

[成果情報名] NMRにおける飽和移動差スペクトル (STD)法によるジベレリンのエピトープ解析

[要 約] 核磁気共鳴 (NMR) における飽和移動差スペクトル (STD) 法を用いることにより、抗体に結合する植物ホルモンジベレリン (活性型ジベレリン) を迅速にスクリーニングし、抗体との相互作用部位の同定も可能になる。

[部 署] 食品総合研究所・分析科学部・状態分析研究室

[連絡先] 状態分析研究室 029-838-8033 hemmi@nfri.affrc.go.jp

[成果区分] 参考

[キーワード] saturation transfer difference (STD)、飽和移動差スペクトル法、核磁気共鳴、NMR、エピトープ解析、ジベレリン

[背景・ねらい]

ジベレリン (GA) は、植物の伸長生長などに関与する植物ホルモンで、120種類を超える類縁化合物が存在する。しかしながら、そのうちの数種のみ (活性型 GA) が、GA レセプターに作用し、生理活性を発現すると考えられている。GA レセプターは、未だ同定されていないため、GA レセプターのように活性型 GA を特異的に認識する抗 GA 抗体を用いて研究が行われている。その抗 GA 抗体に対する各種ジベレリンの結合活性及び抗体認識部位については、これまで交差反応解析法により行われてきたが、その操作は煩雑でしかも時間がかかるため、より効率的な測定法が求められていた。最近、核磁気共鳴 (NMR) を用いたリガント - タンパク質間におけるリガント側の認識部位 (エピトープ) 解析法として、飽和移動差スペクトル (STD) 法が開発され、主に糖 - タンパク質間における糖側のエピトープ解析が行われてきた。そこで、この STD 法が、抗 GA 抗体に対する GA の結合活性及びエピトープ解析を簡便かつ短時間で行うことが可能かどうか検討を行った。

[成果の内容・特徴]

1. 活性型 GA である GA₃ (図 1 A) と抗 GA 抗体との混合液 (混合比 = 100 : 1) について、リファレンスとして通常の 1 次元 NMR スペクトル (図 1 B) と STD 法による NMR スペクトル (STD - NMR スペクトル) を測定した (図 1 C)。STD - NMR スペクトルにおいては、GA₃ 由来のシグナル以外観測されなかったことから、抗体との結合活性を持つ活性型 GA のスクリーニングに応用可能であると考えられた。
2. STD 法では、タンパク質との距離が近いリガントの部位ほどタンパク質からの磁化移動率が大きいという現象を利用して、エピトープ解析を行う。そこで、STD - NMR スペクトル中の GA₃ 由来の各シグナルの面積積分値から抗体認識部位を推定した (図 2)。図 2 で示してあるように、抗体は GA₃ の A, B, C の各リングを認識し、D リングを認識していないこと、さらに、GA₃ の 表面側が抗体との結合に重要であることが分かった。この結果は、すでに結晶構造解析により報告されている GA の抗体認識部位と非常に良い一致を示し、STD 法により容易に抗 GA 抗体との認識部位を解析可能であることが示された。
3. 本法において、サンプル調製は基本的に GA と抗体を混合するだけで、また STD - NMR スペクトルの測定は数十分で終了することから、簡便かつ短時間でエピトープ解析用のデータを取得できる。

[成果の活用面・留意点]

本法は、GA 以外の植物ホルモンのタンパク質との相互作用解析にも応用可能である。ただし、STD - NMR スペクトルは感度が低いため、高感度の NMR 装置が必要である。

[具体的データ]

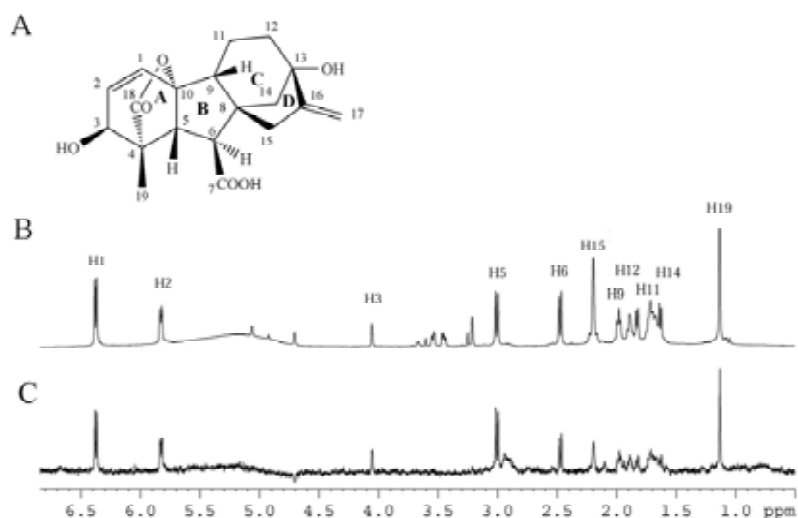


図1 . GA₃ の化学構造 (A)と GA₃ と抗ジベレリン抗体との混合液 (100:1)のリファレンス NMR スペクトル (B)と STD - NMR スペクトル(C)

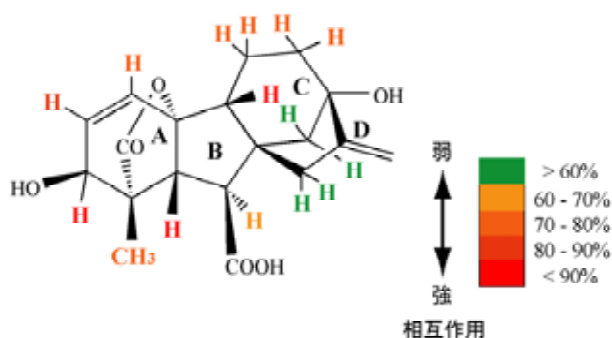


図2 . GA₃ の STD - NMR スペクトルの各プロトンシグナルのシグナル強度
抗体との相互作用が強い方を赤色で示しており、緑色側に行くほど相互作用が弱くなる

[その他]

研究課題名：核磁気共鳴 (NMR) 法による有用タンパク質の構造解析及び機能との相関の解明

予算区分：経常

研究期間：2003 ~ 2005 年度 (2004 年度)

研究担当者：逸見光、村田貴志、中嶋正敏 (東京大学大学院農学部)、吉田充、山口五十磨 (東京大学大学院農学部)

発表論文等：

- 1) Murata T, Hemmi H, Nakajima M, Yoshida M, Yamaguchi I : Epitope mapping of gibberellin to the anti-gibberellin A₄ monoclonal antibody by saturation transfer difference NMR spectroscopy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **307**, 498-502(2003)
- 2) Murata T, Hemmi H, Nakamura S, Shimizu K, Suzuki Y, Yamaguchi I : Structure, epitope mapping and docking simulation of a gibberellin mimic peptide recognized by an anti-gibberellin A₄ monoclonal antibody 4-B8(8)/E9, in preparation