

**京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書**

2019年4月19日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団
会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 農学研究科

職 名 准教授

氏 名 吉永 新

助 成 の 種 類	2018年度 ・ 研究活動推進助成		
申請時の科研費 研究 課 題 名	リグニン-多糖複合体(LCC)に対するモノクローナル抗体の作製		
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	リグニン中の5-5'型結合に対するモノクローナル抗体の作製		
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名)		
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等)		
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円	
	使用した助成金額	1,000,000 円	
	返納すべき助成金額	0 円	
	助成金の使途内訳	費 目	金 額
		マイクロプレートリーダー	540,000円
		凍結保存容器	147,960円
		モノクローナル抗体作製作業費	105,840円
	モノクローナル抗体作製作業費(予定)	105,840円	
	抗体作製関連消耗品費(予定)	100,360円	
当財団の助成に つ い て	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 今回は助成いただき、ありがとうございました。昨今の傾向として、すぐに役に立つ研究への予算配分が優先される中で、基礎的研究にも門戸を開く本助成は本当に貴重です。今後とも引き続き幅広い分野での助成が続いていくことを願っております。		

研究内容

木材をはじめとする木質バイオマスの細胞壁は繊維状のセルロースマイクロフィブリルとヘミセルロース、リグニンが複雑に複合した構造をとっています。その複合状態は木材をはじめとする木質バイオマスを有効に利用するために重要な基礎的情報と言えます。しかしながら、細胞壁の中で相互の成分がどのように複合しているかについては不明な点が数多く残されています。これまでの様々な研究によって、リグニンと多糖類の間にはいくつかの結合があることが示唆されています。その1つについては近年 NMR を用いた分析によって証明されておりますが、その他の結合に関しては直接的にその存在を証明した例は見られません。モデル化合物と細胞壁の二次元 NMR スペクトルの比較と、結合に特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた細胞壁中での分布の可視化を組み合わせることによって、細胞壁におけるそれらの結合の存在をより直接的に証明することが可能となります。

申請者はこれまで、木材細胞壁の主要成分の一つであるリグニン中の 8-5'型、8-8'型、8-O-4'型構造を含んだモデル化合物をタンパク質と結合させ、その複合体を抗原として、それらの結合に特異的に認識するモノクローナル抗体を3種類作製してきました。それらの抗体は様々な細胞壁におけるリグニン化学構造の分布を可視化するための有効なツールとして利用されています。その経験をもとに、リグニンと多糖類の間の結合を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、木材をはじめとするバイオマス細胞壁中でのリグニンと多糖類の間の結合の存在を直接的に証明したいと考えています。

研究成果

申請書には「リグニン-多糖複合体(LCC)に対するモノクローナル抗体の作製」として記載いたしましたが、抗原作製に必要な LCC モデル化合物の合成（森林科学専攻生物材料化学研究室高野俊幸教授に依頼）が難航し、予想外に時間がかかることが明らかになりました。一方、リグニン中には様々な結合様式があり、そのうちで、リグニン中の芳香核同士が炭素-炭素結合によって結合した 5-5'型結合は分解に対して抵抗性を持つので、これまでの分解法を主体とするリグニン分析法では十分に評価されていません。そこで、この重要な結合様式である 5-5'型結合に対するモノクローナル抗体の作製を試みました。5-5'型のリグニンモデル化合物にタンパク質（牛血清アルブミン）を結合させて抗原を調製し、MALDI-TOF MS を用いて結合量を評価しました。その結果、タンパク質1分子あたり 4-5 個モデル化合物が結合した複合体を調製することができました。調製した複合体を用いて外部委託によりマウスモノクローナ

ル抗体の作製を試みました。その結果、残念ながら、複合体中のモデル化合物の部分に反応する抗体の産生が確認されず、その後の作業を中断いたしました。現在、抗原の設計を見直し、これまでに別の結合様式に対する抗体の作製に用いた方法を参考にして、5-5'型の別のモデル化合物にスペーサーを入れた形でタンパク質複合体を調製するための反応条件を検討中です。

本研究経費はモノクローナル抗体作製作業費（特異抗体産生の確認まで）、抗体の特異性を調べるための新規マイクロプレートリーダーの購入（故障した現有装置の更新）、確立したハイブリドーマを液体窒素中で凍結保存するための凍結保存容器の購入に使わせていただきました。今後、5-5'型抗原の調製と解析のための消耗品費、新規に合成した抗原を用いたモノクローナル抗体の作製作業費（特異抗体産生の確認まで）に使わせていただきたいと思いますと考えております。

今後の見通し

5月中をめどに新しく抗原を調製し、本助成の経費で外部委託によりもう一度モノクローナル抗体作製（特異抗体産生の確認まで）に挑戦する予定です。特異抗体を産生するクローンが得られれば、別予算によりモノクローナル抗体の作製（細胞融合、スクリーニング、クローニング、抗体産生ハイブリドーマの確立）を行う予定です。今年度中には5-5'型構造に特異的に反応するモノクローナル抗体を得たいと考えております。もし特異的な抗体が得られれば、これまでに作製した抗体と合わせて、リグニン中の主要な構造に特異的に反応するモノクローナル抗体が揃うことになり、様々な研究用途に使用することが可能となります。

本助成の申請課題である LCC に対するモノクローナル抗体作製に関しましては、科研費（挑戦的研究（萌芽））に申請しており、6月末に結果が開示される予定です。LCC モデル化合物の合成ができれば、今後抗体作製に挑戦したいと考えております。

本助成で購入したマイクロプレートリーダーや凍結保存容器は、今後作製したモノクローナル抗体の特異性の検討や、確立したハイブリドーマの保存に役立たせていただきます。