mol) の大半を占めているため、His27d(L) による水素結合形成が TSA の選択的な認識に重要な働きを担っていることがわかる。ただし、観測される pKa の変化は、1 本の水素結合だけを反映しているのではなく、対象となる部位を中心とした水素結合ネットワークを反映する。6D9 の His27d(L) の場合には、イミダゾール環の 3 位のプロトンが水素結合を形成していることを示したが、その水素結合だけでなく 1 位における水素結合形成も pKa に反映される。さらに、その His 残基の周囲の相互作用形成も反映される場合もある。したがって、substrate から TSA ヘリガンドが変わると、His27d(L) を中心とした相互作用ネットワークが形成され、そのエネルギーが 2.6 (kcal/mol) 以上であると考えられる。

さらに、高分子量タンパク質においても His 残基の互変体を決定可能な方法を開発し、試験的にまず monomeric histidine を用いて N3 互変体と N1 互変体がおおよそ 8 対 2 で混在する平衡状態にあることを示した。この結果は、イミダゾール環の炭素シグナルの化学シフトから存在比を見積もった文献値<sup>11,23)</sup>と一致しており、提唱した方法の正当性が裏付けられている。また、TSA 存在下における各 His 残基の互変異性について検討した結果、His27d(L)、His93(L)、His198(L)、His199(H) については主に N3 互変体をとることがわかった。さらに、各互変体の存在比率を算出したところ、His93(L) と His198(L) については monomeric histidine と大きな差が見られなかったのに対し、側鎖 NH シグナルが観測された His27d(L) と His199(H) については N3 互変体に平衡が偏っていることが明らかになった。

以上の結果より、TSA 存在下における His27d(L) のイミダゾール環は、N3 互変体に平衡が偏り、水素結合を形成していることが判明した。

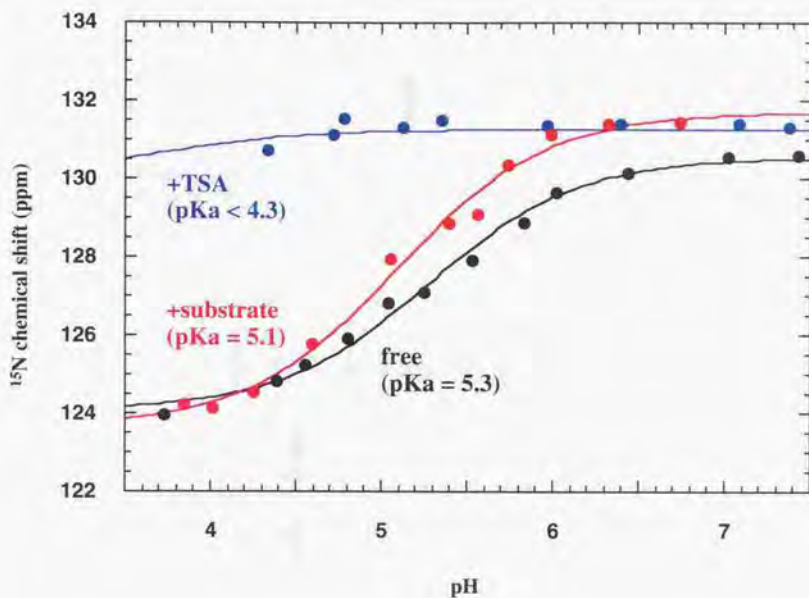


Fig.5-15 Chemical shifts of amide nitrogen plotted against pH for His27d(L).  
The curves represent best fits to these data generated using eq.5.3.

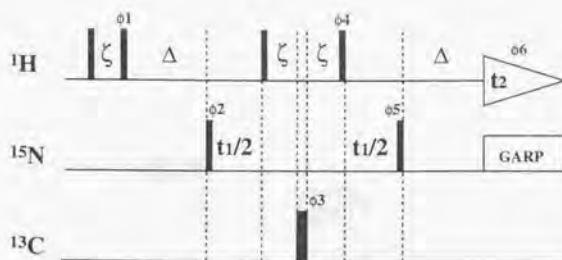


Fig.5-16 Pulse sequence for the  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC experiments.

Phase cycling :  $\phi_1 = -x$ ,  $\phi_2 = x$ ,  $-x$ ,  $\phi_3 = x$ ,  $-x$ ,  $\phi_4 = -x$ ,  $\phi_5 = 2(x)$ ,  $2(-x)$ ,  $\phi_6 = x$ ,  $-x$ ,  $-x$ ,  $x$ .

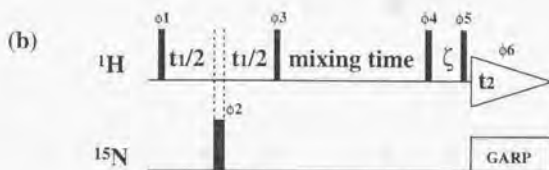
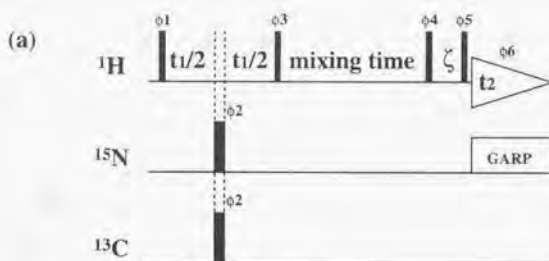


Fig.5-17 Pulse sequences for the  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY experiments.

Phase cycling :  $\phi_1 = x$ ,  $\phi_2 = 8(x)$ ,  $8(-x)$ ,  $\phi_3 = -x$ ,  $\phi_4 = 2(x)$ ,  $2(-x)$ ,  $2(y)$ ,  $2(-y)$ .

$\phi_5 = 2(-x)$ ,  $2(x)$ ,  $2(-y)$ ,  $2(y)$ ,  $\phi_6 = 2(x)$ ,  $2(-x)$ ,  $2(y)$ ,  $2(-y)$ .

(a) with  $^{13}\text{C}$  decoupling, (b) without  $^{13}\text{C}$  decoupling.

