

解説

抗原抗体間相互作用のX線1分子計測と熱測定

佐川琢麻, 東隆親, 佐々木裕次

(受取日: 2007年11月19日, 受理日: 2008年1月12日)

Single-Molecular Detection System with X-ray and Thermodynamics of Antigen-Antibody Interactions

Takuma Sagawa, Takachika Azuma, and Yuji C. Sasaki

(Received November 19, 2008; Accepted January 12, 2008)

Antibody, which is one of the most important proteins for adaptive immunity, has been well studied. In our previous studies, we showed the changes of antigen recognition mechanisms during antibody evolution and the structure changes of antibody with antigen-binding using thermodynamic and kinetic measurements. Since these structure changes were considered extremely small, we investigated the structural fluctuations of a single antibody molecule in real-time and space using a Diffracted X-ray Tracking method with pm-level accuracy. We found that the structural fluctuations of Fab fragments were various on each antibody clone and were suppressed by antigen-binding. In addition, we clarified that the ratio between the antigen-binding and non-binding conditions in the observed structural fluctuations is extremely relative to the binding-affinity or the Gibbs free energy change. These results indicate that the phenomena of antigen-antibody interactions considered stable states can be defined as the results of dynamical processes at the single-molecule level. Such new quantifications from angstrom-level structural fluctuations can be applied to various biological science and biotechnologies.

Keywords: Single-molecular dynamics; X-ray; Antigen-antibody interaction; Thermodynamics; Structural fluctuation

1. はじめに

IgG抗体は、それぞれ重鎖と軽鎖と呼ばれるサブユニットから成る分子量約150 kDaのY字形の蛋白質である。生体内では主に血中や粘膜組織に存在し、病原体など外来異物(抗原)に対して特異的に結合(抗原抗体反応)することで、その後の免疫応答を活性化する役割を持っている。この抗原を特異的に認識する性質(抗原特異性)のため、免疫学における基礎研究はもちろんのこと、検査薬や医薬

品、触媒等への応用研究が現在盛んに行われている。筆者らは、これまで抗原抗体反応における抗原認識機構や、抗体分子の構造変化に着目して抗体の構造と機能の相関を解明すべく研究を進めてきた。本解説では、滴定型熱量計(ITC)や表面プラズモン共鳴(SPR)バイオセンサーによる熱力学的・速度論的解析、さらに最近注目されているピコメートルレベルの位置決定精度を持つX線1分子追跡法(Diffracted X-ray Tracking: DXT法)による分子内構造揺らぎ解析から明らかになった抗体のダイナミクスと機能

との関連性について議論していきたい。¹⁾

2. 抗体の機能とダイナミクス

抗体は免疫後経時的に、また免疫を繰り返すことによって同一個体内で、抗原に対して親和性のより高いものが産生されるようになる（親和性成熟）。これは脾臓など二次免疫器官に存在するB細胞が抗原刺激によって活性化することで、抗体の抗原結合部位をコードする遺伝子領域（可変領域）に高頻度の突然変異（体細胞突然変異）が起き、より親和性の高い抗体を産生できるB細胞クローンが登場することによる。体細胞突然変異による親和性成熟機構、抗原認識機構の変化に関する研究は、高親和性抗体を新規にデザインすることに役立つと期待されている。筆者らは、4-hydroxy-3-nitrophenyl acetyl (NP) を抗原とするマウスモノクローナル抗体を用いて体細胞突然変異による変異の蓄積と親和性の成熟および抗原認識機構変化の関連性について研究を行ってきた。ここで用いたマウス抗NPモノクローナル抗体は、免疫後9週目に得られておりDNA配列解析の結果、同一のクローンを祖先とし、そこから体細胞突然変異によって派生したグループであると考えられている（9T7, 9T8, 9T10, 9T13）。またこれら4種類の抗体は、アミノ酸変異の蓄積度から成熟の途中段階（9T7/9T8）と成熟段階（9T10/9T13）にグループ分けできた。それぞれの抗原結合特性をITC, SPRバイオセンサーにより熱力学的、速度論的に解析を行ったところ、9T7/9T8から9T10/9T13へ成熟が進むことで熱力学的にはエントロピー変化（ ΔS° ）を増加させる方向へ（Fig.1(a)）、速度論的には結合速度定数、解離速度定数ともに減少する方向へ変化していることが分かった。²⁾ これは抗原認識機構がinduced-fit modelから抗原結合による抗原結合部位の構造変化がより少ない（結合反応前後の ΔS° が小さい）lock-and-key modelへ向かっていることを示唆している（Fig.1(b), フログiston参照）。またアミノ酸変異の位置を比較してみると、抗原結合部位というよりはむしろその外側に変異が起きていた。このような変異が抗原結合部位の構造や、重鎖と軽鎖との相互作用安定性に影響を与えているものと考えられる。また各抗体の立体構造上の差は、円二色性分散計では検出されなかったことから、微小で、動的な構造の差がこのような抗原認識機構に影響を与えていると予想された。

