

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成10年度博士課程入学

氏名 村田貴志

指導教官名 山口五十磨

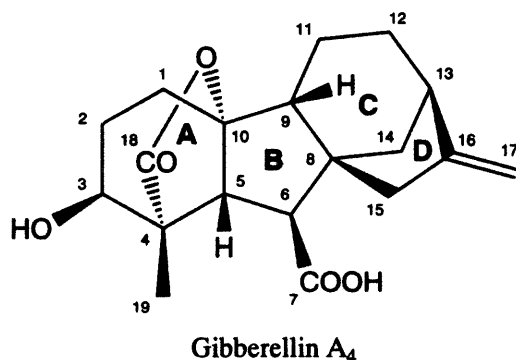
### 論文題目 抗ジベレリン A<sub>4</sub> 抗体の基質認識に関する分光学的解析

本研究は、多くの類縁体が存在するジベレリン (GAs) のうち、受容体に直接認識され、一連の生理作用の発現に関わる数少ない活性型 GAs と、これを特異的に認識する抗ジベレリン A<sub>4</sub> (GA<sub>4</sub>) 抗体 4-B8(8)/E9 の相互作用を分光学的に解析することを目的とした。

イネ馬鹿苗病菌 (*Gibberella fujikuroi*) の生産する病徴誘導物質として単離された GAs は、高等植物に普遍的に存在し、様々な生理現象の調節に関わっていることが明らかにされ、植物ホルモンと見なされるようになった。GAs に関する多くの化学的研究から、今日までに 120 を超える同族体が天然物として単離され、その構造の多様性から構造活性相関にも興味を持たれた。現在では GA<sub>1</sub> に代表される 3β-水酸基、γ-ラクトン、6-カルボキシル基を有し、炭素数 19 の GA<sub>1/3/4/7</sub> が代表的な活性型 GAs として認知されている。他方、これら活性型 GAs に必須な構造的要素を特異的に認識する抗体の調製とその応用が、幾つかのグループにより試みられており、筆者の研究室においても各種 GA に対する抗体を調製し、RIA 法や ELISA 法を用いた

免疫学的手法への応用や、一本鎖抗体 (scFv) 遺伝子の植物への導入による植物の生長制御技術の開発など、分子生物学的手法を用いた応用が試みられている。

これまで、GA<sub>1</sub> や GA<sub>4</sub> などを用いて GA 受容体候補となる GA 結合タンパク質の検索と精製が試みられてきたが、未だ GA 受容体の単離には至っていない。このため、



抗体による植物ホルモンの認識は、タンパク質と低分子化合物との相互作用という観点から、植物ホルモンと受容体との相互作用に比擬される側面を有している。GA<sub>4</sub>を免疫原として調製した本抗体は、各種 GAs に対する交差反応性から活性型 GAs に必須とされる構造的要因であり、且つ受容体との結合に密接に関わっていると予想される 3β-水酸基、6-カルボキシル基を明確に認識していると考えられている。また、本抗体の scFv の構築が試みられたが、抗原に対して結合活性を有した scFv は得られていないことから、この原因を追究し、改良の道を探る上からも、本抗体と GA<sub>4</sub> 複合体の X線結晶解析を行うことは大変有意義である。このような観点から、本研究においては代表的な植物ホルモンである GAs と、これを特異的に認識する抗体との相互作用を表面プラズモン共鳴 (SPR) や NMR、X線結晶解析により解析した。

### 1. 表面プラズモン共鳴法を用いた速度論的相互作用解析

生体分子の相互作用を検出する方法の一つとして、SPR 法が広く用いられるようになった。この方法は結合と解離についての速度論的な解析が行える利点を有する。あらかじめストレプトアビジンを固定したチップ上に、ビオチン標識した GA<sub>4</sub> 誘導体を反応させてセンサー部位を調製した。この系に本抗体から調製した Fab 溶液を供し、その反応量を経時的に追跡した。Fab とビオチン標識 GA<sub>4</sub> の相互作用について、1,000、500、250、125、62.5、31.25 nM の 6 段階の Fab の希釈系列を用いて Kinetics の算出を行い、そのなかで特に信頼性の高いデータを採用し、

$$\text{結合速度定数 } K_{\text{ass}} = 5.4 \times 10^4 \text{ (1/Ms)}$$

$$\text{解離速度定数 } K_{\text{diss}} = 3.4 \times 10^{-3} \text{ (1/s)}$$

$$\text{解離定数 } K_D = K_{\text{diss}} / K_{\text{ass}} = 6.4 \times 10^{-8} \text{ (M)}$$