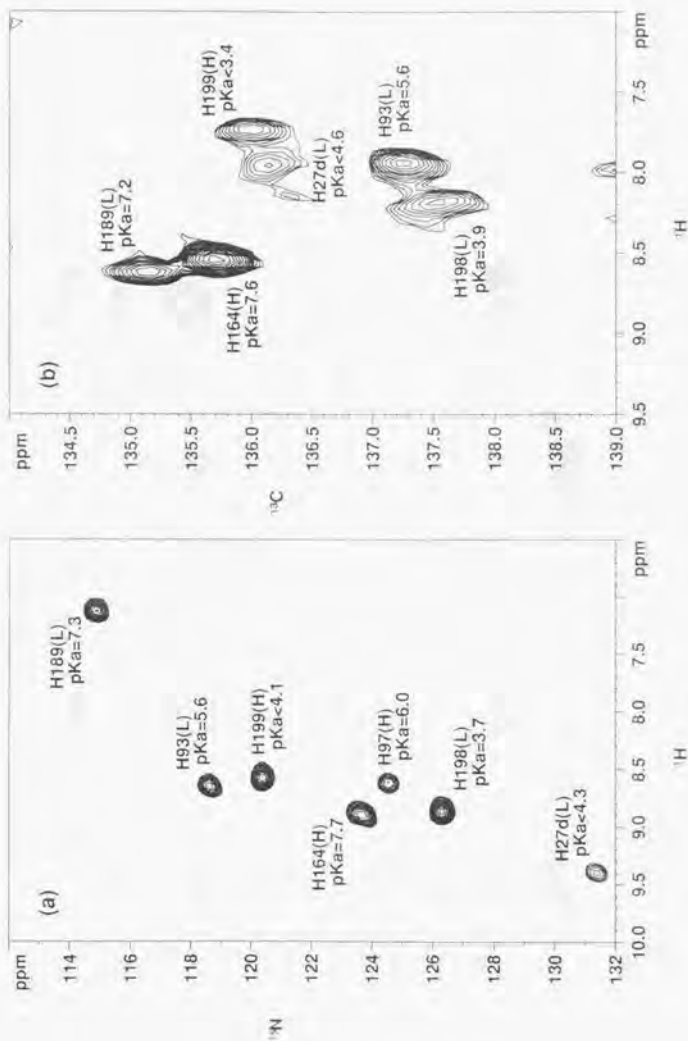


Fig. 5-18. pKa values obtained by using amide nitrogen (a) and C2 proton (b) signals.  
 (a)  $^{15}\text{N}$  HSQC spectrum of [ $^{15}\text{N}$ -His]6D9 Fab in the presence of TSA, pH 6.0, 37 °C.  
 (b)  $^{13}\text{C}$  HSQC spectrum of [ $^{13}\text{C}$ -His]6D9 Fab in the presence of TSA, pH 6.0, 37 °C.

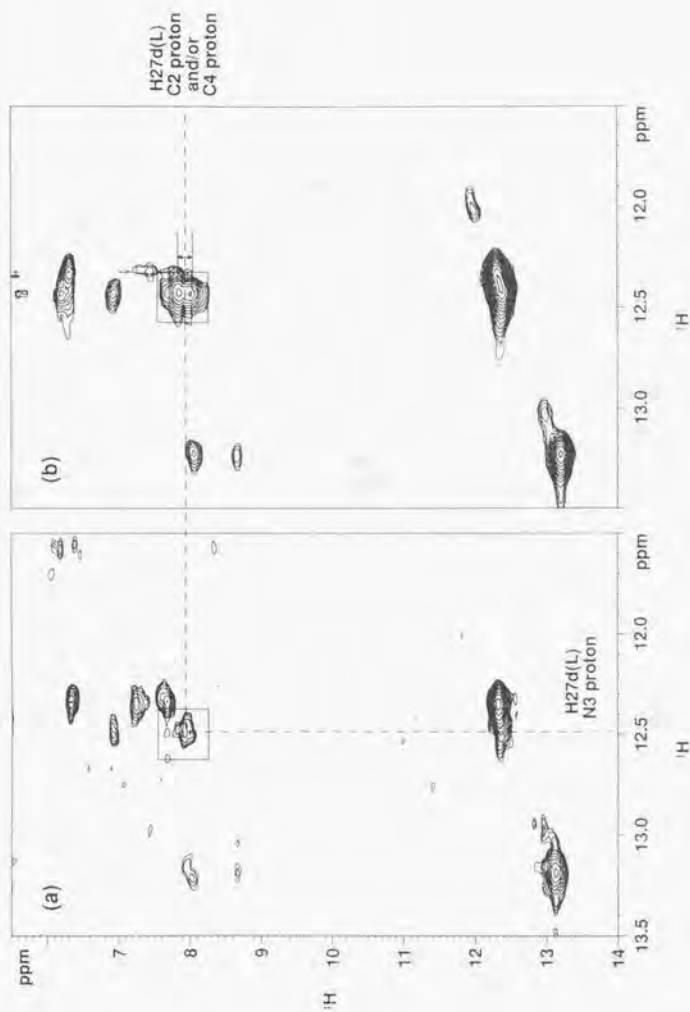


Fig. 5. (a)  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY spectra of  $[\text{p (DQ) (N-His) 6D9-Fab}]$  in the presence of TSA at pH 6.0, 10°C. (a) with  $^{13}\text{C}$  decoupling. (b) without  $^{13}\text{C}$  decoupling.

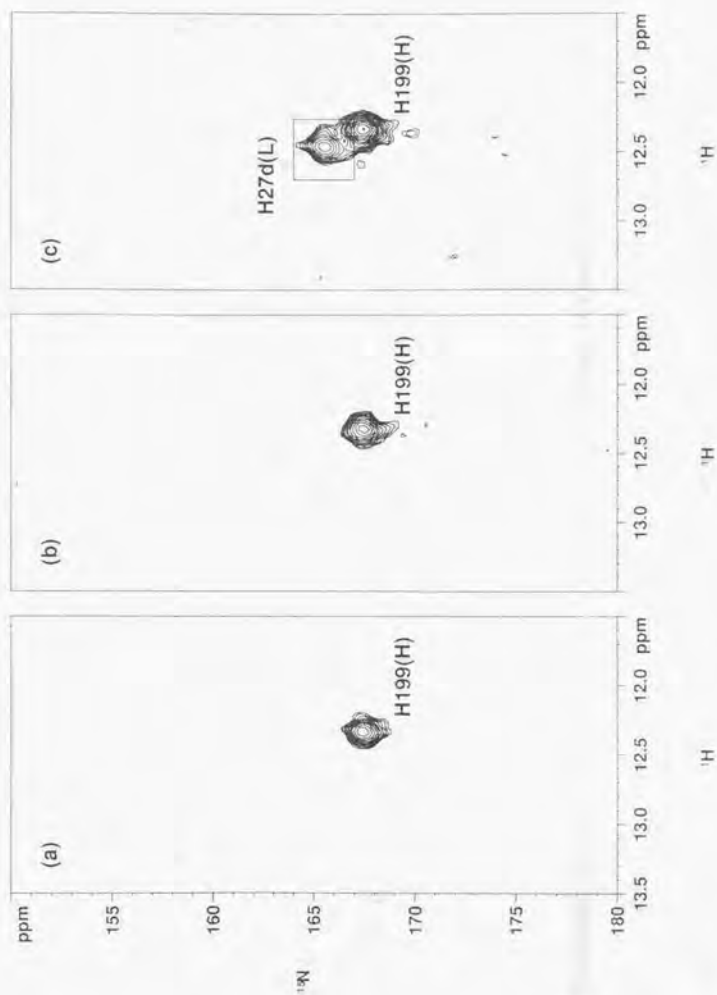


Fig. 5.20  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMQC spectra of  $[6-^{15}\text{N}]$ -His16D9-Fab6 at pH 6.0, 40 °C.  
(a) free; (b) +solitaire; (c) +TSA.