抗体には、溶液中に分泌されるもの以外に、B細胞の細胞膜上に局在しているものもある。これは、抗原受容体として機能しており抗原を認識することで細胞内へシグナル伝達しB細胞を活性化する。この抗原受容体のシグナル伝達機構は、複数のエピトープ（抗体への結合部位）をもつ抗原の結合によって抗原受容体同士を架橋すること（Cross-link）がトリガーになっていると考えられている。しかし

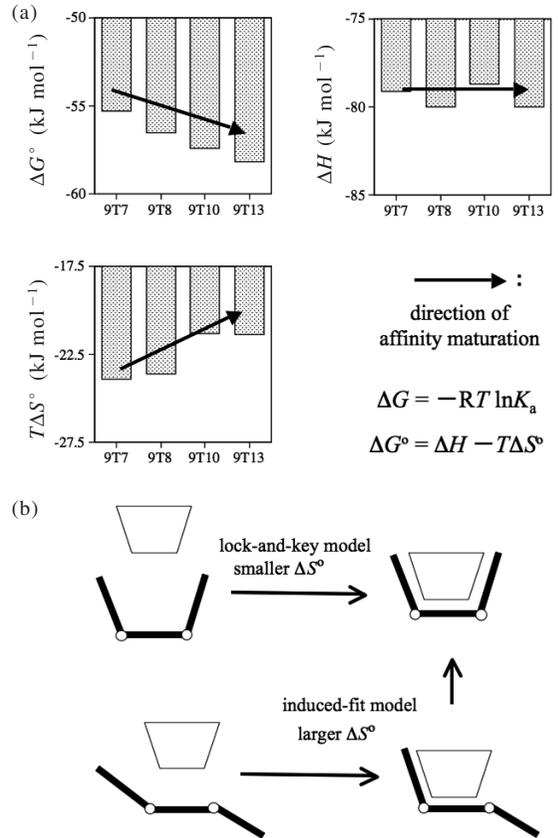


Fig.1 (a) Thermodynamic aspects of 9TX antibodies. The affinity maturation (from 9T7/9T8 to 9T10/9T13) are entropy driven. The data were taken from ITC measurements at 310 K.²⁾ (b) Schematic representation of "induced-fit" model and "lock-and-key" model for the antigen binding. The solid line represents the antigen binding site, and a trapezoid represents the antigen.

ながら世の中に存在する抗原は様々であり、蛋白質抗原をはじめとするエピトープを1分子中に一つしか持たない単価抗原も多く存在する。このような抗原の場合、Cross-linkすることは不可能であり、どのような機構によって抗原受容体はシグナル伝達しているのか、長年にわたり議論されているものの未解明なままである。Cross-linkに代わるシグナル伝達のトリガー機構として、筆者らは抗原結合による抗体分子の構造変化を候補として考えており、これまでに抗体の定常領域を特異的に認識する蛋白質（ブドウ球菌由来のプロテインAや連鎖球菌由来のプロテインG）をプローブ蛋白質として抗原結合による影響を解析した。すなわちSPRバイオセンサーを用いて抗原存在下、非存在下で

抗NPモノクローナル抗体とプロテインAやプロテインGとの相互作用測定をそれぞれ行ったところ、抗原存在下での結合親和性が明らかに低下していた。^{3,4)} 実験原理上、抗原結合によって抗体分子の構造揺らぎ等、詳細な情報は得られなかったものの、抗体定常領域になんらかの構造変化を引き起こしていることは明らかであり、その結果プロテインAやプロテインGとの結合様式に変化をもたらしたのと考えられる。抗体定常領域を認識する蛋白質はこのほかにも、Fcレセプター群や補体などがあり抗体分子との相互作用に抗原結合がどのような影響をもたらすのか今後注目される。

