

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 RITTHISAN Panwad

論文題目

Strategies for improving the expression of antibody derivatives in *Escherichia coli*

(大腸菌を用いたモノクローナル抗体派生物合成の効率化戦略)

### 論文審査担当者

主査	名古屋大学教授	中野秀雄
委員	名古屋大学教授	北島健
委員	名古屋大学准教授	佐藤ちひろ
委員	名古屋大学准教授	岩崎雄吾
委員	名古屋大学助教	兒島孝明

## 論文審査の結果の要旨

Panwad Ritthisan は、モノクローナル抗体およびその派生物の産業利用を目的として、そのより効率的な合成方法の開発に取り組み、安価な製造が期待される大腸菌細胞質内での大量合成方法を検討した。また新規な抗体-酵素融合タンパク質の作製とその性質決定を行った。以下にその要旨を記載する。

抗体は、研究用試薬、検査薬、治療薬をはじめとして、バイオセンサーなど、バイオサイエンスやバイオテクノロジーの様々な分野で利用されている重要な分子の一つである。中でも単一な分子であるモノクローナル抗体とその派生分子は、その特異性や生産安定性と、分子機能を制御できることから近年ますます重要になってきている。モノクローナル抗体は、一般的にはハイブリドーマ技術によって取得され、マウスの腹水中や、細胞培養により製造されている。しかしながら、ハイブリドーマ法は数ヶ月以上の長い時間を要する。さらにその後の動物細胞を用いた工業的規模のタンパク質生産には膨大なコストがかかる他、比較的安価なマウス腹水による製造は動物愛護の観点から問題となりつつある。中野らの研究グループは、ロイシンジッパーのペプをそれぞれ重鎖 (Hc) と軽鎖 (Lc) の C 末端に融合した「Zipbody」という新しい Fab の派生物を開発した。さらタンパク質の N 末端に Ser-Lys-Ile-Lys (SKIK) の短いペプチドタグを挿入することで、大腸菌でのタンパク質合成量を顕著に増大させることを見出した。申請者の博士論文研究では、これらの発見をベースとした抗体結合部位 (Fab) およびその派生物の大量合成法を検討した。例として用いた抗体は、食品安全上非常に重要な大腸菌 0157 に対する特異的モノクローナル抗体と、食物アレルギーとして食品への混入制御が重要なソバアレルギーに対するモノクローナル抗体である。

第 2 章では、大腸菌封入体から Fab 派生物を高収率で得るためのリフォールディング法を検討した。大腸菌 0157 に対するマウス Zipbody (m6FabLZ) を大腸菌 BL21 (DE3) により、37°C で培養し封入体として大量発現させた。その封入体の可溶化条件を調べた。特にタンパク質の局所的な二次構造の保持させることで、フォールディングの効率が上がるのではないかという仮定のもと、低濃度の変性剤の使用と物理的な可溶化とを組み合わせた手法を検討した。最終的に凍結融解法と通常の 1/3 程度の変性剤の使用による封入体の可溶化と活性体へのリフォールディング条件を見出した。精製された m6FabLZ の収量は、1L の培養物から 0.25g であり、大腸菌 0157 に対して高い親和性と特異性を示した。ここで使用されるリフォールディング手順は、比較的短時間で行うことができ、今後の応用が期待される。

第 3 章では、抗体と酵素の融合タンパク質の大量合成を、酸化的細胞質内環境を有し、ジスルフィドイソメラーゼを大量発現する大腸菌 ShuffleT7EXpress 株を用いて試みた。SKIK タグ、ロイシンジッパー、さらにはアルカリホスファターゼ (AP) を付加することによる、抗体およびその融合タンパク質への合成量と可溶化発現効率を調

べた。その結果、SKIK 配列に付加により L 鎖 AP 融合タンパク質の合成量を顕著に増大させるものの、SKIK 配列の付加は同時不溶発現の量も顕著に増大させることがわかった。しかしながら AP を付加した場合、融合タンパク質の不溶性画分の量は低下し、より可溶性になりやすいことを見出した。ロイシンジッパーの効果は Fab-AP 融合タンパク質の ELISA シグナル向上にも寄与していた。本融合タンパク質 (Fab-AP) を Ni-NTA クロマトグラフィーおよびゲルろ過クロマトグラフィーにより精製し、その結合活性を酵素免疫測定法 (ELISA) とバイオレイヤー干渉法により測定したところ、LZ 付加による顕著な結合活性の向上が見られた。またゲルろ過による分子量を推測したところ、多量体を形成していることが推測された。以上のことより作製した Fab-AP 融合タンパク質は AP 部分で二量体を形成することで (Fab-AP)<sub>2</sub> の二価以上の結合部位を有することが示唆された。更にこの Fab-AP 融合タンパク質を用いて、抗原の 1 段階 ELISA アッセイを試みたところ、2 次抗体を用いずに抗原を簡便に測定することができた。

次に本抗体-酵素の融合方法の一般性を調べるため、異なる配列を有するソバアレルゲンに対するマウスモノクローナル抗体に、同様に AP を付加した場合についても調べた。前述の抗大腸菌 0157 Fab-AP 融合タンパク質と同様に、大腸菌 ShuffleT7Express 株での可溶化発現と精製を行い、分子量をゲルろ過法により調べたところ、同様にヘテロオリゴマー構造を有する多価タンパク質であると推定された。また抗原の 1 段階 ELISA 検出にも成功した。

抗体の抗原結合部位である Fab とその派生物は、ヘテロ二量体構造、複合ジスルフィド架橋、抗体の配列多様性などのために、大腸菌で活性体として発現することは一般的に困難である。本研究で示された 2 つの戦略に基づく大量発現手法は、Fab およびその融合タンパク質の、安価で迅速な合成手法として汎用化できることが期待される。

本研究によって得られた成果は、抗体や抗体-酵素融合分子の微生物生産の効率化に寄与し、関連産業の科学と技術の発展に貢献するところが大きい。よって本委員会は本論文が博士(農学)の学位論文として十分価値あるものと認め、論文審査に合格と判定した。