

## 合成抗原と単クロン抗体を用いた抗原－抗体形成機構の解析

藤原 剛

教養部

1. Tsuyoshi Fujiwara, Koichi Fukase, Shoichi Kusumoto, Fumishige Minagawa and James T. Douglas, Antigen recognition mechanism of anti-PGL-I antibody DZ1, ABSTRACTS of "International Leprosy Congress, Working toward a World without Leprosy", 7-12 September, 1998, p.103A-104A (IM44).

概要；別紙1

2. 藤原 剛、皆川文重、PGL-Iの三糖鎖を認識する単クロン抗体SF1の抗原認識機構の解析、日本ハンセン病学会雑誌、68巻、P.49、1999年

概要；別紙2

(別紙1)

### Antigen recognition mechanism of anti-PGL-I antibody DZ1

PGL-Iの糖鎖を認識する単クロン抗体DZ1は三糖鎖 [O-(3,6-di-O-methyl-β-D-glucopyranosyl)-(1→4)-O-(2,3-di-O-methyl-α-L-rhamnopyranosyl)-(1→2)-(3-O-methyl-α-L-rhamnopyranosyl)-(1→)] の還元末端側の単糖と中央の単糖の一部を認識する特異な抗体であることすでに報告したが、この研究では各種のPGL-I関連の合成抗原を用いてDZ1の認識部位を更に厳密に決定し、これと糖鎖の分子モデリング、NMRによる重水中の糖鎖のコンフォメーションの解析を組み合わせ、DZ1が糖鎖を認識する機構を分子レベルで検討した。

実験に用いたDZ1はマウス腹水から0.2-0.33飽和硫酸分画、プロテインGカラム(pH2.7溶出画分)、NT-P-BSA結合セファロースカラムによるアフィニティクロマトグラフィー(pH2.7溶出画分)で精製した。精製DZ1の糖鎖に対する活性は、化学合成した種々の合成抗原を糖濃度31.4-0.0314nMでマイクロプレートに塗布し、ELISAによって測定した。PGL-Iの三糖の分子モデリングはp-ethylphenolをアグリコンとする三糖をモデル化合物として、計算ソフトにMacromodelを用い、力場：amben\*、溶媒モデル：GB/SA water、温度：300K、United atom、サンプリング時間2 psecでMCSD法によって行なった。

三糖の NMR は 500MHz で重水中で測定した。まず COSY、HMQC、HMBC スペクトルによってすべての  $^1\text{H}$  と  $^{13}\text{C}$  のシグナルを帰属した。次に pNOESY 及び HETLOC スペクトルを測定し  $^3J_{\text{CH}}$  を求め  $^3J_{\text{CH}} = 5.7\cos^2\theta - 0.6\cos\theta + 0.5$  より重水中でのグリコシド結合の二面角を求めた。また pNOESY と HETLOC スペクトルを測定し、NOE から重水中のコンフォメーションを決定した。

精製された DZ1 は還元末端側の二糖を認識した。さらにこの二糖の各糖残基上のメチル基、OH 基について DZ1 が認識するかどうかを、合成部分メチル化二糖抗原を用いて調べたところ、4-OH 基、3-O-メチル基、3'-O-メチル基は認識されるが、2'-O-メチル基は認識されなかった。分子動力学計算によると、エネルギーの低い方から A、B、C の 3 種のコンフォメーション群があり、A と B が約半数ずつ (A : 46.2%、B : 50.3%) で、C はごく少なかった。A と B は非還元末端のグルコース残基の配向が異なるコンフォマーで、DZ1 が認識する還元末端側二糖部分は同じコンフォメーションを持っていた。pNOESY 及び NMR の HETLOC スペクトルから得られた重水中のコンフォメーションは B のコンフォメーションとは良く一致したが、A とは一致しなかった。NOE は B と非常によい一致を示したが、A とは非還元末端残基に由来するシグナルがほとんど一致しなかった。従って水溶液中では大部分が B のコンフォメーションであると結論された。コンフォメーション B では三糖鎖は折れ曲がった形を取り、DZ1 が認識する 4-OH 基、3-O-メチル基、3'-O-メチル基はいずれも折れ曲がった所にできる外部に開いた面上の同一方向に配向する。これに対して、DZ1 が認識しない 2'-O-メチル基、非還元末端残基はこれと 90 度または反対の方向に位置する。これらのことから DZ1 はこの両側から糖鎖に結合するものと結論された。また、これが DZ1 が通常は認識されにくい糖鎖の内側を認識する理由であると考えられた。

