

論文審査の結果の要旨

氏名 宇井 美穂子

本論文は、海洋毒の一種である環状ポリエーテル系毒素のうち、世界最大規模の食中毒を引き起こす Ciguatoxin に関して、予防・治療薬として期待される抗 Ciguatoxin 抗体が達成している抗原認識機構、高親和性・特異性創出機構について分子レベルでの記述を目指した研究である。

本論文の大略は次の通りである。

第 1 章は、予防・治療薬としての抗体の重要性と Ciguatoxin およびシガテラ中毒に関するこれまでの研究動向をまとめ、本研究での目的と意義について述べている。

第 2 章では、まず、抗 Ciguatoxin 抗体 10C9Fab 単独と抗原抗体複合体の立体構造を X線結晶構造解析によって解明し、抗原の結合様式を明らかにした。抗原には長さの異なる 2 つの Ciguatoxin 誘導体 CTX3C-ABCD、CTX3C-ABCDE を用い、10C9Fab による認識の違いを比較することで、抗体の環状ポリエーテル化合物に対する認識挙動について詳細に述べている。正規の抗原である CTX3C-ABCDE は、10C9Fab が可変領域の重鎖-軽鎖界面に形成している疎水的で巨大な抗原結合ポケットに結合し、エンタルピー駆動力によって安定な抗原抗体複合体を形成することを示している。このとき、10C9Fab は CTX3C-ABCDE と複合体を形成することによって著しい熱安定性を獲得することも明らかにした。それに対し、抗原として不完全な構造であった CTX3C-ABCD では、CTX3C-ABCDE と同様にエンタルピー駆動型の複合体形成を行うものの、10C9Fab に多大な構造変化を誘起させることで主に定常領域における構造の不安定化を導くことを示した。10C9Fab による CTX3C-ABCD の認識は、抗体の分子全体を利用したダイナミックな結合を示唆しており、このことから、環状ポリエーテル化合物は蛋白質に対して結合エンタルピー獲得のために多大な構造変化を誘発させる可能性があることを明確に示している。

第 3 章は、10C9Fab の抗原結合部位に存在するアミノ酸残基に Ala 変異を導入し、CTX3C-ABCDE への結合活性における各アミノ酸残基の寄与について明らかにした。大腸菌発現系により調製した 7 つの変異型 10C9Fab について、SPR 測定による CTX3C-ABCDE への結合速度と解離速度に関する野生型 10C9Fab との挙動の違いから、抗原結合ポケットが維持する形状相補性の重要性を示した。水分子を介して間接的に相互作用を形成しているアミノ酸残基、また、抗原と直接水素結合を形成している H-N58 に関して、Ala 置換体では野生型 10C9Fab との顕著な違いは確認されなかった。一方、抗原結合ポケットの立体構造形成に積極的に関わっていると推察されるアミノ酸残基への Ala 変異では、著しい結合活性の低下が観察された。このような実験結果から、10C9Fab が CTX3C-ABCDE を認識するためには、抗原抗体相互作用として多くの van der Waals 相互作用を主体として機能させることのできる極めて形状相補性の高い抗原

結合部位を必要とすることが明確に示された。

第4章は、近年注目されている **Fragment-Based Drug Discovery** に関連し、熱力学的測定に基づいたリガンドの選択と創薬戦略について述べたものである。結合分子獲得方法に関しては、ITC および SPR 測定を用いた低分子スクリーニングを行い、10C9 に対する結合活性を持った低分子化合物を同定した。ITC 測定から同定することができた化合物は、いずれも CTX3C の AB 環と類似した構造的特徴を持っていることが明らかとなった。特に水酸基の位置に関して 10C9 は厳密な識別をしており、CTX3C の認識に関しても B 環の水酸基が大きな寄与を果たしていることが推測された。また、SPR 測定から、10C9 は抗原以外の分子でも比較的寛容に受け入れることが示唆され、抗原特異性の創出は化合物の解離過程に反映されていることが示唆された。本研究では、10C9 に結合することのできる分子の最小単位を同定できたと共に、低分子探索における ITC 測定が標的蛋白質との特異的結合に必須な構造的特徴の抽出に非常に有用であることが示された。

以上の結果について、第5章で総括している。

本研究は、研究対象とした抗 **Ciguatoxin** 抗体の分子認識基盤について立体構造、熱力学的解析から明確に記述されており、環状ポリエーテル系毒素による分子間相互作用に関する知見は新規性が高いことから学術的にも大変意義深い。これら抗原抗体相互作用に関する情報は、今後の新たな環状ポリエーテル系毒素認識抗体の作製に指針を与え、医薬品開発の観点からも社会的要請に沿えると期待される。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。