

平成21年 6月17日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17570096
 研究課題名（和文） 溶液中での自由度に着目した抗体の抗原認識機構と抗原結合に伴う構造変化の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of antigen recognition mechanism by antibody and conformational change of antibody upon antigen binding in correlation with protein fluctuation in solution
 研究代表者
 織田 昌幸（ODA MASAYUKI）
 京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授
 研究者番号：20318231

研究成果の概要：

いくつかの抗原抗体間相互作用系を対象として、溶液中での蛋白質の動的挙動が反映される熱力学量や速度論量を主な指標として、静的な構造情報を補完する一般側の導出や方法論有効性の検証を目指した。抗体の抗原認識は多種多様であり、その解析から分子認識の一般側が得られ、さらに複数の抗原結合部位の可動性を解析することで、抗原上の比較的小さな構造変化から大きな構造変化にいたる動的挙動に関する結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	1,700,000	0	1,700,000
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,600,000	360,000	3,960,000

研究分野：蛋白質科学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：生体分子、蛋白質、分析化学、免疫学

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は、親和性成熟過程にある抗4-hydroxy-3-nitrophenyl (NP) 抗体を対象にして、種々の蛋白質科学的アプローチにより、溶液中での抗体の柔らかさと機能との相関解析を進めていた。本研究開始時までには得られた成果の特記事項としては、抗原結合により抗体各部位に結合する蛋白質（ブドウ球菌由来のプロテインAや連鎖球菌由来のプロテインGなど）の結合状態に変化が生じることを見いだした (Oda et al., *Int. Immunol.* 15, 417, 2003)。これは既存の静的な構造解析だけでは明らかにできない抗体の動的な自由

度の変化を含む微小な構造変化を示唆する。このような構造変化の解明を進めることは、細胞内シグナル伝達における抗原受容体としての機能発現において、抗体のクロスリンクだけでは説明できない現象、例えば抗体の構造変化によるシグナル伝達機構の解明にもつながることが期待される。また本研究代表者らは抗体サブクラスの違いによる解析を進める中で、マウス IgG2a 抗体では Fc 部分だけでなく Fab 部分もプロテインAと結合することを見いだした (Sagawa et al., *Mol. Immunol.* 42, 9, 2005)。またハイブリドーマとして取得している親和性成熟各段階の抗 NP

抗体について、主に速度論的および熱力学的に抗原との相互作用解析を行い、抗体の抗原認識機構の変化を明らかにし、論文報告した (Oda and Azuma, *Mol. Immunol.* 37, 1111, 2000; Sagawa et al., *Mol. Immunol.* 39, 801, 2003; Tobita et al., *Mol. Immunol.* 40, 803, 2004)。これら親和性成熟過程はまさに生物進化過程であることから、得られた知見に基づき、高い抗原結合力を果たせるといったラショナルな抗原認識改変ルールの導出なども期待される。

2. 研究の目的

親和性成熟過程にある一連の抗 NP 抗体で得られた成果をさらに発展させることを前提に、他の抗体も含めて、詳細かつ広範に解析を進め、各抗体の抗原認識機構や抗原結合に伴う構造変化の違いや共通性、またそこから引き出される一般則の導出を目指した。特に抗原結合前後での、抗体分子の溶液中での自由度の変化に着目し、新たに開発された手法なども利用して解析を進め、蛋白質の構造生物学研究において、現在、特に重要な位置づけにある構造と機能との相関解明を目指した。その中で、以下の項目を主な研究目的とした。

(1) 抗 NP 抗体で認められた抗原結合に伴う抗体内の構造変化について、他の抗体でも同様の解析を進め、特に Fab 腕の可動性について、B 細胞受容体と同様な Fc 部分固定化の影響に着目しながら解析する。

(2) スクリプス研究所 Romesberg 博士らが最近報告したフォトンエコー分光法を親和性成熟過程にある抗体に適用し、その成熟過程と抗体自由度との相関や、さらには結合熱力学量との相関を解明する。

(3) 抗 NP 抗体で熱力学的に示唆されている「lock-and-key」型への成熟過程を、結晶構造から説明できるかを検証すべく、該当抗体と NP との複合体の結晶化、及び X 線結晶構造解析を行う。

(4) 抗 NP 抗体で特徴的に認められるヘテロクリンティ (NP 免疫で取得したモノクローナル抗体が他の NP 類似化合物に対してより強く結合する現象) に着目し、その抗原認識機構の解明を目指す。

(5) ハプテン価の異なる NP-HEL (NP-hen egg lysozyme) や NP-BSA (NP-bovine serum albumin) と、結合親和性の異なる、抗 NP 抗体との複合体形成について、抗体 Fc 部分固定化に伴う抗原抗体複合体への影響を解析し、各種物理化学的手法の有効性を検

