

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570121

研究課題名（和文） 抗原・抗体間相互作用におけるタンパク質の動的構造変化の解明

研究課題名（英文） Elucidation of dynamic structural changes of protein antigens and antibodies in their interactions

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（和文）：

抗体は様々な分子を識別し、結合するタンパク質で、タンパク質の動的構造変化の解明に向けて、格好の研究対象と言える。本研究では、抗原タンパク質を化学修飾法やジスルフィド結合を欠損させることで、その構造を変化させ、この変化を抗体が如何に識別するかを、主に速度論的、及び熱力学的に解析した。その結果、タンパク質が溶液中で存在する複数の構造体、すなわち揺らぎの寄与を、数値として定量化することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Antibodies recognize various types of antigens, different shapes and sizes, and are good targets for the analysis to elucidate the structural dynamics of proteins. In this study, I changed the structures of protein antigens by chemical modification and disulfide-bond deletion, and analyzed how the antibodies could recognize the slight and dynamic differences in antigens using the methods of binding kinetics and thermodynamics. As a result, I could detect the plural states of protein antigens and antibodies in solution, and quantitatively determine the effects of protein fluctuations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：タンパク質科学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：分子認識、生体分子、タンパク質、分析化学、免疫学

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造機能解明において、タンパク質の溶液中での揺らぎの寄与の解明が重要な研究課題であり、揺らぎの検出系そのものの開発も重要課題であった。本研究代表

者は、Hen Egg Lysozyme (HEL)の Cys6 と Cys127 をカルボキシメチル化した CM^{6,127}-HEL が、結晶構造は native HEL とほぼ同じであるにもかかわらず、新規に取得した抗 HEL 抗体の1つが両者を識別し、

CM^{6,127}-HEL に対して結合速度依存的に結合力が低下することを見出した。これは、還元アルキル化により、HEL の揺らぎが増大し、抗体が認識する立体構造エピトープの存在確率が低下したことを示唆する。すなわち、抗原タンパク質の微小かつ動的な構造変化を、抗体が精緻に識別し、これを抗原抗体間相互作用の結合速度論量で、評価可能であることを示した。また結合速度論量以外でも、結合熱力学量が、タンパク質の揺らぎの寄与を反映すると考えられているが、これらが系統的、かつ定量的には十分評価されていなかった。一方、抗原抗体間相互作用解析において、抗体が認識する抗原の特定部位、すなわちエピトープを同定することが重要であるが、これが特に抗原タンパク質の立体構造に依存する構造依存性エピトープの場合、その決定は難しく、これまで抗原抗体複合体の立体構造解析から初めて明らかになることが多かった。本研究開始直前の 2009 年に、Hamuro らは、重水素交換法と質量分析の組み合わせで、構造依存性エピトープの決定に成功し、論文報告した。

2. 研究の目的

静的な立体構造情報では十分に得られないタンパク質の動的挙動や準安定構造を、抗体の抗原認識能力を利用して明らかにし、さらにその分子認識機構を速度論量や熱力学量として定量化する。本研究では、HEL や ovalbumin (OVA) の自由度を変え、さらに HEL や OVA を認識する一連の抗体を用いることで、各タンパク質の微小かつ動的な構造変化を、抗原抗体間相互作用から評価し、分子認識能に関する一般側の導出を目指す。構造変化を伴う結合について、他の分子間相互作用の知見とも照らし合わせ、「induced-fit」型と「population-shift」型を特徴付ける。また HEL や OVA が卵白中のアレルゲンとなることから、構造変化に伴う抗原性の変化にも着目し、溶液中で存在する構造特性を明らかにする。さらに抗原上のエピトープを、質量分析法を用いて簡便に決定できる手法の開発・改良も行う。