表 各コンフォマーの二面角

	$\Phi 1$	$\Psi 1$	$\Phi 2$	$\Psi 2$	$\Phi 3$	$\Psi 3$
Conformer A	49.5	-169.3	47.4	-42.6	37.8	-34.3
Conformer B	52.2	30.3	46.1	-42.5	38.0	-36.5
Conformer C	52.2	29.9	48.8	31.3	38.2	-36.8
	$\pm 44$	$\pm 44$	$\pm 36$	$\pm 44$	$\pm 52$	
(NMR)	$\pm 128$	$\pm 128$	$\pm 135$	$\pm 128$	$\pm 121$	

(各群の中の最低エネルギーのコンフォマーを表示)

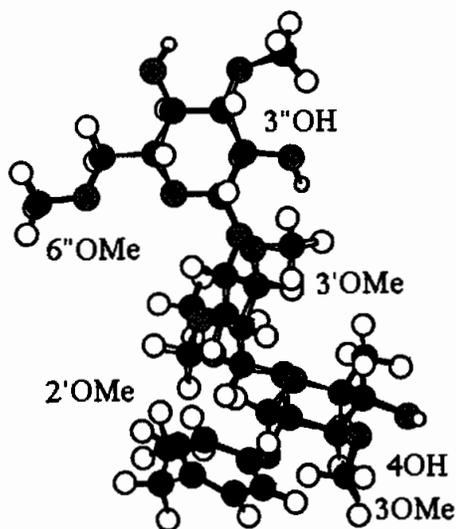
(別紙 2)

#### PGL-I の三糖鎖を認識する単クローン抗体 SF 1 の抗原認識機構の解析

PGL I の三糖鎖の内側の二糖部分を認識する単クローン抗体 DZ1 と三糖鎖の結合様式の解析から、三糖鎖は水溶液中では、図に示すように折れ曲がったコンフォメーション ( $\Phi 1 : 53.8$ 、 $\phi 1 : 29.6$ 、 $\Phi 2 : 47.6$ 、 $\phi 2 : 42.3$ 、 $\Phi 3 : 39.6$ 、 $\phi 3 : -36.4$ 、図) をとり、DZ1 は、その結果

としてできる外部に開いた面の方向から結合する事を報告した。この面には3-O-メチル基、3'-O-メチル基、4-OH基以外に非還元末端の単糖3''、6''-ジ-O-メチルグルコースの3''-O-メチル基が配向するが、6''-O-メチル基は反対側に配向する。従って三糖全体を認識する単クロン抗体SF1は3''-O-メチル基を認識するが6''-O-メチル基は認識しないと考えられる。この点を確認し、それによって上記のコンフォメーションを裏付ける実験を行った。

単クロン抗体SF1はマウス腹水の500倍希釈液を用いた。SF1の糖鎖に対する活性は、合成抗原を糖濃度31.4-0.0314nMでマイクロプレートに塗布し、通常のELISAによって測定した。合成した糖鎖はいずれも三糖で、PGL-Iと同一の構造を持つ三糖鎖 [(3'', 6''-di-O-methyl-β-D-Glc)-(1→4)-O-(2', 3'-di-O-methyl-α-L-Rha)-O-(1→2)-(3-O-methyl-α-L-Rha)-(1→)-OC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOCH<sub>3</sub>] をアシルアジド法でBSAに結合させたNT-P-BSA及びその2'-OH体、3''-O-メチル、6''-OH体、3''-OH、6''-O-メチル体、3'', 6''-OH体の5種類である。三糖鎖の合成は発表済みの方法を一部変更して行い、分子モデリングはコンフォメーションの計算ソフトにMacromodelを用いた。力場は



PGL-I三糖鎖の水溶液中のコンフォメーション

amber\*を(溶媒モデルはGB/SA water)、分子動力学計算にはモンテカルロ法(溶媒モデルはGB/SA water)を用いて行た。三糖のNMR(500MHz)は重水中でHETLOCスペクトルを測定し、<sup>3</sup>J<sub>CH</sub>より重水中での三つのグリコシド結合の二面角を求めた。またpNOESYスペクトルを測定しNOEから重水中の三糖のコンフォメーションを求めた。

単クロン抗体SF1は三糖の2'-OH体と3''-O-メチル、6''-OH体には、もとの三糖であるNT-P-BSAに近い活性を示したが、3''-OH、6''-O-メチル体には弱い活性しか示さなかった。また3'', 6''-OH体にはほとんど活性を示さなかった。従ってSF1は三糖鎖を認識し、非還元末端の3, 6-ジ-O-メチルグルコースについては3''-O-メチル基を認識するが、6''-O-メチル基は認識しない事が明らかになった。これは三糖鎖が分子モデリングとNMRで決定した水溶液中のコンフォメーション(コンフォメーションB、図)が正しく、SF1もDZ1と同じ面から三糖鎖に結合することを示している。