

## 学 位 論 文 の 要 旨

氏 名 松木園 美穂

学位論文題目 ファージディスプレイ法によるアヘン成分認識単鎖抗体の開発

本論文は、抗オピウム一本鎖単鎖抗体(scFv)のM86について、まとめたものである。

第1章は、抗体作製方法と抗ハプテン抗体及び抗モルヒネ抗体について論じている。抗体作製方法としてはハイブリドーマ法とファージディスプレイ法についてそれぞれについて論じている。また、抗ハプテン抗体の特徴と現在までに知られている抗モルヒネ抗体の特徴について論じている。これらをふまえて本研究でハプテンに分類されるモルヒネの抗モルヒネ抗体作製を行うにあたって、ハイブリドーマ法に対するファージディスプレイ法の利点について論じている。本研究におけるファージディスプレイ法の最大のメリットは、抗体遺伝子の多様性が高いことであり、ハプテンを認識する確率の向上に寄与する可能性について論じている。

第2章は、本研究において使用した抗原の調整とハイブリドーマ法による抗モルヒネ抗体作製について論じている。ハイブリドーマ法ではモルヒネ抗体の確立に至らなかったことについて論じている。具体的には、morphine-conjugated thyroglobulinを免疫したマウスよりハイブリドーマ株を樹立したが、様々な薬物-タンパク質コンジュゲート体に広く交差反応性を示した点と、morphine-conjugated BSAを免疫したマウスよりハイブリドーマ樹立を目指したが陽性クローンを得られなかった点について論じている。

第3章は、ファージディスプレイ法を用いたモルヒネ抗体の作製について論じている。第2章で作製に失敗したにもかかわらず、同じ抗原であるmorphine-conjugated BSAを免疫したマウスより免疫ライブラリを作製しファージディスプレイ法を利用することにより、モルヒネを認識する一本鎖単鎖抗体(scFv)であるM86の単離に成功したことについて論じている。M86の特徴を以下の点に要約しM86の特性について論じている。①M86はタンパク質コンジュゲート体に対する反応では、モルヒネコンジュゲート体のみを認識し、構造の類似したコデインコンジュゲート体は認識せず、非常に優れた特異性を有していた。②競合ELISAによる薬物単体に対する評価では、モルヒネ、オピウムのみならず、コデイン、ヘロインを認識した。③Morphine-reactive antibody 9B1 (PDB ID: IQ0Y)を用いたMOEの解析ではモルヒネ特異的抗体に変換できる可能性が示唆された。

また、本研究で得られた結果より、動物にハプテン-コンジュゲート体を免疫し、ハプテン-コンジュゲート体でセレクションを行い、フリーのハプテンを特異的に認識する抗体を作製する作製手法の限界について論じている。このような場合でも本研究のようにコンピューターシミュレーションによる抗体エンジニアリングを組み合わせることにより目的の性能を持つ抗体を作製できる可能性について論じている。

従って、本研究の成果は、モルヒネ特異的認識能を潜在的に保持したM86を確立することができた点と、アヘン剤の検出プローブやアヘン剤中毒の治療薬として利用が期待されることであると論じている。

第4章は、バイオセンサー素子に向けた開発について論じている。第3章で、M86はモルヒネ、コデイン、ヘロインを認識する抗オピウム抗体であるが、抗体エンジニアリングによりモルヒネを特異的に認識できるように変換できる可能性がある点について論じた。第4章では第3章で得られたデータより、AspL94とSerL91のアミノ酸ポイントミューテーションによるmutant-M86を用いたコンピューターシミュレーションによる解析を行い、それらの解析値より抗体エンジニアリングの可能性について論じている。またバイオセンサー開発の一例として、M86を電気化学的測定手法に応用することにより高感度な新規の抗オピウム測定手段となりえる可能性について論じている。