3. 研究の方法

抗原として、化学修飾や熱処理した HEL や、アルカリ処理した OVA に加えて、各 S-S 結合欠損体を大腸菌大量発現系により調製した。抗体として、抗 HEL 抗体と抗 OVA 抗体複数種類をハイブリドーマ細胞から、さらに single-chain Fv (scFv) を大腸菌大量発現系により調製した。抗原と抗体との分子間相互作用解析を、表面プラズモン共鳴バイオセンサー (SPR) や等温滴定型熱量計 (ITC) を主とした各種物理化学的手法により行い、速度論量や熱力学量として数値化した。特に結

合の静電的寄与や結合構造の存在確率に着目し、「induced-fit」型と「population-shift」型の特徴付けを行った。また HEL や OVA のアレルゲンとしての抗原性に着目し、抗原タンパク質や抗体各構造変化の分子論的理解を深めるべく、NMR や X 線結晶構造解析、高速 X 線 1 分子追跡法 (DXT)、フォトンエコー法などによる解析を行った。なお DXT 解析にあたっては、抗体の親和性成熟に伴う動的構造変化や、抗原結合に伴う変化に着目すべく、前述の抗 HEL 抗体や抗 OVA 抗体ではなく、一連の抗ニトロフェニル (NP) 抗体を対象とした。フォトンエコー解析にあっても、当初は蛍光物質を結合させた HEL や OVA の利用により、抗 HEL 抗体や抗 OVA 抗体との結合系を予定したが、蛍光修飾に伴う結合力の低下など、改善すべき点が多く、本研究期間内では、蛍光物質の 1 つ 8-methoxypyrene-1,3,6-trisulfonate (MPTS) とその抗体との相互作用解析において、一定の成果を得た。また抗体のエピトープ解析を、質量分析を用いた重水素交換法により行い、最初の段階として、抗 HEL 抗体の構造依存性エピトープの簡便な決定法の確立を目指した。

4. 研究成果

HEL の各 S-S 結合を欠損させた 4 種類の変異体の大腸菌発現系を構築し、各精製タンパク質を得た。センサーチップ上に固定化した 4 種類の抗 HEL 抗体との分子間相互作用を、SPR を用いて解析した。その結果、いくつかの抗原抗体の組み合わせで、明らかに native HEL との結合とは異なる結果が得られた。また還元アルキル化 HEL と抗 HEL 抗体の相互作用解析も行ったところ、結合速度依存的な結合力の低下が認められ、HEL の結合構造の存在確率に依存する「population-shift」型の結合機構が示唆された (後述の雑誌論文①)。同抗体はそのアルキル化部位近傍を認識しており、結晶構造として観測される最安定構造ではなく、溶液中で存在する「ある結合構造」を特異的に認識することが明らかになった。また HEL について、酸性 pH では熱変性後も可逆的に巻き戻るとされているが、同処理した酸変性 HEL と抗 HEL 抗体の結合を、ITC を用いて解析したところ、結合エントロピー変化量は不利に働き、これを補完するように結合エンタルピー変化量が有利に働くことが明らかになった。

試料調製にあたり、HEL の S-S 結合欠損変異体の調製に成功したものの、NMR 測定用の ¹⁵N, ¹³C ラベル化試料用としての効率的調製に難航しており、大腸菌発現後の巻き戻し効率の改善が必要となっている。同様に、抗 HEL 抗体や抗 NP 抗体の scFv についても、巻き戻し効率の改善が必要な状況にある。一方、

酸変性 HEL の X 線結晶構造解析に成功した。その結果、Asp101 と Gly102 の間のペプチド結合部位に、native HEL との違いが認められた。すなわち、酸変性 HEL では、少なくとも 2 種類の立体構造の混合物であり、前述の熱力学解析結果とあわせると、タンパク質が本来、溶液中で取りうる複数の構造を捉え得たものと考えられる。