この様に抗体は、抗原認識やその後の抗体分子の構造変化などダイナミクスに富んだ蛋白質であると予測され、実際に分子内で何Å程度動いているのか、さらに詳細な動的構造情報を得る必要性が高まった。

3. X線1分子追跡法による抗原抗体反応の解析

1分子計測の技術はまず可視光において発展し、1980年初頭には生体分子に蛍光分子を標識して分子運動を観察する研究が日本で行われた。一般に1分子計測の位置決定精度は、波長を λ とすると $\lambda/100$ 程度まで可能と考えられている。⁵⁾ 可視領域が300~800 nmであることを考慮すると数nmの位置決定精度を持っていることになる。多くの蛋白質分子が10 nm程度の大きさを持っていると考え、細胞膜上での場所など生体分子の位置情報を得るには可視光でも十分であるが、分子内部の運動を精確に計測するにはX線(2~0.01 nm)の様なさらに短い波長の光源を使用する必要がありDXT法が登場することとなった。⁶⁾ 本計測法はX線が物質に照射されることで起きる回折現象を利用して、その回折スポットがどう移動してゆかを経時的に観察することによって目的生体分子の分子内運動をピコメートルレベルの精度で解析する手法である。Fig.2に簡単な模式図を示した。目的生体分子は、石英基板上にその機能を損なうことなく固定されており、動きを見たい部位に金ナノ結晶(約15 nm)がラベルされている。現在の所、生体分子の基板上への固定化は、アミンカップリング法やHis-tagを介した方法で、金ナノ結晶のラベルは、Cys残基を介した方法で行っている。この様にして作製したサンプル基板にX線を照射することで金ナノ結晶からの回折スポットが得られる。そして目的生体分子が動くとき金ナノ結晶も同期して動き、回折スポットの位置が変化する。ここで注意することは、回折スポットの動きは金ナノ結晶の方位変化を反映している点である。つまり目的生体分子が何Å動いているかを見積もるには、金ナノ結晶のラベルされている位置や、目的生体分子のサイズなどを考慮して回折スポットの方位変化量から計算する必要がある。この変化を

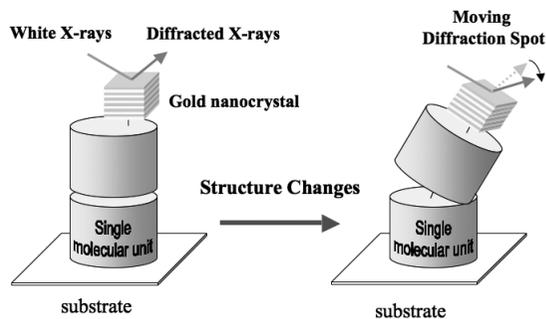


Fig.2 Schematic drawing of the single molecular detection system using X-rays (not to scale). Diffracted X-ray Tracking (DXT) monitors the behavior of a single special domain with the guidance of diffraction spots from the gold nanocrystal which is tightly coupled to the special domain. In DXT, we directly monitor the rotating motions of the labeled gold nanocrystal.

経時的に追跡することで目的生体分子の動きが評価できる。ただし回折現象を観察するにはブラッグの反射条件と呼ばれる式($n\lambda = d\sin\theta$)を満足しなくてはならない(n : 任意の整数, λ : 入射X線の波長, d : 結晶の面間隔, θ : 結晶に対するX線の入射角)。DXT法では、プローブである金ナノ結晶は目的生体分子と同期して動いており結晶に対するX線の入射角は常に変化しているため、それぞれの入射角に対応した波長のX線が必要になる。これは複数の波長が混在したX線源(白色X線)を使用することで解決できるが、日本で白色X線が使用できる場所はそれ程多くなく、SPring-8に代表される放射光施設が必要である。本実験も同施設にあるBL44B2を使用した(ただし現在は、BL44B2では白色X線が使用できないため、準白色であるBL40XUにて研究を行っている)。DXT法による生体分子の解析は、本解説で紹介する抗原抗体反応系以外にも、DNAや、アクチン・ミオシン系、バクテリオロドプシン、主要組織適合複合体、カリウムチャネル、光化学系II等でも行われており、その有用性は、実証済みである。⁷⁻¹¹⁾

