

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 永揆

抗体はその多様な認識特性から、様々な物質の分析・検出系として、イムノアッセイ、Western、免疫染色等に用いられる他、アフィニティーカラムなどの精製手段にも多用されている。低分子脂溶性物質である植物ホルモンの研究においても、それぞれの分子を特異的に認識する抗体の調製が行われ、酵素標識イムノアッセイ（ELISA）やラジオイムノアッセイ（RIA）による高感度分析系も開発されている。また、遺伝子工学技術の発達に伴い、組換え型抗体の生産が可能になり、種々のモノクローナル抗体産生ハイブリドーマよりクローニングした抗体遺伝子を用い、一本鎖抗体（scFv）と呼ばれる組換え型抗体を作成し、様々な用途に用いる研究も展開されている。scFvは抗原結合部位（Fv）を構成する重鎖（H鎖）と軽鎖（L鎖）の可変領域 V_H 、 V_L を可動性の高いペプチドで結合したもので、一分子でFvを構成するため、植物など他生物における発現に利点がある。

本論文は、受容体に認識される活性型ジベレリン（GA）を特異的に、かつ高い親和性を持って認識する抗活性型GA scFvを構築するとともに、これを用いた新規なGA検出系の構築を目的として行われた研究をまとめたもので、序論と2章、総括から構成されている。

序論では、植物ホルモンに対する抗体の抗体工学的研究の歴史に触れ、本研究の背景と意義について述べている。

第一章では、様々な検討にも拘わらず抗原結合能を有するscFvの調製が困難であったGA₁やGA₄等の活性型GAに対するscFvを、*in vitro*での分子進化的な手法を適用して調製した結果について述べている。定法により構築した抗活性型GA scFvが結合活性を示さないのは、 V_H 、 V_L をタンデムに結合したことにより生じたひずみが原因と考え、scFvにランダムな変異を導入したライブラリーを作成し、活性を保持する変異を持ったクローンを選抜した。Cadwell et al.の方法に従い、エラーの生じやすい条件でPCRを行い、2種の抗活性型GAモノクローナル抗体（8/E9, 21/D13）産生ハイブリドーマより調製したscFv遺伝子にランダムな変異を導入した。これを繊維状ファージのコート蛋白質の一つgIIIpとの融合蛋白質として発現させた。パニング操作によりBSA-GA₄結合性のscFv発現ファージを濃縮した。2回のパニングによりファージのタイターは、8/E9, 21/D13のいずれの場合も、1回目の約千倍に増加した。また、この結合は過剰のGA₄により阻害され、GA₄特異的scFvが得られたと判断した。また、ファージ提示型として陽性を示した全てのクローンでscFv部位においてE2Gの置換、あるいはGluのコドンの一塩基が欠失してフレームシフトを起こしているのに加え、少なくとも、もう一つのアミノ酸置換が認められた。2位のアミノ酸は、大腸菌内で切断されるシグナルペプチドのC末端に位置することから、E2G置換はシグナルの切断効率に対する影響と考えられた。元の配列に人為的にE2G置換のみを導入したところ、ファージ提示型では8/E9, 21/D13ともに抗原結合能を示した。しかしながら、これらの可溶性scFvは蛋白質は抗原との結合能を示さなかった。ファージ

上での提示が、scFvに結合活性を持たせる様な構造的な変化を生じたものと考えられる。21/D13では、フレームシフト変異のみを有するクローンしか得られず、結合能を示す可溶性scFvが得られなかったため、フレームシフト変異のみを持ちながらファージ提示型としては陽性を示したクローンに、E2G置換を人為的に導入し正しいフレームとした結果、結合能を有する可溶性scFvが得られた。

第二章ではV_HおよびV_Lのリガンド依存的な会合を利用した新規なGA検出系の確立を試みた結果について述べている。活性型GAに対する組換え型抗体scFvの生産を踏まえ、V_HとV_Lがリガンド依存的に会合する性質に着目し、活性型GAの新規な検出系の確立を試みた。IgGではV_HとV_L部分同士のアフィニティーは弱く、リガンドとの結合によるコンフォメーション変化を通して、お互いのアフィニティーが増加することが知られている。

まず、8/E9, 21/D13のV_H, V_Lをそれぞれ繊維状ファージのコート蛋白質であるgIXp, gVIIpとの融合蛋白質としてファージの一端に提示させたところ、BSA-GA₄との結合能が確認された。gIXpとgVIIpは隣接していることから、V_HとV_Lを立体的に近い位置に発現させれば、両者はリンカーで結合していなくても会合し、抗原結合能を示すことが明らかとなった。次にV_HをgIXpとの融合蛋白質としてファージ上に提示させ、V_Lを可溶性蛋白質として培養液中に分泌させて生産し、リガンド依存的なV_H, V_Lの会合の検出を試みた。しかしながら、回収したファージからはV_H-gIXp融合蛋白質が検出されが、ペリプラズム画分、培養液ともにV_Lは検出されず、V_L単独での発現は不安定であると考えられた。そこでV_LをGSTとの融合蛋白質として発現し、精製後、ファージ上に提示したV_Hとリガンド依存的に会合するか否かを解析した。その結果、GA₄存在下で会合量の増加が認められた。しかしながらGA₄非依存的な会合に比べて依存的な会合量は十分には高くなく、このままではGAの高感度分析に用いることは困難であると考えられた。

次に、より目的に適ったクローンのスクリーニングが将来的に可能な系の確立を視野に、大腸菌内におけるV_H, V_LのGA₄依存的会合をPCA (protein complementation assay) により検出する系の構築を試みた。本研究では大腸菌のコロニーを視覚的にスクリーニング出来る様、GFPをN末端側 (NGFP) とC末端側 (CGFP) の2つに分割し、それぞれにV_H, V_Lを融合蛋白質として発現させた。還元酵素が欠損したOrigami株を用い、NGFP-V_HおよびV_L-CGFPの発現ベクターを同時に導入した。その結果、GA₄存在下で培養した大腸菌はGA₄非存在下で培養した大腸菌に比べて、蛍光顕微鏡下で明らかに強いGFP蛍光を与え、GFPを用いたV_H, V_LによるPCAが可能であることを示すとともに、よりS/N比が高く、感度の良いクローンを選抜できる可能性を示唆している。さらに、S/N比、感度などの問題をクリア出来れば、植物におけるジベレリンの局在を検出する系へと適用できる可能性も期待できる。

以上、本論文は分子進化的な手法を用いて、結合活性を有さないscFvより結合活性を有する抗活性型ジベレリン一本鎖抗体の調製に成功するとともに、ジベレリンの新規検出への応用を検討し、その可能性を明らかにした。これらの成果は学術上、応用上貢献するところが少なくない。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。