

(様式11)

論文審査の要旨（課程博士）

生物システム応用科学府長 殿

審査委員 主査 田中 剛 ⑩
副査 竹山 春子 ⑩
副査 田中 あかね ⑩
副査 稲田 全規 ⑩
副査 吉野 知子 ⑩

学 位 申 請 者	平成 23 年度入学 学籍番号 11702104 氏名 菅又 泰博
申 請 学 位	博士 (生命科学)
論 文 題 目	磁性細菌粒子上への難発現タンパク質の効率的発現技術の開発

論文審査要旨 (2,000 字程度)

現在、診断薬分野における自動化免疫測定や細胞分離、免疫沈降などのタンパク質固定化担体としてナノサイズの人工磁性粒子が広く利用されている。人工磁性粒子上にタンパク質を固定化するためには、目的タンパク質の大量生産、精製および化学修飾といった複数のステップが必要となる。一方、本研究の対象である磁性細菌粒子を用いることで、タンパク質の発現、精製および磁性粒子の調製を 1 ステップで行うことが可能となる。当研究室ではこれまで、磁性細菌 *Magnetospirillum magneticum* AMB-1 が生合成する磁性細菌粒子上に特異的に存在するタンパク質をアンカー分子とし、様々な外来タンパク質を融合タンパク質として発現させてきた。しかしながら、S-S 結合を必要としない細胞内分子や水溶性分子は比較的容易に磁性細菌粒子上に発現できるものの、S-S 結合を有する高等動物由来の細胞外タンパク質や複数回膜貫通タンパク質を十分なレベルで機能発現させることは極めて困難であった。そこで本研究では、このような「難発現タンパク質」を磁性細菌粒子上へ効率的に発現させる技術を開発することを目的とし、複数回膜貫通タンパク質、S-S 結合タンパク質それぞれについて異なる手法を用いた発現検討を行った。

本研究は以下の四章から構成されている。

第一章「緒論」では、難発現タンパク質の代表例として、G タンパク質共役受容体 (GPCR) の大腸菌による発現技術に関する最近の知見と、GPCR の生体膜モデルおよび機能性担体への利用についてまとめた。また、もう一つの難発現タンパク質の代表例として、S-S 結合を有するタンパク質発現に関してタンパク質の S-S 結合形成機構の詳細と大腸菌を用いた発現技術を取り上げ、酸化的環境下での発現の有用性について述べた。さらに、当研究室における外来タンパク質の磁性細菌粒子上への発現技術向上に関する最近の知見について、遺伝子欠損株の利用および発現誘導システムを紹介し、本研究の目的と意義を述べた。

第二章では、GPCR の一つであるヒト甲状腺刺激ホルモン受容体 (hTSHR) をメインターゲットとし、発現誘導システムを用いて磁性細菌粒子上への発現を試みた。テトラサイクリン発現誘導システムにより従来の恒常的発現系では認められなかった hTSHR および、ケモカイン受容体でありヒト免疫不全ウイルス (HIV) の補助受容体としても知られる CXCR4 と CCR5 の発現に成功した。hTSHR の一部は磁性細菌粒子を覆う脂質二重膜に挿入されていることが示唆され、また、リガンドと自己抗体の両方に対する結合能が認められた。今後、発現量の強化やアフィニティー向上のための改良が必要ではあるものの、本研究における

hTSHR 発現磁性細菌粒子はリガンド-受容体相互作用の解析ツールやバセドウ病患者における抗TSHR 自己抗体の診断ツールとしての応用が期待される。

第三章では、S-S 結合を有するタンパク質の新規な効率的発現技術として、ペリプラズム、磁性細菌粒子（細胞質）の 2 つの独立した細胞内区画発現系を同時に機能させたのち、磁性細菌粒子を抽出する過程で結合させる *in vitro* docking 法の開発を行った。モデルタンパク質である抗 β -Galactosidase 単鎖抗体-IgG Fc 融合タンパク質 (scFv-Fc) は、磁性細菌粒子上のアンカータンパク質 Mms13 と Fc 結合タンパク質 (ZZ) の融合タンパク質 (Mms13-ZZ) と磁性細菌粒子抽出過程で結合 (*in vitro* docking) したことが確認された。2 量体形成と λ 軽鎖特異抗体による構造認識から、磁性細菌粒子上に捕捉された scFv-Fc は狙い通りペリプラズムで S-S 結合を形成し正しく折り畳まれたものと考えられた。また、従来型の直接発現法では抗原結合活性が認められなかったのに対し、本手法による scFv-Fc は β -Galactosidase 結合活性を示したことから、*in vitro* docking 法は新規磁性細菌粒子発現法として有用であることが示された。以上の結果より、今後様々な受容体や細胞外タンパク質を磁性細菌粒子上に発現させることで、創薬における探索ツールや診断薬における自動化イムノアッセイ用の担体、さらにはリガンド-受容体相互作用の解析ツールとしての利用が期待される。

第四章では、本研究で得られた成果をまとめ、本研究の意義および今後の展望を述べた。

本研究では創薬ターゲットとして極めて重要な GPCR および免疫測定法を利用した体外診断薬への利用が期待される抗体分子に着目して、2 種類の異なる方法で磁性細菌粒子上での機能発現を試みた。特に、ペリプラズム発現系と磁性細菌粒子（細胞質）発現系を同時に行い、*in vitro* でドッキングさせる手法は本研究が初めての試みである。本研究は S-S 結合を有する外来タンパク質を表面に有する磁性細菌粒子の新規作製技術を提供するものであり、表面抗原を利用した細胞分離やリガンド-受容体、細胞内蛋白質間の相互作用の解析等、基礎研究における利用のみならず、創薬探索におけるアゴニスト/アンタゴニスト同定や体外診断薬用の担体としての有用性が期待できる。