

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 小 出 明 子

新しい結合能を持つ新しいタンパク質を創り出すことは、タンパク質工学の主目的の一つである。そのようなタンパク質は、タンパク質・タンパク質(リガンド)相互作用の研究に役立つほか、医学、工学等さまざまな応用が可能である。本研究では、細胞間マトリクスにおいて細胞間相互作用を担う巨大分子フィブロネクチンの、分子中繰り返しユニットであるタイプ3ドメインの構造が抗体と類似することに着目し、その10番目のフィブロネクチンタイプ3ドメイン(以下FNfn10と略す)を骨組みとして用い、さまざまなタンパク質に対してそれぞれ特異的な結合能をもった新規抗体様タンパク質、すなわち申請者の命名による「モノボディ」を創出することに成功した。

第1章では、さまざまなリガンドに対して特異的結合を示すタンパク質を創出するための戦略として、共通の安定な骨組み構造(scaffold)の上に特異的結合能を付加する例を比較した上で、FNfn10が、 $\beta$ 鎖とフレキシブルなループからなる抗体様の分子でありながら、抗体に比べて分子量が小さく、安定で、水溶性が高く、またS-S結合がないので細胞内でも活性が期待できる優れた特性を持つ点から、新しい骨組み素材としての可能性に着目した。FNfn10のBCループ、DEループ、FGループは、それぞれ抗体の可変ループCDR1、CDR2、CDR3に対応する。抗体の場合、これらのアミノ酸を変異させて多様な抗原に対する特異性、親和性を獲得しているので、申請者は、FNfn10のループ領域を変異させることにより、任意のリガンドに対する結合能を人工的に獲得させることができるという仮説をたてた。

第2章では、まずファージディスプレイによるコンビナトリアルライブラリーの手法を用いて、FNfn10のBCループとFGループ領域にランダムなペプチドを導入したFNfn10のファージライブラリーをつくった。これをヒトユビキチンに対してスクリーニングしたところ、ユビキチンに対する特異的結合能を獲得した変異体を得られ、NMR技術等によりこれがFNfn10の基本構造を安定に維持していることを確認した。これにより、FNfn10のループ領域を変異させて新規抗体様タンパク質を作ることができるという仮説を実証し、これらをモノボディと名付けた。

第3章では、酵母ツーハイブリッド法を用いて、ヒトエストロゲン受容体タイプ $\alpha$ (ER $\alpha$ )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行った。ER $\alpha$ はさまざまなアゴニスト、アンタゴニストと結合し、その結合領域の三次構造が、結合したリガンドによって変化することが知られている。本研究では、各種ER $\alpha$ リガンド複合体にそれぞれ特異的に結合するモノボディを得て、これらが細胞内でもER $\alpha$ リガンド複合体を区別する証拠を示した。

第4章では、モノボディのループの長さを変えることによる効果を検討した。FGループとABループそれぞれの長さを延長した2種類のランダムライブラリーを作り、酵母ツーハイブリッド法でER $\alpha$ に結合するモノボディをスクリーニングし、各ライブラリーからER $\alpha$ に結合するモノボディを得た。FGループライブラリーから得られたモノボディのFGループと、ABループライブラリ

ーから得られたモノボディの AB ループに配列の共通点がないことから、ループの位置によって最適なペプチドの構造が異なることを明らかにした。またターゲットに酵母たんぱく質を用いたモノボディ作製の結果から、ターゲットの種類によって、モノボディのループの最適長が異なることを示唆した。さらにモノボディでは、抗体の CDR に対応するループだけでなく、 $\beta$ シートの反対側のループも新規結合能獲得に使用できることを明らかにした。

第5章では、FNfn10 が低 pH で最も安定であることに注目し、低 pH での安定性に寄与するアミノ酸残基を特定してこれを計画的に変異させ、中性での安定性を野性型の FNfn10 のよりさらに向上させることに成功した。これらを骨組みに用いることにより、より大規模な変異をループ領域に安定に導入することを可能にした。

第6章では、総合考察を行い、とくにプロテオミクスにおけるモノボディの応用的な展望を議論した。

以上、本論文は、独創的アプローチによって任意のタンパク質分子に対する特異的な結合タンパク質をデザインする一般的手法を開発したもので、学問上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。