

[別紙2]

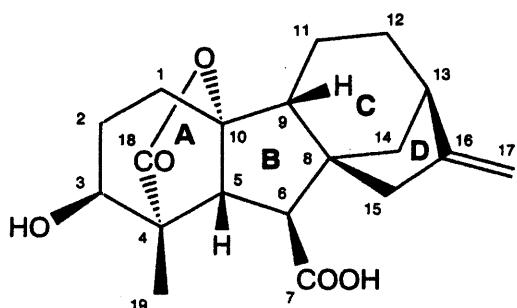
## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 村田貴志

本研究は、代表的な植物ホルモンであり、120種を超える同属体からなるジベレリン(GAs)のなかで、数少ない活性型の一つとされているジベレリンA<sub>4</sub>(GA<sub>4</sub>)と、これを特異的に認識する抗GA<sub>4</sub>抗体4-B8(8)/E9との相互作用を分光学的に解析したものであり、序章を含む4章と総括より構成されている。

序章では、研究の背景、ならびに本研究の目的と意義について述べている。

第1章では、GA<sub>4</sub>と抗体4-B8(8)/E9との結合に関して、BIAcoreを用いた速度論的な解析を行っている。センサー部分にGA<sub>4</sub>を固定する方法として、ビオチン標識GA<sub>4</sub>を用いている。すなわち、あらかじめストレプトアビシンをアミド結合によりセンサー表面に固定し、これにビオチン標識GA<sub>4</sub>を反応させて固定している。この系に抗体4-B8(8)/E9から調製したFabフラグメント溶液を供し、その反応量を経時的に追跡することにより、結合速度定数K<sub>ass</sub>=5.4×10<sup>4</sup>(1/Ms)、解離速度定数K<sub>diss</sub>=3.4×10<sup>-3</sup>(1/s)、解離定数K<sub>D</sub>=6.4×10<sup>-8</sup>(M)をそれぞれ得た。この結果は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り、この方法を用いて、抗体と抗原の親和性を短時間に求めることができることを示した。BIAcoreは、本質的にセンサー部分の質量の増減を感知する、表面プラズモン共鳴法を利用した解析法であることから、低分子化合物への応用には不向きであり、解析例も少ない。しかしながら、本研究において、低分子化合物であるGA<sub>4</sub>をセンサー部位に固定することにより、信頼性の高い相互作用解析を行うことに成功し、BIAcoreをハプテン抗体の特異性の解析法として利用できることを示した。



Gibberellin A<sub>4</sub>

第2章では、抗GA<sub>4</sub>抗体とGA<sub>4</sub>との相互作用をNMR法により解析するにあたり、低分子化合物と高分子タンパク質との相互作用という観点から、低分子プローブ法を利用し、様々なパラメータの変化を指標にGAsの相互作用部位の特定を試みている。特に相互作用解析に配位子であるGAに、GA<sub>4</sub>のアナログであり、抗体と結合したGAと遊離GAとの交換速度の大きいGA<sub>3</sub>を用いることにより、系内に過剰量加えたGA<sub>3</sub>との間で平均化された<sup>1</sup>H核緩

和時間を求め、抗体無添加時の個々の  $^1\text{H}$  核の緩和時間からの変化について検討を加え、相互作用部位を特定することを試み、回転座標系における縦緩和時間( $T_{1p}$ )が有効であることを示した。 $T_{1p}$  の減少率から 9 位と 12-axial 位が相互作用部位であることを示し、この 2 個の  $^1\text{H}$  はいずれも GA<sub>3</sub> 骨格上の C 環  $\beta$  面に配向していることから、抗体 4-B8(8)/E9 は少なくとも GA の C 環  $\beta$  面を認識する可能性が高いことを示した。また、同様に 5 位についても  $T_{1p}$  の減少率が他の  $^1\text{H}$  の値と比較して大きく、この部位の結合への関与をも示唆した。このことは、限られた種類の GAs を用いることしかできなかったイムノアッセイによる交差応応解析から明らかにできなかった情報であり、NMR 法が抗体によるハプテンの認識部位について新たな情報をもたらし得ることを示した。

第 3 章では、抗体 4-B8(8)/E9 Fab フラグメントと GA<sub>4</sub> 複合体の X 線結晶構造解析を行っている。複合体の結晶構造は分解能 2.8 Åまでの反射に対して結晶学的  $R$  因子 23.4%、 $R_{\text{free}}$  因子 29.6%を得ている。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認識され、軽鎖と重鎖の 6 個の相補鎖決定領域(CDR)が結合に関わるとされているが、本研究で用いた抗 GA<sub>4</sub> 抗体は、重鎖の 3 個の CDRs が抗原結合部位を形成し、軽鎖 CDRs は GA<sub>4</sub> の認識に直接関わっていないというユニークなハプテン認識様式を持っていた。抗体 4-B8(8)/E9 の GA<sub>4</sub> の認識においては、GA<sub>4</sub> の 3 $\beta$ -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形成された 2 個の水素結合と、また 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形成された水素結合が重要であることが明らかになった。また 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、そのなかでも重鎖 3 番目の CDR (CDR-H3) に属する Phe100H の側鎖芳香環は、GA<sub>4</sub> の C 環  $\beta$  面に対してほぼ平行に接触した状態になっており、基質認識に特に重要であることを示した。CDR-H3 に属する Leu98H と Leu99H は抗原結合部位の上部に位置し、蓋のような役割をすることにより抗原に対する親和性の上昇に寄与していることを示唆した。

総括では、本研究を要約して得られた研究成果をまとめている。

以上、本研究は、抗 GA<sub>4</sub> 抗体 4-B8(8)/E9 の基質認識の特異性を、BIAcore、NMR、X 線結晶解析を用いて分光学的に解析したものである。本研究により得られた知見は、抗体 4-B8(8)/E9 を母核にして、植物体内において GAs の作用を人為的に抑制する手法の一つとして有効な、scFv を構築するための基礎的な知見を与えるものである。よって、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。

