B093

マウス抗 NP 抗体の抗原結合による構造変化の解析

○佐川 琢麻¹、織田 昌幸¹、森井 尚之²、小園 晴生¹、東 隆親¹ (¹ 東京理科大・生命研・生命情報、² 産総研・生物機能工学)

B 細胞が産生する抗体は Fab 領域で外来の抗原を特異的に認識する一方、Fc 領域を介して補体活性を初めとする様々なエフェクター機能を誘導している。この Fc 領域を介した機能の誘導には抗体に抗原が結合しないと起こらないが抗体分子に何が起きているのか詳細に検討された例は少ない。そこで本研究ではプロテイン A (SpA) やプロテイン G (SpG)、SpA B ドメイン (SpA-B)、SpG C2 ドメインをプローブ分子として、抗原・抗体間相互作用が抗体各部位に及ぼす影響を明らかにすることにした。

マウス抗ニトロフェニル (NP) モノクローナル抗体 (IgG2a) 及び酵素処理により作成した Fab、Fc、F(ab')₂ とプローブ分子との相互作用を Biacore や滴定型熱量計 (ITC) を用いて解析した。マウス抗体に対して SpA は Fc 領域に、SpG は Fab 領域に結合すると考えられていたが本研究で少なくとも抗 NP IgG2a 抗体において両プローブ分子ともに Fab と Fc 両領域に結合することが明らかになった。SpA 結合に関して、Biacore 測定により Fab は Fc に比べ SpA に対する親和性が 5-10 倍程度弱く、また結合速度、解離速度ともに 2-10 倍程度小さいことが示され、ITC 測定による SpA-B との相互作用解析でも Fab は Fc 断片より親和性が小さいことが明らかになった。また intact 抗体を用いた場合、抗原結合により SpA との結合親和性 ($K_a \approx 10^7 \text{M}^{-1}$) に大きな影響は見られなかったが最大結合量は約半分にまで減少していた。F(ab')₂ を用いた場合でも抗原結合により SpA に対する結合量は減少したが Fab にすると抗原結合の影響はほとんど見られなかった。以上の結果はヒンジ領域、あるいは 2 つの Fab 領域の存在が抗原結合による抗体の構造変化に必須であることを示唆している。

T. Sagawa, M. Oda, H. Morii, H. Kozono and T. Azuma : Analyses of the antigen binding-induced conformational change in mouse anti-NP antibody.

B095

HIV-1gp160 の A835 はカルモデュリンの標的分子認識において重要な残基か？

○齋藤 剛史¹、松藤 智洋¹、野口 正裕¹、和泉 義信¹、林 宣宏² (¹ 山大院・理工、² 藤田保健大・総医研)

[目的] ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) の膜表面に存在する糖タンパク質 (Gp160) は、C 末側に 2 箇所のカルモデュリン (CaM) 結合部位を有す。Micoli らは gp160 中の 835 番目の A を W に点変異させたペプチド (A835Wp) を用いた蛍光・生理活性実験を行い、Ca 飽和 CaM (Ca-CaM) が gp160 と複合体形成する際、A835 が重要な役割を演じていると主張した (JBC, 275(2000)1233)。しかし、我々は A835Wp の溶解性が悪い事を見出し、Micoli らの解釈には問題が有る。本研究では、calcineurin とサル免疫不全ウイルス (SIV) の CaM 結合部位のアミノ酸配列が Gp160 の CaM 結合部位と高い相同性を持つ事に着目し、A835 を K、G に点変異させたペプチドがそれぞれ合成された。そして、Ca-CaM との複合体構造が小角 X 線散乱法により決定され、得られた溶液構造情報に基づき A835 の重要性が検討される。[結果と考察] まず、点変異ペプチド A835Wp と A835Gp は、溶液中に於いて正常に溶解することが確認された。Guinier プロットより、Ca-CaM/A835Gp と Ca-CaM/A835Kp 複合体の回転半径はそれぞれ 21.4 Å と 21.5 Å と見積もられた。これらの値は、未変異の複合体に対する値 (20.8 Å) に近かった。又、Kratky プロットより、点変異体の複合体は未変異体の複合体とほぼ同じ構造を取っている事が示唆され、K、G への点変異の効果は複合体形成にはほとんど影響を及ぼさない事が判った。更に、calcineurin の Ca-CaM 結合モチーフの概念を本系に適用すると、A835 はアンカー残基の位置からずれており、Ca-CaM が Gp160 を分子認識する際、A835 が特に重要な役割を演じていると結論するには至らないと思われる。

T.Saito, T.Matsufuji, M.Noguchi, Y.Izumi, N.Hayashi : Does A835 residue in HIV-1gp160 play a key role in calmodulin molecular recognition?

