

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 黒澤 恒平

動物は免疫によって自己と非自己を識別し、非自己を排除することで外来の病原体から生体を防御している。高等動物の免疫機構には、生まれながらにして備わっている免疫と、後天的に病原体と遭遇する経験で備わる免疫がある。後者は、獲得免疫と呼ばれ、B細胞などのいわゆるリンパ球により担われている。また、B細胞で発現している抗原受容体タンパク質(抗体)の遺伝子はあらゆる病原体に対抗するために、積極的にDNA組換えを起こし、多様性を獲得している。さらに、均一な抗原認識能をもったモノクローナル抗体は副作用の少ない標的分子医薬や生命科学実験用試薬として用いられており、非常に注目度の高い分子である。本研究では、抗体の遺伝子多様化機構とそれを利用した抗体設計技術に関するものである。本研究により、抗体遺伝子の多様化にヒストン脱アセチル化酵素のHDAC1が関与すること、またHDAC1およびそのパラログであるHDAC2が抗体遺伝子の多様化や発現において異なる機能を有することを見出した。さらに、抗体の定常領域の迅速改変技術の開発にも成功している。以下に本論文の構成と概要を述べる。

序論において、抗体の構造や生体内での免疫としての役割が概観されている。次に、抗体遺伝子多様化とヒストン化学修飾の関与について、これまでの背景がまとめられている。最後に、ニワトリB細胞由来のDT40細胞をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のトリコスタチンAで処理すると抗体遺伝子の多様化が促進すること、DT40細胞を使ったモノクローナル抗体作製技術であるADLibシステムの概要が説明されている。また、ADLibシステムの改良を目的として、ヒストン脱アセチル化酵素による抗体遺伝子多様化機構の解析と、抗体定常領域を改変技術の開発を行ったことが記載されている。筆者は上記の目的達成のため、高頻度で遺伝子ターゲティングが可能なDT40細胞と逆遺伝学的手法を用いて、分子機構の解析と抗体設計技術の開発を行った。

「結果」の第1章では「抗体遺伝子可変領域の多様化に関するヒストン脱アセチル化酵素の機能」、第2章では「抗体定常領域の迅速可変方法の開発」について記述されている。第1章の結果は3部から構成される。第1部では、HDAC1遺伝子もしくはHDAC2遺伝子をノックアウトしたDT40細胞の表現型解析が行われている。ここでは、抗体遺伝子の転写と多様化の制御にHDAC1が関与することが示され、さらに抗体遺伝子制御においてHDAC1はHDAC2とは異なる役割を果たすことが明らかにされた。第2部では、HDAC1とHDAC2の機能分業メカニズムについて検証がなされた。はじめに、両タンパク質の構造的差異に注目し、部位特異的置換を用いて実験を行って

る。その結果、保存性の低い C 末端側の領域ではなく、保存性の高い N 末端側の構造的差異が抗体遺伝子制御における役割の違いを生み出していることが示された。さらに、抗体遺伝子重鎖の転写制御における機能分業には上述の構造的差異に加えて、両遺伝子の発現量の差も影響することが明らかになった。第 3 部では、HDAC1 および HDAC2 が抗体タンパク質の性質にどのような影響をおよぼすかについて検証がなされている。それぞれの遺伝子破壊株から ADLib システムでウサギ IgG に特異的に結合する抗体産生細胞の獲得を試みている。その結果、HDAC2 遺伝子破壊株の方がウサギ IgG 抗体を効率的に獲得できることが示された。考察では、HDAC1 遺伝子破壊株と HDAC2 遺伝子破壊株で増殖の違いや、ヒストン脱アセチル化の基質特異性の違いについて、その意義が検討された。また、HDAC1 に特異的なリン酸化サイトの意義についても考察されている。

第 2 章の結果は 5 部から構成される。第 1 部では、loxP 配列とその変異体である 2272 配列を DT40 細胞の抗体遺伝子重鎖の定常領域に挿入した細胞株の構築について述べられている。第 2 部では、ADLib システムを用いて前述の細胞株から抗 EGFR 抗体産生細胞を獲得したことが述べられている。第 3 部では、Cre リコンビナーゼを利用して、抗体の Fc 部分がマウス IgG 型の抗 EGFR キメラ抗体産生細胞の作製に成功している。なお、遺伝子導入後は培地に選抜用の薬剤を加えるだけで短時間(4 日程度)のうちに抗体 Fc 領域を改変した細胞を獲得できることが示されている。第 4 部から第 5 部では、上述の Fc 迅速改変技術を用いてルシフェラーゼや蛍光タンパク質を融合した抗体を産生する細胞株の構築に取り組んでいる。また、それらの抗体が ELISA、FACS、免疫染色、ドットブロットなどの検出試薬として使用できることを確認している。考察では、DT40 細胞を使ってモノクローナル抗体を作製する利点と、本研究で開発した Fc 改変技術の応用について述べられている。

本研究は、HDAC1 が抗体遺伝子制御に関わることがはじめて明らかにした点、また、HDAC1 とそのパラログである HDAC2 の機能分業メカニズムを遺伝学的に示した点、またそれらを介した抗体遺伝子多様化と特異抗体出現効率の検証、抗体の定常領域を従来法よりも格段に迅速かつ簡便に改変する技術を開発した点で、当該分野において学問的に重要な貢献を果たしたと考えられる。

なお、本論文のデータの一部は、林和花と太田邦史との共同研究により得られたものである。しかしながら、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。したがって、審査委員会は全員一致で黒澤恒平に博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。