

審査の結果の要旨

氏名 渋谷 理紗

本論文は、タンパク質の安定化のための分子設計戦略の確立を目指し、主鎖環状化による改変タンパク質のデザインと作製した改変タンパク質の生物物理学的分析による安定化機構の解明を行ったものである。

本論文は8章からなり、第1章は緒言で、タンパク質医薬品、タンパク質の安定性、タンパク質の安定化手法としての主鎖環状化、研究対象としたヒト顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)について述べられている。主鎖環状化は医薬品への応用が期待される改変技術であるが合理的な設計戦略が未完成であること、G-CSFは治療薬として利用されているものの生体内安定性や保管安定性の改善が課題となっていることから、本研究は、G-CSFの構造安定性とコロイド安定性の向上、主鎖環状化がタンパク質安定性に及ぼす効果の解明、および環状化 G-CSF のデザイン手法の検証の3点を目的とした旨が述べられている。

第2章では、主鎖環状化 G-CSF の作製と特性について記されている。安定性の向上を目指して、主鎖末端をつなぐセグメント（コネクター）の長さが異なる4種の環状化 G-CSF をデザインした旨と、作製した改変タンパク質が元の直鎖状 G-CSF と同様の天然構造を維持していること、環状化 G-CSF は直鎖状 G-CSF に比べてコンパクトな変性構造を示すことを明らかにした旨が述べられている。

第3章では、熱変性実験および変性剤変性実験を行い、溶液中における環状化 G-CSF と直鎖状 G-CSF の構造安定性を比較した結果が記されている。G-CSF は主鎖環状化によって構造安定性が増加し、その増加量はコネクター長に依存することを明らかにした旨が述べられている。

第4章では、熱および変性剤に対する改変タンパク質の凝集性の改善が記されている。小角X線散乱、サイズ排除クロマトグラフィー等の分析を行い、環状化 G-CSF は直鎖状 G-CSF に比べて凝集性が低減することを見出した旨が述べられている。また、両者の凝集性の違いは構造安定性の差、および中間構造と変性構造におけるコロイド安定性の差が反映したものであるとの考察が述べられている。

第5章では、最も構造安定性が向上した改変タンパク質の構造安定性に影響する因子の特定について記されている。X線結晶構造解析、分子動力学シミュレーション等の解析により、主鎖環状化による変性構造のエントロピー減少と、分子内水素結合による天然構造のエントルピー増大の相乗効果によって改変タンパク質が安定化していることを明らかにした旨が述べられている。

第6章では、環状化 G-CSF のデザイン手法の検証について記されている。最も構造安定性が向上した改変タンパク質のコネクター領域の構造と、デザインした際に使用したテンプレートであるヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフの構造群を構造学的アプローチで比較解析した結果、両者の水素結合の形成位置と頻度は相関していたこと、さらに両者は同じタイプのタ

ーン構造を形成していたことを明らかにした旨が述べられている。

第 7 章では、第 2 章から第 6 章で得られた研究結果の考察が記されている。コネクター長を最適化して G-CSF を環状化することにより構造安定性と凝集性が改善したこと、安定性の向上には分子内水素結合の増大によるエンタルピー効果が寄与していたこと、ターンのアミノ酸数のみに着目した統計解析で、安定性向上に寄与する水素結合とターン構造を抽出できていたこと、環状化タンパク質と直鎖状タンパク質の変性構造の水和状態が異なること、本論文の主鎖の長さのみに着目したデザイン手法は、タンパク質デザインの膨大な構造空間を探索しやすくする可能性があること、主鎖環状化タンパク質が治療薬の生体内安定性の向上につながることにについて述べられている。

第 8 章は総括で、各章で得られた研究成果と考察を踏まえた将来展望について簡潔にまとめられている。

以上、本論文は、好中球減少症の治療薬として既に利用されている G-CSF を題材にして、その構造安定性とコロイド安定性が向上した改変タンパク質の作製に成功した。両安定性の向上は生体内安定性や保管安定性の改善につながることから改変タンパク質は医薬品として応用が期待される。また、作製した改変タンパク質の多角的な分析から、構造安定性とコロイド安定性が向上したメカニズムを明らかにし、主鎖環状化タンパク質に関する分子論的理解を深めた。さらに、実施したデザイン手法を検証することにより合理的な主鎖環状化のための設計戦略の指針を提示した。これらの成果は、医療用タンパク質の改良技術の発展に貢献することが期待される。なお、本論文の第 2 章および第 3 章は本田真也、宮房孝光、二島渉、大原璃恵、吉田昼也との共同研究、第 4 章から第 6 章は、本田真也、宮房孝光との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって本論文は博士（科学）の学位請求論文として合格と認められる。

以上 1 9 9 0 字