

学位論文の要旨

氏名

Md. Kamrul Hasan Khan

学位論文題目

T7ファージ提示技術によるIgY結合ペプチドの開発と抗体精製への応用

本論文は、ニワトリ抗体IgYに特異性を有するIgY結合ペプチドの単離、ならびにそのIgYの卵黄からの精製における応用研究に関するものである。T7ファージディスプレイ技術によって構築したランダムペプチドライブラリーからのバイオパンニングによって、IgY結合ファージが単離され、それら由来の合成ペプチドは、ELISAや親和性解析により特徴づけられた。得られたデータは、IgY結合ペプチドの特性を明らかにするとともに、卵黄からのIgY精製に向けた使用の可能性を示唆した。そこで、種々の脂質の抽出法ならびに硫酸アンモニウム沈殿法を比較し、卵黄の前処理法を検討した。その結果、最終的に、検討した卵黄の前処理法とIgY結合ペプチドをコンジュゲートしたカラムを使ったグロマトグラフィー技術を合わせることで、卵黄からのIgYのアフィニティ精製法の確立に成功した。本論文は、6章より構成されるが、各章の概要を以下に示した。

第1章は、生化学的な研究や診断、免疫治療分野における魅力的なツールとしてのIgY抗体の構造と機能に関する一般的な紹介を行った。特に、IgY抗体の優れた特性として、高い特異性、系統的に遠位であるため哺乳類蛋白質に対する交差結合性が少ないこと、pHや温度に対する高い安定性、さらには、卵黄から精製可能であることから、哺乳類抗体よりはるかに低い生産コストを実現できる可能性等が挙げられる。

第2章は、本研究で用いたT7ファージ提示法の紹介とランダムペプチドを提示したファージライブラリーの作製についてまとめた。ジスルフィド結合を分子内に有するランダムペプチドライブラリーを構築するため、ランダムペプチド配列をコードするDNAの鋳型をデザインし、PCRによる増幅、T7ファージベクターへのライゲーション、大腸菌への感染によるファージ増幅について記した。最後に、構築したライブラリーの質について評価した。

第3章は、ランダムペプチドライブラリーからのIgY結合ペプチドの単離と、得られたペプチドの特性を解析した。バイオパンニング法がファージライブラリーから特異的な結合ファージの単離に使用され、結果として数クローンのIgYに特異的に結合するファージが単離された。ファージから得られた配列をもとに調製した合成ペプチドを用い、特異性と親和性を含めたペプチドの結合特性が評価された。

第4章は、IgY精製への応用に向け、ニワトリ卵黄からの脂質除去を含む卵の前処理法についての検討を行った。卵黄の前処理法として、以前報告されていた2つの脂質除去法が検討された。種々の条件検討の結果、最終的には、従来の方法の欠点を補う簡易な脂質抽出除去を含む前処理法を確立した。

第5章は、IgY結合ペプチドを用いたIgY精製法の確立について記した。IgY結合ペプチドを固定化したカラムの作製とそれを用いたIgYの精製条件の検討を行い、卵黄からのIgYの精製システムを構築した。この方法では、従来の方法に比べ、高い純度でのIgYの他回収率での精製が可能となった。

第6章は、本研究の結果をまとめるとともに、我々の方法の有用性について、他の方法との比較を交えながら産業的な観点から議論し、本論文を総括した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Development of IgY Binding Peptide using T7 Phage Display Technology and its Applications for Antibody Purification

Name: Md. Kamrul Hasan Khan

In this thesis, we present a study about the identification of IgY binding peptides which can specifically recognize chicken antibody IgY, and its application for the purification of IgY from egg yolk. Through biopanning from the random peptide-displaying phage libraries constructed by T7 phage display technology, IgY-specific binding phages were isolated, and those synthetic peptides were characterized by several analytical techniques. The obtained data elucidated interesting properties of the IgY-binding peptides and indicated the potential use in purifying IgY antibody from egg. Therefore, egg yolk dilapidation technique was validated by comparing the lipid extraction and the subsequent ammonium sulfate precipitation methods which were previously reported. Finally, IgY purification system was established by combining the dilapidation technique and the chromatographic technique using the IgY-binding peptide-conjugated column. This thesis is composed of six chapters and the content of each chapter was summarized as following.

Chapter 1, described the general introduction of the IgY antibody's structure and functions as an attractive tool for biological research, diagnostic use and preparation of immunotherapy. Especially, this chapter also analysed the advanced features of IgY antibodies, such as its higher specificity, their low cross-reactivity to mammalian proteins due to the maximum phylogenetic distance between them, improved pH/temperature stability and cost-effective preparations over mammalian IgG.

Chapter 2, summarised the introduction and the preparation of random peptide-displaying T7 phage library used here. To construct T7 phage library harbouring the disulphide constrained random peptide library, the design of DNA template generating random peptide sequence, PCR

amplification of template, the ligation of amplified DNA to T7 phage vector and the phage propagation using *E. coli* were described. Finally, the quality of peptide-displaying T7 phages libraries constructed here was also validated.

Chapter 3, described the isolation of IgY-binding peptide from random peptide displaying T7 phage libraries and the characterizations of the obtained peptides. The biopanning procedure was applied to identify IgY-binding phage and the specific phages were isolated. The synthetic peptides derived from the sequences of the phages were prepared and their binding properties including their specificity and affinity were analyzed.

Chapter 4, reports the pretreatment of chicken egg including delipidation of egg yolk for the use of IgY purification. Two previously developed egg delipidation techniques were compared and validated for the pretreatment of egg yolk. Finally, a novel and potential egg delipidation technique which can serve lipid extraction solution for better IgY purification was identified.

Chapter 5, described the establishment of the IgY purification system using IgY binding peptides. The preparation of affinity column immobilized with IgY-binding peptide and the determination of IgY antibody purification condition was performed to establish the purification process of IgY antibody from egg yolk. This established process made it possible to purify IgY in high purity, as compared with the conventional methods used previously.

In Chapter 6, the results of this study were summarized and the usefulness of our method was discussed from a viewpoint of industrial applications, comparing with other methods.