本研究では、抗体の分子内構造揺らぎが抗原認識によってどのように変化するのかを明らかにするためDXT法を用いて抗体の分子内構造揺らぎ評価を行った。抗原に対する結合親和性がそれぞれ異なる4種類のマウス抗NPモノクローナル抗体N1G9 ($K_a = 8.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), C6 ($K_a = 8.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), 9T13 ($K_a = 5.1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), E11 ($K_a = 3.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$)を用いた。また抗体をパブリン消化することでFab断片を作製し、1:1の抗原抗体反応を観察できるようにした。Fab断片はアミンカップリング法によりLys残基を介して石英基板上に固定化し、金ナノ結晶は抗原結

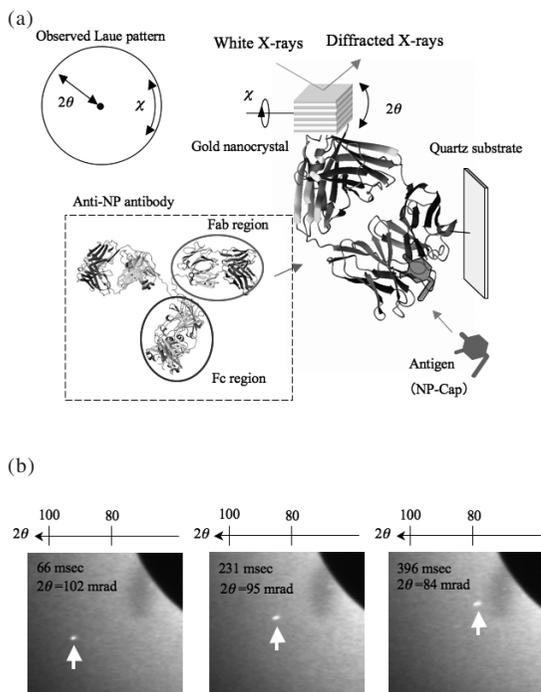


Fig.3 (a) Schematic drawing of the detection system for single Fab molecule with X-rays. The antigen binding region (variable region) and constant region represent dark gray and light gray respectively. The size of gold nanocrystal is approximately 15-20 nm. Structure data were taken from PDB (accession numbers are 1NGP and 11GT). (b) The representative images of Laue spots moving in position frame to frame at 293 K. The Laue spots from individual gold nanocrystals appeared as brightly shining dots.

合部位から最も遠い位置にある Cys 残基にラベルした (Fig. 3(a)). また、生理的環境に近い条件で計測を行うため、サンプルは厚さ数 μm のバッファー層 (50 mM HEPES, pH 7.0) に存在するように工夫している。抗原 (NP-Cap) は最終濃度 0.18 mM となるようにして、平衡論的に全ての Fab 分子が抗原と結合している状態で計測した。X線はパルス波を 2 秒間照射し、ビデオ測定した。Fig.3(b)は、C6 Fab を抗原無しで計測し、165 ms おきのスポット変動の様子を示している。このときのスポット変動量は、50 ~ 90 mrad s^{-1} であった。Fab 断片が剛体のように硬いと仮定すると、Fab 断片の大きさが約 70 Å であることから 6 ~ 11 Å s^{-1} 程度の動きに相当すると見積もられる。しかし、蛋白質は本来非常に柔らかいものであるから、見積もられた値より小さい動きを、DXT 法ではモニターしていること

