

論文審査の結果の要旨

氏名 大城 理志

本論文は、次世代型バイオ医薬品として開発が進んでいるフラグメント抗体等の低分子化タンパク質の血中滞留性の向上に寄与する汎用技術の確立を目指して、抗原性が確認されている細菌由来のアルブミン結合ドメインを代替する分子を提供することを目的としたもので、細菌由来アルブミン結合ドメインの結合様式を模倣したヒト型人工タンパク質の分子設計、合成、評価、分子間相互作用機構について述べたものである。

本論文は 9 章からなり、第 1 章は序論で、タンパク質医薬の開発における血中滞留性向上技術の概要、*Streptococcal Protein G* アルブミン結合ドメイン (ABD) を利用した血中滞留性向上法の概要、および当該技術の抗原性問題について述べられている。この問題の解決策として、ABD のホモログである GA module のヒト血清アルブミン (HSA) 接触残基をヒトタンパク質に移植する分子グラフティングが有効であるとし、本研究の目的を、分子グラフティングによって細菌由来のアルブミン結合ドメインを模倣したヒト型人工タンパク質を設計と定めた旨が記されている。

第 2 章では、分子グラフティングを実行する前段階として、既知の GA module/HSA 複合体結晶構造をもとにした GA module の HSA 接触残基の解析、HSA 接触残基の移植先となるヒトタンパク質の探索について述べられている。結果として、GA module の HSA 接触残基は 18 個存在すること、GA module の HSA 接触残基の移植先となるヒトタンパク質として、GA module との主鎖の構造類似性をもとに human APAF-1 CARD (hAC) が選択された旨が記されている。

第 3 章では、hAC に対し 18 個の HSA 接触残基を全て導入した hAC_18m の合成と評価について述べられている。表面プラズモン共鳴 (SPR) 法による解析から hAC_18m の HSA への結合が検出され、その親和性は見かけ上解離定数 $K_D = \text{約 } 5 \mu\text{M}$ であった。しかし、その値の信頼性は低く、かつ変性中点温度が 11 K (ケルビン) 低下していたことから、これらを改善する課題が顕在化した旨が記されている。

第 4 章では、構造インフォマティクスによる hAC 変異体の設計について述べられている。溶媒露出面積比の解析やフォールディング自由エネルギー変化の予測を利用することで、hAC 変異体の熱安定性を低下させる変異を除外し、hAC 変異体の親和性を向上させることを試み、HSA 接触残基の導入数を 18 から 15 へ減少させた変異体 hAC_15m を作製し、その結果、HSA への親和性が $K_D = \text{約 } 1 \mu\text{M}$ まで向上した分子の作成に成功した旨が記されている。

第 5 章では、前章の hAC 変異体の親和性をさらに向上させた分子の設計について述べられている。GA module および Protein G ABD の HSA 結合残基を hAC_15m に追加した変異体を作製したところ、hAC_15m(T36S), hAC_15m(E41N) で親和性の向上がみられ、それぞれの K_D は 618 nM, 283 nM であった旨が記されている。

第 6 章では、hAC 変異体-HSA 間相互作用の熱力学的解析について述べられている。van't Hoff 式および Eyring 式に基づく熱力学的解析を行い、hAC_15m(T36S/E41N)の HSA に対する結合はエンタルピー的、エントロピー的に有利な結合であること、この傾向は GA module と HSA の結合においても同様であり、hAC_15m(T36S/E41N) の結合様式が GA module に類似することで親和性が向上したことが示唆されたこと、GA module-HSA 間相互作用では、結合エントロピー障壁の存在しない down-hill の遷移状態が確認され、主鎖の動きや側鎖の動きなどのエントロピーロスを伴わない結合が示唆されたことなどの考察が記されている。

第 7 章では、hAC 変異体と GA module 間の競合試験について述べられている。hAC_15m(T36S/E41N)の HSA 結合部位が GA module の HSA 結合部位と同一であるかを検証するために、表面プラズモン共鳴法を用いた競合結合試験を行い、両者の HSA 結合部位が重複していることを明らかにした旨が記述されている。

第 8 章では、hAC 変異体、GA module の免疫原性リスク評価について述べられている。*in silico* の T 細胞エピトープ予測を行い、Protein G ABD および GA module との免疫原性リスクを比較したところ、hAC_15m(T36S/E41N)の T 細胞エピトープのヒト白血球型抗原 (HLA) に対する結合数は Protein G ABD および GA module よりも減少していると予測され、hAC_15m(T36S/E41N)の免疫原性リスクが低減されていると予測された旨が記述されている。

第 9 章は結論で、各章を総括するとともに、結語として、設計された人工ヒト型タンパク質がタンパク質医薬の血中滞留性改善技術において細菌由来アルブミン結合ドメインに代わる低リスク分子として有望であるとの期待が述べられている。

以上、本論文は、次世代型バイオ医薬品の血中滞留性の向上に寄与する汎用技術の確立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、戦略的なアプローチで適切な性能を有する人工ヒト型タンパク質の作製に成功した事実と共に、設計された人工タンパク質の相互作用メカニズムに関する考察など学術的に興味深い事項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。

以上 1 9 9 0 字