

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	非天然アミノ酸を用いた抗体への 新たな機能の付加に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	来見田遥一
Author(English)	Yoichi Kurumida
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10935号, 授与年月日:2018年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:林 宣宏,一瀬 宏,村上 聡,長田 俊哉,上田 宏
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10935号, Conferred date:2018/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：	分子生命科学	専攻	申請学位 (専攻分野)：	博士	(理学)
Department of			Academic Degree Requested	Doctor of	
学生氏名：	来見田 遥一		指導教員 (主)：	林宣宏	准教授
Student's Name			Academic Supervisor(main)		
			指導教員 (副)：		
			Academic Supervisor (sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

[目的] 抗体は生体内免疫系で働くタンパク質の一種であり、その標的分子に対して高い親和性と特異性を持つため、分子の検出や病原体を標的とする医薬品として使用されている。本研究では、非天然のアミノ酸を用いて新たな機能を付加することで、さらに有用性の高い抗体を開発することを目的とした。

大腸菌を用いた *in vivo* 非天然アミノ酸導入系を使用して、非天然のアミノ酸である 3-アジド-L-チロシンを抗体に導入することで、特定の官能基をもつ任意の分子を部位特異的にこの抗体に付加することができる。まず、この部位特異的な蛍光色素の修飾により、溶液中の抗原を蛍光測定のみで検出できる Q-body を開発した。次に、光異性化分子であるアゾベンゼンを部位特異的に導入して、紫外線照射により結合力変化が起こる Light-body を作製した。その元となる抗体には、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) の遺伝子産物の一つである Nef を抗原とする抗 Nef 抗体を使用した。抗 Nef 抗体が認識する抗原の部位 (エピトープ) が不明であったため、最初にエピトープの探索を行なった。

[結果] 本論文の第 2 章では、抗 Nef 抗体のエピトープの探索を行なった。Nef のアミノ酸配列に相当するペプチドを用いた競合 ELISA により、抗原の N 末端の Gly2-Ser9 がエピトープであることがわかった。

本論文の第 3 章では、5 種類の Nef Q-body の作製を行なった。まずホモロジーモデリングにより抗体の構造を予測した。抗体の相補性決定領域 (CDR) から 5 残基以内に存在する保存度の低い 4 箇所のアミノ酸残基と、CDR から遠距離の 1 箇所を選び、アジドチロシンに置換したのち、蛍光色素の Cy3 で修飾した。Cy3 修飾抗体に対して抗原を滴定し、その時の蛍光強度を測定した。その結果、抗体の L 鎖の 67 番目の Lue (L67L) を 3-アジド-L-チロシンに変異させ蛍光色素を導入した L67LAzY の蛍光強度が、抗原結合により最大約 1.8 倍となった。抗体のアミノ酸配列で L67L の隣に位置する L 鎖の 66 番目の Thr (T66L) を同様の方法で蛍光色素修飾した T66LAzY は蛍光強度が 1.4 倍であった。こういった結果から、蛍光色素が、抗原が結合していない状態では、保存されているトリプトファンによりクエンチされていることを確認した。また、保存されていないトリプトファンをフェニルアラニンに置換したところ、蛍光強度が抗原結合により最大約 2 倍となり感度が増大した。抗原のエピトープ近傍に存在しているトリプトファンをフェニルアラニンに置換したところ、蛍光強度の変化率が低下した。

本論文の第 4 章では、紫外線照射により構造異性化を起こすアゾベンゼンの誘導体を導入した Nef Light-body を作製した。L67L をアジドチロシンに置換した抗体にアゾベンゼン誘導体の修飾を行なった結果、6.7% の修飾率となった。この抗体と抗原の結合力を表面プラズモン共鳴法により比較したところ、紫外線照射を行っていないものを 100% とした時に、紫外線照射を行なったものでは 95% に有意に低下することを確認した。

[考察] 第 2 章では、抗 Nef 抗体のエピトープが N 末端の 2-9 残基であることが判った。Nef の N 末端の Gly2 はミリスチル化され細胞膜への局在に寄与している。また Nef の Ser6 はミリスチル基を基質から Nef に転移させる N-ミリスチル化転移酵素の認識部位となっており、この部位に結合することでミリスチル化が抑えられることが予想される。従って、抗 Nef 抗体は AIDS の発症に関係があると考えられている Nef の細胞膜への移行を阻害する可能性が示唆された。

第 3 章 Nef Q-body の開発では、隣り合っているアミノ酸残基にそれぞれ蛍光色素を導入した T66LAzY と L67LAzY の蛍光強度変化率が 1.4 倍と 1.8 倍と異なった。トリプトファンとの距離はほとんど変わらないのにも関わらず蛍光強度変化率が大きく変化した理由として、T66L と L67L の部位は β シート構造を取っているため T66L と L67L のアミノ酸残基の側鎖の向きは互いに逆向きとなる。このことから蛍光強度変化はクエンチを行なっているトリプトファンと蛍光色素の距離のみでなく、アミノ酸残基の側鎖の向きも蛍光強度変化率に関与する可能性が示唆された。

抗体の抗原認識部位である CDR のある面に露出しているトリプトファンをフェニルアラニンに置換することで、蛍光強度変化が最大 2 倍となる Q-body の開発に成功した。この知見は、他の Q-body の感度上昇に有用と考えられる。

本研究により、アゾベンゼンを導入することで紫外線の照射による結合力変化可能な抗体が作製できることを証明した。今後さらに結合力変化率が上昇することにより、Light-body を用いた変性を伴わない抗体カラムの作製や細胞内での分子操作が可能となることが期待される。

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：	分子生命科学	専攻
Department of		
学生氏名：	来見田 遥一	
Student's Name		

申請学位(専攻分野)：	博士	(理学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員(主)：	林 宣宏	准教授
Academic Supervisor(main)		
指導教員(副)：		
Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

[Introduction] An antibody is a protein that can bind to an antigen with high affinity and specificity. In this study, two types of antibodies have been developed using an *in vivo* site-specific unnatural amino acid incorporation system. One of the antibodies named Q-body can detect target molecules in solutions. The other one named Light-body can change the affinity with ultraviolet light (UV) irradiation. An antibody that recognizes the human immunodeficiency virus (HIV) antigen Nef was used as the prototype. And, the antibody's epitope was identified.

[Results and Discussions] In the chapter 2, the epitope of the anti-Nef antibody was identified using comparative-ELISA method. The antibody's epitope was revealed to locate at Gly2-Ser9. The N-term of Nef is involved in the localization to the cell membrane. Therefore, the localization of Nef might be inhibited using this antibody.

In the chapter 3, Q-bodies were developed from the anti-Nef antibody. Each of the five amino acid residues in the antigen were changed to 3-azido-L-tyrosine, and were modified with Cy3. Fluorescence intensities were measured with titration of the antigen.

In the results, the maximum change in fluorescence intensity of 2-fold was observed after optimization of the dye position. And, fluorescence intensity of an antibody whose non-conserved tryptophan was changed increased.

In the chapter 4, Light-body was developed from the same anti-Nef antibody. Azobenzene is a small compound whose structure is changed by UV irradiation. The antibody was modified by an azobenzene derivative. The antibody affinity was measured with or without UV irradiation. In the result, the affinity of the antibody decreased with UV irradiation. It is a success that developed antibody can be changed the affinity using UV irradiation. The antibody might be used as an antibody column. And, binding affinity of the antibody might be controlled in the cells.