

学位論文要旨

学位授与申請者

氏名 雨坂 心人

題目 : Design and development of antibody mimics intended to enhance their versatility.
(抗体模倣分子の有用性拡大を志向した設計と開発)

本研究では、抗体模倣分子として広く研究されているモノボディ (Mb) を対象に、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) に関連する単量体 Cu/Zn スーパーオキシドジスムターゼ (SOD1) の検出における有用性を評価した。加えて、「超好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 cold shock protein (TmCSP) を骨格とする加熱殺菌可能な新規抗体模倣分子」の創出方法ならびに機能・物性解析の詳細を報告した。

Chapter 1: General introduction. (序論)

抗体模倣分子は、抗体の可変領域を模倣して設計された、抗原特異的結合能を有するタンパク質分子である。これまでに、Mb、DARPin、アンチカリンなどの多数の抗体模倣分子が、様々なタンパク質骨格を基盤に開発されてきた。抗体と比較して、抗体模倣分子は分子量が小さい、開発期間が短い、大腸菌で大量生産が可能である、さらに構造骨格にジスルフィド結合を持たないため細胞内での利用が可能であるといった利点を有している。このような特徴から、抗体模倣分子は医学・生物学の診断薬や研究ツール、さらにはバイオ医薬品としての応用を見据えた研究開発が進められている。本研究では、ALS に関連する単量体 SOD1 を特異的に検出する Mb の開発、および医療分野での安全性向上を目指して「加熱殺菌可能な新規抗体模倣分子」の創出に取り組んだ。

Chapter 2: Engineering a monobody specific to monomeric Cu/Zn-superoxide dismutase associated with amyotrophic lateral sclerosis.

(筋萎縮性側索硬化症に関連する単量体 Cu/Zn-superoxide dismutase に特異的なモノボディのエンジニアリング)

SOD1 は、細胞内で活性酸素を分解する働きを持つ酸化還元酵素で、通常は銅イオンと亜鉛イオンを含むホモ二量体として安定した構造を保っている。しかしながら、ALS 患者の一部では、ミスフォールドした SOD1 が脊髄の運動ニューロンに蓄積していることが知られている。この原因として、金属イオンの解離や病原性変異による構造的不安定化が挙げられ、それによって SOD1 が凝集しやすい単量体へと変化し、ALS の発症につながると考えられている。このような背景から、ALS の病態解明への貢献ならびに診断用ツールへの応用を目指し、単量体 SOD1 を特異的に認識するプローブとして Mb の開発に取り組んだ。

ファージディスプレイと酵母表面ディスプレイを用いて、変異導入により単量体化させた SOD1 に対する Mb のスクリーニングを行い、二量体 SOD1 (WT) には結合せず、単量体 SOD1 に対して特異的に結合する Mb (S4) を獲得した。一方で、単量体 SOD1 と Mb (S4) の親和性が低いということから、近接分子を特異的に架橋するクロスリンク法の併用で単量体 SOD1 の検出を試みた。in vitro 試料として精製された

SOD1、ex vivo 試料として SOD1 を発現させたマウス由来神経芽細胞腫細胞株 Neuro-2a, *S. cerevisiae*, *E. coli* のライセートを用意し、それぞれに対して Mb (S4) を添加後、架橋剤処理を施した。架橋後の試料を SDS-PAGE とウェスタンブロッティングで解析した結果、Mb (S4) は in vitro と ex vivo の両条件において単量体 SOD1 を特異的に検出できることを示した。

Chapter 3: Heat-sterilizable antibody mimics designed on the cold shock protein scaffold from hyperthermophile *Thermotoga maritima*.

(超好熱菌 *Thermotoga maritima* 由来 cold shock protein を骨格として設計された加熱殺菌可能な抗体模倣分子)

バイオ医薬品の製造工程への加熱殺菌処理の導入は、高度な安全性が求められる医療分野で有益だと考えられる。しかしながら、Chapter 2 で用いた Mb を含めた従来の抗体模倣分子や抗体は、高温下で不可逆的に変性するため、加熱殺菌処理の導入は困難であった。そこで本研究では、高温下で変性状態となるが、常温に戻すと天然構造へと巻き戻るという TmCSP の高いリフォールディング特性に着目し、TmCSP を骨格とする加熱殺菌可能な新規抗体模倣分子の創出を目指した。

まず、TmCSP の構造表面アミノ酸残基に対して網羅的な変異解析を行い、変異を導入しても安定性を大きく失わない部位を特定した。次に、特定したアミノ酸残基の一部を多様化した変異体ライブラリを構築し、そのライブラリの中から、ファージディスプレイと酵母表面ディスプレイによる選別を経て、8 種類の標的タンパク質に対して結合する 47 種類の変異体 TmCSP を取得した。取得した変異体 TmCSP に対し、生化学的および分光学的手法を用いて機能と物性を解析した。その結果、100℃での熱処理後、常温に戻すと、解析を行った全ての変異体 TmCSP で二次構造および結合能がほぼ完全に回復することを確認した。さらに、オートクレーブ処理 (121℃、20 分、2 気圧) 後でも、二次構造および結合能を回復する変異体 TmCSP も存在した。また、これらの変異体 TmCSP は凍結乾燥後も機能を保持した。加えて、変異体 TmCSP とその標的である *Alicyclobacillus acidocaldarius* 由来 Esterase との複合体の結晶構造を 2.0 Å の解像度で決定し、特異的な相互作用の詳細を確認した。

Chapter 4: General discussion and Conclusion. (総括と結論)

本研究では、ALS に関連する単量体 SOD1 を特異的に検出する Mb の開発、および加熱殺菌可能な新規抗体模倣分子の創出を行った。Mb (S4) は単量体 SOD1 に対して高い特異性を示し、架橋剤を活用した手法により、in vitro および ex vivo 条件下で単量体 SOD1 を正確に検出できることを確認した。また、TmCSP を骨格とする抗体模倣分子は、100~121℃の加熱殺菌処理や凍結乾燥に耐える優れた特性を備えていることを確認し、これらの抗体模倣分子を HSbody と命名した。これらの成果は、さらなる抗体模倣分子の応用可能性を大きく高めると期待される。