第5章は、【ファージディスプレイ法によるアヘン成分認識単鎖抗体の開発】について、以下の項目で総括した。

- ①本研究で得られたM86の抗オピウム抗体として有用について総括した。
- ②M86は、抗体エンジニアリングにより抗モルヒネ抗体へと変換できる可能性を秘めた有用な抗体である点について総括した。
- ③バイオセンサー素子へ向けた開発について総括した。
- ④本研究で得られた知見より抗ハプテン抗体作製に関する方法論について総括した。

## 論文審査の要旨

報告番号	理工研 第 379 号		氏 名	松木園 美穂
審査委員	主 査	杉村 和久		
	副 査	隅田 泰生		伊東 祐二

学位論文題目     ファージディスプレイ法によるアヘン成分認識単鎖抗体の開発  
(Development of a phage-display library-derived anti-opium antibody)

審査要旨

提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、ファージディスプレイ法によるアヘン成分認識単鎖抗体の開発、について述べたもので、全文5章より構成されている。

第1章では、薬物認識抗体及びその抗体作製方法について述べている。国際的に抗モルヒネ抗体単離のためにハイブリドーマ法が用いられているが交差反応性を排除できない結果であり、且つそれらの抗体の遺伝子構造は明らかにされていない。本研究ではそれらの現状を踏まえて多様性が高いと期待されるファージディスプレイ法を利用してscFv抗体の単離を行うに至った考察がなされている。

第2章では、ハイブリドーマ法による抗体作製、について検討している。ハイブリドーマ法では抗モルヒネ抗体は単離できなかった。

第3章では、ファージディスプレイ法を用いたモルヒネ特異的一本鎖抗体 (single chain Fv, scFv)の単離とその特異性の評価、について検討している。免疫抗体ライブラリより抗モルヒネscFv抗体, M86の単離に成功し、M86の詳細な特異性の検討と遺伝子構造を報告している。ファージディスプレイ法を利用した抗体ライブラリより得られた抗モルヒネ抗体の詳細な報告は国際的に初めての報告であり、抗モルヒネ抗体や抗ハプテン抗体作製において重要な報告である。また、遺伝子構造の決定によりハイブリドーマ法による従来の場合と異なり抗体エンジニアリングによる微細な特異性の調整が可能であることを報告している。M86はモルヒネのみならず、類似物であるコデイン・ヘロインも認識するため、アヘン（モルヒネやコデインを含有）やヘロインの検出プローブとして、またそれらの中毒の治療薬の開発に大きく寄与する。

第4章では、バイオセンサー素子開発に向けた開発、について検討している。第3章に基づきM86のアミノ酸変異体のコンピューターシミュレーション解析により、M86のモルヒネ3位ヒドロキシル基近傍に配置していると推測されるアミノ酸残基（SerL91, AspL94）を置換することでM86の活性の調整が可能であることが計算上推測されている。これはM86の更なる選択的特異性の保持において重要なことでありモルヒネ特異的抗体、コデイン特異的抗体、ヘロイン特異的抗体の開発に大きく寄与する。

第5章は（総括）である。

以上本論文は、ファージディスプレイ法による免疫抗体ライブラリより抗モルヒネ特異的一本鎖抗体の単離に成功し、その特異性の詳細な検討と遺伝子構造を国際的に初めて報告したものである。本研究の成果は、アヘン（モルヒネやコデインを含有）やヘロインの検出プローブとして、またそれらの中毒の治療薬の開発に大きく寄与する。また、遺伝子構造の解明により抗体エンジニアリングも可能となったため、特異性の調整による更なる応用が期待される。従って、審査委員会は博士（工学）の学位論文として合格と判定する。

## 最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第 379 号		氏 名	松木園 美穂
審査委員	主 査	杉村 和久		
	副 査	隅田 泰生	伊東 祐二	

平成25年2月8日（金曜日）13時30分より14時30分（1時間）、工学部共通棟305号教室にて本審査が実施された。審査員は主査、杉村、副査の隅田泰生教授、伊東祐二教授である。審査員を含む約20名の前で学位論文の内容が説明された。その後、以下に示すような質疑応答が行われ、その一部を要約する。

