

学位論文の要旨

氏名 畠中 孝彰

学位論文題目 IgA結合ペプチドによる特異的精製システムの開発に関する研究

本論文は、T7ファージディスプレイシステムを利用したライブラリ技術を用いて、全く新規のIgA特異的結合ペプチドのデザインと、これを用いた新規ヒト/マウスIgA抗体特異的な精製システムの構築を行ったものであり、全7章から成る。

第1章は、研究背景として、抗体（特にIgG、IgA）の医薬品としての有用性を記述するとともに、その製造過程での精製システムにおける問題点について提起した。抗体は、我々の免疫機能を担う重要な分子であるが、特にIgGにおいては、すでに、癌や自己免疫疾患を中心に抗体医薬品として臨床の現場で用いられている。一方、近年IgAが、免疫細胞中で最も多い好中球を効果的に動員し、腫瘍細胞を傷害できることが明らかとなってきた。このことから、IgAもまたIgGと同様に抗体医薬品としての有用性を有していると考えられるが、IgGにおけるプロテインAカラム精製のような、確立された精製システムが未だ無いことが、IgAの医薬品化を妨げる一つの原因となっている。そこで、IgA結合性のペプチドをデザインすることにより、新たなIgA精製システムの開発を試みた。

第2章は、本研究でIgA結合性のペプチドのデザインに用いたファージディスプレイ法によるランダムペプチドライブラリについて概説した。1985年、Smith等により、M13ファージを用いたファージディスプレイ法が報告されて以来、この技術を用いて、抗体やペプチドの分子ライブラリを構築することで、多くの機能性分子が発見されてきた。また、近年、T7ファージを用いたランダムペプチドライブラリによる機能性ペプチドの単離が多く報告されており、本研究で用いたT7ファージの利点について、M13ファージとの比較を交えながら概説した。

第3章は、T7ファージディスプレイ法によって構築されたランダムペプチドライブラリからのヒトIgA結合ペプチドの単離・デザインを記述した。T7ファージライブラリを用いてヒトIgAに対してバイオパニングを行った結果、4種類のIgA結合ファージクローン（A1-A4）が単離され、この内最も結合力の高かったA2ペプチドを用い、ペプチドを固定化したアフィニティカラムでのヒトIgAの精製が原理的に可能であることを示した。しかし、一方で、親和性・特異性の改良が必要であることが明らかとなり、A2配列を基にした部分変異ペプチドファージライブラリを用いることで、ヒトIgAへの結合に必須な残基の同定を行った。

第4章は、3章で得られたヒトIgA結合ペプチドの親和性増強の検討を行った。結合に必須な残基を固定化し、それ以外をランダム化したライブラリを用いることで、A2 ($K_d=1.3 \mu\text{M}$) よりも親和性の高いA2-3a ($K_d=530 \text{ nM}$) ペプチドの単離に成功し、さらに、ライブラリより得られたヒトIgA結合配列データと合成ペプチドを用いた手法により、親和性上昇に効果のあるアミノ酸を同定することで、極めて高い親和性を持つOpt-1ペプチド ($K_d=33 \text{ nM}$) のデザインに成功した。一方で、Opt-1ペプチドはIgA以外の血清タンパクに非特異的な結合を示した。

別記様式第3号-2

第5章では、Opt-1ペプチドのIgAとの結合における特異性の改善を試みた。分子シミュレーションにより得られたOpt-1ペプチドの溶液中におけるモデル構造から、Opt-1ペプチドにおいて非特異的結合を引き起こす残基を推定し、それらの残基に変異導入したペプチドのアフィニティカラムによる血清中IgAの精製実験を基に改良を加え、最終的に高い特異性と親和性を持つOpt-3ペプチドをデザインし、そのペプチドによるIgA精製システムを確立した。

第6章では、得られたヒトIgA結合性ペプチドのマウスIgA結合性への特異性変換の試みを行った。ヒトIgA結合ペプチドは弱いながらもマウスのIgAを認識したため、ヒトIgA結合ペプチドを基にした部分変異ペプチドライブラリを構築し、マウスIgAに対してスクリーニングを行った。この結果、ヒトよりもマウスのIgAを高い親和性で認識するMA1ペプチドの単離に成功したが、親和性が $60 \mu\text{M}$ (Kd)と低いため、親和性の改善が今後必要であることが分かった。

