

# 終末糖化産物 GA-pyridine に特異的な Fv 抗体の X 線結晶構造解析 X-ray crystallographic study on an Fv antibody against GA-pyridine

中村照也<sup>1,2,\*</sup>, 森岡弘志<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 熊本大学大学院先端機構, 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

<sup>2</sup> 熊本大学大学院生命科学研究部 (薬学系), 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1  
Teruya NAKAMURA<sup>1,2,\*</sup> and Hiroshi MORIOKA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Priority Organization for Innovation and Excellence, Kumamoto University,  
5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kumamoto University,  
5-1 Oehonmachi, Chuo-ku, Kumamoto, 862-0973, Japan

## 1 はじめに

終末糖化産物 (AGEs) は、タンパク質中の Arg や Lys が還元糖による糖化反応を受けることで形成され、様々な糖尿病性合併症に関与している。GA-pyridine はグリコールアルデヒドに由来した最も細胞毒性の強い AGEs の一つである。これまでに我々は GA-pyridine に対する一本鎖 Fv (scFv) 抗体 73MuL9-scFv を創製し、その抗原認識と特異性の詳細を生物物理学的手法で評価してきた。本研究では、73MuL9-scFv による GA-pyridine 認識機構を原子レベルで明らかにすることを目的に 73MuL9-scFv の X 線結晶構造解析を試みた [1]。

## 2 実験

高純度で調製した 73MuL9-scFv の結晶化スクリーニングを行ったが、結晶を得ることはできなかったため、大阪大学の有森らが確立した Fv-clasp 抗体として 73MuL9 を調製した (73MuL9-Fv-clasp) [2]。73MuL9-Fv-clasp は、大腸菌発現系の封入体から回収し、リフォールディングさせた後、ゲルろ過カラムと陰イオン交換カラムにより精製した。GA-pyridine 誘導体の存在下で 73MuL9-Fv-clasp の結晶化スクリーニングを行ったところ、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液の条件で微結晶が得られた。最終的に 52 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>・H<sub>2</sub>O, 1.3 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> の結晶化溶液を用いることで X 線回折実験可能な結晶を得た。X 線回折実験は AR-NE3A で行い、2.6 Å 分解能の X 線回折強度データを収集した。73MuL9-Fv-clasp の結晶は、空間群 P4<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2 に属し、格子定数は  $a = b = 91.2$ ,  $c = 119.8$  Å であった。位相の決定は、プログラム MOLREP を用いた分子置換法により行い、サーチモデルには P20.1 Fv-clasp fragment (PDB ID: 5XCT) を用いた。構造の精密化はプログラム PHENIX と COOT を用いて行い、 $R_{\text{work}}/R_{\text{free}} = 0.214/0.260$  の最終構造を得た。

## 3 結果および考察

GA-pyridine 誘導体の GA-pyridine 部位が 73MuL9-Fv-clasp の抗原結合ポケットに結合していた (図 1)。

GA-pyridine の pyridine 環が抗体の VL 領域にある Tyr96 と  $\pi$ - $\pi$  スタッキング相互作用を形成していた。GA-pyridine のヒドロキシメチル基は VL の Gln89 と VH の Tyr100a とそれぞれ水素結合を、ヒドロキシル基は VH の Asn35 と Tyr47 と 2 本の水素結合を形成していた。また、GA-pyridine の炭素鎖部位と VH の Tyr33、Tyr100a との間には CH- $\pi$  相互作用が見られた。これら数多くの相互作用により、73MuL9-Fv-clasp が GA-pyridine を特異的に認識していることを明らかにした [1]。

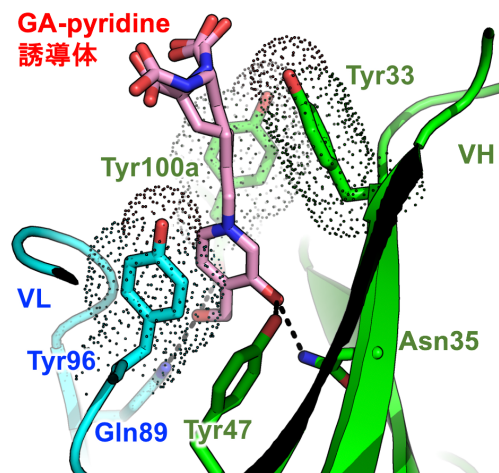


図 1 73MuL9-Fv-clasp と GA-pyridine 誘導体の相互作用

## 謝辞

本研究の X 線回折実験にご協力いただきましたビームラインスタッフの皆様はこの場を借りてお礼申し上げます。

## 参考文献

- [1] Y. Kobashigawa *et al.*, *J. Biochemistry* **170**, 379-387 (2021).  
[2] T. Arimori *et al.*, *Structure* **25**, 1611-1622 (2017).

\* tnaka@gpo.kumamoto-u.ac.jp