

論文の内容の要旨

論文題目 The Development and Applications of Novel Antibody Mimics, Monobodies.

新規抗体様たんぱく質モノボディの技術確立と、その応用

氏名 小出明子

新しい結合能を持つ新しいたんぱく質をつくりだすことは、たんぱく質工学の主目的の一つである。そのようなたんぱく質は、たんぱく質-たんぱく質相互作用の研究に役立つ他、医学、工学等さまざまな応用が可能である。

私達は、ファイブロネクチンタイプ3ドメインの構造が抗体と類似することに着目し、10thファイブロネクチンタイプ3ドメイン（以下FNfn10と略す）の骨組みを用いて新規抗体様たんぱく質をつくることができるかどうか、研究を行った。

FNfn10は、抗体同様、 β ストランドとそれらを繋ぐフレキシブルループからなる。しかし、FNfn10は抗体に比べ分子量が小さく（約1万ダルトン）、安定で、水溶性が高く、S-S結合がないので、大量生産しやすい、生産後安定に保存できる、細胞内でも活性があるといった、抗体よりもすぐれた特性を持つ。両者の構造比較から、FNfn10のBCループ、DEループ、FGループはそれぞれ抗体のCDR1、2、3に対応する。抗体の場合、CDR1、2、3のアミノ酸を変異させることにより、さまざまな抗原にたいする特異性、親和性を獲得する。私達は、FNfn10のループ領域のアミノ酸を変異させることにより、ある分子に対する新しい結合能を獲得させることができるのではないかと仮説をたてた。

FNfn10のループ領域のアミノ酸を変異させるにあたっては、コンビナトリアルライブラリースクリーニングの手法を用いた。はじめにコンビナトリアルライブラリースクリーニングで最も多くつかわれているファージディスプレイの手法がFNfn10に応用できるかどうか検討した。M13ファージの膜たんぱく質のひとつp3とFNfn10を繋いだ遺伝子をM13ファージの他の遺伝子と共に大腸菌内で発現させ、M13ファージを生産させたところ、FNfn10がM13ファージの表面にディスプレイされていることが確認された。次にFNfn10のBCループとFGループに対

応する領域にランダムミュータジェネシスをおこないFNfn10のファージライブラリーをつくった。このライブラリーをヒトたんぱく質ユビキティンに対してスクリーニングを行ったところ、ユビキティン結合能を獲得した変異体を得られた。私達は、この変異体がユビキティンに特異性を示す上、FNfn10の基本構造を維持していることを確認した。これにより、FNfn10のループ領域のアミノ酸を変異させることで新規抗体様たんぱく質をつくることのできるという私達の仮説が証明された。私達は、FNfn10を用いた新規抗体様たんぱく質をモノボディと名付けた。

さらに、イースト2ハイブリッドスクリーニングの手法を用いて、ヒトエストロジェンリセプタータイプ α （以下ER α と略す）に結合するモノボディのコンビナトリアルライブラリースクリーニングをおこなった。ER α はさまざまなリガンドと結合すること、そしてER α リガンド結合領域は結合したリガンドによって三次構造をかえることが知られている。私達は、ER α リガンド複合体に特異的に結合するモノボディを得た。これらのモノボディは、細胞内でER α リガンド複合体を区別することができた。

つぎに、私達は、モノボディのフレキシブルループの長さを変えることができるか検討した。FNfn10のループ領域にポリグリシンを挿入し、たんぱく質の安定性を調べたところ、すべてのループが、FNfn10のコア領域の構造を壊さず延長できることがわかった。中でもFGループとABループを延長したものは、野性型とほぼ同じ安定性であった。そこで、延長したFGループ、ABループのランダムミュータジェネシスをそれぞれ行い、2種類のライブラリーをつくり、イースト2ハイブリッドスクリーニングの手法を用いて、ER α に結合するモノボディのコンビナトリアルライブラリースクリーニングをおこなった。それぞれのライブラリーからER α に結合するモノボディを得られた。興味深いことに、FGループのライブラリーから得られたモノボディのFGループのアミノ酸配列は、ABループのライブラリーから得られたモノボディのABループのアミノ酸配列と共通する部分がなく、ループの種類によってペプチドがとりうる3次構造が異なることが明らかにされた。またこの結果から、抗体のCDR1、2、3に対応するループだけでなく、モノボディ分子の反対側に位置するループも新規結合能獲得に使用できることが明らかになった。

つぎに、2種類のFGループのライブラリーを用いて、2種類のたんぱく質、YGR247wとMET22とにそれぞれ結合するモノボディのスクリーニングをおこなった。YGR247w結合モノボディは短いFGループライブラリーのみから得られ、MET22結合モノボディは延長したFGループライブラリーのみから得られた。これらの結果から、ループの長さを変えたライブラリーを複数用意することにより、より多様な結合能を持つモノボディが得られることが明らかになった。

最後に、FNfn10が低pHで最も安定であることに注目し、どのアミノ酸残基が低pHでの安定性に寄与しているか調べた。FNfn10の中性での安定性をより上げる為、低pHでの安定性に寄与するアミノ酸残基の部位特異的変異を行い、変異体の安定性を調べたところ、これら変異体は、野性型より高い安定性を示した。これらの変異体を使うことにより、より大幅な変異をループ領域に安定に導入できる可能性がある。

以上、本研究では、新規抗体様たんぱく質モノボディの構築、モノボディの安定性の研究、新しい結合能を獲得したモノボディのスクリーニングとそれらの特性評価について報告する。