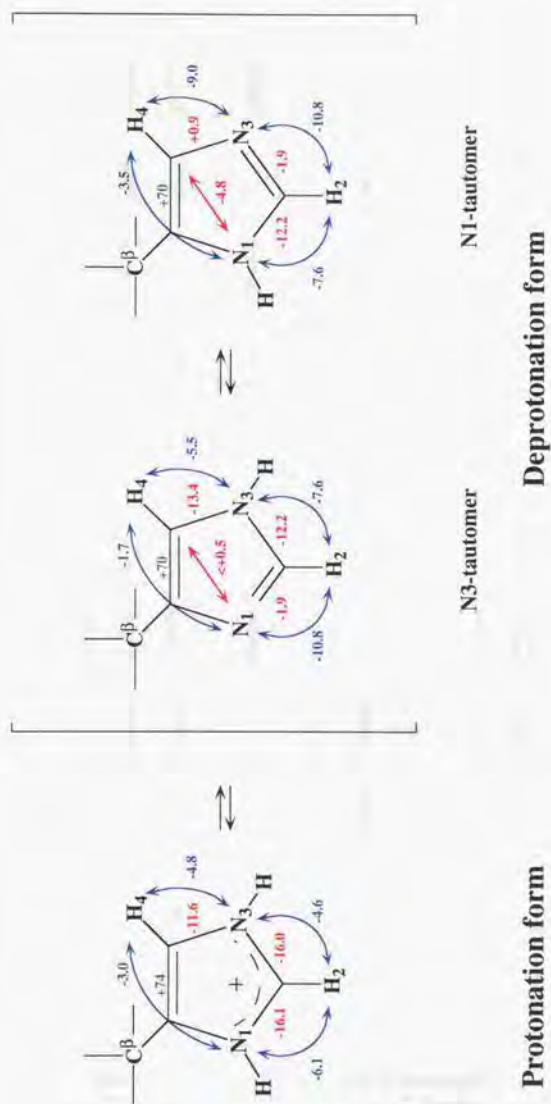


Fig.5-21  $^1J_{C2-N1}$ ,  $^1J_{C2-N3}$ ,  $^1J_{C4-N1}$ ,  $^1J_{C4-N3}$ ,  $^2J_{N1-H1}$ ,  $^2J_{N1-H2}$ ,  $^2J_{N1-H3}$ ,  $^2J_{N1-H4}$ ,  $^2J_{N3-H1}$ ,  $^2J_{N3-H2}$ ,  $^2J_{N3-H3}$ ,  $^2J_{N3-H4}$ ,  $^2J_{C4-N1}$  and  $^2J_{C4-N3}$  values of protonation state and each tautomeric state from literatures<sup>(9,20)</sup>.



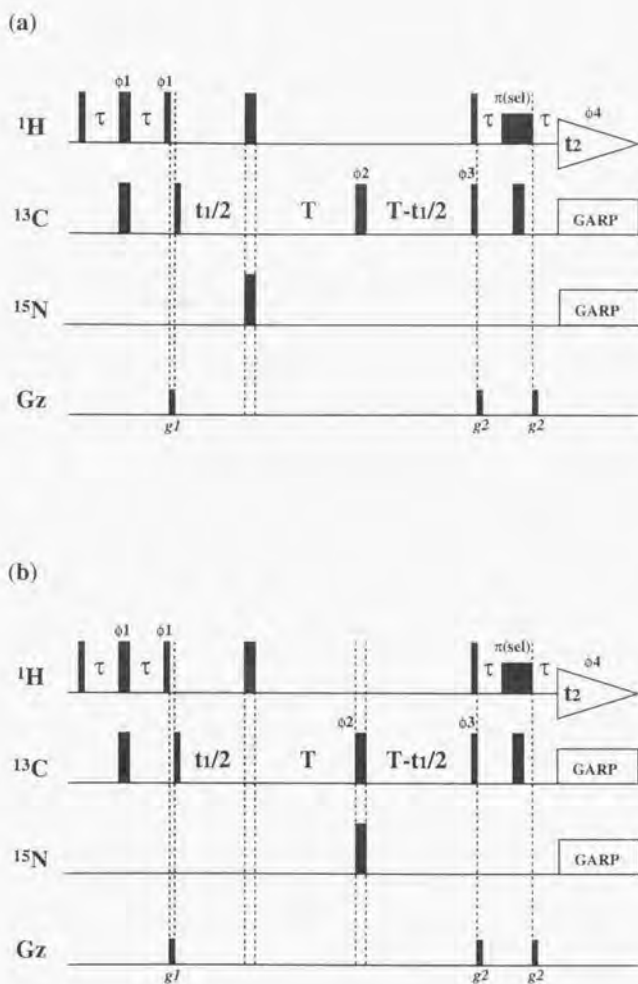


Fig. 5-22 Pulse sequences for the  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  CT-HSQC experiments.

Phase cycling :  $\phi 1 = y, -y, \phi 2 = 2(y), 2(-y), 2(-x), 2(x)$ .

$\phi 3 = 8(x), 8(-x), \phi 4 = 2(x, -x), 4(-x, x), 2(x, -x)$ .

(a) without  $J_{\text{C-N}}$  amplitude modulation, (b) with  $J_{\text{C-N}}$  amplitude modulation.

2T (ms)	14.3	28.6	42.9	57.2
N3-tautomer	0.82	0.36	-0.23	-0.74
N1-tautomer	0.98	0.91	0.80	0.65

Table S-4 Calculated intensity ratio  $I/I^0$  of the cross-peaks obtained in the  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CT-HSQC experiments with and without  $J_{\text{C-N}}$  amplitude modulation, with variable constant-time delay.

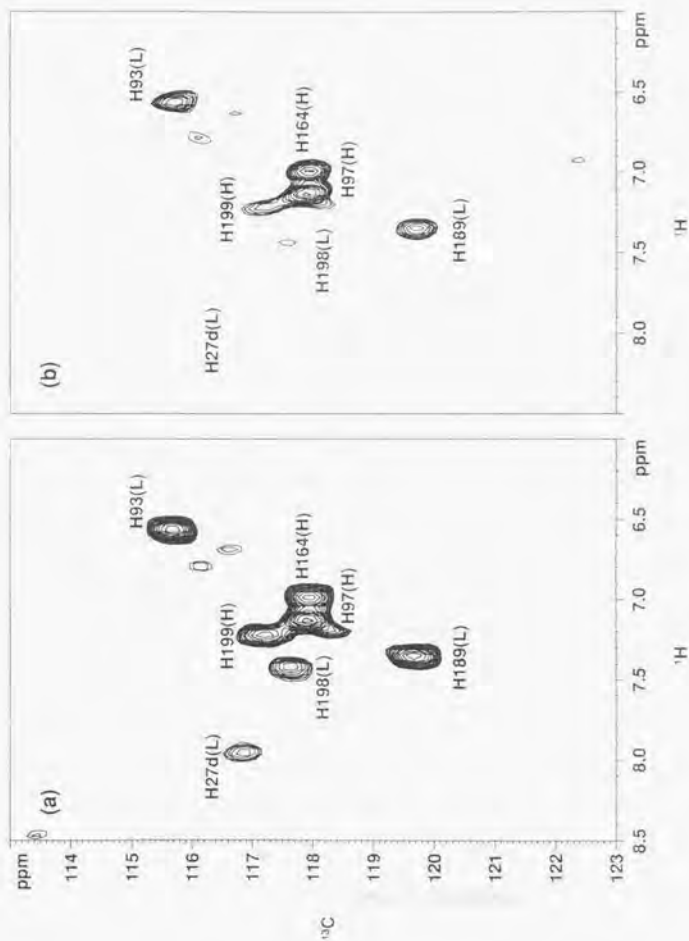


Fig. 5.23  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CT-HSQC spectra of [11- $^{13}\text{C}$ ]-N-His (dD<sub>2</sub>O) in the presence of TSA.  $2T = 28.6$  ms, pH 6.0,  $45^\circ\text{C}$ . (a) without  $T_{2s}$  amplitude modulation; (b) with  $T_{2s}$  amplitude modulation.

residue	$I/I^0$	major state
H27d(L)	$0.27 \pm 0.13$	N3-tautomer
H93(L)	$0.52 \pm 0.02$	N3-tautomer
H198(L)	$0.57 \pm 0.05$	N3-tautomer
H199(H)	$0.44 \pm 0.03$	N3-tautomer

