

審査の結果の要旨

氏名 飯田 健夫

生体内には、血中とエンドソーム内の微細な pH 変化に応答し標的分子と結合・乖離を行うことで、代謝を回避しリサイクルする機構を有するタンパク質が複数報告されている。近年、このような pH 依存的な相互作用をタンパク質性医薬品に対し人工的に付与することで、代謝安定性を高めることが可能となることを示唆する研究が報告されているが、その適応範囲は極めて限定的であった。

飯田健夫氏は、あらゆる標的分子に対して pH 依存的に相互作用する分子を創出するための新技術の構築を目指し、モデル系としてヒト胎児性 Fc 受容体 (FcRn) に対する pH 感受性ペプチドアダプターの取得を行った。

第一章では、天然に存在する様々な pH 依存的な相互作用の例を交えながら、モデルとして選択した FcRn と免疫グロブリン G (Immunoglobulin G, IgG) の相互作用が生体内でどのような役割を果たしているかについて述べられている。次に、pH 依存性を志向したタンパク質エンジニアリングの現状と課題について説明した後、新規に pH 依存的に相互作用する分子を取得するための技術背景となる試験管内選択技術、および遺伝暗号改変技術について述べられている。

第二章においては、無細胞翻訳系によって構築した大環状構造を有するペプチドライブラリーを用いて、FcRn に対する pH 感受性ペプチドアダプターの取得について報告している。従来の試験管内選択とは異なり、標的分子に対する pH 6.0 における結合と pH 7.4 における乖離による淘汰圧を加えることで、pH 依存的に相互作用する分子の取得を行った結果、FcRn に対して数 nM～数百 nM の解離定数で結合する様々な新規のペプチド配列の取得に成功した。得られたペプチドの中には、pH 6.0 から 7.4 への微細な変化によって約 4 倍親和性が減少するペプチドも含まれており、pH 感受性ペプチドアダプターが取得されている。しかしながら、pH 6.0 における親和性に関しては、天然の基質である IgG と同等以上であるものが多い一方で、pH 依存性に関しては更に改善の余地がある結果となった。

第三章では、前章で取得されたものよりも強く pH 依存性を示す分子を取得するための手法として、pH 依存性を志向した改変遺伝暗号表の構築と、それを用いた FcRn 結合 pH 感受性ペプチドアプタマーの試験管内選択について報告している。本章ではまず、生体内の pH 変化により側鎖の電荷の状態が変化する非タンパク質性アミノ酸を調査し、3-ニトロチロシン、4-アミノフェニルアラニン、3-ピリジルアラニン、N ω -ニトロアルギニンを見出した。続いて、アミノアシル tRNA 合成リボザイムであるフレキシザイムを用いて、これらの非タンパク質性アミノ酸が翻訳導入可能かどうか検証を行った。さらにこれらの非タンパク質性アミノ酸を含む、合計 22 種類のアミノ酸をコードした改変遺伝暗号表を構築し、最終的に、この改変遺伝暗号表を試験管内選択法と組み合わせることにより、FcRn に対する pH 感受性ペプチドアプタマーの単離に成功した。新規に得られたペプチドは、pH 6.0 では FcRn に強固に結合する一方で、pH 7.4 では解離定数が約 70 倍低下することが確認されている。また、ヒト結腸癌由来の細胞株である Caco-2 細胞に発現している FcRn に対しても pH 依存的に相互作用することを示唆する結果が得られている。この一連研究により、本技術が pH 依存的に標的分子と相互作用する分子の創出のための基盤技術となりうることが証明された。

結論では、本論文の総括と意義、今後の展望について述べている。

以上より、本論文では試験管内選択法と改変遺伝暗号技術を利用し、pH 感受性ペプチドアプタマーを取得するための、独創性の高い新技術が提案・実証されている。これらの成果が、今後のバイオテクノロジー及びケミカルバイオロジーの発展に与える意義は非常に大きい。

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。