がそれぞれ得られた。この結果はこれまでに RIA 法を用いて得られている K<sub>D</sub> 値とほぼ同様の値であった。

### 2. NMR を用いた相互作用解析

抗体は Fab フラグメントに消化された状態においてもその分子量は 40,000 を超え、抗体とハプテン抗原の相互作用を、NMR を用いた高次構造の解析を通して理解することは困難である。このような場合、一般に高分子に配位する低分子をプローブと見なし、プローブの化学シフトをはじめとする様々なパラメータを通して、相互作用を解析する手法が用いられている。そこで抗体に配位する GA をプローブと見なし、GA と抗体の相互作用を解析した。

本抗体と結合した場合の、GA<sub>4</sub> のケミカルシフトの変化を検出することを目的に、<sup>13</sup>C 標識酢酸を GAs の生産菌 *G. fujikuroi* に取り込ませて <sup>13</sup>C 標識 GA<sub>4</sub> を調製し、これを用いて GA<sub>4</sub>-Fab 並びに遊離 GA<sub>4</sub> の HMQC スペクトルを測定した。Fab を加えた <sup>13</sup>C 標識 GA<sub>4</sub> の HMQC スペクトルでは、シグナルが全体的にブロード化していた。さらに、Fab を加えたスペクトルには抗体由来と思われるシグナルの他、GA<sub>4</sub> のシグナルと思われる新たなクロスピークが観測された。これらの帰属を行うことはできなかったが、この新たなクロスピークの出現から、本抗体と GA<sub>4</sub> は遅い交換過程にあると推測された。

GA<sub>3</sub>は活性型 GAs である GA<sub>1/3/4/7</sub>のうち、本抗体に対して最も低い親和性を示すことが RIA 法を用いた解析から明らかにされている。したがって、本抗体と GA<sub>3</sub>の交換は速い過程にあることが期待されることから、GA<sub>3</sub>を用いて、本抗体を加えた場合の<sup>1</sup>Hシグナルのケミカルシフトや緩和時間の変化から相互作用を解析した。抗体を加えた場合に緩和時間の減少率の大きい<sup>1</sup>Hは、基本的に抗体の認識に関わる部位であると考えられ、GA<sub>3</sub>の<sup>1</sup>Hについて、縦緩和時間 ( $T_1$ ) と、横緩和時間に同義である回転座標系における縦緩和時間 ( $T_{1\rho}$ ) を測定した。

1mM の GA<sub>3</sub> に対して本抗体を 0.025mM 並びに 0.05mM 加えた<sup>1</sup>H-NMR スペクトルにおいて、期待されたケミカルシフトの変化は観測されなかったが、緩和時間において変化が観察された。 $T_1$ は特に複雑な変化を示し、3 $\alpha$ 位と6位は加えた抗体濃度に対応して $T_1$ の減少が認められたが、そのほかの部位に関しては、 $T_1$ の変化に基づいた相互作用部位の推定は困難であった。一方、 $T_{1\rho}$ は観測できたすべての<sup>1</sup>Hに関して減少が認められ、0.05mM の抗体濃度において、9位の $T_{1\rho}$ が特に大きく減少した。このほか、12-axial位も $T_{1\rho}$ がほぼ1/2になっていた。9位と12-axial位の<sup>1</sup>HはいずれもGA<sub>3</sub>骨格上のC環 $\beta$ 面に配向しており、本抗体は少なくともC環 $\beta$ 面を認識する可能性が高いことが示唆された。また同様に5位についても $T_{1\rho}$ の減少が他の<sup>1</sup>Hの $T_{1\rho}$ と比較して大きく、この部位の結合への関与も示唆された。しかしながら、本抗体との相互作用に必須の構造的要因と考えられているGAの3 $\beta$ -水酸基と6-カルボキシル基については、抗体との結合による影響が3 $\alpha$ 位や6位の $T_{1\rho}$ には反映されなかった。

