1P017

マウス抗 NP 抗体の抗原結合による抗体定常部の構造変化

○佐川 琢麻¹、織田 昌幸²、森井 尚之³、小園 晴生¹、東 隆親¹ (¹東京理科大・生命研、²京都府大・院農、³産総研・生物機能工学)

一般に B 細胞活性化には抗原受容体同士の架橋が必須であるとされている。しかし抗原として考えられる物質には、この架橋構造をとらせることができない物も多く存在しており別のシグナル伝達の機構があると考えられている。その可能性の一つに抗原結合による抗体分子の構造変化があげられるがこれまで詳細に検討された例は少ない。

そこで本研究では抗体定常部に結合するプロテイン A(SpA)を主なプローブ分子として抗原・抗体間相互作用が抗体分子に及ぼす影響を滴定型熱量計や Biacore を用いて明らかにすることにした。酵素処理により作製したマウス抗 NP 抗体 (IgG2a) の Fab、F(ab')₂ 断片では溶液中の SpA への結合が観察されなかったがセンサーチップ上に固定化された SpA とは結合することができた。また intact IgG2a では、固定化した SpA の方が溶液中の SpA より 20 倍も親和性が高かった。これは固定化 SpA と IgG2a が多価結合により高いアビディティで相互作用しているためと考えられる。また抗原結合により F(ab')₂ の SpA に対する結合が弱くなっていることがわかった。intact 抗体の時では、抗原結合により約半分にまで結合量が減少していた。IgG2a と SpA の結合には F(ab')₂ 領域を介しているものと Fc 領域を介しているものがあり、前者は抗原結合により SpA との結合が弱くなることから Fab 領域に構造変化をもたらししていると考えられる。一方 Fc 領域を介した結合は高いアビディティのため抗原結合による影響は見かけ上見られなかった。しかし IgG2a との親和性が 10 倍程度低くなるように変異を入れた SpA を用いた時では、抗原結合により Fc 領域にも構造変化があることが示された。プロテイン G をプローブ分子に用いた時も同様の現象が観察されている。

T. Sagawa, M. Oda, H. Morii, H. Kozono and T. Azuma : Conformational change of mouse anti-NP antibody constant domains induced by antigen binding

1P019

X 線溶液散乱測定によるアダプター蛋白質 GGA(VHS-GAT)の溶液構造の解析

○上久保 裕生¹、村崎 康浩¹、川崎 政人²、加藤 龍一²、中山 和久³、若槻 壮市²、片岡 幹雄¹ (¹奈良先端大・物質、²高エネ機構・構造生物セ、³京大・薬)

クラスリン被覆小胞への積み荷蛋白質の取り込みはアダプター蛋白質を介して行われる。アダプター蛋白質としては AP 複合体が古くから知られているが、近年、GGA 蛋白質が発見された。AP 複合体が 4 つのサブユニットからなる複合蛋白質であるのに対し、GGA は 3 つのドメイン (VHS/GAT/GAE) からなる単量体で機能していると考えられている。すでに X 線結晶構造解析によって、各ドメインとそのターゲット複合体の構造が明らかになり、ターゲット認識に関する詳細な知見が報告されている。しかしながら GGA の機能発現機構を理解するためには、全長構造の動態を明らかにすることが重要である。そこで、まず VHS 及び GAT の 2 つのドメインを含む断片 (VHS-GAT) に対し、その溶液構造を明らかにするために X 線溶液散乱測定を行った。さらに輸送蛋白質受容体 (M6PR) との相互作用が VHS-GAT に与える影響を明らかにするために、M6PR-C 末端ペプチド存在下での X 線溶液散乱曲線と比較した。その結果、ペプチド非存在下では VHS-GAT は 2 量体を形成しているのに対し、存在下では 2 量体の解離が観測された。距離分布関数、及び Ab initio 構造予測解析の結果、VHS-GAT は、VHS ドメインを介して 2 量体を形成していることが示唆され、比較的長いリンカーに両者は反して近接した複合体を形成していることが明らかとなった。また、ペプチド存在下で形成される単量体構造を解析したところ、VHS、GAT が互いに広がった構造をとっていることが示唆された。従来、GGA は単量体で機能していると考えられていたが、本結果は GGA も AP 複合体のヘテロ 2 量体に類似した 2 量体を形成していることを示唆している。年会では、ペプチド結合による 2 量体の解離もふまえ、GGA の機能モデルについて議論する。

H. Kamikubo, Y. Murasaki, M. Kawasaki, R. Kato, K. Nakayama, S. Wakatsuki, M. Kataoka : Structural characterization of GGA (VHS-GAT) using x-ray solution scattering.