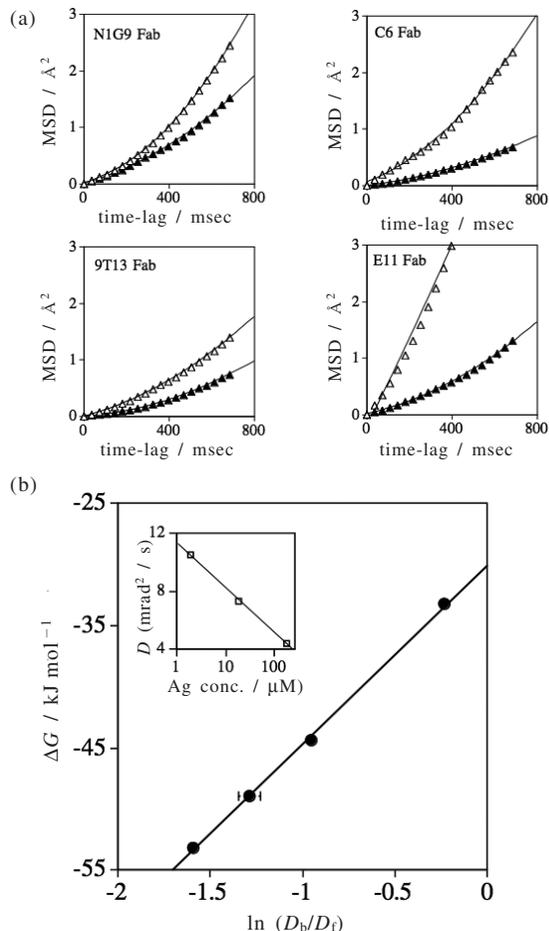


Fig.4 (a) Mean square displacements (MSD) of the gold nanocrystals as a function of time interval in each Fab. Antigen free and bound (0.18 mM) states are indicated by open and closed square respectively. (b) The relationship between $\ln(D_b/D_f)$ and Gibbs free energy change and antigen concentration dependency of the C6 D values (inset). D_b : the D values of Ag binding state, D_f : the D values of antigen free state.

になる。ところで蛋白質の動きには、ピコ秒、ナノ秒オーダーからミリ秒、秒オーダーまで様々な動きが存在するが、本実験で観察されたミリ秒オーダーの動きは、酵素反応やフォールディングなど蛋白質の持つ機能や性質を反映している時間スケールであり、DXT 法は蛋白質がまさに働いている様子を観察できる計測法と言える。この時間スケールでは、NMR を用いてプロトン交換反応や化学シフトの揺らぎから構造上どの部位が動いているのか推測がなされている。DXT 法では、蛋白質の形に関する情報は得られない

めNMRによって得られる構造情報と併せることで蛋白質機能をより深く理解することが可能となる。また本計測法では、X線照射による生体分子へのダメージが懸念されるが、2秒間という計測時間内ではスポット変動量が小さくなくなったり、また逆に急に大きく動いたりすることは観察されず、Fab断片への大きなダメージはないものと評価できた。

この様にして得られる回折スポットがどの程度動いているのか、Mean-square Displacement (MSD) カーブを取ることで詳細に検討してみた (Fig.4(a))。単純なブラウン運動では、 $(\Delta\theta)^2 L^2 - \Delta t$ プロットは直線性を示すが、ある一定方向の流れがブラウン運動に加わっている場合、放物線状のプロットになることが知られている。¹²⁾ 本実験は均一溶液環境下で計測しており、Fab断片も互いに立体障害が起きないように十分離れた位置になるように固定化していることから異常拡散現象は起きていないと考えられる。よって外部から何らかの力が加わっていると考えられるが、これまでの研究において分子の硬さや大きさに影響されることから、ファンデルワールス力やカシミール効果に伴う引力ではなくX線の放射圧に由来していることが分かっている。¹¹⁾ この影響を大きく受けているものほど外からの力に対して柔軟な構造を持っていると考えられる。抗体の場合、抗原存在下でより直線的なプロットとなっていることから抗原結合によって外からの力に対してより堅い構造をとっていると解釈できる。MSDカーブを4種類の抗体と比較してみると抗体によって分子内構造揺らぎに違いが見られることが分かった。定常領域のアミノ酸配列にほとんど違いがないことをふまえると可変領域のアミノ酸配列の違いによって抗体分子全体の分子内構造揺らぎが変化したと考えられる。特に9T13は4種類の抗体の中でもっとも分子内構造揺らぎが小さく、前述したlock-and-key modelの抗

