

審査の結果の要旨

氏名 笹島 義志

本論文は、免疫測定の特標識酵素やレポーター酵素として広く用いられる哺乳類由来アルカリフォスターゼ、なかでもヒトアルカリフォスターゼの生命工学分野における有用性向上を目指した蛋白質工学的研究について述べたものであり、4章より構成されている。

第1章は序論であり、本研究の意義を明確にするために、酵素標識抗体とアルカリフォスターゼ(AP)に関する既存の研究を中心に、研究の背景が述べられている。

第2章では、哺乳類細胞を用いた抗体-ヒト AP 融合蛋白質発現システムの構築について述べている。抗体に酵素を標識する一般的な手法として化学標識法があるが、反応のために煩雑な行程を伴い、その過程で抗体の結合能や酵素活性が失われてしまうケースがしばしば見られる。一方で抗体と酵素との融合タンパク質を発現させる遺伝子工学的手法により、これまで抗体と大腸菌 AP との融合タンパクを大腸菌で発現した例がいくつか報告されているが、抗体活性の低下、比活性の低い原核細胞由来酵素しか発現できないといった問題点があった。そこで今回、標的結合分子として抗体の抗原結合能を有する最小単位である V_H 、 V_L ドメインをペプチドリンカーでつなげた single chain Fv (scFv) をヒト由来分泌型 AP である SEAP と融合させた scFv-SEAP 融合蛋白質の酵素動物細胞を用いた発現が示されている。また抗原濃度に依存した V_H - V_L 間相互作用の変化を利用した免疫測定法 Open Sandwich ELISA 法 (OS-ELISA) に利用できる V_H -SEAP 融合蛋白質の発現も若干の分解はあるものの可能であることが示されている。それぞれの融合タンパクは、ともに AP 活性ならびに所期の特標的結合能を有していることが確認され、また精製後の酵素活性評価ではほぼ予想された活性を保持していることが確認された。すなわち本章の手法を応用することで、ELISA や OS-ELISA で用いる様々な種類の標識抗体を迅速に生産できることが示され

た。

第3章では、前章で構築した発現系における酵素部分をさらに各種産業応用に適した性能とするため、ヒトアルカリファスファターゼの2種の相同酵素間の配列キメラ化により、高活性かつ熱安定性の高いAPを創出する試みが述べられている。ヒト由来のAPには胎盤型(PLAP=SEAP)、小腸型(IAP)、生殖細胞型(GCAP)、組織非特異型(TNAP)の4つの相同酵素(アイソザイム)が存在し、それぞれ比活性と熱安定性が異なることが知られている。なかでもPLAPは最も高い熱安定性を持ち、IAPは最も高い比活性を示し、両者のアミノ酸配列の相同性は88%と高い。そこで、両者の配列情報と立体構造情報をもとに配列をキメラ化することで、両者の長を併せ持つ、高活性かつ熱安定性が高い、標識酵素に適したAPを創出することが試みられた。この結果、N末側にIAP由来配列をもち、C末側に分泌型PLAP配列をもつ2種類のキメラ酵素がPLAPよりも高い熱安定性と、高い比活性を持つことが示された。なかでも1種類はIAPよりも高い比活性を示し、診断分野において特に有用性が高い酵素であると結論づけられた。また、熱安定性の高い変異体は二量体の界面に近い残基がPLAP由来残基であることから、二量体の安定化が酵素全体の安定化にも重要であることが示唆された。また興味深いことに、最もN末端の25残基は二量体の安定化に寄与するにも関わらず、IAP由来の配列にした方がより高い安定性を示すという知見も得られている。

第4章では研究全体の総括と、今後の展望が述べられている。

以上本論文において筆者は、代表的な哺乳類由来APであるヒトAPの抗体融合酵素としての有用性、ならびにAP自体のエンジニアリングによる天然酵素を上回る比活性と安定性を持つ酵素の取得という二つの側面で、蛋白質工学を応用した新たな有用タンパク質の創製に成功した。その成果は蛋白質工学ならびに本酵素の蛋白質科学の進展に寄与するところ大である。

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。