1P018

Fc alpha/mu レセプターと抗体の結合における認識部位の解明

○石川 勝美¹、中川 将利¹、渋谷 彰²、東 隆親¹ (¹東京理科大・生命研、²筑波大・基礎医・免疫)

免疫グロブリンの Fc 領域を特異的に認識して結合するレセプターとして、IgG 抗体に対する Fc γ RI, II, III や、IgE 抗体に対する Fc ϵ RI, II などが知られており、それらレセプターの構造や機能の詳細な解析が行われている。しかし、IgM 抗体に対するレセプターである Fc μ R についてはいまだはっきりしないことが多い。

近年発見された IgA と IgM の両方の Fc 部分に結合できると言われているレセプター (Fc α/μ R) は、1 個の免疫グロブリンドメイン構造を有し、分子量が約 70kDa の I 型膜貫通タンパク質であるということはアミノ酸配列から推定されているが、その機能と構造に関する研究はほとんど行われていない。そこで、Fc α/μ R の機能と構造を解明するために生化学的な手法を用いて研究を行った。

まず、Fc α/μ R が IgM 抗体のどの部分を認識して結合しているかを調べた。IgM 抗体を還元アルキル化して作製した単量体、及びそれを酸化して作製した六量体の IgM、酵素処理により作製した IgM 抗体の (Fc)₅ μ と Fab を用いて FACS, Western blotting により解析した。その結果、今まで Fc α/μ R は、IgM 抗体の Fc 領域を認識していると考えられていたが、実際には J 鎖を特異的に認識していることが分かった。

また、Fc α/μ R の免疫における役割を明らかにするため、同レセプターが B 細胞のどの分化段階に発現しているかも RT-PCR 法および FACS により解析したのでそれについても併せて報告する。

K.Ishikawa, M.Nakagawa, A.Shibuya and T.Azuma : Biochemical analysis on the binding sites of Fc alpha/mu receptors

1P020

GGA 蛋白質 2 量体形成における VHS ドメインの関与

○村崎 康浩¹、上久保 裕生¹、川崎 政人²、加藤 龍一²、中山 和久²、若槻 壮市²、片岡 幹雄¹ (¹奈良先端大・物質、²高エネ研・物構研・構造生物グループ、³京大・薬)

GGA 蛋白質はクラスリン小胞輸送に関与するアダプター蛋白質である。従来から知られるアダプター蛋白質である AP 複合体が、4 つのサブユニットからなる複雑な複合体であるのに対し、GGA は 3 つのそれぞれ固有の役割を担うドメインからなる比較的単純な構造を有している。すでに、X 線結晶構造解析によって各ドメイン、及び標的蛋白質ペプチドとの複合体構造が明らかにされており、その認識機構に関しては明らかになりつつある。現在、我々は GGA の機能発現過程におけるドメイン配置構造の変化を明らかにするために X 線溶液散乱実験を行っている (本年会上久保ら発表)。その結果、従来 GGA は単量体で存在すると考えられていたが、N 末端に存在する VHS ドメインを介して 2 量体を形成していることが示唆された。そこで、本研究では VHS ドメインの 2 量体形成への関与を明らかにするために X 線溶液散乱測定を行った。原点散乱強度から見かけの分子量を算出したところ、単量体の約 2 倍の値を示したことから、VHS ドメインはそれ自身で 2 量体形成能を有することが明らかになった。さらに、輸送蛋白質受容体 (M6PR)C 末端ペプチド存在下で測定を行ったところ、単量体への解離が観測された。この結果は VHS-GAT で観測されたペプチド依存的な 2 量体解離に VHS ドメインの状態変化が関与していることを示唆している。VHS ドメインのペプチド依存的な状態変化を確認するために、円二色性分光を測定したところ、ペプチド存在下では約 5 % 程度の 2 次構造含有量の低下が観測された。この変化を指標として、M6PR-ペプチドを用いた滴定実験を行ったところ、その解離定数は約 10 μ M であることが明らかとなった。年会では、GGA 内に存在する VHS に対する自己阻害配列に対して行った実験をふまえ、GGA の自己阻害機構についても議論する予定である。

Y.Murasaki H.Kamikubo M.Kawasaki R.Kato K.Nakayama S.Wakatsuki M.Kataoka : The role of the VHS domain in the dimer formation of GGA proteins