

氏名	福田 枝里子		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 乙 第 2950 号		
学位授与年月日	令和2年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Development of a Novel Insoluble Tag INSOL for Simplified Protein Preparation and its Application to the Analysis of Autoantibody Response to Cancer Vaccine (タンパク質調製を簡便にする新規不溶性タグINSOLの開発とその癌ワクチン治療における自己抗体反応解析への応用)		
主査	筑波大学教授	学術博士	橋本 哲男
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	千葉 智樹
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	稲垣 祐司
副査	筑波大学教授 (連携大学院)	博士 (医学)	永宗 喜三郎

## 論 文 の 要 旨

タンパク質調製時に、GST-tagやHis-tagのような可溶性のタグを用いて目的タンパク質を十分な量得られない場合、不溶性のタグを融合し不溶化して目的タンパク質を回収する手法が用いられることがある。しかし、これまでの不溶性タグには、大腸菌発現系においてのみ開発されているため目的タンパク質の精製に手間がかかること、不溶化させることができた成功例が少ないことなどの問題点があり、タンパク質の網羅的な解析には適していなかった。本論文の著者は、コムギ胚芽無細胞発現系で任意の目的タンパク質を普遍的に不溶化し、遠心分離だけで簡便に精製することが可能な新規の不溶性タグINSOL-tagを開発し、網羅的解析のためのプロテインアレイを作製した。さらに、それを応用して癌抗原アレイを作製し癌ワクチン療法を受けた患者の自己抗体反応の検出に成功した。

本論文第一章において著者は、INSOL-tagの開発研究の過程とINSOLタグを用いて作製したヒトプロテインアレイにより自己抗体の検出を行った結果について述べている。著者は、非常に不溶化しやすいMafG (MAF BZIP Transcription Factor G) という転写因子 (162 a.a.) の不溶性タグとしての有用性を高めるため、N末端側を削って短くし、質量分析時に6 a.a.以下に消化されるように10個のアルギニンを挿入して118 a.a. のINSOLタグを開発した。このタグを用いて任意選択の111種類の目的タンパク質にINSOLタグを付加して発現・遠心分離することにより、既存のGSTタグの収量の、平均して約7倍の収量を得た。次に著者は、INSOLタグを付加して調製したタンパク質を用いてプロテインアレイを作製する方法を開発した。目的タンパク質のN末端側にINSOLタグを付加し、コムギ胚芽無細胞系で発現して遠心分離により目的タンパク質を精製した。精製したタンパク質を0.04%のSDSを含む溶媒で可溶化し、表面に活性エステル基が修飾されている基板上にアミンカップリングで架橋した。こうして作製したプロテインアレイにおいて、蛍光標識した抗ヒトIgG抗体を用い自己抗体の検出を行ったところ、アレイ上の抗原に結合したIgGの検出限界が11.1pgであり、ELISA法との相関が高い ( $R^2=0.91$ 以上) ことを示した。これにより著者は、作製したアレイが優れた性能をもつとの結論に至った。

本論文第二章において著者は、開発した方法の実際の生物学的解析への応用例として、癌抗原群を搭載したプロテインアレイを作製し癌ワクチン療法を受けた患者の自己抗体反応の解析を行った結果について述べている。著者は、267個の癌抗原にINSOLタグを付加し、コムギ胚芽無細胞系において発現・精製してアレイ化を試み、267抗原全てを搭載量のバラツキが87倍という狭いレンジで搭載することに成功した。このレンジは、101個の癌抗原が搭載された既存の最大のプロテインアレイのばらつきのレンジ約 $10^4$ と比べてはるかに小さいものであった。次に、このアレイを用いて、癌ワクチン投与患者のワクチン投与前から13回投与後までの自己抗体解析を行い、ワクチン抗原に対する自己抗体の増加を検出した。また、ワクチン抗原以外の癌抗原に対する自己抗体も11種類検出し、ワクチン療法により抗原拡散が生じたことを示した。これらのことから著者は、今回開発したプロテインアレイが腫瘍免疫学研究の分野において有用な実験手段となりうるとの結論に至った。

以上の成果に基づき著者は、今回開発した方法論が、癌ワクチン治療をはじめとする癌免疫療法の評価にとどまらず、癌の早期診断・治療適者の選定・再発の予測にも使用可能である点、さらには、より広範囲な生物学的解析にも有用となりうる点について議論した。

## 審 査 の 要 旨

本論文の著者は、任意の目的タンパク質を普遍的に不溶化し、簡便に精製することが可能な新規の不溶性タグ INSOL-tag を開発し、網羅的解析のためのプロテインアレイを作製した。さらにそれを応用して、癌抗原群を搭載したアレイを作製し、癌ワクチン療法を受けた患者の自己抗体反応の検出に成功した。タンパク質の網羅的解析は、基礎・応用を問わず生物学のあらゆる分野でその重要性が高まっている基盤技術である。著者が、網羅的解析の規模に大きく影響するタンパク質の網羅的精製法を検討し、不溶化によってこれまでよりも遥かに多くのタンパク質を精製してアレイ化することに成功した点は、生物学における大きな貢献であり高く評価できる。この技術を用いて、実際に癌ワクチン投与患者の抗原拡散の存在を実証できた意義も大きい。

令和2年1月28日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び学力の確認を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士(生物科学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。