Table 5-5 Values of  $I/I^0$  for the histidine residues in 6D9-Fab

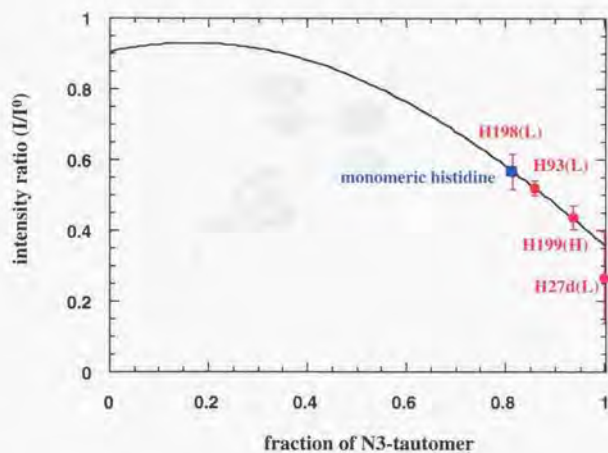


Fig.5-24 シグナル強度比( $I/I^0$ )とN3互変体の比率の関係。  
実線については、既知のカップリング定数から計算した。

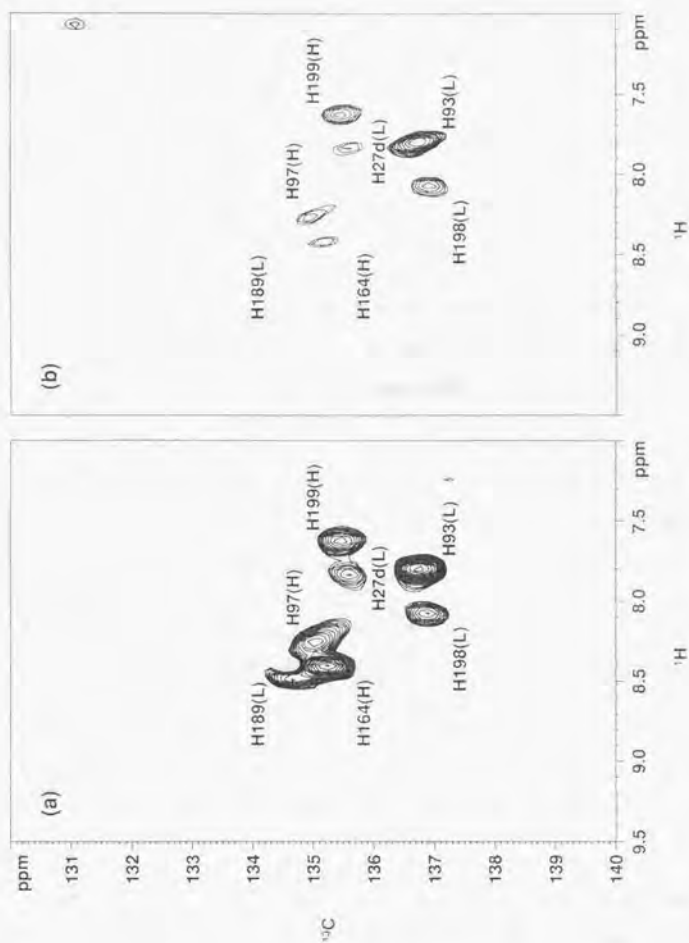


Fig. 5.25  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HMQC NMR spectra of  $[\mu\text{-}^{12}\text{C}_6\text{H}_6]^{2+}$  in the presence of TSA,  $\Delta T = 28.6$  ms, pH 6.0,  $45^\circ\text{C}$ . (a) without  $1_s$  amplitude modulation; (b) with  $1_s$  amplitude modulation.

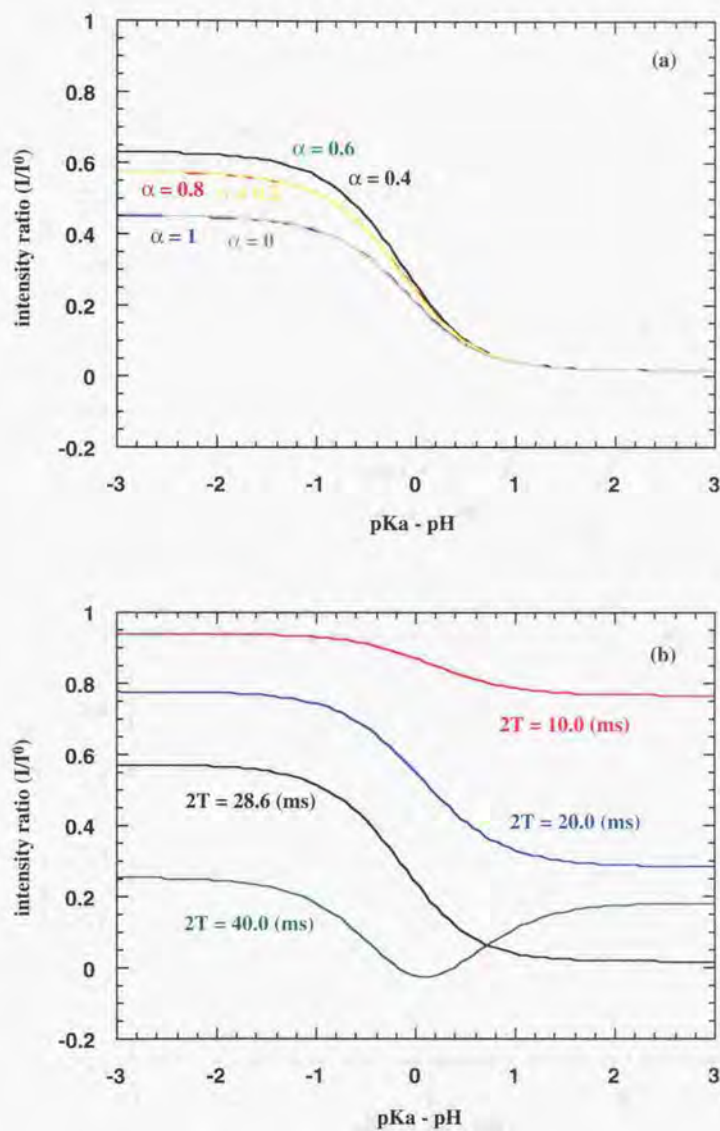


Fig.5-26 シグナ強度比( $I/I^0$ )と $[pK_a - pH]$ の関係.

(a) N3 互変体の存在比( $\alpha = 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1$ ) ごとに計算した理論曲線. ただし,  $T = 28.6$  (ms).  
 (b) 各  $2T$  ( $= 10.0, 20.0, 28.6, 40.0$  (ms)) ごとに計算した理論曲線. ただし,  $\alpha = 0.8$ .

