2P013

抗原・抗体間相互作用における抗原の大きさや抗体の自由度と親和性や結合比との相関

○織田 昌幸¹、内山 進²、小林 祐次²、東 隆親¹ (¹東京理大・生命研、²阪大院・薬)

抗体は複数の抗原結合部位をもち、多価抗原に対してはアビディティにより高い結合親和性を示す。IgG抗体では2本のFab腕に可動範囲があり、抗原の大きさによりその複合体形成機構が異なるものと考えられる。我々は最近、抗ニトロフェニル抗体と抗原との相互作用において、キャリアー蛋白質の大きさやハプテンを導入数を変えた抗原を用いることにより、親和性や結合比が異なることを報告した(Mol.Immunol. 37, 1111, 2000)。本研究ではさらに大きさの異なる蛋白質抗原とそのモノクローナル抗体との結合について、溶液中と、細胞表面のようにFc部分を固定した場合との違いに着目しながら、BIAcoreや超遠心分析法を用いて解析した。

抗体のFc部分に結合する抗体をセンサーチップ上に固定化し、そこに着目する抗体を結合させて、抗原との相互作用をBIAcoreにより解析した。その結果、卵白リゾチーム(HEL; 14.3kDa)と抗HEL抗体では2:1の複合体が、オボアルブミン(OVA; 45kDa)やウシ血清アルブミン(BSA; 67kDa)と抗OVA抗体、抗BSA抗体それぞれでは1:1の複合体が観測された。一方、抗原となる蛋白質を固定化し、溶液中の抗体との相互作用を解析すると、1:1の複合体形成であれば単価結合によるアフィニティの寄与だけが観測されるべきところ、抗OVA抗体、抗BSA抗体いずれにおいても二価結合によるアビディティの寄与が認められた。これらの結果はBSA程度の大きさの抗原に対しても溶液中の抗体は2:1の複合体を形成できるのに対して、Fc部分を固定することによりOVA以上の大きさの抗原に対して同様の複合体形成ができなくなることを示唆している。溶液中では、超遠心分析法からもBSA:抗BSA抗体=2:1の結果が支持された。本発表では抗ハプテン抗体の結果とあわせて、特にIgG抗体の有する各部位の自由度と抗原認識能の相関について議論したい。

M.Oda, S.Uchiyama, Y.Kobayashi and T.Azuma: Correlation of binding affinity and stoichiometry with the size of antigens involved and the segmental flexibility of antibodies

2P015

オシダプラストシアニンの特異的構造と電子移動反応に関する研究

○新関 智丈¹、柳澤 幸子¹、Dennison Christopher²、Lawler Anne²、北川 禎三³、高妻 孝光¹ (¹茨城大・理、²ニューカッスル大学、³分子研)

プラストシアニンは、光合成系においてチトクロム *b6/f* 複合体から光化学系IのP700への電子伝達体として機能している。高等植物のプラストシアニンは、酸性条件下で還元されると溶媒側に露出したヒスチジン残基がプロトン化を受け銅イオンから解離する、つまり電子移動反応とプロトン移動反応がカップルすることが知られている。近年、シダ植物由来のプラストシアニンは、高等植物由来のプラストシアニンとはまったく異なる電子移動反応を示し、その構造上の特異性との相関がKohzumaらによって報告された。本研究においては、シダ植物のプラストシアニンにおける構造上の特異性と酸化還元に伴うヒスチジン残基の挙動および付随する蛋白質構造変化について244nm励起の紫外共鳴ラマンスペクトル法によって検討し、自己交換電子移動反応をNMRスペクトルによって検討した。244 nm励起の紫外共鳴ラマンスペクトルにおいて、酸化型プラストシアニンでは1386 cm⁻¹にイミダゾールπ位の窒素で銅イオンに配位したヒスチジンに特徴的なラマンバンドを与えた。還元型プラストシアニン(pH* = 4.9)では、銅イオンに配位したヒスチジン由来のラマンバンドが1377cm⁻¹に低波数側へとシフトすることが見出され、1個の銅イオンからヒスチジンイミダゾールへのπバックドネーションにより低波数側にシフトしたものと解釈された。酸性条件下においてもヒスチジンイミダゾールに由来するラマンバンドは現れないことから、シダ植物由来のプラストシアニンのヒスチジンは高等植物由来のプラストシアニンとは異なり、酸性条件下で還元されてもプロトン化されず銅イオンに結合していることが明らかとなった。また、自己交換電子移動反応との相関についてNMRスペクトルによって検討した結果についてもあわせて報告する。

T.Niizeki, S.Yanagisawa, C.Dennison, A.T.Lawler, T.Kitagawa, T.Kohzuma: Studies on the structure and electron transfer reaction of plastocyanin from *Dryopteris crassirhizoma*

