

## 審査の結果の要旨

氏名 宮鍋 一紘

本論文は、序論、および五つの章から構成されている。序論では、抗原ペプチドが抗体結合前にとりうる配座アンサンブルのうちひとつを抗体が認識する可能性について言及している。この背景を踏まえた上で本論文では、抗原ペプチドの配座アンサンブルが抗体との相互作用に与える影響について、熱力学と構造化学の観点から原子レベルでの詳細な解析を行っていた。

第一章では、溶液中で天然変性状態にある CC ケモカインレセプター5 由来の抗原ペプチド pep1(DINYITSEP)に対する抗ペプチド抗体(IgG)の遺伝子配列を元に、一本鎖抗体(4B08HL)を設計した。さらに、一本鎖抗体を大腸菌封入体からの巻き戻しによって取得した。

第二章では、pep1 と 4B08HL との複合体の結晶構造解析の結果をもとに、複合体中で pep1 分子内に形成された分子内水素結合が相互作用においてどのような貢献を果たしているのかを、詳細に解析した。pep1 が複合体中で形成した 4 つの分子内水素結合に着目し、これらの水素結合の pep1 単独での形成を分子動力学計算で予測した。すると、興味深いことに 4 つの分子内水素結合の 1 つが、25 %前後の頻度で形成された。この分子内水素結合は、pep1 のトレオニン(T6)側鎖とグルタミン(E8)主鎖の間で形成され、4B08 のエピトープである pep1 の C 末端領域(TSEP の 4 アミノ酸)の配座を規定していた。さらに、アラニン置換によってこの分子内水素結合を喪失した変異体では、4B08 との親和性が pep1 のそれより著しく低下していた一方で、結晶構造解析によって得られた T6A の複合体構造は、分子内水素結合の喪失を除き野生型とほぼ完全に一致した。本章の結果は、従来ほとんど解析されてこなかった抗原ペプチド-抗体間相互作用における分子内水素結合の貢献を定量化するとともに、分子内水素結合によって規定された抗原ペプチドの構造が抗体から認識されるという、未知の抗原ペプチド認識機構を示唆するものであった。

第三章では、4B08HL と直接相互作用していなかった pep1 の 2 つのチロシン側鎖(Y4,Y5)の酸素原子に対して、主要な翻訳後修飾のひとつであるチロシン硫酸化を施すことで、複合体構造への影響を最小限にとどめつつ抗原ペプチドの

相互作用以前の構造に干渉することを試みた。つまり本章では、抗原ペプチドの硫酸化が相互作用以前の抗原配座を変化させることで抗体との相互作用にどのような影響を与えるのかを解析している。分子動力学計算の結果、硫酸基とペプチド N 末端側主鎖(DIN)の間に分子内水素結合が形成され、未修飾の pep1 と比べ N 末端側の主鎖のゆらぎが小さくなっていた。次に ITC で Sulfo-pep1 と 4B08 との相互作用を測定すると、pep1 と比べ不利なエントロピー変化が軽減され、親和性が 2 倍程度向上した。Sulfo-pep1 と 4B08 の複合体構造解析では、チロシン側鎖の配向が若干変化した他は野生型と共通の複合体構造であり、硫酸基は 4B08 と相互作用しなかった。本章の結果は、抗原ペプチド主鎖の配座変化をチロシン側鎖の硫酸化によって制限することで、抗体との親和性が向上することを示唆していた。また、抗体結合前の抗原配座の制限が抗体との相互作用に貢献する可能性を示していた。

第四章では、4B08HL と直接相互作用していなかった抗原ペプチドの N 末端側への蛋白質融合が抗体との相互作用に与える影響について解析した。pep1 を融合する蛋白質として、大腸菌で発現可能かつ水溶性の高い green fluorescent protein(GFP)を利用し、pep1 の N 末端に GFP を融合した GFP.NT を作成した。4B08 との相互作用を ITC で測定すると、興味深いことに GFP.NT は pep1 と比べ 4B08 との親和性が約 8 倍向上した。本章の結果は、pep1 の N 末端側の配座変化が蛋白質融合で制限され、4B08 との親和性が向上した可能性を示していた。

第五章は、本論文の総括である。本論文の一連の結果は、4B08 の結合が免疫時の pep1 の状態、すなわち N 末端側を蛋白質との融合によって、C 末端側を分子内水素結合によって配座を規定された状態、を選択的に認識するよう最適化されるという、従来明らかでなかった抗ペプチド抗体の配座選択型の抗原認識機構の存在を示唆している。さらに、本論文は抗原ペプチド単独の分子動力学計算を行うことで、抗原ペプチドの抗体結合時に観察された分子内水素結合の形成を予測していた。この発見は、与えられた抗原ペプチド配列が抗体結合時にとる構造を予測でき、その結果をもとに抗原ペプチドの選択や抗体の合理的設計が行えるという応用面での可能性も期待できる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。