B094

クモの糸の弾力性分子機構の解析

○宮澤 光博¹、片山 詔久² (¹ 農業生物資源研、² 名市大・自然科学)

クモの糸は繊維状蛋白質の 1 つで、ナイロンやスチールに匹敵する弾力性や強靱性を備えている。最近では遺伝子組換え技術を用いて、クモの糸の遺伝子を大量に発現させ、天然資源に依存しない繊維素材を生産することが試みられている。しかし紡糸された発現産物は、天然のクモの糸と同じ物性を得るまでに至っておらず、1 次構造が同じでも、高次構造が再現されていないことが原因の 1 つと考えられる。本研究はマイクロ FT-IR 分光法を用いてクモ糸蛋白質の高次構造を解析し、その特異的な力学的性質が生み出される分子機構を解明することを目的としている。クモは営巣行動の最初に、牽引糸と呼ばれる強度の強い糸を出す。この行動の性質を利用し試料の採取を行い、偏光スペクトルの測定を行った。その結果、主鎖の N-H 基や C=O 基は、繊維軸に対して平行に配向し、アラニンの側鎖などに帰属されるメチル基は、垂直方向に配向する成分が多いことが示された。一方、クモの糸は水に濡れると弾力性が著しく増加する。これより水を牽引糸に吸着させ、張力を与えたときのスペクトルについて観察を行った。張力の増加と共に、シート構造に帰属できるバンドの強度は減少する一方、分子間で水素結合をしているストランドに帰属できるバンドの強度は増加する傾向が見出された。同時に C-C など主鎖の骨格振動が現れる吸収領域でも、特定のバンドで強度変化や波数シフトが観察された。以上の結果、クモの糸の弾力性が生み出される分子機構は、蛋白質の高次構造の変化が大きく関わっていると考えられた。発表では牽引糸の分子モデルを提案すると共に、他の種から採取した牽引糸のスペクトル特性についても説明を行う。

M. Miyazawa and N. Katayama : Molecular mechanism of elasticity of spider fibroin

B096

カルモデュリン/NO 合成酵素系標的ペプチド複合体の小角 X 線散乱

○上野 都子、松藤 智洋、和泉 義信 (山大院・理工)

[目的] カルモデュリン (CaM) の標的酵素である NO 合成酵素 (NOS) には、(内皮型)eNOS、(神経型)nNOS、(誘導型)iNOS の 3 種がある。eNOS の CaM 結合部位は、M13 や RS20 と異なり、CaM 結合部位内に酸性アミノ酸残基 E を含み、N 末端側の塩基性 3 残基が 1 位のアンカー残基から離れ、複合体形成に Ca^{2+} 濃度非依存的であるという特徴を持つ。この eNOS ペプチド (eNOSp) を対照として用い、本研究では nNOSp の Ca^{2+} 存在下と非存在下での Ca^{2+} /CaM/NOSp と apoCaM/NOSp 複合体の溶液構造を、放射光小角 X 線散乱法を用いて解析し、nNOSp の CaM 結合モチーフの決定と複合体形成に及ぼす酸性アミノ酸残基の影響を考察した。なお、CaM/iNOSp 複合体は溶解しなかった。

[結果・考察] apoCaM/eNOSp と apoCaM/nNOSp 複合体の分子量増分がほぼ等しく、Kratky Plot が共にブロードな形状を示すことから、nNOSp も apoCaM とアレイ型複合体を形成する事が分かる。Ca²⁺/CaM/eNOSp と Ca²⁺/CaM/nNOSp の Kratky Plot は共にシャープな形状を示し、回転半径 (R_0) もほぼ同じ値を取る事から、両複合体はコンパクトな球状構造をとる事が分かる。さらに PAPIA クラスターの 2 次構造予測のデータもふまえ、nNOSp の CaM 結合部位は、eNOSp と同様に [1-5-8-14] モチーフである可能性が高いと考察する。両複合体の R_0 の値及び Kratky Plot の形状が、M13 や RS20 の CaM 複合体のそれとほぼ同じである事から、CaM 結合部位内に酸性アミノ酸残基を含み、N 末端側の塩基性 3 残基が 1 位のアンカー残基から離れているという NOSp の特徴は、複合体形成に影響を及ぼさないと考察する。

S.Ueno, T.Matsufuji, and Y.Izumi : Small-angle X-ray scattering from a calmodulin/NO synthase complex