

糖ペプチドが結合した抗体の X 線結晶構造解析 Crystal structure of antibody bound to a glycopeptide

鈴木花野¹, 小笠原諭¹, 村田武士^{1,*}¹千葉大学大学院理学研究院, 〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33Kano Suzuki¹, Satoshi Ogasawara¹, Takeshi Murata^{1,*}¹Graduate School of Science, Chiba University, 1-33 Yayoi-cho, Inage-ku, Chiba, 263-8522, Japan

1 はじめに

体内で様々な働きをするタンパク質は糖分子などにより修飾されているが、発現する組織や疾患などにより糖鎖構造が異なる。抗体はエピトーフを介して抗原と結合することができ、この修飾の違いを判別するエピトーフを持った抗体は疾患などのバイオマーカーや医薬品として有用である。

ポドプラニンリンパ管マーカーとして用いられる分子であり、糖鎖修飾が非常に多い糖タンパク質である。また悪性脳腫瘍、悪性中皮腫、肺がん、食道がん、卵巣がんなどで高発現し、がん細胞の浸潤や転移を引き起こすことが知られているため、抗体医薬の標的分子としても期待されている。これまで東北大学の加藤教授らはポドプラニンに対するモノクローナル抗体を数多く作製し、その中に糖ペプチドが主要なエピトーフである糖ペプチド抗体も存在することがわかった [1,2]。このような糖ペプチド抗体の性質を利用し、タンパク質を修飾している糖鎖構造を明らかにすることで関連する生命機能や疾病原因の解明につながると期待されている。そこで今回は抗ポドプラニン糖ペプチド抗体 (LpMab-3) が糖ペプチドに結合した状態の立体構造を原子レベルで明らかにするため複合体の X 線結晶構造解析を行った。

2 実験

糖ペプチドは化学的合成法と酵素学的合成法を組み合わせて大量合成した。LpMab-3 は IgG から抗原部分のみを取り出した LpMab-3-Fab を精製し、合成した糖ペプチドを加えた条件と加えない条件でそれぞれ結晶化を行った。得られた結晶は波長 1.1 Å で X 線回折実験を行い、得られた回折データは XDS で指数付け・積分・スケール処理した。分子置換は Phaser-MR を用い、構造精密化には COOT、Phenix refinement を用いた。

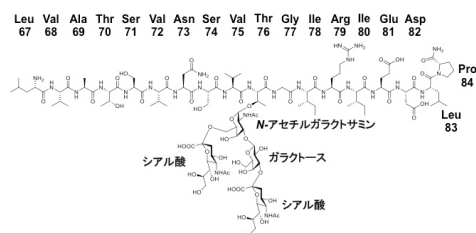


図 1 : 合成した糖ペプチド

3 結果および考察

糖ペプチドを加えなかった LpMab-3-Fab 結晶は空間群 $P2_1$ に属しており、格子定数は $a=53.7$ Å, $b=63.9$ Å, $c=117.8$ Å, $\alpha=90.0^\circ$, $\beta=97.3^\circ$, $\gamma=90.0^\circ$ で分解能 2.13 Å の回折データセットを取得し分子置換を行った。一方糖ペプチドを加えた結晶は空間群 $P2_1$ に属しており、 $a=43.1$ Å, $b=43.0$ Å, $c=221.1$ Å, $\alpha=90.0^\circ$, $\beta=91.4^\circ$, $\gamma=90.0^\circ$ で分解能 2.84 Å の回折データセットを取得し、同じく分子置換を行った。

得られた構造を比較した結果、糖ペプチドを加えた LpMab-3-Fab の結晶中には糖ペプチドの結合が示唆される部分が見つかった (図 1)。

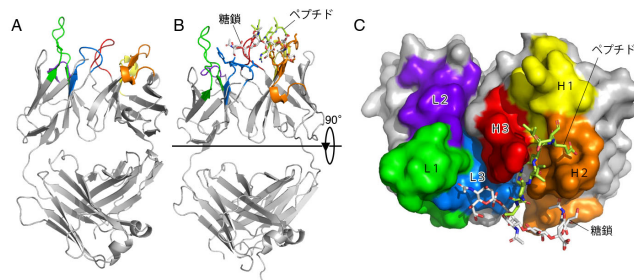


図 1 : LpMab-3-Fab の結晶構造。

(A: 糖ペプチド添加なし。B: 糖ペプチド添加あり。C: B を 90° 回転させた図。糖タンパク質はスティックで表示した。黄緑がペプチド、白が糖鎖)

4 まとめ

得られた糖ペプチドの立体構造はアミノ酸と糖鎖が T 字型に繋がった立体的に大きな構造であった。そして抗体の相補性決定領域 (CDR) に嵌まり込むように結合しており、糖ペプチドの 6 つのアミノ酸と 2 つのシアル酸が CDR と相互作用していた (図 1C)。

この結晶構造により本研究で使用した抗体はその抗原認識の機能を生かし、空間的に広がりを持つエピトーフに対して結合することが明らかとなり、IgG 抗体が低分子型の抗体や抗体以外の結合分子よりも複雑で大きな抗原を認識することができるという優位性を示すことができた。

本研究は Biochemical and Biophysical Research Communications に論文として発表した [3]。

謝辞

X線回折実験を行うにあたり、Photon factory のチームラインスタッフのみなさまに大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Y. Kato, M. A. Kaneko, *Sci. Rep.* **4**, 5924, (2014).
- [2] H. Oki *et al.*, *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* **34**, 44-50, (2015).
- [3] S. Ogasawara *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **533**, 57-63, (2020).

* t.murata@faculty.chiba-u.jp