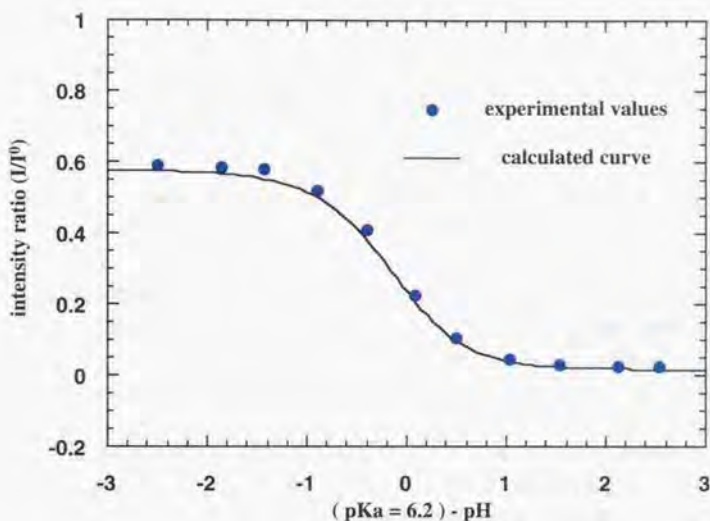


Fig.27 monomeric histidine における  $I/I^0$  値と  $[pKa - pH]$  の関係。  
各 pH における  $I/I^0$  値を  $[pKa - pH]$  に対してプロットした。また、既知のカップリング定数から計算した理論曲線を実線で示した。ただし、 $\alpha = 0.8$  とした。； 30 °C、 $pKa = 6.2$ 。

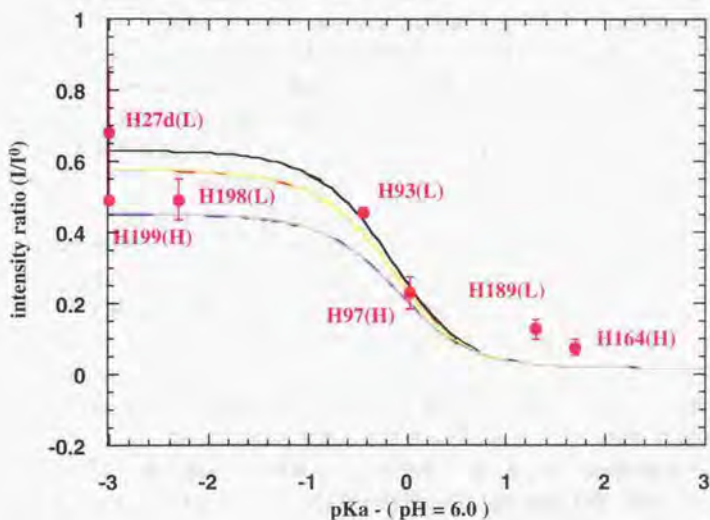


Fig.28 6D9-Fab における  $I/I^0$  値と  $[pKa - pH]$  の関係。  
各 His 残基における  $I/I^0$  値を  $[pKa - pH]$  に対してプロットした。ただし、His27d(L)、His199(H) の  $pKa$  については、 $\sim 3.0$  と仮定した。また、既知のカップリング定数から計算した理論曲線を実線で示した (Fig.5-26(a) 参照)。；  $pH = 6.0$ 。

## 5-5. 考察

substrate または TSA 添加に伴って化学シフトが変化する主鎖アミド NH シグナルを帰属することにより、substrate 結合部位と TSA 結合部位がともに  $V_H$ ,  $V_L$  ドメインの界面に位置すること、His27d(L)が substrate 結合部位と TSA 結合部位を形成する残基に含まれていることが明らかになった。さらに、主鎖アミド NH シグナルを指標にして substrate 複合体と TSA 複合体において異なる高次構造をとっている部位を探索したところ、substrate 存在下における His97(H), Tyr100j(H), Tyr32(L)には構造多形性が存在しているが、TSA 存在下ではその構造多形性が消失していることが明らかになった。また、同様な現象は、Phe91(H)または Phe100k(H)についても見られた。以上の結果より、substrate 存在下においては H3 ループを中心に構造多形性が存在しているが、TSA 存在下では消失することが判明した。構造多形性が消失することは、エントロピー的には結合の推進力にならないが、水素結合、静電相互作用、ファンデアワールス相互作用などの形成を促す。したがって、TSA 存在下において H3 ループを中心とした領域には、substrate 存在下においては見られない相互作用が形成されていると考えられる。

続いて、6D9 の His27d(L)を Ala へと置換した部位特異変異体では TSA 結合能が大きく低下し触媒活性が失われることが報告されていたので、substrate 存在下と TSA 存在下における His27d(L)の相互作用様式について解析を行った。まず、His27d(L)のアミド窒素シグナルの pH 依存性を解析したところ、substrate 存在下における pKa についてはハブテン非存在下のものとほぼ同じ値を示したのに対し、TSA 存在下では pKa が大きく低下することが明らかになり、substrate 存在下と TSA 存在下において His27d(L)が異なる相互作用様式をとることが示唆された。そこで、His 残基の側鎖イミダゾール環の窒素を  $^{15}\text{N}$  標識した Fab を調製し His27d(L)の側鎖 NH シグナルの検出を試みたところ、substrate 存在下においては観測されなかったが、TSA 存在下では観測され、TSA 存在下における His27d(L)の側鎖 NH が substrate 存在下に比べて強固な水素結合を形成していることが明らかになった。さらに、TSA 存在下において His 残基の互変異性を解析した結果、His27d(L)については N3 互変体に平衡が偏っていることが判明した。したがって、TSA 存在下において His27d(L)のイミダゾール環は N3 互変体に平衡が偏り水素結合を形成することが明らかになった。

以上、NMR を用いて 6D9 の抗原結合部位を解析した結果、H3 ループの構造多形性が消失したり、His27d(L)が水素結合を形成することによって、6D9 が substrate に比べて TSA と高い親和性を獲得することが明らかになった。substrate 存在下と TSA 存在下における His27d(L)の pKa 値の比較から、substrate から TSA にリガンドが変わることによって形成される His27d(L)の水素結合エネルギーを 2.6 (kcal/mol)と見積もったが、これは His27d(L)を中心とした相互作用ネットワークの形成を反映した値である。したがって、His27d(L)の水素結合形成と H3 ループ



の構造多形性の消失については、相補的な関係にある可能性も高いが、少なくともこの2つの事象により substrate と TSA の結合エネルギー差 ( $\sim 4.0$  kcal/mol) の大半を説明できることがわかる。以上、substrate 複合体と TSA 複合体を比較検討した結果から、H3 ループの構造多形性が消失したり His27d(L) が水素結合を形成することにより、遷移状態が安定化され触媒活性が発現されと考えられる。

NMR を用いた 6D9 の抗原結合部位の高次構造解析より、触媒活性改良に向けた二つの道筋が考えられる。一つは、substrate 存在下と TSA 存在下において NMR スペクトルに違いが現われた部位以外を無作為的に変異した抗体を作製する方法である。6D9 において見られたように、substrate と TSA を識別している部位は、NMR スペクトル上に鋭敏に反映される。これらは触媒活性に重要な部位であるため、変異させると現有の触媒能が低下してしまう恐れがある。しかしながら、それ以外の部位は現有の触媒能とほとんど無関係であるから、変異によって触媒能が低下する危険性はなく、触媒能を向上させる機能のみが付加される可能性がある。6D9 については、H3 ループ (His97(H), Tyr100j(H) など) と H1 ループ (His27d(L), Tyr32(L) など) が substrate と TSA の識別に重要な部位であるため、抗原結合部位を形成するその他のループ (H1、H2、L2、L3) の残基を無作為的に変異させる。これによって、四面体中間体の安定化という機能を損なわずに、水酸化物イオンの求核性の向上やアルコールの脱離のしやすさなどの機能が付加される可能性があると考えている。もう一つは、三次元構造を参考にして、より強く TSA を認識できるようにしたり、その他の機能を付加させる方法である。6D9 については、substrate 複合体 (または、substrate analogue 複合体) や TSA 複合体の三次元構造を X線結晶構造解析によって明らかにするため具体的な示すことができないが、このときに His27d(L) の互変体に関する知見等は役立つと考えられる。

