1P057

Biased mutation scrambling 法による多重置換体スクリーニングの効率化

○浜松 典郎、相田 拓洋、野宮 由起子、内山 秀文、芝中 安彦
(ノバルティス ファーマ (株) 筑波研究所)

我々はこれまでに、効率的な多重置換体探索法として Mutation scrambling 法を確立し、数種の酵素の改変を実現してきた。Mutation scrambling 法は、複数のアミノ酸置換の最適な組合せを見つけ出す方法である。しかし、組合せるアミノ酸置換数は、組合せ総数の幾何級数的増大から十数種までと限られていた。そこで、我々は、Mutation scrambling 法で作製される多重置換体ライブラリーの構成を工夫することで、組合せ総数の増大に関係なく少ないスクリーニング数で最適多重置換体を同定する方法を考案した。我々のこれまでの知見からアミノ酸置換効果は概ね独立であることが分かっている。この考えからは、より多くの有利アミノ酸置換を蓄積した多重置換体に偏ったライブラリーが好ましい。そこで、多重置換体ライブラリーの作製で用いる Self-assemble PCR において、変異が導入されやすい反応条件でライブラリー中の多重置換体含有率を増加させる方法を考案した。この方法を、プロリルエンドペプチダーゼの耐熱化に寄与する 14 のアミノ酸置換の組合せで実施した結果、ライブラリー中の多重置換体の増加に伴う耐熱性変異体の含有率の増加を確認することができた。また、その分布特性から、高耐熱性変異体の選抜に適したスクリーニングサイズを予測し、わずか 2000 クローンから高耐熱性変異体を同定した (57.5 度の活性半減期で野生型の約 2000 倍)。しかもそれは、従来の方法で約 4 万クローンから同定された変異体よりも高い耐熱性を有するものであった。これにより、Mutation scrambling 法で組合せるアミノ酸置換総数の増加が可能となり、同時にスクリーニングの省力化が可能となった。本研究は、通産省産業科学技術研究開発制度の一環として、新エネルギー産業技術総合開発機構 (NEDO) より委託を受け実施したものである。

Norio Hamamatsu, Takuyo Aita, Yukiko Nomiya, Hidefumi Uchiyama, Yasuhiko Shibana: Rapid and efficient screening of mutants with multi amino-acid substitutions by biased mutation scrambling

1P059

MHC クラス I 分子及びヒト NK 細胞阻害受容体 (KIR) の効率的な巻き戻しと相互作用の熱力学的解析

○郷田 秀一郎^{1,2}、横田 亜紀子¹、白石 充典¹、津本 浩平¹、前仲 勝実³、熊谷 泉¹ (¹ 東北大・院工・生工、² NEDO、³ 国立遺伝学・構造遺伝学研究センター)

T 細胞とナチュラルキラー (NK) 細胞は細胞免疫システムで相補的な役割を果たしている。ヒト NK 細胞阻害受容体 (KIRs) は標的細胞上の MHC クラス I 分子に特異的に結合することによって NK 細胞の細胞障害活性を阻害あるいは活性化することによって制御している。本研究では、MHC クラス I 分子 Cw7、 β_2 -microglobulin 及び KIR2DL2 大腸菌を用いた発現系により得、それらの相互作用を等温滴定型熱量計 (ITC) により測定・解析を行ったので報告する。

蛋白質は大腸菌 (*E. coli*, BL21(DE3)) を用いて発現させ、不溶性顆粒として得た。MHC 分子及び β_2 -microglobulin は 6M GuHCl で可溶化した後、抗原性ペプチド DS11 と共に希釈することによって巻き戻した。巻き戻し後は、ゲル濾過及びイオン交換で精製し、MHC 分子が β_2 -microglobulin、ペプチドと複合体を形成していることを確認した。その収率は 12% であった。KIR2DL2 は、可溶化後、透析チューブに入れ、透析外液の GuHCl 濃度を段階的に希釈し、ある段階において酸化型グルタチオンを透析外液に加えることによって巻き戻しを行った。巻き戻しを終えた段階での可溶化率は 70% で、ゲル濾過後では 46% であった。それらの試料を用いて ITC の測定を行った結果、30℃ではごく小さな結合エンタルピー変化 (~5 kcal/mol) が観察された。

(謝辞) 本研究の一部は、NEDO 新規産業創造型提案公募事業により行われている。

S. Goda, A. Yokota, M. Shiroishi, K. Tsumoto, K. Maenaka and I. Kumagai : Effective refolding of MHC class I molecule (Cw7) and killer cell inhibitory receptor (KIR2DL2) and their interaction