本研究で用いた抗 HEL 抗体のエピトープ解析について、重水素交換法と質量分析を組み合わせた一連の実験条件を確立できた。すなわち、HEL をペプシンにより断片化する最適条件を決め、さらに HEL 単独時と抗 HEL 抗体との複合体形成時の重水素交換経時変化を解析した。後者については、最大で 6 Da の質量差が認められ、これはエピトープが抗体によりマスクされた差に相当すると考えられる。

OVA について、アルカリ処理で得られる S-OVA と、新規に取得した 14 種類の抗 OVA 抗体との分子間相互作用解析を、主に SPR を用いて行った。その結果、すべての抗体が OVA と S-OVA を厳密に識別しており、うち 4 種類の抗 OVA 抗体は S-OVA に対する結合力を失っていた。OVA と S-OVA の結晶構造は、Ser 3 残基が異性化構造をとること以外、ほぼ同一であることから、これら部位特異的な構造の違い、あるいはその影響による動的構造の違いを、抗体が識別するものと考えられる。

抗 NP 抗体 scFv のマイクロ秒からミリ秒スケールの動的挙動を DXT 法により解析した。親和性成熟前後の各抗 NP 抗体由来の scFv、及び抗原結合前後の scFv の動的挙動を比較すると、成熟前の抗 NP 抗体由来の scFv、及び抗原結合前の scFv で、より大きな動きが観測された。この結果は、成熟前の抗体が結合力は弱いものの抗原を捕捉しやすい柔らかい状態にあり、抗原結合後は固い状態に移行する動的挙動変化を示唆する。

親和性成熟過程にある 8 種類の抗 MPTS 抗体と MPTS 抗原との結合を ITC で熱力学的に解析し、同じ複合体をフォトンエコー法により動的構造解析を行った。その結果、各アミノ酸置換が、抗体の動的挙動に影響し、これが ITC で得られるエントロピーの寄与と、フォトンエコー法で得られる動的変化に反映され、両者は相互に良く相関した（後述の雑誌論文②）。

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 2 件）

- ① Adhikary, R., Yu, W., Oda, M., Zimmermann, J., and Romesberg, F.E., Protein dynamics

and the diversity of an antibody response., 査読有, J. Biol. Chem. 287, 2012, 27139–27147.

- ② Oda, M., Kitai, A., Murakami, A., Nishimura, M., Ohkuri, T., Abe, Y., Ueda, T., Nakamura, H., and Azuma, T., Evaluation of the conformational equilibrium of reduced hen egg lysozyme by antibodies to the native form., 査読有, Arch. Biochem. Biophys., 494, 2010, 145-150.

〔学会発表〕（計 6 件）

- ① Yusuke Tanaka, Dynamic structural and antigen binding analyses of antibody single-chain Fvs, 第 50 回日本生物物理学会年会, 2012 年 9 月 24 日, 名古屋
- ② Yusuke Tanaka, Generation of single-chain Fv of anti-(4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl antibody and its heteroclitic antigen binding, 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011 年 9 月 17 日, 姫路
- ③ 佐野 智生, 蛋白質の天然構造と変性構造を見分ける抗体の識別能, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6 月 7 日, 大阪
- ④ Masayuki Oda, Effects of substrate strain on binding thermodynamics and kinetics of catalytic antibodies, IX European symposium of The Protein Society, 2011 年 5 月 23 日, Stockholm
- ⑤ 織田 昌幸, 等温滴定型カロリメトリー (I) – 酵素反応の熱力学解析 –, 第 1 回生体分子相互作用解析フォーラムワークショップ, 2011 年 3 月 10 日, 東京
- ⑥ Masayuki Oda, Correlations between the Dynamics of Antibody-Antigen Complexes and the Antigen Binding Thermodynamics of Antibodies, 21st IUPAC International Conference on Chemical Thermodynamics Conference, 2010 年 8 月 3 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〕

ホームページ等

http://www2.kpu.ac.jp/life_environ/biop_hys_chem/

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
内山 進 (UCHIYAMA SUSUMU)
大阪大学・大学院工学研究科・
准教授
研究者番号：90335381