

審査の結果の要旨

氏名 岩井 宏徒

本論文は、抗体可変領域ドメイン間相互作用を利用した抗体選抜法および酵素活性制御法に関する検討と、その免疫測定への応用を目指したものであり、全5章から構成されている。

第1章は序論であり、アロステリック酵素と抗体ファージディスプレイ法に関するこれまでの知見を整理した上で本研究の背景と目的を述べている。

第2章では、抗体ドメイン間相互作用を指標にした低分子認識抗体の新規選抜法の構築とその結果について述べられている。従来、低分子認識抗体の選抜においてはその過程で低分子をタンパク質などに結合させるため、抗原部分を特異的に認識する抗体の選抜には手間と工夫が必要といった問題があった。このため筆者は抗体可変領域のうちV_Hドメインをランダム化してファージに提示し、V_Lドメインを磁気ビーズに固定化して、未標識の低分子抗原と混合することで抗原抗体複合体を形成したファージを回収する選抜法（Open Sandwich Selection）の開発により、上記の問題の解決を試みた。骨代謝マーカーであるヒトオステオカルシン(Bone gla protein, BGP)のC末端ペプチドを認識する抗体KTM219を材料に、この方法を用いて本抗体の親和性成熟を試みた結果、選抜された変異型V_HはOpen Sandwich ELISA法における抗原検出感度が野生型V_Hに比べ約300倍に向上し、精製V_H、V_Lタンパク質の抗原親和性についても有意な向上が認められた。以上より、期待された選抜原理の証明と、抗原検出能が向上した新規抗BGP抗体の取得に成功したと述べている。

第3章では、抗体Fvと円順列変異体β-ラクタマーゼ(cpBLA)の融合タンパク質Fv-cpBLAの特性について反応速度論的解析を交えて論じている。ここでは触媒活性部位近傍に新規N、C末端を有するcpBLAを用い、そのN、C末端にKTM219のV_H、V_Lをそれぞれリンカーを介して連結した融合タンパク質を作製した。まず、大腸菌不溶性画分をグアニジン塩酸塩で可溶化した後に精製と段階的透析を行うことで、十分な純度のFv-cpBLAタンパク質を単離精製できたことを述べ、その後表面プラズモン共鳴法等を用いた抗原結合活性評価、ラクタマーゼ活性評価の結果、Fv-cpBLAが元のFvと同様の抗原結合活性を有すること、抗原ペプチドの添加によりその触媒回転速度が25%向上することを明らかにしている。さ

らに、Fv-cpBLAを発現する大腸菌の増殖を指標に抗原検出と高活性なタンパク質の選抜の可能性を検討し、ネオニコチノイド系農薬イミダクロプリド(ICP)を認識する抗体の可変領域 V_H 、 V_L を用いてFv-cpBLAを設計し、そのリンカー部分をランダム化した変異体が大腸菌に発現させ、抗生物質アンピシリンと抗原ICPを含む培地での増殖を指標に選抜を行った。選抜されたクローン由来のFv-cpBLAがより高いICP依存的な酵素活性を示したことから、本手法でより高活性なアロステリック酵素の選抜に成功したと述べている。

第4章では、前章で作製したFv-cpBLAの抗原応答性を更に向上させるため、円順列変異酵素の制御に適した円順列変異抗体ドメインcircularly permuted V_H (cp V_H)およびcp V_L の創出について論じている。cp V_H 、cp V_L は V_H 、 V_L の従来のN、C末端をそれぞれリンカーペプチドで連結し、ドメイン界面近傍のループに新規末端を導入した円順列変異タンパク質ペアであり、抗原結合時に両者のドメイン末端が10オングストローム近くにまで近接するため、円順列変異酵素と連結した際により効果的な活性制御が期待される抗BGP抗体KTM219を材料としたcp V_H 、cp V_L を、前章とは末端位置の異なるcpBLA (RG13)のN、C末端にリンカーを介さずに連結したタンパク質cpFv-cpBLAを作製した。精製タンパク質を用いた一連の評価により、融合タンパク質の抗原特異的な結合能と、その触媒活性の抗原ペプチド依存的な上昇が示されている。さらに酵素反応溶液に尿素やTriton X-100などの変性剤ないし界面活性剤を適量加えることで、触媒回転数の抗原依存性が4.7倍程度にまで向上し、抗原ペプチドのより高感度な検出に成功したと述べている。そしてこれらの結果を、酵素の安定性や動的特性変化を活性制御に利用する近年の研究と関連付けて考察している。さらに、従来の V_H 、 V_L ドメインを、リンカーを介さずに連結した場合と比較することで、cpBLAの活性制御には抗体ドメイン末端間の距離が重要であると結論づけている。

第5章では、以上を総括し、今後の展望について述べている。cpFv-cpBLAは多様な分子を検出可能な抗体-酵素融合体の一般的なデザインとして免疫測定や抗体選抜法に広く適用可能であり、またcp V_H 、cp V_L はその短い末端間距離から、各種相互作用検出系の高性能化や適用拡大に寄与し得ると述べている。

以上、本論文では抗体可変領域ドメイン間相互作用の抗原依存的変化に着目し、これを利用することで、試験管内抗体選抜および人工アロステリック酵素設計における新たな方法論を提案している。これらの成果により抗体工学、酵素工学のさらなる進展が期待され、化学生命工学の進展に寄与するところ大である。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。