## 5-6. 結論

NMR を用いて触媒抗体 6D9 の抗原結合部位を解析することにより、substrate 存在下における H3 ループを中心とした構造多形性が TSA 存在下において消失することを示した。また、TSA 存在下において His27d(L) のイミダゾール環が N3 互変体を取り水素結合を形成することを明らかにした。したがって、6D9 は H3 ループを中心とした構造多形性や His27d(L) の水素結合によって substrate と TSA の認識に差を生み出していると結論した。以上の結果より、H3 ループを中心とした構造多形性が消失したり His27d(L) が水素結合を形成すると、遷移状態が安定化され触媒活性が発現されと考えられる。

## 第6章 総括

本研究では、NMR を用いて抗 DNS-Fv と触媒抗体 6D9 の抗原結合部位の高次構造解析を行った。抗体の高次構造解析には X 線結晶構造解析法が用いられることが多いが、NMR 法によって新たに得られる情報も多々存在する。そのため、抗 DNS-Fv や触媒抗体 6D9 をそれぞれ一つのモデルケースと考え、NMR 法によってのみ得られる高次構造情報の抽出に心がけながら研究を進めた。

抗 DNS 抗体については、 $C_H1$  ドメインが欠落した変異体のクロストリパイン消化によって抗原結合の最小単位である Fv フラグメントを作製することが可能であり、抗体の中でも特に NMR 解析に適した系と考えられる。さらに、エピトープが DNS 基であるため、蛍光検出など、NMR 以外の分析手法も適用可能であることも有利な点として挙げられる。本研究では、NMR とストップフロー法を用いて抗 DNS-Fv の動的立体構造解析を行い、その結果、抗原結合部位に 2 つのコンフォメーションが存在し、そのうち一方に DNS-Lys が結合することを明らかにすることができた。今まで NMR を用いて観測される動的構造情報は時間域に限られていたが、ストップフロー法を併用することにより結合活性との相関を明らかにできることを見出した。さらに、各コンフォマーの高次構造情報については、残基間 NOE ピークを観測することにより抽出することに成功した。ただし、各コンフォマーの立体構造を決定するためには、さらに NOE 情報を増やしたりカップリングから角度情報を得る必要があり、今後の課題と考えている。

また、抗 DNS-Fv の抗原結合部位に存在する 2 つのコンフォマーのうち DNS-Lys と結合できない方については、他の抗原を認識する可能性があると考え、抗体の抗原認識の多様性を補うために抗原結合部位に構造多形性が存在していると考察した。この点に関しては、NMR やストップフロー法を同様に用いて、DNS-Lys と結合できないコンフォマーに対するリガンドを見つけ、抗 DNS 抗体の多機能性を証明する必要があると考えている。また、他のさまざまな種類の抗体についても構造多形性が存在していることを示したり、本研究において着目したミリ秒オーダー以外の時間域の動的構造が抗原認識に及ぼす影響についても解析することが望ましい。

本研究で用いたアプローチ方法については、 $\mu\text{s} \sim \text{ms}$  より遅い運動性と結合活性の関係を解析するときには適切な手段だが、それよりも速い運動性に関しては適用できないという問題点を抱えている。 $\mu\text{s} \sim \text{ms}$  より速い運動性が存在している場合、各コンフォマー由来の NMR シグナルは平均化し一つのシグナルとして観測されるため、各コンフォマーに関する情報を分離することができない。また、ストップフロー法においても、サンプリング速度に関して装置に限界があるため、 $\mu\text{s} \sim \text{ms}$  より速い運動性の存在は多相性の緩和過程として観測されないことなどが理由として挙げられる。NMR 装置の高磁場化やストップフロー装置の改良

によって若干の改善を期待できるが、ns 以下の速い運動性については他のアプローチ方法の開発が望まれる。

触媒抗体 6D9 については、substrate 結合能と TSA 結合能の差によって触媒活性を説明できるため、高次構造情報を触媒活性に結びつけやすい系であることが利点として挙げられる。本研究では、(1) substrate 存在下では H3 ループを中心に構造多形性が存在しているが、TSA 存在下では消失すること、(2) TSA 存在下における His27d(L)は、substrate 存在下にくらべて強固な水素結合を形成していること、を明らかにすることができた。また、構造多形性を検出するための測定法や His 残基の互変体を決定するための測定法を確立した他、NMR を用いた解析戦略を示すことができた。今後、この知見を参考にして、より活性が高い部位特異変異体が作製されたり、NMR を用いることにより他の触媒抗体についても有用な知見が得られていくことを期待する。

6D9 の触媒機構については、H3 ループを中心とした構造多形性の変化や His27d(L)による水素結合形成が、遷移状態の安定化に有利に働いていると考えられる。このように、活性発現に重要な部位を探索し、その寄与について言及することができるのは、6D9 については遷移状態の安定化エネルギーを TSA の結合エネルギーに置き換えて考えられることによる。NMR の適用範囲をさらに広げていくためには、活性発現機構がより複雑な、触媒抗体を含めた酵素を用いて、さらにアプローチ方法を充実させていく必要がある。

また、望んだ化学反応に対して高い活性をもった触媒抗体を作製するためには、どのようなハブテンを用いれば良いのか。この問題点を克服しなければ、触媒抗体の実用性・汎用性を高めることはできない。今までは、目的とする反応の中間体（遷移状態）のみが着目されハブテンがデザインされてきたが、今後は、抗体の抗原結合部位の特徴（canonical structure や柔軟性など）なども考慮しながらデザインする必要があると考えている。そのためにも、さまざまな化学反応に対する触媒抗体の抗原結合部位が解析され、知見が蓄積されていくことが期待される。その際には、X 線結晶構造解析のみならず、NMR も有効な手段として用いることができるであろう。

タンパク質や核酸などの三次元構造が解き明かされ、機能解析や創薬に役立った例がいくつも報告されているが、静的な構造からだけでは不十分な点も多く、動的立体構造に関する研究への期待は大きい。しかし、得られた動的構造情報を機能と結び付けるのは難しく、創薬への応用にはさらにいくつものハードルを越えなくてはならない状態である。そこで、今後は、動的構造に関する知見を蓄積していくことだけにとどまらず、その情報を参考にしてより有用な「もの」を作製したり、それを作製するための道筋を確立していく必要があると考えている。

