

論文審査の結果の要旨

氏名 塚本 雅之

本論文は、抗体医薬品の分離精製工程で課題となっている、酸性溶液による溶出操作に伴う抗体分子の不安定化を解決することを目指して、pH感受性を変化させたプロテインAのBドメイン(PAB)変異体を設計し、より穏和な溶液条件で抗体分子を溶出できるアフィニティ・クロマトリガンドを作製することを目的としたもので、その分子設計、合成、評価、および抗体-リガンド相互作用機構について述べられている。

本論文は9章からなり、第1章は序論で、タンパク質工学的研究の現状、黄色ブドウ球菌プロテインAに関する先行研究、抗体医薬品の開発動向、及び本研究の目的について述べられている。

第2章「ライブラリ設計」では、タンパク質相互作用のpH感受性変換に向けた遺伝子ライブラリの設計方法とその構築結果について述べられている。PABと免疫グロブリン(IgG)のFc領域との複合体のX線結晶構造解析データを用いて、選定条件を設定してPABの相互作用界面上のヒスチジン変異導入部位を決定し、最終的にT7ファージシステムで選択可能なライブラリサイズを考慮して、17個のヒスチジン変異導入部位を決定した旨が記されている。

第3章「コンビナトリアル・スクリーニング」では、前記ライブラリを用いたスクリーニングの実験方法と実験結果について述べられている。複数回のセレクション操作を通して配列の収束を確認し、その収束配列群の各部位のアミノ酸出現頻度解析から、pH感受性変換に効果的な部位を推定し、3か所を特定した旨が記されている。

第4章「タンパク質作製」では、様々な一置換または二置換変異体タンパク質の発現ベクターの作製方法、変異体タンパク質の発現/精製方法、及び実験結果について述べられている。大腸菌BL21(DE3)株を用いて、いずれのタンパク質もその発現を確認し、高い純度で精製した旨が記されている。

第5章「アフィニティ・クロマトグラフィの評価」では、前記で作製したPAB変異体を不溶性レジンに固定化し、アフィニティ・クロマトグラフィカラムを作製する方法、クロマトグラムとして評価する方法、及び実験結果と考察について述べられている。前記で特定した3つの変異(Q9、Q10、D36)を組合せることで、先行研究で開発されたアフィニティ・リ

ガンドよりも穏和な条件で抗体溶出を可能とするPAB変異体を作製できた旨が記されている。

第6章「タンパク質間相互作用の評価」では、表面プラズモン共鳴法を利用して、前記で作製した PAB 変異体と IgG との親和性を評価する方法、及び測定結果と考察について述べられている。本研究のライブラリ設計は、PAB と IgG の主要な結合サイトである Fc 領域との相互作用の変換を目的として実施したが、結果的に弱い結合サイトである Fab 領域(Fc より 1000 倍以上弱い)の中に pH 感受性を変化させるうえで大変効果的な変異部位(D36)が存在することを明らかにした旨が記されている。

第7章「タンパク質の熱安定性評価」では、作製したPAB変異体の熱安定性を評価するために行った円偏光二色性スペクトル法の実験方法、及び測定結果と考察について述べられている。PABのヒスチジン変異はすべからず熱安定性をやや減少させるものの、その程度は小さくアフィニティ・リガンドとしての利用には支障ないことを示した旨が記されている。

第8章「スクリーニングの収束配列の構造と機能評価」では、第3章で行ったスクリーニングで最終的に得られた収束配列の熱安定性、抗体親和性を評価する実験方法と結果について述べられている。最終的に得られた配列の物性が、必ずしも本研究が目指した最適のものでなかった事実から、セレクション条件の修正を行うことが今後の課題であると考察している。

第9章は結論で、各章について総括するとともに、結語として以下の点が強調されている。すなわち、本研究で行った合理的設計とコンビナトリアル・スクリーニングを組み合わせる方法は相互の利点と欠点を補完した有効なものであること、作製したアフィニティ・カラムの性能は先行研究より穏和な条件で抗体精製できるものであること、単独では弱い結合サイトであるFab領域への変異がアフィニティ・リガンドの性能向上に有効であることが述べられている。

以上、本論文は、社会的課題である抗体医薬品の製造技術革新を目指して行ったタンパク質工学分野における応用開発研究の成果で、独創的なアプローチで性能の高い新規アフィニティ・リガンドの作製に成功した事実と共に、その分子の作用機序の解析と考察、さらにはタンパク質工学技法の改良に関する解析と考察が適切かつ明快にまとめられている。なお、本論文第2章から8章は、本田真也、渡邊秀樹、大石郁子との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及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。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。