原認識機構を想起させる点が非常に興味深い。抗原無しの状態と抗原有りの状態でMSDカーブを比較してみると今回使った4種類の抗体すべてにおいて、抗原結合状態になることで分子内構造揺らぎは抗原無しの状態と比較して明らかに小さくなっていった。分子間相互作用によって分子同士が安定化し揺らぎが小さくなることは、多分子系の研究で実験的にも理論的にも示されていたが、1分子でそれを観察したのは、本研究が初めてである。抗原認識による抗体の構造変化は、抗体の分子内構造揺らぎを抑制するものであることがFab断片を用いた本実験から明らかとなった。B細胞へのシグナル伝達や、エフェクター機能など抗体の機能とどのように関連しているのかが今後注目される。さらにMSDカーブをfitting解析することでD、V二つのパラメータを算出した (Table 1)。Dは抗体の分子内構造揺らぎを反映し、VはX線の放射圧に対する柔軟性を反映したパラメータである。今回特に注目したのはD値である。抗原が結合するとD値が小さくなるのは、4種類の抗体すべてに当てはまるが、その減衰率は抗原に対する結合親和性が高い抗体ほど大きくなっていることが分かった。抗原結合によるギブス自由エネルギー変化 (ΔG) とD値の減衰率 ($\ln(D_b/D_f)$) を軸にプロットを取ってみると、両者の相関性は非常に良いことが分かる (Fig.4(b))。そしてこのプロットから、

$$\Delta G = -RT \ln K_a = \alpha \ln(D_b/D_f) + \beta$$

という式が導き出される。D値は抗原濃度に依存して変化しており (Fig.4(b) inset)、このことから α は抗原濃度に、 β はその他の計測条件 (測定温度、Fabの固定化法など) に依存するパラメータと考えられる。本研究では、 α と β はそれぞれ、14.7, 30.1 kJ mol⁻¹と見積もられた。さらに式変形をすると、

Table 1 The values of D and V were determined from the plots (Fig.4(a)) of $(\Delta\theta)^2 L^2$ vs the interval times by χ^2 minimization fit for Eq.1. The measured spots are 45 trajectories. $(\Delta\theta)^2 L^2 = 4Dt + (Vt)^2$ (Eq.1) ($L = 70 \text{ \AA}$). The values of ΔG and K_a were taken from ITC measurements.

Name	$D \times 10^{-1} / \text{\AA}^2 \text{ s}^{-1}$	$V / \text{\AA} \text{ s}^{-1}$	$\Delta G / \text{kJ mol}^{-1}$	K_a / M^{-1}
N1G9 free	2.65 ± 0.03	1.67 ± 0.01		
N1G9 + antigen	2.11 ± 0.03	1.18 ± 0.01	-33.5	8.5 ± 1.3 × 10 ⁵
C6 free	3.97 ± 0.03	1.61 ± 0.01		
C6 + antigen	1.54 ± 0.03	1.01 ± 0.01	-44.4	8.2 ± 3.8 × 10 ⁷
9T13 free	2.35 ± 0.03	1.26 ± 0.01		
9T13 + antigen	0.65 ± 0.03	1.09 ± 0.01	-49.0	5.1 ± 6.9 × 10 ⁸
E11 free	9.49 ± 0.07	1.94 ± 0.01		
E11 + antigen	1.93 ± 0.03	1.13 ± 0.01	-53.2	3.0 ± 7.2 × 10 ⁹

The S.D. were based on fitting errors.

$$\ln K_a = -(\alpha/RT) \ln(D_b/D_f) - (\beta/RT)$$

となる。これは、1分子計測による分子内構造揺らぎの変化から平衡論の概念である結合親和性が求まることを意味している。今後抗原抗体反応以外のリガンド-蛋白質系でも同様の測定をして確認を急がなければならないが、大変興味深い事実である。分子間相互作用を1分子レベルで測定するシステムとして蛍光相関分光法（FCS法）を用いた手法がすでに可視光の分野では知られている。¹³⁾ この方法は溶液中の分子ブラウン運動に着目し、結合反応による分子の質量変化に伴う運動速度変化から結合親和性を解析している。DXT法では、分子内部に由来するブラウン運動の変化から結合親和性を求めており、分子運動のスケールは違うもののブラウン運動に着目している点でFCS法は、今後参考にすべき測定手法と言えらる。他にも原子間力顕微鏡（AFM）を利用した方法が1990年代から登場している。¹⁴⁾ もともとAFMの目的は、試料表面と探針に作用する原子間力を検出することで、試料の表面形状を評価することであった。しかし探針に目的生体分子を、基板表面にそれと相互作用するもう一方の分子をそれぞれ固定化することで、その結合特性を破断力として評価できる。この破断力は探針負荷速度依存性があり、分子の熱平衡に由来していると考えられている。つまり1分子レベルでは、分子間相互作用も一定ではなく揺らいでいることを示唆している。DXT法で得られる分子内構造揺らぎとの相関を解析することで、1分子レベルでも揺らぎの少ない安定した結合状態を作り出すにはどのような変異体にすれば良いのか新たな知見が得られると考えている。