### 3. X線結晶解析による相互作用解析

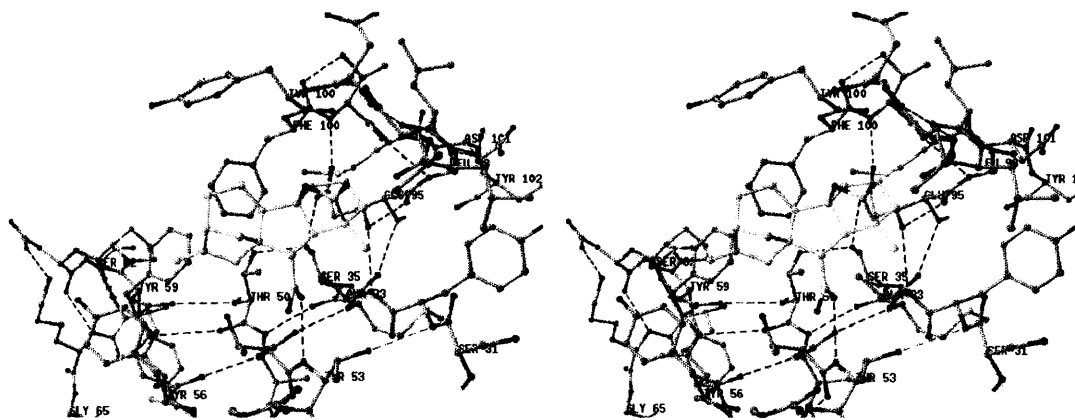
Fab-GA<sub>4</sub>複合体の結晶は、約8mg/mlのFab溶液(10mM Tris-HCl, pH 7.0)にモル比換算で2倍量のGA<sub>4</sub>を加え、20% (v/v) glycerol, 12% (w/v) polyethylene glycol (PEG) 3350、0.06M Bis-Tris (pH 6.5)をリザーバー溶液として、sitting drop 蒸気拡散法を適用して得た。結晶の回折強度データは高エネルギー加速器研究機構の放射光施設で窒素気流下の低温条件下で測定し、分解能2.7Åまでの反射データを収集した。構造決定は本抗体と同じクラスのマウスFab抗体のFv領域を、本抗体のFv領域と相同性の高いFv抗体 anticancer antibody B1に置換したものをサーチモデルとして用い、分子置換法によって行った。結晶学的な精密化を行い、最後にGA<sub>4</sub>を構造モデル中にあてはめ、分解能2.8Åまでの反射に対して結晶学的R因子23.4%、 $R_{free}$ 因子29.6%まで精密化した。

本抗体Fabフラグメントの構造は、すべての抗体に共通の構造として認められているイムノグロブリンフォールドを有し、これを土台として抗原との結合に関与する軽鎖と重鎖の計6個の相補鎖決定領域(CDR)がループを形成していた。本抗体重鎖の第3の超可変領域(CDR-H3)は12残基から構成され、非常に特徴的なループ構造を形成していた。特にGlu95Hの主鎖アミノ基とThr100CHの主鎖カルボニル基間に認められた水素結合によって、この両残基間の8残基が円を描くような構造になっていた。一般にハプテン抗原は、抗体中央に位置するイムノグロブリンフォールドが形成するくぼみの中で結合するとされているが、本抗体においてはハプテン抗原であるGA<sub>4</sub>は3個の重鎖CDRsに取り囲まれ、軽鎖CDRsはGA<sub>4</sub>の認識に直接関わっていないことが明らかとなった。

本抗体と GA<sub>4</sub> の相互作用について、GA<sub>4</sub> の 3β-水酸基から Glu95H の主鎖カルボニル基と、Ala33H の主鎖アミノ基との間に 2 個の水素結合の形成が認められ、3β-水酸基が抗原認識の主要なターゲットであることが明らかにされた。一方、GA<sub>4</sub> の 6-カルボキシル基と Thr53H の主鎖アミノ基の間に水素結合が形成されており、6-カルボキシル基と抗体の抗原結合部位は密に接触していた。GA<sub>4</sub> の C/D 環の認識には 4 個の芳香族アミノ酸側鎖が関わり、特に Phe100BH の側鎖芳香環は GA<sub>4</sub> の C 環 β 面に対してほぼ平行に接触した状態になっており、基質認識に重要であると考えられた。CDR-H3 に属する Tyr100AH と Phe100BH は互いに作用し合って抗原結合部位の底部を形成し、CDR-H2 の 2 個の芳香族アミノ酸 Tyr56H、Phe58H とともに抗原結合部位に疎水的な領域を提供して、GA<sub>4</sub> の C/D 環との結合にはたらいっているものと考えられた。さらに、CDR-H3 に属する Leu98H と Leu99H は抗原結合部位の上部に位置し、蓋のような役割をしていることから、これも抗原に対する親和性の上昇に寄与すると考えられた。

#### 4. まとめ

上述のように、抗 GA<sub>4</sub> 抗体 4-B8(8)/E9 の基質認識の特異性を分光学的に解析した。このうち、NMR 法を用いた解析により得られた緩和時間の変化が、これまで一般的に行われてきた交差反応の解析結果に対応して、相補的な役割を担えることを示した。一方、Fab-GA<sub>4</sub> 複合体の結晶構造から、両者の相互作用を視覚的に理解することができた。これらの知見を基に今後、本抗体を母核にして、分子生物学的手法を用いて特定の GA を認識する scFv を構築してゆくことが可能になると考える。さらに scFv 遺伝子を植物体内で発現させ、植物の生長制御や GA の機能解析に応用していく上で重要な情報を与えるものと期待する。



Antigen-combining site of the antibody 4-B8(8)/E9