

博士学位論文審査等報告書

審査委員 主査 田中 俊一

副査 増村 威宏

副査 高野 和文

副査 岩崎 有作

副査 岡 真優子

1 氏名： 雨坂 心人

2 学位の種類： 博士（理学）

3 学位授与の要件： 学位規程第3条第3項該当

4 学位論文題目

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）

5 学位論文の要旨および審査結果の要旨

【学位論文の要旨】

別紙に記載

【論文目録】

別紙に記載

【審査結果の要旨】

本論文では、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ている。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ものである。

Chapter 1 では、抗体模倣分子の特徴や活用方法、これまでに開発されてきた代表的な抗体模倣分子について概説している。抗体模倣分子は多様な応用事例が報告されているが、従来にない独自の特性を持つ抗体模倣分子の開発や新たな応用方法の

提案によって、その適用範囲をさらに拡大できる。

Chapter 2 では、抗体模倣分子の応用事例の 1 つとして、ALS に関連する単量体 SOD1 を特異的に検出する Mb の開発を記載している。SOD1 は通常、ホモ二量体として安定しているが、ALS 患者ではミスフォールドにより単量体化し、神経細胞に蓄積すると考えられている。本研究では、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、二量体 SOD1 には結合せず、単量体 SOD1 に特異的に結合する Mb (S4) を取得に成功している。しかし、Mb (S4) の親和性が低いため、クロスリンク法を併用する検出系を構築している。精製 SOD1 (in vitro) および Neuro-2a 細胞などのライセート (ex vivo) を用いた解析により、Mb (S4) が単量体 SOD1 を特異的に検出できることを確認している。

Chapter 3 では、従来の抗体模倣分子にはない特徴を持った抗体模倣分子の開発として、「加熱殺菌可能な新規抗体模倣分子の創出」について記載している。バイオ医薬品の製造において加熱殺菌処理の導入は有益だが、従来の抗体模倣分子や抗体は高温で不可逆的に変性するため困難であった。本研究では、高温で変性しても常温で天然構造に戻る TmCSP のリフォールディング特性に着目し、加熱殺菌可能な抗体模倣分子の創出に成功している。構造表面の網羅的変異解析により安定性を維持できる部位を特定し、変異体ライブラリを構築した後、ファージおよび酵母表面ディスプレイ法により 8 種類の標的に結合する 47 種の変異体を取得している。解析の結果、全ての変異体は 100℃処理後に二次構造と結合能が回復し、一部は 121℃のオートクレーブ処理後も機能を保持していることを確認している。また、凍結乾燥後も結合能を維持していることを確認している。さらに標的との複合体構造を 2.0 Å の解像度で決定し、標的特異的な結合様式も明らかにしている。

Chapter 4 では、本研究成果のまとめ、抗体模倣分子分野の発展における本研究成果の意義を述べている。

以上、本論文では、抗体模倣分子の有用性を示すとともに、その適用範囲の拡大に貢献する成果を示している。本研究の成果は、抗体模倣分子のさらなる活用を促進し、タンパク質工学や医療をはじめとする幅広い研究分野の発展に寄与することが期待される。以上より、本論文は博士論文の要件を十分に満たすものであると評価できる。

6 最終試験の結果の要旨

本論文の内容は、令和 7 年 2 月 7 日午前 15 時より、稲盛記念会館 101 室において公開の博士学位論文発表会で発表された。口頭発表後、質疑応答が行われ、抗体模倣分子の創出方法、抗体模倣分子と抗体の違い、抗体模倣分子は SOD1 以外の標的に対しての単量体・二量体の識別に適応可能か、抗体模倣分子は低分子化合物も標的として利用可能か、加熱殺菌可能な抗体模倣分子は生体内で適切に代謝されるの

かなど、多岐にわたる内容であったが、それぞれ適切に回答した。最終試験の結果としては、審査委員全員一致で合格とした。

以上