

博士（薬 学） 小 林 博 幸

学 位 論 文 題 名

紫外線損傷 DNA に対して強い結合活性を有する
一本鎖抗体の分子認識機構に関する研究

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

序論

紫外線の照射により形成される損傷 DNA が、生物の生存に多くの影響を与えることは知られている¹。紫外線により形成された光産物は、修復タンパク質等により修復される^{2,3}。紫外線損傷 DNA と親和性を持つタンパク質は、これまで数多く報告されているが^{4,5}、その損傷 DNA 認識機構の詳細は明らかにされていない。

生体内に形成された紫外線損傷 DNA を検出・定量するために、数種類のモノクローナル抗体 (MAb) が樹立された^{6,7}。筆者は、一匹のマウスから產生された数種類の MAb の抗原認識機構に注目した⁸。 (6-4) 光産物を特異的に認識する 3 種類の MAb—64M2, 64M3 および 64M5 一の可変領域のアミノ酸配列は高く保持されていた。しかしながら、これらの mAb と (6-4) 光産物の相互作用の解析において、64M5 は 64M2 や 64M3 と比較し強い結合活性を示す結果が得られた。

これらの (6-4) 光産物特異的抗体の分子認識機構を調べるために、タンパク質工学的手法を用いて抗体の VL 鎮と VH 鎮をポリペプチドリンカーで接続した一本鎖抗体 (scFv) を構築し、結合に関与するアミノ酸残基の同定を行った。さらには二本鎖 DNA 中に存在する (6-4) 光産物の分子認識機構の解析を行い、細胞内への導入を目的とした scFv の構築を行ったので報告する。

(6-4) 光産物に特異的な一本鎖抗体 (64M5scFv) の構築とその結合活性の解析^{9,10}

64M5 の Fv 領域のコンピューター・モデルを参考に、VL 鎮と VH 鎮をペプチドリンカーで連結した scFv を構築した。またこの際に、タンパク質の精製および再生を簡便に行うために、scFv の C-末端側にヒスタグを連結した。

64M5scFv の抗原結合活性を比較するために、(6-4) 光産物を含む鎖長の異なるオリゴヌクレオチドを合成した。速度論的パラメーターは、表面プラズモン共鳴現象を利用した BIAcore を用いて算出した。 (6-4) 光産物に対する 64M5scFv の結合活性は、64M5Fab フラグメントのものと同等であり、scFv 分子の抗原結合領域の構造が、天然型抗体のものと同一であることが示された。scFv の結合活性は、鎖長依存的に増加した。各鎖長間で結合速度定数 (k_{ass}) には差がなかったが、解離速度定数 (k_{diss}) に著しい差が観察された。

64M2, 64M3, 64M5 のアミノ酸相同性は高いにも関わらず、その抗原結合能は大きく異なる。結合活性に関与するアミノ酸を調べるために、64M3 と 64M5 のキメラ型 scFv、および超可変領域のアミノ酸を置換した変異体を構築し、その結合活性を測定した。各キメラ抗体の結合速度測定の結果、64M5 の VL 鎮が DNA との結合に大きく寄与していることが明らかとなった。さらに VL-Y30, VL-T50 特に VL-R90 が、強い結合活性に寄与していることが明らかとなつた。

64M5 の表面に位置するリジン残基群の役割¹¹

64M5scFv のコンピューター・モデル解析により、VH 鎮に正荷電領域 (H62, H64, H66, H68)

が存在することが明らかとなった。このリジンクラスターの抗原 DNA との結合に寄与する役割を解析するために、各リジン残基をアラニン残基に置換した 4 種の変異体、および 4 つのリジン残基をすべてアラニンに置換した変異体を構築した。各変異体の k_{diss} は、天然型のものと比較して若干変化したのみであった。これに対して、 k_{ass} には著しい減少が観察された。また、イオン強度の影響を観察したところ、 k_{diss} にはほとんど変化が観察されなかつたのに対して、高塩濃度条件での k_{ass} は低塩濃度条件のものと比較すると約 4 倍低下した。すなわち、両者が結合する際には静電的な相互作用が寄与していることが示された。

64M5scFv の二本鎖 DNA 中に含まれる (6-4) 光産物との親和性とその認識機構の解析

64M5 は一本鎖および二本鎖 DNA 中に存在する (6-4) 光産物と結合する⁹。64M5 は損傷を含む一本鎖 DNA を免疫することにより得られた MAb である。そのため 64M5 の二本鎖 DNA 中に存在するエピトープとの結合様式には興味が持たれる。また、この scFv を細胞内で用いるためには、二本鎖 DNA との結合を明らかにすることが必要である。そこで (6-4) 光産物を含む二本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、64M5scFv の速度論的パラメーターを解析した。さらに、(6-4) 光産物の 3'-T の相補鎖側に G が位置するフラグメント、および蛍光物質である 2-アミノプリン (2-AP) が位置するフラグメントを合成し、それらに対する結合速度の解析を行った。

