

博士論文（要約）

Thermodynamic and structural analyses of the mechanism of
the antigen recognition by an anti-peptide antibody

(抗ペプチド抗体の抗原認識機構に関する熱力学・構造化学的解析)

宮鍋 一紘

序論、

蛋白質の天然変性領域は、一定の二次構造をとらないアミノ酸配列と定義され、しばしば他の構造蛋白質の認識標的となる。天然変性領域の認識機構は、天然変性領域を短鎖ペプチドで代替し、蛋白質との複合体の構造的特徴(ペプチドの二次構造、非共有結合など)を解析することで理解されてきた。それらの研究を基に、こうした天然変性領域と蛋白質との相互作用は、天然変性領域が相互作用時に構造化する、誘導適合型モデルで解釈されてきた。しかし近年、分子動力学計算による予測から、ペプチドの配座アンサンブルの中に一定の頻度で複合体構造が観察されるという報告がなされている。こうした報告例は、一定の構造をとった変性領域と構造蛋白質が選択的に結合する、配座選択型の分子認識機構の存在を示唆している。

抗原ペプチド-抗体間相互作用は、抗原配列に対し抗体側のみが最適化されその相互作用を成熟(親和性向上)させる点で、他の天然変性領域と構造蛋白質との相互作用と異なり、分子進化の観点から極めて興味深い研究対象である。一様な構造のない抗原に対し抗体はどのように最適化されるのか。抗ペプチド抗体に関する報告の中で、一つの抗原ペプチドが異なる抗体上で類似した二次構造をとるという報告がなされており、抗体上での抗原構造の決定において何らかの法則性の存在が示唆されている。前述の、天然変性領域の認識における配座選択型相互作用の可能性と合わせて考えると、抗ペプチド抗体もまた抗原の配座アンサンブルの中の特定の構造を認識する可能性を想起させる。しかし、抗ペプチド抗体の分子認識の研究において、相互作用前後の抗原構造、特に抗原ペプチドの配座アンサンブルを抗体との相互作用に関連付けて詳細に議論した例は皆無である。そこで本研究では、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た。

第一章、抗ペプチド一本鎖抗体の調製、および相互作用解析

本研究の対象として、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(DINYYTSEP)を用いた。また、マウス由来の抗 pep1 抗体 (IgG)について、可変領域の重鎖と軽鎖をペプチドリンカーでつないだ一本鎖抗体 4B08 を設計した。一本鎖抗体は抗原と抗体との一対一の相互作用を解析でき、大腸菌で発現可能という利点がある。4B08 は大腸菌封入体からの巻き戻しで得られ、pep1 との複合体構造を結晶構造解析で決定した。

4B08 結合時の pep1 は、9 つの分子間水素結合と 4 つの分子内水素結合を形成することでその構造を安定化していた。分子間水素結合のうち 6 つは pep1 の C 末端領域(SEP)に偏在し、これらの側鎖は抗体との相互作用界面積も広いため、pep1 の C 末端側が 4B08 のエピトープと予想された。また、等温滴定型熱量測定(ITC)による解析の結果、pep1 と 4B08 との相互作用は大きな負のエンタルピー変化で駆動されており($\Delta H = -17.2$ kcal

/ mol)、分子内外の水素結合が相互作用の駆動力であると示唆された。一方、相互作用のエントロピー変化は不利であり($-T\Delta S = 8.6$ kcal / mol)、4B08 との相互作用に伴う pep1 の配座制限によるエントロピー損失の寄与が示唆された。

第二章、抗原ペプチドの分子内水素結合が抗体との相互作用に与える影響の解析

4B08 が配座認識型の相互作用を pep1 に対して行う場合、pep1 が複合体形成時に有する構造的特徴が、相互作用以前にも観察されうる。そこで、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)側鎖とグルタミン酸(E8)主鎖の間で形成され、4B08 のエピトープである pep1 の C 末端領域の配座を制限していた。そこで、T6 側鎖をアラニン置換し分子内水素結合を喪失した変異体 T6A(DINYYA~~S~~EP)で、4B08 との相互作用を解析した。すると、T6A では 4B08 との親和性が pep1 のそれより 27 倍程度低下し、負のエントロピー変化も大きく減少した($\Delta H = -8.2$ kcal / mol)。一方、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。