第7章は、研究の総括であり、今回用いたヒトIgA、マウスIgA特異的ペプチドのデザイン手法の一般性、得られたペプチドのIgA精製用リガンドとしての有用性についてまとめ、今後の展望と課題について述べた。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第 377 号	氏 名	畠中 孝彰
審査委員	主 査	伊東 祐二	
	副 査	杉村 和久	高梨 啓和
		橋本 雅仁	
<p>学位論文題目 IgA結合ペプチドによる特異的精製システムの開発に関する研究 (Development of IgA Purification System by Using IgA-specific Peptide)</p> <p>審査要旨</p> <p>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、新規のヒトイムノグロブリンA (IgA) の精製システムの開発を目的に、T7ファージ提示法によるペプチドライブラリから、IgAに特異的に結合するペプチドを単離し、その改良とペプチド固定化カラムによるIgAの精製の実証研究を行ったものであり、7章より構成される。</p> <p>第1章は、研究背景であり、抗体（特にIgG、IgA）の医薬品としての有用性を記述するとともに、現在その製造における問題点について提起した。抗体は、免疫機能を担う重要な分子であるとともに、IgG抗体は、癌や自己免疫疾患を中心に抗体医薬品として用いられている。一方、近年、IgAもその抗腫瘍活性が明らかとなり、抗体医薬品としての可能性が示唆されているが、その精製システムが確立されていないことが、IgAの医薬品化を妨げる一つの原因となっていることを提起した。</p> <p>第2章は、本研究で用いた基本技術であるT7ファージによるランダムペプチドライブラリについて、従来用いられてきたM13ファージとの比較を交えながら概説した。</p> <p>第3章は、T7ファージ提示法によるランダムペプチドライブラリからの、ヒトIgAに特異的に結合するペプチドの単離・デザインを記述した。バイオパンニングという手法によって、ヒトIgAに特異的に結合する4種類のペプチドを同定し、この内A2ペプチドを固定化したアフィニティカラムを使って、ヒトIgAの精製が原理的に可能であることを示した。しかし、一方で、親和性・特異性の改良が必要であることが明らかとなった。</p> <p>第4章は、3章で得られたヒトIgA結合ペプチドの親和性増強を行った。結合に必要な残基を固定し、それ以外をランダム化したライブラリを用いることで、A2ペプチドよりも、40倍程親和性の高いOpt-1ペプチドのデザインに成功した。</p> <p>第5章では、Opt-1ペプチドの欠点である非特異的結合を抑えるため、計算科学的手法によるペプチドモデル構造をベースに、Opt-1ペプチドの改良を行い、最終的に高い特異性と親和性を持つOpt-3ペプチドをデザインし、そのペプチドによるIgA精製方法を確立した。</p> <p>第6章では、得られたヒトIgA結合性ペプチドのマウスIgAへの結合性の特異性変換の試みを行った。特異性変換については成功したが、そのペプチドの親和性は低く今後の改良が必要である。</p> <p>第7章は、研究の総括であり、今回用いたヒトIgA特異的ペプチドの設計手法の一般性、得られたペプチドのIgA精製用リガンドとしての有用性をまとめ、今後の展望と課題について述べた。</p> <p>以上のように、本論文は、新規のヒトIgA結合ペプチドの単離とそれを応用したヒトIgA精製システムの確立を行っており、この研究成果は、ヒトIgAの工業的な精製法を提供することで、IgAの抗体医薬化を大きく推進できると期待される。</p> <p>よって、審査委員会は、本論文が、博士（理学）の学位論文として合格と判定した。</p>			

最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第 377 号	氏 名	畠中 孝彰
審査委員	主 査	伊東 祐二	
	副 査	杉村 和久	高梨 啓和
		橋本 雅仁	

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25年2月4日の14時00分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、30分の博士論文内容の発表後、約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) T7ファージによる提示において機能的な分子を提示するために必要なリンカーの長さについて
回答：本研究では、T7ファージ粒子表面タンパク質のG10というタンパク質C末端に融合した形でペプチドを提示しているが、そこでのリンカーはアミノ酸で15個の長さを持つことから機能的には十分な長さであると考えられる。
- 2) 本研究で得られたペプチドのIgAの結合部位がCH2とCH3境界領域の境界領域に集中する特別な原因はあるのか。
回答：ペプチドのような低分子のリガンドが標的分子に結合する場合、標的部位との相互作用に、なるべく広い分子表面積作る必要がある。そのことから考えて、比較的大きなキャビティが存在するCH2とCH3境界領域が標的になっている可能性が考えられる。
- 3) アフィニティカラムにおける特異性を向上させるため、洗浄方法や界面活性剤の使用の検討は行ったか。
回答：洗浄回数、洗浄pH、界面活性剤を使用した洗浄方法の検討を行った。洗浄方法を工夫することで、得られるIgAの純度は向上したが、収量の低下がみられたことから、ペプチドリガンドの改良が必要と判断した。
- 4) 使用しているペプチドの分子内SS結合の重要性について検討は行ったか。
回答：分子内SS結合を還元剤によって還元後、結合活性が大きく減弱することを確認している。また、SS結合に関与するCysをSerに置換したペプチドを合成して評価したところ、こちらもほとんど結合活性が見られなかったことから、本ペプチドの機能においては、分子内SS結合は極めて重要な役割をしていると考えられる。
- 5) コンピュータシミュレーションの信頼性、ファージ提示法の違い、IgA抗体医薬の可能性について。
上記の点について、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。

以上の内容から、4人の審査員は、審査対象者が大学院博士課程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。