64M5scFv と二本鎖 DNA の k_{ass} は、相補鎖側にアデニンが位置する場合が最も高く、2-AP やゲアニンの場合の約 10 倍であった。この結果および融解温度測定から得られた結果を考察すると、64M5scFv はより不安定な二本鎖 DNA 中に存在する (6-4) 光産物とより速く結合するということが示された。さらに、2-AP が持つ蛍光特性を利用し、scFv の二本鎖中に含まれる (6-4) 光産物の認識機構を解析した。二本鎖 DNA 中に存在する (6-4) 光産物部分が局所的に一本鎖となり、64M5scFv がその (6-4) 光産物部位を特異的に結合していることが示唆された。

64M5scFv の DNA 鎮伸長に及ぼす影響¹²

紫外線により引き起こされる変異の原因として、DNA 複製過程におけるミスマッチ塩基の取り込みが考えられている。紫外線照射により形成した (6-4) 光産物部位における DNA 複製を阻害することができれば、このミスマッチ塩基対の形成を阻止することができる。そこで、DNA 複製時における 64M5scFv の鎮伸長に及ぼす影響を調べた。

(6-4) 光産物を 1箇所のみ含む合成 DNA を鋳型とし、大腸菌 Klenow fragment と DNA ポリメラーゼ α 、 β 、 δ を用いて鎮伸長反応における 64M5scFv の影響を解析した。DNA 鎮に対して 1 等量の scFv が存在する場合、明らかに鎮伸長反応は阻害された。KF, pol α , pol β および pol δ による鎮伸長反応は、3'-ピリミドンのそれぞれ 4, 6, 8, 8 塩基手前で停止した。

in vivo における 64M5scFv およびランダム変異体の活性

大腸菌 AB1886 は DNA 修復因子 UvrA 欠損株であり、紫外線感受性が高い。これを 64M5scFv の特定の超可変領域にランダム変異を挿入した遺伝子をコードするプラスミドで形質転換すると、紫外線に対して抵抗性を示すクローニングが得られた。それらのプラスミドを抽出し、scFv のアミノ酸配列を比較したところ、ある類似した配列を持つことが明らかとなった。

文献

1. Friedberg, E C, Walker, G C, & Siedl, W. (1995) *DNA repair and mutagenesis*, ASM press, Washington, DC.
2. Sancar, A. (1996) *Ann. Rev. Biochem.* **65**, 43-81.
3. Toda, T, Kim, S. T, Hidemori, K, Ooshi, E, Inui, T, Morioka, H, Kobayashi, H, Chitsuka, E, Toh, H, & Ikenaga, M. (1997) *Nucleic Acid Res.* **25**, 764-768.
4. Bowman, K. K, Sidk, K, Smith, C. A, Taylor, J. S, Doetsch, P. W, & Freyer, G. A. (1994) *Nucleic Acid Res.* **22**, 3026-3032.
5. Kai, M, Toda, T, Wada, M, Ryo, H, Matsuzaki, C, Kobayashi, H, Morioka, H, Chitsuka, E, Hiraoka, F, & Sakaguchi, K. (1998) *Biochim Biophys. Acta* **1397**, 180-188.
6. Mori, T, Nakane, M, Hidemori, T, Matsunaga, M, Ihara, M, & Nikaido, O. (1991) *Photochem Photobiol.* **54**, 225-232.
7. Matsunaga, T, Hidemori, Y, Chita, M, Mori, T, & Nikaido, O. (1993) *Photochem Photobiol.* **57**, 93-940.
8. Morioka, H, Miura, H, Kobayashi, H, Koizumi, T, Fujii, K, Asano, K, Matsunaga, T, Nikaido, O, Stewart, J. D, & Chitsuka, E. (1998) *Biochim Biophys. Acta* **1385**, 17-32.
9. Kobayashi, H, Morioka, H, Torizawa, T, Kato, K, Shimada, I, Nikaido, O, & Chitsuka, E. (1998) *J. Biochem.* **123**, 182-188.
10. Kobayashi, H, Morioka, H, Tobisawa, K, Torizawa, T, Kato, K, Shimada, I, Nikaido, O, Stewart, J. D, & Chitsuka, E. (1999) *Biochemistry* **38**, 532-539.

11. Kobayashi, H, Morioka, H, Nakaido, O, Stewart, J. D, & Otsuka, E (1998) *Protein Engi.* **11**, 1089-1092.
12. Kobayashi, H, Sato, K, Konatsu, Y, Morioka, H, Stewart, J. D, Tsurimoto, T, & Otsuka, E (1999) *Photochem Photobiol.*, in press.

