

審査の結果の要旨

氏名 太期 健二

学位論文「高親和性抗体のスクリーニング方法と抗体結合磁性ビーズプロテオミクス法の開発」について審査した結果を報告する。

生命反応の基本である細胞の刺激応答の分子メカニズムの解明は生命現象の理解に重要であり、様々な病態の解明と新規の治療法の開発につながる。これまで、単一分子の反応機構が論じられてきたが、ゲノム解読とそれに続くトランスクリプトーム解析やプロテオミクス解析の発達により、刺激応答のメカニズムには複数の分子の相互作用が複雑に関与することが知られるようになり、新規の解析法が求められるようになっている。さらに、生体の刺激応答は 10^{-9} モル濃度付近で調節されているため、これらのメカニズムに関与する分子の細胞内濃度は極めて低く、従来の生化学的アプローチが困難である。このように、細胞内の極少量のタンパク質分子の相互作用を検出するには、少量の分子を捉えるプローブが必要不可欠である。抗体は外来性の病原体を攻撃するために生物が進化の過程で獲得した高性能のプローブであるということができる。ケーラーとミルシュタインにより、特定の抗原に対して特異的に反応する抗体分子を作製するモノクローナル抗体の技術が確立されて、ほとんど全ての分子に対する抗体の作出が可能となった。しかし、上記目的に使用できる極微量の目的分子のみを認識する高親和性抗体の作出は必ずしも容易ではない。本研究は、高感度のアッセイ系をうまく組み合わせることにより、効率よく高親和性抗体をスクリーニングする方法を提供し、さらにそれを用いて細胞内の微量タンパク質の相互作用を検出する新規の方法を開発するものである。

本研究の前半では、肝癌の特異的マーカータンパク質である フェトプロテインをマウスに免疫しモノクローナル抗体を作製する過程で、蛍光寿命の長いユーロピウムを用いる高感度 ELISA と表面プラズモン共鳴を用いる定量的抗体抗原反応親和性測定法 (BIAcore 法) を組み合わせることにより、高親和性のモノクローナル抗体を効率よくスクリーニングできることを示している。モノクローナル抗体作製における最初の段階では、ハイブリドーマクローンが多数混在しているため、培養上清中の個々の抗体の正確な濃度が不明であり、高感度 ELISA によりシグナルが検出されても親和性を定量的に測定することが不可能である。また、数種類の抗体が混在する状態では、BIAcore 法も正確な数値を求めることができない。本研究では、抗原抗体の溶液化学平衡論より、異なる 2 種類の抗原濃度を適度に設定することにより、抗体濃度に依存しない抗体親和性の評価式が導かれることを示し、モデル抗原抗体により当該評価式の有効性を立証し、実際に フェトプロテインを抗原として用いて、通常の方法に比べ効率よく高親和性抗体がスクリーニングできることを示した。

本研究の後半では、このような高親和性の抗体を磁性ビーズに固定化し、細胞内の微量タンパク質複合体の濃縮および同定を試みている。HNF4は、核内受容体と呼ばれるファミリータンパク質の一つで、エネルギー代謝に関与するタンパク質の発現量を遺伝子レベルで調節する転写調節因子であるが、肝臓やすい臓細胞の核内に極微量存在するためこれまで検出が困難であった。本研究で得られたヒトHNF4に対する高親和性抗体($K_D < 10^{-9} M$)を非特異タンパク質低吸着性磁性ビーズに固定化し、ヒト肝臓由来培養細胞株HepG2の10cmディッシュ1枚分(細胞数約 10^7 個)からアフィニティー濃縮し、マススペクトロメトリー(MS)によりHNF4タンパク質を同定することに成功している。さらに、アクリルアミドゲル電気泳動法による複合体タンパク質バンドの切り出しとMSにより、HNF4とHNF4が複合体を形成していることを発見し、証明した。また、本法とLC-MSを組み合わせることにより、ショットガンMS法を適用してさらに高感度の相互作用分子の同定法を開発し、10個以上の新規の相互作用分子を同定して、HNF4が他の核内受容体と同様に複合体を形成して転写調節を行なっていることを示した。現在通常のMS解析では大量発現系という人為的方法を用いて、さらにディッシュ300枚からやっと数個の相互作用分子を特定できることと比較すると感度として100倍以上すぐれていると考えられ、また強制的にタンパク質を発現した系では、モル比がくずれたりタンパク質修飾が生理的なものでなくなったりすることから、細胞内の正常な複合体を反映しているといいがたいのに比べ、本法は生理的複合体をそのまま抽出、分析することを可能にした点でも優れている。本研究は、これまで不可能であった細胞内微量タンパク質の複合体解析を可能にするブレイクスルー的技術開発に成功したものであり、これからの生命科学の研究や創薬スクリーニングに与える影響は極めて大きいと考えられる。よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。