4. おわりに

1867年頃スコットランドの物理学者ジェームズ・クラーク・マクスウェルは、分子の動きを観察できる架空の存在を想定し「熱力学第二法則」で禁じられたエントロピーの減少が可能であると提唱した。マクスウェルの悪魔の誕生である。残念ながらこの様な悪魔の存在は現在のところ否定されているが、1分子計測はこの悪魔の目となりうる手法である。すなわち1分子個々の情報を収集し、分類、解析することである。谷口らの最近の研究では、キネシモータの熱運動を1分子レベルで詳細に解析した結果、エントロピー駆動で前進ステップを選択的に行っていることを明らかにしている。¹⁵⁾ 今後この様な1分子レベルでの熱力学がますます重要となることは間違いない。

我々の今後の方向性としては三つのポイントが上げられる。第一に多分子系の解析で良く取り扱われる生体分子間相互作用における熱力学的、速度論的特性とDXT法をはじめとする1分子計測によって観察される1生体分子のもつ特

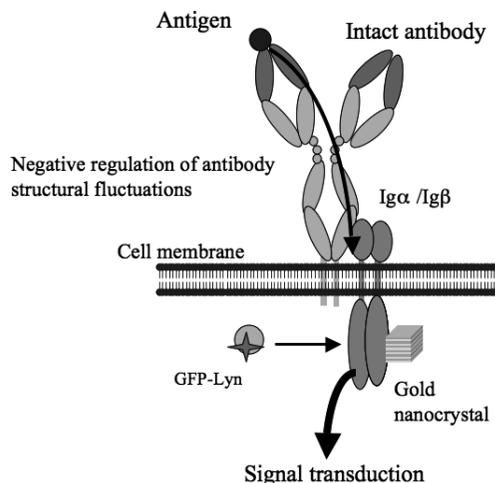


Fig.5 Schematic drawing of the idealistic single-molecule analysis on the living cell. The structural changes of the receptor are measured by DXT, and related signal transduction molecules are monitored by FCS.

性との相関解析である。多分子系の解析では、熱力学的、速度論的特性からその分子間相互作用の特異性や分子認識機構等が議論されているが、1分子レベルのどのような性質が基となっているのかを明らかにしたい。現在、熱力学的特性の一つであるエントロピー変化と分子内構造揺らぎとの相関を明らかにすべく解析を進めている。第二に1細胞を反応場とする1分子解析である。この分野はすでに可視光を用いて細胞内における生体分子局在の様子や分子間相互作用の観察は行われているが、分子内構造揺らぎ等生体分子の微小な動きと生体機能に着目した研究はまだ行われていない。細胞内、細胞膜上に存在する生体分子のリガンド分子との相互作用や分子内構造揺らぎとシグナル伝達等の生体機能との相関をDXT法によって明らかにすべく準備を進めているところである（Fig.5）。細胞を計測の場とすることで、究極的な生理環境が実現でき、生命現象のより深い理解に繋げることができらる。第三は第二のテーマに繋がるものでもあるが、分子内構造揺らぎをコントロールすることによる生体機能の制御である。これまでの手法では、目的蛋白質の変異体を作製する、阻害剤を添加するなどの方法で機能制御がなされてきたが、臨床応用を考えると作製コストの面や、薬剤が患部以外のところへ拡散することで予期しない副作用が発生してしまうといった問題点があった。しかし目的生体分子の分子内構造揺らぎに対して外部摂動を加えることで特異的、能動的に制御することが可能になれば、新たな医療として注目されるに違

ない。ナノレベルの光技術を応用することでこの様なことができないか模索中である。

謝 辞

本研究は、東京理科大学生命科学研究所および高輝度光科学研究センターにて行い、科学技術振興機構戦略的基礎研究推進事業 (JST/CREST) “蛋白質の構造・機能と発現メカニズム” によって行われた研究の一部である。織田昌幸講師 (京都府立大学)、村上明一研究員 (東京理科大学) 両氏をはじめ多くの方々のご協力により行うことができた。この場を借りて感謝申し上げます。