証する。

(6) HEL と抗 HEL 抗体の分子間相互作用を対象に、立体構造が部分的、または動的挙動として変化した蛋白質抗原に対し、抗体がそれらを如何に識別するかを、速度論的に明らかにする。

(7) 抗原にある $-CF_3$ 基を $-CH_3$ 基に置換することで、抗体との結合時の熱力学的寄与が如何に変化するか、特にフッ素の置換効果を明らかにする。

3. 研究の方法

分子量の異なる蛋白質 (HEL, 14 kDa, Ovalbumin (OVA), 45 kDa, BSA, 66 kDa など)、及びそれらにハプテンとなる NP の数を変えて結合させたものを抗原として、さらに親和性の異なる抗 HEL 抗体 (IgG)、抗 OVA 抗体 (IgG)、抗 BSA 抗体 (IgG)、抗 NP 抗体 (IgG および IgM) を調製した。また抗体については、必要に応じてパパイン処理により Fab 化した。各抗原と抗体との分子間相互作用を、表面プラズモン共鳴バイオセンサー、等温滴定熱量計、超遠心分析計、質量分析計、電子顕微鏡など、各種物理化学的手法を用いて解析した。得られる結合の強さや、結合速度論量、結合熱力学量、結合比、抗原抗体複合体の大きさ、などに関する情報を総合的に評価し、さらに参考となる立体構造情報とも比較し、検討する。その他、関連して、HEL の部分的構造変化に伴う抗体の抗原認識解析のため、還元アルキル化 HEL の調製を行い、また抗原抗体間相互作用における $-CF_3 \rightarrow -CH_3$ の寄与を解析するため、対応する各抗原と抗体を準備し、分子間相互作用解析に供した。

4. 研究成果

* 下記、各番号は、前記、研究の目的欄に記載の各項目番号と対応する。

(1) 溶液中にある抗体は、少なくとも BSA 程度以下の大きさの抗原に対し、2 本の Fab 腕が結合に関与できる (抗原 : 抗体 = 2:1) のに対して、抗体の Fc 部分を固定化した状態では、HEL とは 2:1 で結合できるものの、OVA や BSA とは 1:1 でしか結合できないことが明らかになった。これは抗体 Fab 腕の可動範囲と密接に関連し、Fc 部分固定化の影響が、その可動性に影響することを示唆した。これは抗 NP 抗体で認められた抗原結合に伴う微小な構造変化、すなわち抗体 Fc 部分の構造情報が Fab 部分に伝達されることを示唆する。抗体の Fab 部と Fc 部間の構造情報伝達に関する結果は、細胞表面上で B 細胞受容体の架橋を伴わないシグナル伝達に果たす抗体の役割に結び付けられる。なお本成果

は、FEBS J., 273, 2006, 1476-1487にて、論文発表した。

(2) 抗体の自由度解析に応用しうるフォトンエコー分光法を米国スクリプス研究所にて学んだ。対象とした抗体は、親和性の異なるいくつかの抗 fluorescein 抗体 (IgG) で、各抗体と抗原との複合体のエコー測定を行うことで、その自由度の違いを解析した。また各抗体の抗原結合について、等温滴定熱量測定を行い、各結合のエントロピー変化量と、エコー測定により得られた自由度との間に、相関が認められた。傾向として、親和性成熟が進んだ抗体と抗原との複合体では、自由度が相対的に低下し、結合のエントロピー変化量は負に大きな値へ、この不利なエントロピー変化量を補償するよう増大したエンタルピー変化量で、高い結合力を得る抗体進化の過程が示唆された。なお本成果は、Biochemistry, 47, 2008, 7237-7247にて、論文発表した。

(3) 「lock-and-key」型への親和性成熟過程にある抗 NP 抗体の Fab と NP との複合体、計 4 種類の結晶化を試み、その 1 つについて、比較的良好な結晶が得られたので、その X 線解析実験を行った。その結果、分解能が 3Å 程度であり、さらなる高分解能の立体構造情報取得のため、より良質な結晶化条件を検討している。

(4) 抗 NP 抗体のヘテロクリシティ解明のため、親和性成熟過程にある 3 種類の抗体と 3 種類の抗原、NP、4-hydroxy-3-iodo-5-nitrophenyl (NIP)、4-hydroxy-3,5-dinitrophenyl (NNP) との各相互作用解析を、表面プラズモン共鳴バイオセンサーを用いて行った。各 pH 条件下での解析の結果、ヘテロクリシティによる分子認識の違いが、各抗原の水酸基の解離状態にも起因し、抗体が本質的にもつ認識の違いとあわせてヘテロクリティックとなることが明らかになった。水酸基がイオン化した phenolate form では、phenolic form より 100 倍程度、親和性が高く、既知の NP と抗 NP 抗体複合体の結晶構造上でその原因を解析すると、抗原結合部位にある、Arg 残基や Lys 残基が、塩結合に関与できるためと考えられた。また抗体が本質的にもつ認識の違いによるヘテロクリシティについては、NIP や NNP で付加されたヨード基やニトロ基が、抗原結合部位の芳香族残基と van der Waals 結合することで、親和性が相対的に高くなることが示唆された。なお本成果は、現在、論文投稿準備中である。

