

京都大学	博士 (医学)	氏 名	Suharni
論文題目	Proteoliposome-based selection of a recombinant antibody fragment against the human M2 muscarinic acetylcholine receptor (ヒト M2 ムスカリン性アセチルコリン受容体に対する組換え型抗体フラグメントの効率的選抜法の確立)		
(論文内容の要旨)			
<p>G タンパク質共役型受容体 (GPCR)は、心血管疾患、消化器疾患、代謝性疾患、神経変性疾患、精神疾患、免疫系疾患、がん等の発症に関与することが示されており、臨床での使用が認可された医薬品の 30%以上が GPCR を作用点としている。今後、GPCR に関連した病因の理解が進むとともに、GPCR の性状解析・精製・組織局在性解析・臨床診断・医薬品等の用途での抗体の需要はさらに高まってゆくであろう。しかしながら、GPCR に対する抗体作製は技術的に困難である。大部分の GPCR は界面活性剤を用いて可溶化した状態では不安定なため、変性・凝集しやすく、抗体スクリーニングの過程で非特異結合や擬陽性を生じさせる原因となる。GPCR をリポソームに再構成して抗原・結合標的として用いれば、これらの問題点が克服できるものと考えられる。</p> <p>本論文では、抗 GPCR 抗体の産生・単離を目的としてプロテオリポソームを用いた免疫・スクリーニング技術の開発に関する一連の研究を述べている。技術開発のモデル標的としては、医学・基礎生物学研究における重要性を考慮し、ヒト M2 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (M2 受容体) を選定した。本論文は大きく 4 つの部分から構成されている。</p> <p>(1) プロテオリポソーム抗原を用いた免疫法. 高親和性の逆作動薬 3-quinclidinyl-benzilate (QNB)が結合して安定化された M2 受容体精製品を、ニワトリ卵黄ホスファチジルコリン (egg PC) を用いて再構成した。アジュバントとして Lipid A をリポソーム中に添加した。免疫寛容を回避するために M2/M4 ダブルノックアウトマウスにリポソーム抗原を免疫し、一本鎖 Fv (scFv)抗体ファージライブラリーを作製した。</p> <p>(2) プロテオリポソームを結合標的としたファージライブラリーの効率的選抜法. QNB 結合型の M2 受容体精製品を、egg PC と 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(cap biotiny) (ビオチン化脂質) を用いて再構成した。得られたビオチン化プロテオリポソームをストレプトアビジンが固定化されたマイクロプレートまたは磁気ビーズに結合させて、ファージライブラリー選抜の標的とした。ファージパニングおよびリポソームを標的とした ELISA を行い、scFv を 1 クローン単離した。</p> <p>(3) 結合定数の測定. 界面活性剤を含むバッファー中で、scFv と M2 受容体精製品の相互作用を検出する表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定技術を確立した。選抜された scFv は、QNB 結合 M2 受容体に対して高親和性を示し、その解離定数は nM オーダーであった。</p> <p>(4) エピトープマッピング. 選抜された scFv のエピトープを同定するため、膜外親水性領域に相当するポリペプチド配列を 1 つずつ無作為な異なる配列に置換した変異体、さらには特定の親水性領域にアラニンスキャン変異を導入した変異体を作製した。これら一群の変異体を用いて ELISA を行った結果、エピトープは細胞内第 3 ループ (ICL3) 内部のアミノ酸配列であると同定できた。この配列は他のムスカリン受容体サブタイプには存在しないため、選抜された scFv は M2 受容体に対して特異性が高いことが示唆された。</p> <p>以上を総括すると、本研究で確立された方法はヒト・哺乳類の GPCR、とりわけ熱安定性が低い GPCR に対する特異的バインダーを取得するのに有用である。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

G タンパク質共役型受容体 (GPCR)は種々の疾患の発症に深く関与する。今後、GPCR に関連した病因の理解が進むとともに、GPCR の性状解析・精製・組織局在性解析・臨床診断・医薬品等の用途での抗 GPCR 抗体の需要はさらに高まると予想される。しかしながら、これまで GPCR に対する抗体作製は技術的に困難であった。大部分の GPCR は界面活性剤を用いて可溶化した状態では不安定なため、変性・凝集しやすく、抗体スクリーニングの過程で非特異結合や擬陽性を生じるためである。

本学位授与申請者は、GPCR をリポソームに再構成して抗原・結合標的として用いれば、上記の問題点が克服できる可能性が高いという点に着目して、プロテオリポソームを用いた免疫法およびファージディスプレイ法による抗体スクリーニング技術の開発を行った。技術開発のモデル標的としては、医学・基礎生物学研究における重要性を考慮し、ヒト M2 ムスカリン性アセチルコリン受容体 (M2 受容体) を用いた。また実際に、ヒト M2 受容体に対して高い特異性・親和性を兼ね備えた scFv クローンを単離し、開発した技術の実用性を証明した。

以上の研究はヒト・哺乳類の膜蛋白質、とりわけ安定性が低い GPCR に対する特異抗体を迅速かつ高効率で作製する汎用技術の確立に貢献し、基礎医学・生化学に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 10 月 21 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである

要旨公開可能日： 年 月 日以降