## 参考文献

### 第1章

- 1) Tonegawa, S. *Nature* **302**, 575 (1983).
- 2) Kohler, G. & Milstein, C. *Nature* **256**, 495 (1975).
- 3) Gelfand, I. M. & Kister, A. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 10884 (1995).
- 4) Chothia, C. & Lesk, A. M. *J. Mol. Biol.* **196**, 901 (1987).
- 5) Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., Colman, P. M., Spinelli, S., Alzari, P. M. & Poljak, R. J. *Nature* **342**, 877 (1989).
- 6) Chothia, C., Lesk, A. M., Gherardi, E., Tomlinson, I. M., Walter, G., Marks, J. D., Llewelyn, M. B. & Winter, G. *J. Mol. Biol.* **227**, 799 (1992).
- 7) Tomlinson, I. M., Cox, J. P. L., Gherardi, E., Lesk, A. M. & Chothia, C. *EMBO J.* **14**, 4628 (1995).
- 8) Tramontano, A., Janda, K. D. & Lerner, R. A. *Science* **234**, 1566 (1986).
- 9) Pollack, S. J., Jacobs, J. W. & Schultz, P. G. *Science* **234**, 1570 (1986).
- 10) Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. & Walker, J. E. *Nature* **370**, 621 (1994).
- 11) Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. & Yoshikawa, S. *Science* **269**, 1069 (1995).
- 12) Ernst, R. R., Bodenhausen, G. & Wokaun, A. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*, Oxford University Press (1987).
- 13) Wuthrich, K., *NMR of Proteins and Nucleic Acid*, John Wiley & Sons, New York (1986).
- 14) Kline, A. D., Braun, W. & Wuthrich, K. *J. Mol. Biol.* **204**, 675 (1988).
- 15) Ikura, M., Kay, L. E. & Bax, A. *Biochemistry* **29**, 4659 (1990).
- 16) Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Zhu, G., Klee, C. B. & Bax, A. *Science* **256**, 632 (1992).
- 17) Tjandra, N., Omichinski, J. G., Gronenborn, A. M., Clore, G. M. & Bax, A. *Nature Struct. Biol.* **4**, 732 (1997).
- 18) Lipari, G. & Szabo, A. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546 (1982).
- 19) Lipari, G. & Szabo, A. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4559 (1982).
- 20) Kay, L. E., Torchia, D. A. & Bax, A. *Biochemistry* **28**, 8972 (1989).
- 21) Clore, G. M., Driscoll, P. C., Wingfield, P. T. & Gronenborn, A. M. *Biochemistry* **29**, 7387 (1990).
- 22) Broadhurst, R. W., Hardman, C. H., Thomas, J. O. & Laue, E. D. *Biochemistry* **34**, 16608 (1995).
- 23) Peng, J. W. & Wagner, G. *J. Magn. Reson.* **98**, 308 (1992).

- 24) Ishima, R. & Nagayama, K. *Biochemistry* **34**, 3162 (1995).
- 25) Szyperski, T., Luginbuhl, P., Otting, G., Guntert, P. & Wuthrich, K. *J. Biomol. NMR* **3**, 151 (1993).
- 26) Akke, M. & Palmer, III, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 911 (1996).
- 27) Denisov, V. P. & Halle, B. *J. Mol. Biol.* **245**, 682 (1995).
- 28) Denisov, V. P. & Halle, B. *J. Mol. Biol.* **245**, 698 (1995).
- 29) Denisov, V. P., Halle, B., Peters, J. & Horlein, H. D. *Biochemistry* **34**, 9046 (1995).
- 30) Englander, S. W. & Kallenbach, N. R. *Q. Rev. Biophys.* **16**, 521 (1984).
- 31) Gryk, M. R., Finucane, M. D., Zheng, Z. & Jardetzky, O. *J. Mol. Biol.* **246**, 618 (1995).
- 32) Edmundson, A. B., Ely, K. R., Abola, E. E., Schiffer, M. & Panagiotopoulos, N. *Biochemistry* **14**, 3953 (1975).
- 33) Wilson, I. A. & Stanfield, R. L. *Current Opinion in Structural Biology* **3**, 113 (1993).
- 34) Wilson, I. A. & Stanfield, R. L. *Current Opinion in Structural Biology* **4**, 857 (1994).
- 35) Braden, B. C. & Poljak, R. J. *FASEB J.* **9**, 9 (1995).
- 36) Rini, J. M., Schulze-Gahmen, U. & Wilson, I. A. *Science* **255**, 959 (1992).
- 37) Arevalo, J. H., Taussig, M. J. & Wilson, I. A. *Nature* **365**, 859 (1993).
- 38) Bhat, T. N., Bentley, G. A., Boulot, G., Greene, M. L., Tello, D., Dall'Acqua, W., Souchon, H., Schwarz, F. P., Mariuzza, R. A. & Poljak, R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1089 (1994).
- 39) Kelly, R. F., O'Connell, M. P., Carter, P., Presta, L., Eigenbrot, C., Covarrubias, M., Snedecor, B., Bourell, J. H. & Vetterlein, D. *Biochemistry* **31**, 5434 (1992).
- 40) Foote, J. & Milstein, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10370 (1994).
- 41) Benkovic, S. J., Napper, A. D. & Lerner, R. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 5355 (1988).
- 42) Janda, K. D., Lerner, R. A. & Tramontano, A. *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 4835 (1988).
- 43) Braisted, A. C. & Schultz, P. G. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 7430 (1990).
- 44) Janjic, N. & Tramontano, A. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 9109 (1989).
- 45) Shokat, K. M., Leumann, C. J., Sugawara, R. & Schultz, P. G. *Nature* **338**, 269 (1989).
- 46) Thorn, S. N., Daniels, R. G., Auditor, M.-T. M. & Hilvert, D. *Nature* **373**, 228 (1995).
- 47) Kirby, A. J. *Acta Chemica Scandinavica* **50**, 203 (1996).
- 48) Haynes, M. R., Stura, E. A., Hilvert, D. & Wilson, I. A. *Science* **263**, 646 (1994).
- 49) Gigant, B., Charbonnier, J.-B., Eshhar, Z., Green, B. S. & Knossow, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7857 (1997).

## 第2章

- 1) Igarashi, T., Sato, M., Takio, K., Tanaka, T., Nakanishi, M. & Arata, Y. *Biochemistry* **29**, 5727 (1990).
- 2) 田中俊之 東京大学理学部修士論文 (1987)
- 3) Matthews, H. R., Matthews, K. S. & Opella, S. J. *Biochim. Biophys. Acta* **497**, 1 (1977). など
- 4) Takahashi, H., Igarashi, T., Shimada, I. & Arata, Y. *Biochemistry* **30**, 2840 (1991).
- 5) Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **71**, 4546 (1979).
- 6) Macura, S. & Ernst, R. R. *Mol. Phys.* **41**, 95 (1980).
- 7) Bax, A. & Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **63**, 207 (1985).
- 8) States, D. J., Haberkorn, R. A. & Ruben, D. J. *J. Magn. Reson.* **48**, 286 (1982).
- 9) Bodenhausen, G. & Ruben, D. J. *Chem. Phys. Lett.* **69**, 185 (1980).
- 10) Marion, D. & Wuthrich, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**, 967 (1983).
- 11) Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. & Bax, A. *J. Biomol. NMR* **6**, 277 (1995).

## 第3章

- 1) Takahashi, H., Igarashi, T., Shimada, I. & Arata, Y. *Biochemistry* **30**, 2840 (1991).
- 2) 高橋栄夫 東京大学薬学部博士論文 (1993)
- 3) Takahashi, H., Suzuki, E., Shimada, I. & Arata, Y. *Biochemistry* **31**, 2464 (1992).
- 4) Takahashi, H., Odaka, A., Kawaminami, S., Matsunaga, C., Kato, Koichi., Shimada, I. & Arata, Y. *Biochemistry* **30**, 6611 (1991).
- 5) Odaka, A., Kim, J. I., Takahashi, H., Shimada, I. & Arata, Y. *Biochemistry* **31**, 10686 (1992).
- 6) 榎葉信久 東京大学薬学部修士論文 (1995)
- 7) Lipari, G. & Szabo, A. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4546 (1982).
- 8) Lipari, G. & Szabo, A. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 4559 (1982).
- 9) Kay, L. E., Torchia, D. A. & Bax, A. *Biochemistry* **28**, 8972 (1989).
- 10) Clore, G. M., Driscoll, P. C., Wingfield, P. T. & Gronenborn, A. M. *Biochemistry* **29**, 7387 (1990).
- 11) Szyperski, T., Luginbuhl, P., Otting, G., Guntert, P. & Wuthrich, K. *J. Biomol. NMR* **3**, 151 (1993).
- 12) Akke, M. & Palmer, III, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 911 (1996).
- 13) Peng, J. W. & Wagner, G. *J. Magn. Reson.* **98**, 308 (1992).
- 14) Ishima, R. & Nagayama, K. *Biochemistry* **34**, 3162 (1995).