(5) 抗原としてハプテン価の異なる

NP-HEL や NP-BSA を用い、親和性の異なる各種抗 NP 抗体との分子間相互作用解析を行った。その結果、抗原のハプテン価や大きさ、抗体の単価抗原結合力 (affinity) と、抗体の多価結合力 (avidity) や形成される複合体の大きさの間に、相関関係が見出された。また上記 (1) の成果同様に、抗体 Fc 部分を固定化することで、抗原結合部となる Fab 部分が影響されることも明らかになった。さらに測定手法の有効性の検証としても、特に質量分析法と電子顕微鏡の適用例として着目したが、前者では分子間相互作用をマス値として良く検出できることが明らかとなり、また後者では複合体形成を比較的簡便に可視化できることを証明した。なお本成果は、現在、論文投稿中である。

(6) HEL の 4 本の S-S 結合全て、または Cys6-Cys127 のみを還元アルキル化し、HEL の立体構造を部分的に崩した 2 種類の還元アルキル化 HEL を調製した。なおこれまでの立体構造解析から、これら 2 種類のうち、前者は non-native 構造を、後者は native-like 構造を有することが知られている。各 HEL 抗原と 2 種類の抗 HEL 抗体との分子間相互作用解析を行った結果、全 S-S 結合を還元アルキル化した HEL に対し、native HEL に比べ、結合速度依存的な抗原結合親和性の低下が認められた。さらに Cys6-Cys127 還元アルキル化 HEL に対しても、1 つの抗体は同様の結合低下が認められ、同部位のエピトープ認識であること、また結晶構造ではほぼ同一であるような微細な構造の相違を抗体が見分けていることが示唆された。以上の結果は、抗体の抗原認識において、エピトープの native-format の存在確率が結合速度に反映されていると解釈できる。なお本成果は、現在、論文投稿中である。

(7) 抗原上の官能基として -CF₃ 基をもつ抗原抗体間相互作用を対象として、-CF₃ 基を -CH₃ 基に置換することで、結合熱力学量が如何に変化するかを、主に等温滴定熱量計を用いて解析した。その結果、-CF₃ 基をもつ抗原では、エンタルピー的には有利に、エントロピー的には不利に働くことが明らかになった。この要因を分子動力学計算により解析したところ、特に抗体との非結合時に、フッ素は水和結合に伴うエンタルピーが相対的に不安定化方向に働き、その結果、結合エンタルピー変化量が有利に働くと解釈できた。なお本成果は、J. Mol. Recognit., in pressにて、論文発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕（計 3 件）

- ① Oda, M., Uchiyama, S., Robinson, C.V., Fukui, K., Kobayashi, Y., and Azuma, T., Regional and segmental flexibility of antibodies in the interaction with antigens of different size., 査読有, FEBS J., 273, 2006, 1476-1487.
- ② Thielges, M.C., Zimmermann, J., Yu, W., Oda, M., and Romesberg, F.E. Exploring the energy landscape of antibody-antigen complexes: Protein dynamics, flexibility, and molecular recognition., 査読有, Biochemistry, 47, 2008, 7237-7247.
- ③ Oda, M., Saito, M., Tsumuraya, T, and Fujii, I., Contribution of the trifluoroacetyl group in the thermodynamics of antigen-antibody binding., 査読有, J. Mol. Recognit., in press.

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 北井 麻希、抗リゾチーム抗体の抗原認識能とエピトープ解析、日本生物高分子学会 2006 年度大会、2006 年 9 月 22 日、京都
- ② Maiko Koga、Interactions of antibodies with antigens of different sizes and valences、第 36 回日本免疫学会総会、2006 年 12 月 12 日、大阪
- ③ Aki Kitai、Molecular basis of antigen-antibody interaction critical for B-cell activation、第 37 回日本免疫学会総会、2007 年 11 月 20 日、東京
- ④ Maiko Koga、Direct observation of antigen-antibody complex: Effects of antigen size, valence, and binding affinity of antibody、第 45 回日本生物物理学会年会、2007 年 12 月 22 日、横浜
- ⑤ 織田 昌幸、触媒抗体 7C8 と 6D9 の基質認識の比較、第 44 回熱測定討論会、2008 年 10 月 17 日、つくば

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

織田 昌幸 (ODA MASAYUKI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：20318231

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし