

論文審査の結果の要旨

氏名 長田 江里子

本論文は主に「モノクローナル抗体 (Immunoglobulin G) に対するエピトープマッピング」の章を中心に、リボソームディスプレイ法を用いたエピトープマッピングの実用化と応用化について述べられている。

ランダムペプチドプールから新機能・高機能性ペプチドの探索は創薬をはじめ多くの分野でその重要性が指摘されているが、現時点では、基盤となる技術開発が不十分である。そこで、筆者はペプチド-抗体間 (エピトープ-抗体間) の特異的な結合を応用し、10 アミノ酸からなるランダムペプチドライブラリからモノクローナル抗体のエピトープを決定するエピトープマッピング系の技術開発を行った結果について述べている。

現在行われているエピトープマッピング (ペプチドアレイ、ファージディスプレイ、X線結晶構造解析、NMR など) では、コストが高い・汎用性が低い・実験操作が煩雑・合成困難なペプチドがある等の問題を抱えている。このような背景を踏まえ、これらの問題解決の一つの手法として、再構成型無細胞タンパク質合成系である PURE system を応用したリボソームディスプレイ法を提案し、従来法と比較し、迅速かつ簡便にエピトープマッピングを行うことに成功した結果について筆者は述べている。リボソームディスプレイ法とは cDNA ライブラリから *in vitro* で翻訳し、特定の結合特性を持つタンパク質のスクリーニングに大変有用な手法である。リボソームディスプレイ法では、選択ラウンドを繰り返すことで、ターゲット抗体に対して特異的に結合するペプチドの選択ができる。そのうえ、選択されたペプチドのアミノ酸配列からエピトープを決定することも可能である。

「モノクローナル抗体 (Immunoglobulin G) に対するエピトープマッピング」の章では、エピトープ既知および未知のモデル抗体をターゲットに選択を行い、リボソームディスプレイ法を用いたエピトープマッピングの実用化と応用化の可能性について述べられている。技術系確立の第一段階として、エピトープが既知の抗 FLAG M2 モノクローナル抗体に対する選択を行い、抗 FLAG M2 モノクローナル抗体のエピトープ DYKXXD を持つペプチドを濃縮することが出来た。この結果より、リボソームディスプレイ法を用いたエピトープマッピングの実用性が示された。第二段階として、エピトープが未知の抗 β -Catenin モノクローナル抗体を用いた本格的な選択を試み、選択 1 ラウンド後から抗 β -Catenin モノクローナル抗体と特異的に結合するペプチドの選択が出来た。選択後の cDNA プールをクローニングし、配列解析したところ、 β -Catenin と得られたペプチド間のアミノ酸配列に相同性が見られた。そこで、得られたペプチドの配列情報を元に推定エピトープを PURE system で合成すると、この推定エピトープは抗 β -Catenin モノクローナル抗体と特異的に結合した。更に、推定エピトープの配列情報からエピトープの決定にも成功した。本手法を用いることで、エピトープが未知のモノクローナル抗体に対す

るエピトープマッピングができることも示された。第三段階として、本手法の更なる迅速化と簡便化を目指し、抗 β -Cateninモノクローナル抗体のビーズへの固定化方法、およびlow pHバッファーによる溶出条件の検討を行った。前者では、培養上清中に含まれるモノクローナル抗体を直接ビーズへ固定化し、この抗体に対する選択を行った。この方法では、細胞培養サイズのスケールダウンとモノクローナル抗体の精製操作の省略化を図ることが出来る。後者のlow pHバッファーによる溶出では、0.2 M Glycine (pH2.5)を溶出バッファーに使用した。この方法では、抗原タンパクの準備と溶出条件の検討の省略化を図ることが出来る。両者とも、選択1ラウンド後から、ターゲット抗体と特異的に結合するペプチドが選択された。これらの結果から、実験操作の迅速化と簡便化も可能であることが併せて示されている。

以上の成果は、エピトープマッピングのみならず、創薬、抗体工学、タンパク質工学、タンパク質間相互作用解析などの諸分野の発展にも大きく寄与することが期待される。

なお、「モノクローナル抗体 (Immunoglobulin G) に対するエピトープマッピング」の章のモデル抗体である抗FLAG M2モノクローナル抗体に対する選択では、Bintang Karunia Akbar氏との共同研究であるが、著者が主体となって分析および検証を行ったもので、著者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。