- 15) Torda, A. E., Scheek, R. M. & Gunsteren, W. F. *J. Mol. Biol.* **214**, 223 (1990).
- 16) Tolman, J. R., Flanagan, J. M., Kennedy, M. A. & Prestegard, J. H. *Nature Struct. Biol.* **4**, 292 (1997).
- 17) Bothner-By, A. A., Stephens, R. L., Lee, J., Warren, C. D. & Jeanloz, R. W. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 811 (1984).
- 18) Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. *J. Chem. Phys.* **71**, 4546 (1979).
- 19) Falzone, C. J., Wright, P. E. & Benkovic, S. J. *Biochemistry* **33**, 439 (1994).
- 20) Bundi, A. & Wuthrich, K. *Biopolymers* **18**, 285 (1979).
- 21) Glasstone, S., Laidler, K. J. & Eyring, H. *In the Theory of Rate Process*. McGraw-Hill Book Co., New York and London (1941).
- 22) Shimba, N., Torigoe, H., Takahashi, H., Masuda, K., Shimada, I., Arata, Y. & Sarai, A. *FEBS Letters* **360**, 247 (1995).
- 23) Bedzyk, W. D., Johnson, L. S., Riordan, G. S. & Voss, E. W., Jr. *J. Biol. Chem.* **264**, 1565 (1989).
- 24) Herron, J. N., He, X.-m., Mason, M. L., Voss, E. W., Jr. & Edmundson, A. B. *Proteins* **5**, 271 (1989).
- 25) Arevalo, J. H., Taussig, M. J. & Wilson, I. A. *Nature* **365**, 859 (1993).
- 26) Foote, J. & Milstein, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 10370 (1994).
- 27) 廣海啓太郎, 酵素反応解析の実際, 講談社, (1978)
- 28) 廣海啓太郎, 酵素反応, 岩波書店, (1991)

#### 第4章

- 1) 加藤晃一 東京大学薬学部博士論文 (1991)
- 2) Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R. & Saudek, V. *J. Magn. Reson. Series A* **102**, 241 (1993).
- 3) Piotto, M., Saudek, V. & Sklenar, V. *J. Biomol. NMR* **2**, 661 (1992).
- 4) Grzesiek, S. & Bax, A. *J. Magn. Reson.* **96**, 432 (1992).
- 5) Bax, A., Ikura, M., Kay, L. E., Torchia, D. A. & Tschudin, R. *J. Magn. Reson.* **86**, 304 (1990).
- 6) Sklenar, V. & Bax, A. *J. Magn. Reson.* **74**, 469 (1987).
- 7) Bax, A. & Davis, D. G. *J. Magn. Reson.* **65**, 355 (1985).

#### 第5章

- 1) Miyashita, H., Karaki, Y., Kikuchi, M. & Fujii, I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 5337 (1993).



- 2) Miyashita, H., Hara, T., Tanimura, R., Tanaka, F., Kikuchi, M. & Fujii, I. *Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 6045 (1994).
- 3) Fujii, I., Tanaka, F., Miyashita, H., Tanimura, R. & Kinoshita, K. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6199 (1995).
- 4) Lienhard, G. E. *Science* **180**, 149 (1973).
- 5) Miyashita, H., Hara, T., Tanimura, R., Fukuyama, S., Cagnon, C., Kohara, A. & Fujii, I. *J. Mol. Biol.* **267**, 1247 (1997).
- 6) Zuiderweg, E. R. P. *J. Magn. Reson.* **89**, 533 (1990).
- 7) Kainosho, M. & Tsuji, T. *Biochemistry* **21**, 6273 (1982).
- 8) Ikura, M., Kay, L. E. & Bax, A. *Biochemistry* **29**, 4659 (1990).
- 9) Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R. & Saudek, V. *J. Magn. Reson. Series A* **102**, 241 (1993).
- 10) Sudmeier, J. L., Ash, E. L., Gunther, U. L., Luo, X., Bullock, P. A. & Bachovchin, W. W. *J. Magn. Reson. Series B* **113**, 236 (1996).
- 11) Reynolds, W. F., Peat, I. R., Freedman, M. H. & Lyster, J. R., Jr. *J. Am. Chem. Soc.* **95**, 328 (1973).
- 12) Pelton, J. G., Torchia, D. A., Meadow, N. D. & Roseman, S. *Protein Sci.* **2**, 543.
- 13) Bax, A., Griffey, R. H. & Hawkins, B. L. *J. Magn. Reson.* **55**, 301 (1983).
- 14) Van Dijk, A. A., Scheek, R. M., Dijkstra, K., Wolters, G. K. & Robillard, G. T. *Biochemistry* **31**, 9063 (1992).
- 15) Bax, A. & Summers, M. F. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2093 (1986).
- 16) Schmidt, J. M., Thuring, H., Werner, A., Ruterjans, H., Quaas, R. & Hahn, U. *Eur. J. Biochem.* **197**, 643 (1991).
- 17) Zuiderweg, E. R. P. *J. Magn. Reson.* **86**, 346 (1990).
- 18) Xia, B., Cheng, H., Skjeldal, L., Coghlan, V. M., Vickery, L. E. & Markley, J. L. *Biochemistry* **34**, 180 (1995).
- 19) Blomberg, F., Maurer, W. & Ruterjans, H. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 8149 (1977).
- 20) Alei, M., Jr., Morgan, L. O., Wageman, W. E. & Whaley, T. W. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 2881 (1980).
- 21) Vuister, G. W. & Bax, A. *J. Magn. Reson.* **98**, 428 (1992).
- 22) Huyghues-Despointes, B. M. P. & Baldwin, R. L. *Biochemistry* **36**, 1965 (1997).
- 23) Farr-Jones, S., Wong, W. Y. L., Gutheil, W. G. & Bachovchin, W. W. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 6813 (1993).



## 謝辞

本研究の機会を与えて下さり、常にやる気に満ち溢れるよう、温かい励ましと、御指導を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 嶋田一夫教授に心から深く感謝いたします。

研究全般から生活面まで、細やかな御指導を賜り、有益な御助言を頂きました、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 高橋栄夫博士に深く感謝いたします。

本研究で用いた触媒抗体の産生細胞ならびにそれに対するリガンドを御恵与下さった上、有益な討論をして頂きました、生物分子工学研究所 藤井郁雄博士、田中富士枝博士に深く感謝いたします。

抗 DNS-Fv の結晶構造の座標を使わせて下さった、東京大学大学院薬学系研究科 蛋白構造生物学教室 佐藤能雅教授に深く感謝いたします。

Bruker DMX600 での測定にあたり便宜をはかってくださった、味の素中央研究所 鈴木栄一郎博士、大竹亮子さんに深く感謝いたします。

本研究において共に実験を行い、ときには互いに励ましあった、東京大学大学院薬学系研究科 生命物理化学教室 坂倉正義さん、増茂正泰さんに深く感謝いたします。

6 年間の研究生活にわたって温かい御指導、御意見を頂いた、西村千秋博士、加藤晃一講師、金蔵一博士をはじめとする、生命物理化学教室の皆様感謝いたします。

長い研究生活の間、終始温かく励ましてくれた、家族、友人に心から感謝いたします。

最後になりましたが、研究に夢中になるきっかけを作ってください、終始温かい御指導を賜りました、東京大学名誉教授、現機能水研究所所長 荒田洋治先生に心より深く感謝申し上げます。