文 献

- 1) T. Sagawa, T. Azuma, and Y. C. Sasaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 770 (2007).
- 2) T. Sagawa, M. Oda, M. Ishimura, K. Furukawa, and T. Azuma, *Mol. Immunol.* **39**, 801 (2003).
- 3) M. Oda, H. Kozono, H. Morii, and T. Azuma, *Int. Immunol.* **15**, 417 (2003).
- 4) T. Sagawa, M. Oda, H. Morii, H. Takizawa, H. Kozono, and T. Azuma, *Mol. Immunol.* **42**, 9 (2005).
- 5) S. Weiss, *Science* **283**, 1676 (1999).
- 6) 佐々木裕次, 放射光 **18**, 165 (2005).
- 7) Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, and T. Ishibashi, *Science* **263**, 62 (1994).
- 8) Y. C. Sasaki, Y. Suzuki, N. Yagi, S. Adachi, M. Ishibashi, H. Suda, K. Toyota, and M. Yanagihara, *Phys. Rev. E.* **62**, 3843 (2000).
- 9) Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, Y. Suzuki, and N. Yagi, *Nucl. Instrum. Methods A* **467** (2001).
- 10) Y. C. Sasaki, Y. Okumura, S. Adachi, H. Suda, Y. Taniguchi, and N. Yagi, *Phys. Rev. Lett.* **87**, 248102 1 (2001).
- 11) Y. C. Sasaki, Y. Okumura, T. Miyazaki, and T. Higurashi, *Appl. Phys. Lett.* **89**, 053121 1 (2006).
- 12) A. Kusumi, Y. Sako, and M. Yamamoto, *Biophys. J.* **65**, 2021 (1993).
- 13) S. Y. Tetin, K. M. Swift, and E. D. Matayoshi, *Anal. Biochem.* **307**, 84 (2002).
- 14) O. H. Willemsen, M. M. E. Snel, A. Cambi, J. Greve, B. G. De Groot, and C. G. Figdor, *Biophys. J.* **79**, 3267 (2000).
- 15) Y. Taniguchi, P. Karagiannis, M. Nishiyama, Y. Ishii, and T. Yanagida, *Biosystems* **88**, 283 (2007).

要 旨

抗体は獲得免疫系の中で最も重要な蛋白質の一つであり、様々な研究が行われている。筆者らはこれまでの研究にお

いて、抗体の親和性成熟に伴う抗原認識機構変化や、抗原結合による抗体分子の構造変化が起きていることを熱力学的、速度論的手法により明らかにしてきた。この様な構造変化は極めて小さいことが予想されたため、ピコメートルレベルの位置決定精度を持つX線1分子追跡法を用いて抗体の分子内構造揺らぎを時分割計測し、評価を行った。その結果、「揺らぎの大きさの絶対値は、抗体の種類によって大きく異なること」、「いずれの抗体でも、抗原の結合によって揺らぎの大きさが抑制されること」が明らかになった。さらに抗原結合による分子内構造揺らぎの減衰率は、抗原抗体間の結合親和性と極めて良い相関性が認められた。これは、分子内構造揺らぎ変化という1分子レベルの特性から平衡論的特性である結合親和性が求まることを示唆している。この様なオングストロームレベルの分子内構造揺らぎによる新しい結合親和性定量法は、生命科学に大きく貢献すると思われる。



佐川琢麻 Takuma Sagawa
東京理科大学 生命科学研究所, Research Institute for Biological Sciences, Tokyo University of Science, TEL. 04-7121-4083, e-mail: tsagawa-9txmabs@xqj.biglobe.ne.jp
研究テーマ：抗原抗体間相互作用解析, 抗体分子の構造揺らぎ計測



東 隆親 Takachika Azuma
東京理科大学 生命科学研究所, Research Institute for Biological Sciences, Tokyo University of Science, TEL. 04-7121-4082, e-mail: tazuma@rs.noda.tus.ac.jp
研究テーマ：免疫化学



佐々木裕次 Yuji C. Sasaki
財団法人高輝度光科学研究センター & 科学技術振興機構 戦略的基礎研究推進事業 佐々木チーム, JASRI & Sasaki-team, Core Research Evolutional Science and Technology (CREST), Japan Science and Technology Agency (JST), TEL. 0791-58-0802 (3931), FAX. 0791-58-2512, e-mail: ycsasaki@spring8.or.jp
研究テーマ：計測方法論