

審査の結果の要旨

氏名 前田 真吾

本研究では、親和性を向上させたフレームワーク改変抗体の認識機構について、速度論的や熱力学的観点から議論を試み、分子動力学計算により結合速度定数向上に関する動的構造の変化を明らかにし、親和性向上における分子認識機構の解明を試みている。本論文は抗体分子の親和性改変エンジニアリングに関して議論されており、5章より構成されている。

第1章は本論文における序論であり、親和性改変を中心とした抗体エンジニアリング手法について記述されている。また、本研究テーマとなる抗体FR改変技術に関する概説もされており、分子認識メカニズムの解明へ向けた研究課題について記述されている。

第2章は、抗インスリン抗体を対象とした速度論的解析及び遷移状態解析結果について議論している。既報の先行研究同様に、抗原電荷と対となる電荷を有する塩基性アミノ酸を抗体FRに導入することで結合速度定数が向上する結果が得られた。一方で抗原電荷と同じ酸性アミノ酸をFRに導入した場合は、結合速度定数が低下する結果が示された。FRの改変による親和性向上のみならず、親和性低下も可能であるという新たな知見が得られた。

またSPRを用いた熱力学的解析結果からは、変異導入に伴うエンタルピーやエントロピーの寄与が顕著に変化し、遷移状態において熱力学的に安定になることが示された。これらの結果より、反応におけるエネルギー障壁を低下させることと、結合速度定数向上との関連性が強く示唆された。

第3章では、抗リゾチーム抗体を対象として速度論的解析及び遷移状態の熱力学的解析を行い、第2章において明らかとなった結合速度定数向上における知見の一般性を議論している。速度論的解析より、塩基性エピトープに対して、塩基性アミノ酸であるアルギニンをFRに導入することで結合速度定数が向上する結果が得られている。この結果は、結合速度定数向上のメカニズムが抗原抗体の分子間に存在する静電相互作用には大きく依存しないことを示唆している。また本章では、抗原認識におけるhot-spotとの関連も議論しており、FR改変がhot-spotの役割には変化を与えないことを明らかにしている。

熱力学的解析では、抗インスリン抗体の場合と同様に遷移状態における熱力

学的な安定化が確認され、FR 改変による結合速度定数の向上は遷移状態におけるエネルギー障壁の低下によって達成されることを明らかとした。また、HY33F や HY58A といった CDR 上の特定のアミノ酸変異との組み合わせにおいても解析しており、それぞれで遷移状態における熱力学的寄与が異なることから、始状態における水和構造の変化に着目して議論を進めている。エネルギー障壁の低下について、遷移状態におけるエンタルピー獲得に加え、脱水和によるエンタルピー損を抑制することによる可能性についても言及している。抗インスリン抗体、抗リゾチーム抗体ともに確認された変異入に伴う抗体の熱安定性の低下もまた、初期構造の不安定化を示唆する結果となっている。

第 4 章では、第 3 章で示唆された始状態の不安定化に関する議論を進めるため、分子動力学計算を用いて動的構造解析を行っている。RMSD を指標として解析した結果、FR にアルギニンを導入することで、Apo 体での重鎖 CDRH1 と H2 の相対配置が野生型に対してより柔軟になる結果が得られた。この結果は、熱安定性の変化に見られるような始状態の不安定化と一致しており、さらに第 3 章で議論した始状態における CDR 表面の水和構造の変化を説明し得る結果であると言える。また、Holo 体における RMSD 値の解析結果からは複合体形成後は野生型、FR 変異体ともに同等の安定構造をとり得ることが示されている。

第 5 章は本研究の総括である。結合速度定数向上は始状態の不安定化および遷移状態安定化による相互作用におけるエネルギー障壁の低下によって達成され、またそのメカニズムは、CDR を中心とした分子表面の柔軟性の向上と水和構造の変化によるものであることを明らかとした。本研究成果は、結合速度定数改善を目的とした抗体エンジニアリングにおいて、重要な設計指針を与えるものである。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。