

Title	新規抗体酵素L-zymeの創製及びその機能解析に関する研究
Author(s)	幸田, 勝典
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40193
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	幸田勝典
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 13109 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科醗酵工学専攻
学位論文名	新規抗体酵素L-zymeの創製及びその機能解析に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 今中 忠行 教授 室岡 義勝 教授 卜部 格 教授 山田 靖宙 教授 小林 昭雄 教授 菅 健一 教授 塩谷 捨明 教授 吉田 敏臣 教授 関 達治 教授 二井 将光 教授 金谷 茂則

論文内容の要旨

本論文は、ポルフィリン分子を特異的に認識でき、且つポルフィリン分子との複合状態において酵素活性を保持する抗体L鎖、新規抗体酵素L-zymeを創製し、その機能をタンパク質工学的、または構造面から解析したものである。

序論では、本研究の背景と目的、およびその意義について記述している。

第一章では、ポルフィリン分子である meso-Tetrakis(4-Carboxyphenyl) Porphyrin (TCPP) に対するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ2種03-1, 13-1からの両抗体Fab領域をコードするcDNA塩基配列決定を行っている。

第二章では、抗ポルフィリン抗体をホストタンパク質として利用した新規抗体酵素の創製を行っている。L鎖、H鎖を大腸菌内で発現させる系を構築し、両抗体ともL鎖単独でも抗原結合能があることを明らかにし、ポルフィリン鉄錯体との結合状態において13-1 L鎖の場合、ピロガロールを基質として高いペルオキシダーゼ活性、反応至適温度(90℃)を保持することから新規抗体酵素L-zymeと命名している。また、シャペロニンと抗体タンパク質の同時発現系を構築し、抗体タンパク質を可溶性タンパク質として発現させることを可能にしている。

第三章では、13-1 L鎖定常領域の欠失タンパク質の構築とその性質の解析を行っている。欠失タンパク質の性質を解析した結果、定常領域内の115-146領域(疎水性)がL-zymeの耐熱性に、147-189領域(親水性)がL-zymeの高活性に影響を与えていることが示唆されている。

第四章では、CDスペクトルによりL-zymeの熱変性過程における構造変化を解析し、そのモデル構築を行っている。

第五章では、L-zymeの立体構造を予測し、触媒機構の解析を行っている。天然のペルオキシダーゼにおいて保存されている遠位、近位のヒスチジンに相当する残基が超可変領域に存在し、その結果に基づき触媒反応モデルを構築している。

総括では、以上で得られた知見を総括し、新規抗体酵素L-zymeの創製及びその機能解析に関する研究の将来展望について論じている。

論文審査の結果の要旨

抗体酵素に関する研究は、生化学、医薬、タンパク質工学等の分野においてその重要性は年々高くなってきている。しかし、従来の作製法では高性能の抗体酵素作製が難しいため、新たな手法により抗体酵素作製を試みることも肝要である。本論文では、ポルフィリン分子にたいする抗体を宿主分子として捉え、抗体-ポルフィリン分子複合状態では酵素活性を保持するという仮定に基づき、新規抗体酵素L-zymeを創製し、その機能をタンパク質工学的、または構造面から解析したものである。得られた結果を要約すると以下の通りである。

- (1) 抗ポルフィリンモノクロナール抗体を生産するハイブリドーマ2種03-1, 13-1を取得し、両抗体Fab領域をコードするcDNA塩基配列を決定している。
- (2) 抗ポルフィリン抗体を宿主タンパク質として利用した新規抗体酵素の創製を行っている。L鎖, H鎖を大腸菌内で発現させる系を構築し、L鎖特に13-1 L鎖について解析を行い、ポルフィリン鉄錯体との結合状態において13-1 L鎖の場合、ピロガロールを基質として高いペルオキシダーゼ活性、反応至適温度(90℃)を保持することから新規抗体酵素L-zymeと命名している。また、シャペロニンと抗体タンパク質の同時発現系を構築し、抗体タンパク質を可溶性タンパク質として発現させることを可能にしている。
- (3) 13-1 L鎖定常領域の欠失タンパク質の構築とその性質の解析を行い、定常領域内の115-146領域(疎水性)がL-zymeの耐熱性に、147-189領域(親水性)がL-zymeの高活性に影響を与えていることを明らかにしている。
- (4) CDスペクトルによりL-zymeの熱変性過程における構造変化を解析し、そのモデル構築を行っている。
- (5) L-zymeの予測立体構造から、天然のペルオキシダーゼにおいて保存されている遠位、近位のヒスチジンに相当する残基が超可変領域に存在していることを明らかにし、その結果に基づき触媒反応モデルを構築している。

以上のように本論文は、抗体を宿主分子として利用する新しい手法により従来の抗体酵素を凌ぐ高活性、耐熱性を保持する高性能抗体酵素の創製が可能であることを明らかにしており、抗体工学のみならず、タンパク質工学、有機合成化学の分野に貢献するところが大きい。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。