2P014

紫外線損傷DNA切断抗体の創製

○平井 隆寛¹、鳥澤 拓也¹、加藤 晃一¹、二階堂 修²、大塚 栄子³、嶋田 一夫¹ (¹東大院・薬、²金沢大・薬、³北大院・薬)

【目的】モノクローナル抗体64M5は、紫外線損傷DNAである(6-4)光産物と高い親和性を有する。また、CITC (isothiocyanobenzyl-EDTA) は、アスコルビン酸および鉄イオン存在下でDNAを切断することが知られている。そこで本研究では、64M5の持つ高い特異性とCITCのDNA切断活性を利用し、(6-4)光産物を含むDNAを特異的に切断する新規機能抗体を創製することを目的とした。

【方法】64M5 Fabに存在するLys残基選択的にCITCを共有結合させた。CITCの結合分子数および結合部位を決定するために、CITC-64M5 Fabおよびリシルエンドペプチダーゼ消化物を質量分析法により解析した。またSPR法により、CITC-64M5 Fabと(6-4)光産物を含むDNAとの結合定数を求めた。次にCITC-64M5 Fabに鉄イオンをキレートさせたFeCITC-64M5 Fabと(6-4)光産物を含むDNAにアスコルビン酸を添加し、DNAの切断反応を行った。これらの反応溶液を逆相HPLCによって分析し、DNA切断活性を評価した。

【結果および考察】質量分析の結果より、CITCはFab1分子あたり平均2残基結合し、その結合部位はDNA認識領域近傍であることが明らかとなった。また、CITC-64M5 Fabと(6-4)光産物を含むDNAの結合定数は1.1 × 10⁹(M⁻¹)であり、十分な結合活性を保持していることが判明した。HPLC分析の結果より、FeCITC-64M5は、(6-4)光産物を含むDNAの損傷部位付近を選択的に切断することが確認された。以上の結果から、(6-4)光産物を含むDNAを特異的に切断する新規抗体を得ることに成功した。

T.Hirai, T.Torizawa, K.Kato, O.Nikaido, E.Otsuka, I.Shimada: Nobel antibody with UV-damaged DNA cleaving activity

2P016

電子移動反応における蛋白質間での認識機構

○古川 良明、松田 史博、石森 浩一郎、森島 績(京大院・工)

電子移動(ET)反応の際の蛋白質間会合は、ET後に複合体が解離するため、その詳細な分子機構の検討は困難であった。そこで我々は、二つの蛋白質をクロスリンクすることで、どのような複合体形成を経て電子が移動するか検討できると考え、亜鉛置換ミオグロビン(ZnMb)とシトクロム *b₅* (*b₅*)を蛋白質間ET反応のモデルとして用いた。クロスリンク剤にはEDCを用い、質量分析によりZnMbと*b₅*が1:1でクロスリンクされていること(ZnMb-*b₅*)を確認した。クロスリンクしたZnMb-*b₅*のペプチドマッピングにより、MbはLys50,56,96を含むサイトとLys78,79,87を含むサイトで*b₅*と、一方、*b₅*は蛋白質表面全体でZnMbと非特異的に相互作用を行うことが示された。つまり、溶液中ではZnMbと*b₅*は様々な配向でETのための複合体を形成すると考えられる。しかし、ET反応は酸化還元部位間の距離に対し指数関数的に依存することから、全ての配向において一樣の速度でETが進むとは考えにくい。そこで、フォトリシス法によりZnMb-*b₅*中の亜鉛ポルフィリンを励起させ(ZnP*)、ZnMbから*b₅*へのET反応を検討した。その結果、ZnP*は三倍以上の過程で減衰していた。最も遅い相は70s⁻¹でZnP*の自己失活に対応していたが、速い方の二種類以上の相は約2x10⁴-2x10⁵s⁻¹程度で電子が移動することを示していた。まず、最も遅い相は、ETがZnP*の自己失活よりも遅く、ETに対し効率の悪い複合体の存在を示唆している。つまり、ZnMbと*b₅*では非特異的な衝突が繰り返されるが、全ての複合体でETが起こるのではないと考えられる。一方で、ETが進行する相にも二種類以上存在することから、ETを起こす複合体の中には少なくとも二種類以上の配向が存在すると考えられた。溶液中では、ZnMb/*b₅*間のET反応は、単一の結合部位を特異的に認識して進むのではなく、様々な配向で相互作用し、その配向の分布によって制御されていると提案できる。

T.Furukawa, F.Matsuda, K.Ishimori, I.Morishima: The recognition mechanism in the protein-protein electron transfer