1P058

蛋白性抗原-抗体相互作用における Asn 残基の役割に関する考察

○横田 亜紀子¹、白石 充典¹、近藤 英昌²、津本 浩平¹、熊谷 泉¹ (¹ 東北大・院工・生工、² 産総研)

抗体の相補性決定領域のアミノ酸組成には偏りがあることが知られており、特に Tyr、Ser、Asn 残基の重要性が示唆されてきた。我々は抗ニフトリゾチーム抗体 HyHEL-10 の Fv 断片とニフトリゾチーム (HEL) との相互作用に着目し、部位特異変異導入と滴定型熱量測定および構造解析を組み合わせて抗原認識機構の詳細な議論を行ってきた。今回は軽鎖 31 位、32 位、92 位の Asn 残基に着目し、それぞれ Ala、Asp に置換することにより HEL との相互作用における Asn 残基の寄与を考察したので報告する。熱力学的測定の結果、31 位、32 位への変異導入により、エンタルピー変化量の減少に伴う親和性の大きな低下 (10^{-2} ~ 10^{-3}) と、顕著なエントロピー変化量の減少が見られた。以前に調べた界面の水分子を介した水素結合欠損時の相互作用においては、結合定数およびエンタルピー変化量は若干の減少に留まったことを鑑みると、これらの結果はこの部位の Asn 残基の寄与がエンタルピーのかつ非常に重要であることを示し、これら Asn の形成する水素結合が界面の構造を強固にするためエントロピー損を伴うことを示唆する。一方、92 位への変異導入では、結合定数およびエンタルピー変化量の減少は若干に留まった。LN92D 変異-HEL 複合体の X 線結晶構造解析から、全体構造の大きな変化は見られなかったが、変異導入箇所の局所的な構造変化および界面に存在する水分子の移動が大きく、変異導入により切断された水素結合を相補するような構造変化が示唆される。それと比較して LN32D 変異体の局所的構造変化は小さいことから、32 位の Asn 残基の欠損は構造変化によって相補しえないことが示唆された。現在、LN31D 変異体-HEL 複合体の構造精密化を行っている。

A. Yokota, M. Shiroishi, H. Kondo, K. Tsumoto and I. Kumagai : Contribution of Asn residues to protein antigen-antibody interaction

1P060

不溶性顆粒から巻き戻した各種受容体細胞外ドメインの機能評価

○北村 武¹、郷田 秀一郎¹、津本 浩平¹、前仲 勝実²、三沢 悟³、熊谷 泉¹ (¹ 東北大院・工・生工、² 遺伝研、³ ジャパンエナジー・医薬バイオ研)

免疫細胞表面には、多種多様な分子認識に重要な受容体が発現している。創薬などの観点からこれらのタンパク質を用いた研究の重要性が指摘されており、様々な角度から進められている。我々は、ヒト細胞表面上に存在するイムノグロブリンフォールドに似た構造を持つ受容体について、その可溶性ドメインを大腸菌を用いて発現させ、得られた不溶性顆粒を巻き戻した後、その機能、特性を評価した。受容体細胞外ドメインとして、EPO 受容体、IL-1 受容体、Fc 受容体 (CD16、CD32b)、(NK 細胞受容体 (KIR)、T 細胞受容体) を取り上げた。巻き戻し方法については、段階透析法を用い、イムノグロブリンフォールドのモデルとして一本鎖抗体 (scFv) で成功している塩酸グアニジン (GuHCl) による変性状態からの巻き戻し過程において、適切な変性剤濃度で酸化試薬を導入する方法で行った⁽¹⁾。いずれの受容体の場合も基本的には本手法の適用が可能であり、高効率で回収することができた。得られた受容体の詳細な解析を行うために、熱量測定 (ITC)、表面プラスモン共鳴法 (IAsys) を用いた結合活性評価、CD スペクトルによる構造の評価、変性剤・熱安定性の解析、様々な条件による分子状態の比較等を行い、受容体細胞外ドメインの会合特性の解明を試みたのであわせて報告する。

(1) Tsumoto, K. *et al.*, *J. Immunol. Methods*, (1998))

(謝辞) 本研究の一部は、NEDO 新規産業創造型提案公募事業により行われている。

T. Kitamura, S. Goda, K. Tsumoto, K. Maenaka, S. Misawa, I. Kumagai : Assessment of function for several receptor extracellular domains refolded from inclusion bodies