

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Identification of diphtheria toxin R domain mutants with enhanced inhibitory activity against HB-EGF  |
| Author(s)    | 鈴木, 圭祐  |
| Citation     | 大阪大学, 2014, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/34593">https://hdl.handle.net/11094/34593</a>   |
| rights       |   |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;大阪大学の博士論文について&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論 文 内 容 の 要 旨

## 〔 題 名 〕

Identification of diphtheria toxin R domain mutants with enhanced inhibitory activity against HB-EGF  
(HB-EGFに対して阻害活性の強いジフテリア毒素 Rドメイン変異体の同定)

学位申請者 鈴木 圭 祐

Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF), a ligand of EGF receptor, is involved in the growth and malignant progression of cancers. CRM197, a non-toxic mutant of diphtheria toxin (DT), specifically binds to EGF-like domain of HB-EGF and inhibits its mitogenic activity thus CRM197 has currently been under evaluation in clinical trial for cancer therapy. To develop more potent DT mutants than CRM197, I screened various mutant proteins of the R domain of DT, the binding site for HB-EGF. Various R-domain mutant proteins fused with maltose binding protein were produced and evaluated their inhibitory activity *in vitro*. I found four R domain mutants showing with much higher inhibitory activity against HB-EGF than wild-type (WT) R domain. These R domain mutants suppressed HB-EGF-dependent cell growth more effectively than the wild-type R domain. Surface plasmon resonance revealed their higher affinity to HB-EGF than wild type R domain. CRM197(R460H) derivative carrying the newly identified mutation showed increased cell growth inhibitory activity and affinity to HB-EGF. These results suggest that CRM197(R460H) or other recombinant proteins carrying newly identified mutation(s) in the R domain are potential therapeutics targeting HB-EGF.

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 鈴木 圭祐 ) |     |           |
|---------------|-----|-----------|
|               | (職) | 氏 名       |
| 論文審査担当者       | 主 査 | 教授 目加田 英輔 |
|               | 副 査 | 教授 吉森 保   |
|               | 副 査 | 教授 中村 春木  |

## 論文審査の結果の要旨

Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) は、EGFファミリーの増殖因子であり、がん細胞の増殖や悪性化に重要な役割を果たしている。そのHB-EGFを受容体として認識するタンパク質がジフテリア毒素である。ジフテリア毒素には無毒性変異蛋白質CRM197がある。CRM197は、HB-EGFに結合し、HB-EGFがEGF受容体に結合する過程を阻害することで、HB-EGFの細胞増殖活性を阻害する。CRM197がHB-EGFの増殖因子作用を阻害することから、CRM197を有効成分とする抗がん剤の開発が現在進められている。本研究の目的は、CRM197にさらに変異を加えることで、CRM197よりも強いHB-EGF阻害活性を保持する変異体を同定することである。著者は、この目的のために、始めにジフテリア毒素のHB-EGF結合領域であるRドメインとmaltose binding protein (MBP)を融合したMBP-R(WT)を作製し、これがHB-EGFの細胞増殖因子活性を阻害することを確認した。次に、ジフテリア毒素とHB-EGF複合体の結晶構造解析データに基づいて、MBP-R(WT)のRドメインに変異を加えたMBP-R(変異体)を多数作製し、これらの変異体の中でMBP-R(WT)よりも強いHB-EGF阻害活性を有するものをスクリーニングした。その結果、4種の変異体 (MBP-R(H391K), MBP-R(R460H), MBP-R(R472K), MBP-R(G466D/D467A/V468T)) がMBP-R(WT)よりも強い阻害活性を有することを明らかにした。さらに、表面プラズモン共鳴を用いた結合活性測定の結果、これら4種の変異体は野生型と比べてHB-EGFに対する結合親和性が上昇していることを明らかにした。次に4種の変異体の中で最も阻害活性が高かったR460H 変異を導入したCRM197(R460H)を作製し、ジフテリア菌体で発現させることでCRM197(R460H)変異蛋白を合成し、このHB-EGF阻害活性についても検討を進め、CRM197(R460H)はCRM197よりも強いHB-EGF阻害活性を示すことを明らかにした。本研究で著者は、HB-EGF結合活性を持つジフテリア毒素に対して、人為的に改変を加えることで、結合活性をさらに増強できることを実証した。一般的に、相互作用する天然物に人為的に改変を加えることで結合活性を増強させることは大変困難であり、良い意味で稀な例である。本研究の成果は、現在臨床開発中の抗がん剤を、さらに薬剤学的に有用なものへと改変する端緒を拓いた有意義な研究成果であり、学位に値するものである。