一連の結果から、pep1 の分子内水素結合は相互作用前後の配座を規定し、4B08 との相互作用に貢献することが示唆された。また、分子内水素結合で規定された pep1 の溶液中での配座と 4B08 との複合体中での pep1 の構造の相関から、抗ペプチド抗体による抗原認識における配座選択型の存在を強く示唆した。しかし、分子内水素結合の喪失は、相互作用前後の抗原配座両方に影響し、相互作用以前の pep1 の構造化がもたらした貢献の度合いは不明だった。そこで、次章以降で 4B08 との直接的な相互作用に寄与していない pep1 の部位に分子修飾を施し、pep1 の配座アンサンブル、および 4B08 との相互作用が受ける影響を解析した。

第三章、抗原ペプチドのチロシン硫酸化が抗体との相互作用に与える影響の解析

pep1 の 2 つのチロシン側鎖(Y4,Y5)の酸素原子は、ともに 4B08 と非共有結合を形成せず、相互作用界面から離れた配向をとっていた。そこで、チロシン側鎖に対する主要な翻訳後修飾である硫酸化を施し、Sulfo-pep1(DIN(Ys)(Ys)TSEP, Ys = 硫酸化チロシン)として 4B08 との相互作用を解析した。

Sulfo-pep1 の分子動力学計算では、野生型で 25 %程度形成された T6 側鎖の分子内水素結合が 16 %に低下していた。一方で、Ys5 の硫酸基と 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($-T\Delta S = 5.3$ kcal / mol)、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。なお、複合体形成時の Sulfo-pep1 N 末端側の配座は、硫酸基を介した分子内水素結合を組む溶液中の配座と大きく異なった。

以上の結果から、チロシン硫酸化は第二章で論じた相互作用以前における複合体構造の提示と異なり、硫酸基を介した分子内水素結合により抗原のゆらぎが減少して相互作用のエントロピー損を抑え、親和性を向上させていた。

第四章、抗原ペプチドへの蛋白質融合が抗体との相互作用に与える影響の解析

pep1 のマウス免疫時には、pep1 の N 末端側をキャリア蛋白質に融合していた。また、pep1 を免疫したことで得られた 4B08 は pep1 の C 末端側をエピトープとする抗体であった。そこで、抗体との相互作用に直接関与しない pep1 の N 末端に蛋白質を融合し、免疫時の抗原の状態を模倣した際に、4B08 との相互作用が受ける影響を解析した。pep1 を融合する蛋白質として、大腸菌で発現可能な green fluorescent protein を利用し、その C 末端に pep1 を融合した GFP.CT 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.CT は pep1 と比べ 4B08 との親和性が約 8 倍向上した。一方、GFP の N 末端に pep1 を融合した GFP.NT は pep1 と同程度の親和性であった。

以上の結果は、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。同時に、4B08 は蛋白質融合によって N 末端側の構造変化を制限された状態の pep1 と相互作用するよう最適化していた可能性を示している。

第五章、総括

本研究は、第一章で示した抗原ペプチド-抗体複合体の構造をもとに、第二章で分子内水素結合の役割に着目した。その結果、分子内水素結合により規定された配座が抗体結合時の抗原構造を定める上で重要な、抗体による抗原構造認識の要であることを示せた。また、第三章、第四章ではそれぞれ抗原の硫酸化と蛋白質融合によって、N 末端側の配座変化を制限し、抗体との親和性向上に成功している。一連の結果は、抗体の結合が免疫時の抗原の状態、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それぞれ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ていた可能性を示唆している。

本研究結果は、分子動力学計算により抗原ペプチドの構造変化を予測することで、複合体時の抗原構造も類推できることを示唆する。この知見を活かし、例えば抗蛋白質抗体の産生を誘起するペプチドワクチンを設計する場合、標的となる蛋白質配列をペプチドとして構造予測を行い、蛋白質の二次構造とより近い配座をとるものを採用する、といった戦略が可能である。