学位論文審査の要旨

主査 教授 大塚 栄子
副査 教授 有賀 寛芳
副査 助教授 井上 英夫
副査 助教授 松本 健一

学位論文題名

紫外線損傷 DNA に対して強い結合活性を有する 一本鎖抗体の分子認識機構に関する研究

申請者は(6-4) 光産物を特異的に認識する 3 種類のモノクローナル抗体 – 64M2, 64M3 および 64M5 – の分子認識について研究を行ってきたが、一本鎖抗体の遺伝子の構築と発現によって以下の結果を得た。

(6-4) 光産物に特異的な一本鎖抗体 (64M5scFv) の構築とその結合活性の解析

64M5 の Fv 領域のコンピューター モデルを参考に、 VL 鎖と VH 鎖をペプチド リンカーで連結した scFv を構築し、 scFv の C- 末端側にヒスタグを連結した。

64M5scFv の抗原結合活性を比較するために、(6-4) 光産物を含む鎖長の異なるオリゴヌクレオチドを合成した。速度論的パラメーターは、表面プラズモン共鳴現象を利用した BIAcore を用いて算出した。(6-4) 光産物に対する 64M5scFv の結合活性は、 64M5Fab フラグメントのものと同等であり、 scFv 分子の抗原結合領域の構造が、天然型抗体のものと同一であることが示された。 64M2, 64M3, 64M5 のアミノ酸相同意は高いにも関わらず、その抗原結合能は大きく異なる。結合活性に関与するアミノ酸を調べるために、 64M3 と 64M5 のキメラ型 scFv, および超可変領域のアミノ酸を置換した変異体を構築し、その結合活性を測定した。各キメラ抗体の結合速度測定の結果、 64M5 の VL 鎖が DNA との結合に大きく寄与していることが明らかとなった。

64M5 の表面に位置するリジン残基群の役割

64M5scFv のコンピューター モデル解析により、 VH 鎖に正荷電領域 (H62, H64, H66, H68) が存在することが明らかとなった。このリジンクラスターの抗原 DNA との結合に寄与する役割を解析するために、各リジン残基をアラニン残基に置換した 4 種の変異体、および 4 つのリジン残基をすべてアラニンに置換した変異体を構築した。各変異体の k_{diss} は、天然型のものと比較して若

干変化したのみであった。これに対して、 k_{ass} には著しい減少が観察された。また、イオン強度の影響を観察したところ、 k_{diss} にはほとんど変化が観察されなかつたのに対して、高塩濃度条件での k_{ass} は低塩濃度条件のものと比較すると約4倍低下した。すなわち、抗原との結合には静電的な相互作用が寄与していることが示した。

64M5scFv の二本鎖 DNA 中に含まれる (6-4) 光産物との親和性とその認識機構の解析

64M5 は一本鎖および二本鎖 DNA 中に存在する (6-4) 光産物と結合する。 (6-4) 光産物を含む二本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、64M5scFv の速度論的パラメーターを解析した。さらに、(6-4) 光産物の 3'-T の相補鎖側に G が位置するフラグメント、および蛍光物質である 2-アミノプリン (2-AP) が位置するフラグメントを合成し、それらに対する結合速度の解析を行い、

二本鎖 DNA 中に存在する (6-4) 光産物部分が局所的に一本鎖となり、64M5scFv がその (6-4) 光産物部位を特異的に結合していることを推定した。

64M5scFv の DNA 鎮伸長に及ぼす影響

紫外線により引き起こされる変異の原因として、DNA 複製過程におけるミスマッチ塩基の取り込みが考えられている。紫外線照射により形成した (6-4) 光産物部位における DNA 複製を阻害することができれば、このミスマッチ塩基対の形成を阻止することができる。そこで、DNA 複製時における 64M5scFv の鎮伸長に及ぼす影響を調べた。

(6-4) 光産物を 1箇所のみ含む合成 DNA を鋳型とし、大腸菌 Kienow fragment と DNA ポリメラーゼ α , β , δ を用いて鎮伸長反応における 64M5scFv の影響を解析した。DNA 鎮に対して 1等量の scFv が存在する場合、明らかに鎮伸長反応が阻害されることを示した。

in vivo における 64M5scFv およびランダム変異体の活性

大腸菌 AB1886 は DNA 修復因子 UvrA 欠損株であり、紫外線感受性が高い。これを 64M5scFv の特定の超可変領域にランダム変異を挿入した遺伝子をコードするプラスミドで形質転換すると、紫外線に対して抵抗性を示すクローンが得られた。それらのプラスミドを抽出し、scFv のアミノ酸配列を比較したところ、ある類似した配列を持つことから紫外線抵抗性蛋白が発現していると推定した。

以上の業績は、博士（薬学）を授与するに値するものと判断した。