【質問1】Pierce社キットの反応メカニズムはどのようなものか。  
【回答1】マンニッヒ反応でコンジュゲート体が作製されている。

【質問2】3本のバンドの分子種はどのようなものか。  
【回答2】1stバンドと2ndバンドが抗原結合活性を有し、1stバンドが全長M86であり、2ndバンドはMALDI TOF MSのPMF解析によりE-tagの前かE-tagの途中で切断された可能性が高く、proteinase Kもしくは原因不明の切断が生じている。3rdバンドについては、その後の研究によりプロテアーゼインヒビターにより断片の除去に成功したため解析を行っていない。

【質問3】9B1は単離されたにもかかわらず今回ハイブリドーマ法で単離されなかった理由はなぜか。  
【回答3】これまでの研究と異なり新規ハプテンキャリアタンパク質コンジュゲート体を使用しているためと考えられる。

【質問4】9B1のKd値はどの程度か。  
【回答4】9B1のKd値は報告されていない。

【質問5】尿等生体由来サンプルに対する活性評価を行っていないのか。  
【回答5】現段階では生体由来サンプルに対する評価は行っていない。

【質問6】ハプテン抗体でVHHとアンチカリンが適していると考えられる理由はなぜか。  
【回答6】どちらも構造的な要因であり、アンチカリンの場合は深く、非常に相補的なリガンドポケットを形成するため、VHHの場合は、CDR3のlong fingerlike extensionにより結合キャビティを形成する可能性が高いと推測されるため、と考えられるため。

【質問7】IgG分子は抗ハプテン抗体に不利なのか。  
【回答7】現在までにIgGの抗ハプテン抗体は報告されているため不利ではないと考えられるが、これまでの研究によりアンチカリンとVHHは構造的な要因で有利であると推測される。

【質問8】2ndバンドについて、ウェスタンブロットで検出されるのか。  
【回答8】ウェスタンブロット解析でanti E-tag抗体では検出されない。

【質問9】コンピューターシミュレーションにおいて、リンカー部位はどこに相当するのか。  
【回答9】図を用いてC-コンジュゲート体のリンカー部位、N-コンジュゲート体のリンカー部位を示した。

【質問10】変異部位はどこか。モルヒネ・コデイン・ヘロインの結合様式とエネルギー値は関連しているのか。  
【回答10】モルヒネの3位ヒドロキシル基の近傍に配置していると推測されるSerL91とAspL94とを変異体のターゲットとした。モルヒネとヘロインとではM86と明確な結合がありコデインについては明確な結合はMOEの今回の解析条件では提示されていないが結合様式とエネルギー値は関連していると考えられる。

【質問11】モルヒネ・コデイン・ヘロインはM86のタンパク質側に向いているのか。  
【回答11】9B1と異なりM86の場合はモルヒネの3位、6位のヒドロキシル基がM86側へ向いているようである。

【質問12】ファージディスプレイ法はハイブリドーマ法の壁を越えることはできないという考察に対して言いすぎではないか。もっと免疫動物の数を増やせばよいのではないか。  
【回答12】本研究では発表者が考察したとおりであるが、伊東教授の意見のように確かに自ら複数の免疫した動物を準備し比較を行なっていないので、言いすぎかもしれない。

【質問13】薬物単体を免疫するとはどういうことか。  
【回答13】抗体価には期待できないが、薬物摂取患者には薬物に対する抗体が生じるため、薬物単体を動物に免疫すればコンジュゲート体使用に起因する問題を回避できるのではないかと考える。

【質問14】モルヒネ・コデイン・ヘロインの配向性についてその他ありえる配向はないのか。示したデータの場合リンカーが結合できる猶予があるのか。  
【回答14】ドッキングシミュレーションの結果、示したデータが最もエネルギー的に安定でとり得る配座である。またモルヒネタンパク質コンジュゲート体においてリンカーが結合した状態でもポケットに結合できると推測される。

発表者は抗ハプテン抗体や抗体エンジニアリングについて博士後期過程修了者として十分な見識を有することを、これらの質疑応答を通して示した。以上の結果を受け、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（工学）の学位を与えるに足る資格を有するものと判断した。