

【審査結果の要旨】

本論文は、分子混雑環境中のタンパク質の振る舞いを詳しく理解するために、ラマン分光法を用いて、高濃度/分子混雑環境中のタンパク質の挙動を詳細に解析・考察したものである。

第1章では、分子混雑環境中でのタンパク質の挙動についてのこれまでの知見を概説し、本研究の背景と目的についてまとめている。細胞内のように様々な分子が混み合って存在している分子混雑環境中では、タンパク質の挙動は、試験管内とは異なることが報告され始めており、その挙動を総合的に理解する必要がある。また、高濃度製剤化が進められている抗体医薬品では、高濃度環境中の分子の挙動を理解することは、最適な製剤条件の模索に重要な知見を与える可能性がある。ラマン分光法は、分子の二次・三次構造の知見から、各官能基単位の詳細な情報を詳しく解析することができる手法である。本論文では、ラマン分光法に着目し、高濃度/分子混雑環境中のタンパク質分子を官能基単位で解析し、その挙動の詳細な理解を得ることを試みた。

第2章では、高濃度により誘起される構造の変化がラマンスペクトルに与える影響を詳しく調べるため、構造情報やその他の様々な知見が数多く蓄積されているニワトリ卵白リゾチームをモデルタンパク質として用い、濃度依存性測定 (2.5-300 mg/mL) を行った。スペクトルの解析結果から、濃度増大に伴い Trp バンド (1555 cm^{-1}) の半値幅の増大、Tyr のダブルットバンドの強度比 (I_{856}/I_{837}) の変化などが観測され、高濃度での排除体積効果や分子が近接することにより生じる近距離相互作用などが生じていることがわかった。以上の結果、濃度効果を反映するラマンバンドとして疎水性残基 (Trp と Tyr) が有効であることと、その基本的な解釈を明らかにした。

第3章では、第2章で明らかにした主要なラマンバンドの知見をもとに、Bovine serum albumin (BSA) 分子の高濃度/分子混雑環境中の挙動を調べた。BSA 分子は pH7 では剛直な荷電粒子としての性質が強いが、pH3 では柔らかくなることが知られている。この性質を利用し、異なる pH 条件で濃度依存性測定を行い、分子の剛直さと混雑環境の関係を調べた。剛直な分子は分子混雑環境に伴う排除体積効果などの影響を受けにくく、柔らかい分子は受けやすいことが明らかになった。また、CH と OH 伸縮振動 ($2800-4000\text{ cm}^{-1}$) の領域の解析結果から、pH7 と pH3 ではタンパク質の水和水の挙動に違いがあり、pH3 では水和水全体の量が多いが、界面水がほとんど存在しないことが示された。この結果は、分子構造と水和水が関連していることを示唆するも

のである。

さらに、分子混雑環境中の排除体積効果をより詳細に調べるために、別の超好熱菌由来タンパク質存在下で、BSA分子のH-D置換の温度依存性測定を行い、その挙動を比較した。その結果、超好熱菌由来タンパク質存在下では、温度上昇による構造変化の温度が5℃程度上昇しており、排除体積による効果が観測された。

第4章では、第2章および第3章で得られた知見をもとに、高濃度抗体溶液中の分子挙動を解析し、抗体分子間の相互作用の評価を行った。濃度増加に伴い、高濃度中で誘起されるタンパク質間相互作用により、疎水基周辺の微視的環境に変化が生じていること、疎水基の変化と相関して、界面水が減少している様子が観測された。以上の結果、高濃度溶液では、構造の変化を伴わない分子会合体（凝集体）が形成されており、TyrとPheのバンドの変化を解析することで、会合体形成の状態を推測できることがわかった。そこで、製剤化における応用展開に向けて、pH依存性、塩濃度依存性、保管試験の際の解析事例も示した。

第5章では、本研究の成果をまとめ、タンパク質科学研究およびバイオ医薬品産業における本研究成果の意義を述べている。

以上、本論文はラマン分光法による高濃度/分子混雑環境中のタンパク質の挙動の解析手法を確立するとともに、高濃度抗体溶液のタンパク質間相互作用の評価に、ラマン分光法が応用可能であることを示した。したがって、本論文は博士論文の要件を十分に満たすものであると評価できる。

6 最終試験の結果の要旨

本論文の内容は、平成28年8月4日午後4時より、図書館視聴覚室において公開の博士学位論文発表会で発表された。口頭発表後、質疑応答が行われ、高濃度溶液におけるラマン多重散乱の影響、励起波長の設定理由、異種タンパク質存在下における共同効果、細胞内タンパク質挙動解析への展望など、多岐にわたる内容であったが、それぞれ適切に回答した。最終試験の結果としては、審査委員全員一致で合格とした。

7 学力の確認の結果

別紙に記載するように、学力確認を行った結果、合格とした。

以上