

## 最終試験結果の要旨

|      |             |       |                       |
|------|-------------|-------|-----------------------|
| 報告番号 | 理工研 第 459 号 | 氏 名   | Md. Kamrul Hasan Khan |
| 審査委員 | 主 査         | 伊東 祐二 |                       |
|      | 副 査         | 内海 俊樹 | 九町 健一                 |

最終試験は、以下の要領で博士論文の発表会を行い、研究発表内容の質、発表状況、質疑応答の内容を総合的に審査した。

博士論文の発表会は、平成30年1月24日の14時より鹿児島大学理学部2号館生命化学科セミナー室にて開催された。3名の審査委員の他、聴講者10名の出席者のもと、30分の博士論文内容の発表後 30分間の諮問を含む質疑応答が行われた。具体的な質疑応答の内容の一部を以下に示す。

1) 質問：IgYに対する親和性ペプチドを見出す際に、直鎖状ではなく、環状ペプチドライブラリを使用した理由は？

回答：直鎖状のペプチドは、立体構造の自由度が大きいため、高い特異性と親和性を持ったペプチドが得られない可能性があった。このため、本研究では、分子内にジスルフィド結合を有する環状化したペプチドライブラリを用いた。特異性の高いペプチドが得られたのも、環状化ペプチドライブラリを使用したことが有利に働いたと考えている。

2) 質問：卵黄の前処理操作に利用した硫酸沈殿操作は精製作業に必須か？

回答：本来、卵黄は脂質含量が高く、粘度も高い。蒸留水による卵黄の希釈操作だけでは、十分に脂質の除去ができず、また粘度も高いため、このままカラムにアプライするとカラムの急速な劣化が予想された。よって、硫酸沈殿操作は精製作業に必須と考えている。

3) 質問：ランダムペプチドライブラリの構築を行う際に、遺伝子配列に混合ヌクレオチドNNKのコードを用いたのはなぜか？

回答：ランダムなアミノ酸を発生させる場合、NNNというコードを使うことが考えられるが、3番目の塩基をNに用いると、終止コード(UAA, UGA)の出現頻度が上がる。これを避けるため、NNKを用いている。ただし、NNKでは、UAGの終止コードの出現は避けられないが、TrpのコードTGGやMetのコードATGを含めるためには、どうしても3番目の塩基に、Gは必須となる。

4) 質問：現在、得られているIgY結合ペプチドは、 $\mu\text{M}$ のオーダーの $K_d$ を持つが、この親和性を改善する方法は？

回答：IgY結合ペプチドの遺伝子に部分的な変異を入れてライブラリを構築し、厳しい条件でバイオパンニング選別を行うことで、この中から結合力の強くなったペプチド由来のアミノ酸変異を見つけ、それらを組み合わせで、ペプチドの親和性を改善することが可能であり、今後の課題である。

5) 質問：現状の精製では、pH2.5の溶出ではIgYの回収率は良いが、凝集等により純度は低下する一方、pH3.0の溶出では純度は良いが回収率が悪いといったジレンマがある。この解決法は？

回答：例えば、IgYペプチドにHisタグ配列を導入して、金属キレートカラムで精製する方法が考えられる。この方法では、溶出は、1Mのイミダゾールを使うものの、pHは中性付近なので、IgYの凝集といった変性は起こらないと推察されるが、今後の検討が必要である。

上述のような審査員から質問があったが、審査対象者は、適宜、適切な対応と回答・討論を行った。以上のことから審査委員会は、申請者が博士課程の修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士(理学)の学位を与えるに足る資格を有するものと判定した。