

氏名（本（国）籍）	Md. Nuruddin Mahmud（バングラデシュ人民共和国）
主指導教員氏名	岐阜大学 教授 猪 島 康 雄
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第545号
学位授与年月日	令和元年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学位論文題目	Studies on the Antigen Recognition Mechanism of Multispecific Antibody G2 (複数の抗原を特異的に認識する抗体 G2 の抗原認識機構に 関する研究)
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 准教授 高 島 康 弘 副査 帯広畜産大学 教 授 横 山 直 明 副査 岩 手 大 学 教 授 村 上 賢 二 副査 東京農工大学 准教授 古 谷 哲 也 副査 岐 阜 大 学 教 授 猪 島 康 雄

学位論文の内容の要旨

モノクローナル抗体は、一般的に一つだけの抗原を認識する。その非常に高い特異性のために、抗体医薬品や生物学的ツールとして今日広く用いられている。しかしながら、まれに1つの抗体が複数の抗原を特異的に認識する抗体の存在が報告されており、これらは”複数の抗原を特異的に認識する抗体” (multispecific Ab) と呼ばれている。この複数の抗原を特異的に認識する抗体に関する研究は非常に限られており、その抗原認識機構は明らかにされていなかった。本研究対象の抗体 G2 は、この複数の抗原を特異的に認識する抗体に属する。そのため、G2 は複数の抗原を特異的に認識する抗体の抗原認識機構の解明のための興味深い研究標的であった。この抗体 G2 は、免疫源としたニワトリプリオンタンパク質 (ChPrP) 以外に少なくとも3つの異なるニワトリタンパク質 (ATP6V1C1, SEPT3, C6H10orf76) を認識した (Kamatari *et al.*, Protein Sci. 23, 1050-1059, 2014)。以前の研究では、ChPrP および ATP6V1C1 上の G2 によって認識されるエピトープ配列のみが同定されており、SEPT3, C6H10orf76 上のエピトープ配列は明らかにされていなかった。

第1章では、SEPT3 上のエピトープ配列を同定した。興味深いことに、このアミノ酸配列は、以前同定された ChPrP 上のエピトープ配列とも、ATP6V1C1 上のエピトープ配列とも全く異なっていた。表面プラズモン共鳴 (SPR) により、3つのいずれのエピトープペプチドも G2 に対して、高い結合親和性を有することを明らかにした。配列相同性が全くない3つの異なるエピトープペプチドに対して高い親和性で結合する抗体は、本報告がはじめてであった。さらに、競合的 ELISA 実験により、この3つの抗原に対する G2 上の抗原結合部位は重複していることを明らかにした。これらの知見に基づき、G2 の抗原結合部位は異なる

構造に柔軟に変化することで異なる抗原と結合するという結合モデルを提案し、この複数の抗原を特異的に認識する抗体の抗原認識機構を説明した。

第2章では、抗体 G2 が認識する 5 番目のタンパク質 SREK1 を同定した。アミノ酸配列比較は、SREK1 が先に同定された他の 4 つのタンパク質 (ChPrP, ATP6V1C1, SEPT3, C6H10orf76) のいずれとも配列類似性を有さないことを示した。次に、C6H10orf76 および SREK1 上の G2 により認識されるエピトープ配列を決定した。驚くべきことに、各エピトープのアミノ酸配列は他の 3 つの配列と類似性がなかった。したがって、G2 によって認識される 5 つのタンパク質 (ChPrP, ATP6V1C1, SEPT3, C6H10orf76, SREK1) 上の 5 つのエピトープ配列はいずれも異なること明らかにした。

結論として、この研究は複数の抗原を特異的に認識する抗体に関する我々の知識を拡張したと言える。また、この研究は単一の抗原を認識する抗体だけでなく、複数の抗原を特異的に認識する抗体でも高い親和性が実現可能であることを示しており、複数の抗原を特異的に認識する抗体の抗体医療への可能性も示唆した。

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、” 複数の抗原を特異的に認識する抗体 ” である抗ニワトリプリオンタンパク質 (ChPrP) モノクローナル抗体 G2 の抗原認識機構を解明することを目的とし、抗体 G2 のこれまでに明らかにされていなかった新しいエピトープの同定、G2-抗原ペプチドの結合親和性や反応速度論的の解析、複数の抗原を特異的に認識する抗体の結合モデルの提唱を行った。

第1に、これまでに明らかにされていなかった G2 によって認識される抗原タンパク質 SEPT3 上のエピトープ配列を同定した。興味深いことに、今回明らかにした 3 番目のエピトープのアミノ酸配列は、以前同定されていた 2 つのエピトープ、すなわち ChPrP 上のエピトープとも、ATP6V1C1 上のエピトープとも全く異なることを明らかにした。そして、表面プラズモン共鳴測定により、3 つのいずれのエピトープも G2 に対して、高い結合親和性を有することを明らかにした。配列相同性が全くない 3 つの異なるエピトープペプチドに対して高い親和性で結合する抗体は、本報告がはじめてであった。

第2に、競合的 ELISA 実験により、3 つの抗原に対する G2 上の抗原結合部位は重複していることを明らかにした。これは、G2 の抗原結合部位は異なる構造に柔軟に変化することで異なる抗原と結合することを示唆しており、これに基づき複数の抗原を特異的に認識する G2 の結合モデルを提案した。

第3に、G2 の認識する 5 番目のタンパク質 SREK1 を新たに同定した。さらに先に同定された 4 番目のタンパク質 C6H10orf76 および今回同定した SREK1 上の G2 により認識されるエピトープ配列を決定した。これにより、G2 によって認識される 5 つのタンパク質 (ChPrP, ATP6V1C1, SEPT3, C6H10orf76, SREK1) 上の 5 つのエピトープ配列はいずれも異なることを明らかにした。

以上の結果から、この研究は複数の抗原を特異的に認識する抗体に関する我々の知識を大きく拡張した。本研究は、抗体の抗原認識機構のさらなる理解や、複数の抗原を特異的に認識する抗体の抗体医療への応用に繋がる貴重な基礎知見を提供していると判断した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : A multispecific monoclonal antibody G2 recognizes at least three
completely different epitope sequences with high affinity

著 者 名 : Mahmud, MN., Oda, M., Usui, D., Inoshima, Y., Ishiguro, N.
and Kamatari, Y.

学術雑誌名 : Protein Science

巻・号・頁・発行年 : 26(11):2162-2169, 2017