



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Characterization and single chain Fv construction of neutralizing antibody to measles virus [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	JAHAN, MST LUBNA
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第12445号
Issue Date	2016-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/63441
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	JAHAN_MST_LUBNA_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 ジャハン ムスト ルブナ

審査担当者	主 査	教 授	前 仲 勝 実
	副 査	教 授	中 川 真 一
	副 査	准教授	尾 瀬 農 之
	副 査	講 師	米 田 宏

学 位 論 文 題 名

Characterization and single chain Fv construction of neutralizing antibody to measles virus
(麻疹ウイルスに対する中和抗体の機能評価と一本鎖 Fv 断片の構築)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

麻疹は、安全性および有効性が高い弱毒ワクチンが得られる現代においても小児を中心として世界中で多くの感染者と死者をだしている感染力が極めて高い急性ウイルス感染症である。麻疹ウイルス (MV) はパラミクソウイルス科モルビリウイルス属に属するマイナス鎖 RNA ウイルスで、ベローブ膜上に受容体結合タンパク質であるヘマグルチニンタンパク質 (H タンパク質) と膜融合を担う融合タンパク質 (F タンパク質) という 2 つの糖タンパク質を有する。また、これまでに Signaling lymphocyte activation molecule (SLAM) と nectin-4 が麻疹ウイルスの標的受容体タンパク質として同定されている。麻疹ウイルスの侵入は、ウイルス表面の H タンパク質が宿主細胞表面に発現する受容体と結合することにより開始され、その結合によって H タンパク質-受容体複合体の構造が大きく変化し、それに伴って隣接する F タンパク質の構造変化を誘導して膜融合が起こるといふモデルが提唱されている。従ってこれら 2 つのエンベローブ膜上の糖タンパク質は麻疹感染を阻止する中和抗体の標的となる。今日までに、異なる抗原を用いて数々の中和抗体が産生されているが、それらの多くは H タンパク質を標的としている。著者の共同研究者らは H タンパク質を発現する細胞を抗原として中和抗体（マウスモノクローナル抗体）2F4 を樹立した。ウイルス感染実験により、SLAM、および nectin-4 いずれの受容体発現細胞株に対しても 2F4 モノクローナル抗体が高い中和能を持つこと、そのエピトープ部位が、完全には同定されていないものの、受容体結合部位と重なっている可能性があることを示した。しかし、その分子基盤に関する正確な理解は十分に進んでいない。

本論文では、麻疹中和抗体と物理化学的な手法を駆使した詳細な相互作用解析を通じて麻疹ウイルスの融合阻害における分子機構を解明することを目的としている。著者は、低い免疫原性、および分子量が小さいことによる高い組織浸透性を有しているため、最も注目されている低分子化組換え抗体の一つである一本鎖抗体可変領域断片 (scFv; single chain variable antibody fragment) に着目した。中和抗体 2F4 をモデルとして、その一本鎖抗体 (2F4-scFv) の大腸菌発現系を構築し、組換えタンパク質として大腸菌内で大量発現させ、封入体からの巻き戻しおよびゲル濾過クロマトグラフィーによる精製を行った。当初 2F4-scFv は巻き戻しに対して不安定な組換えタンパク質 (収率 0.5 mg/1L 培養液; 巻き戻し効率 1.5%) であったが、各調製過程において様々な条件検討を行ったところ収率 1.5 mg/1L 培養液、巻き戻し効率 4% にまで改善することに成功した。

次に、著者は精製した組換え 2F4-scFv と表面プラズモン共鳴法 (SPR) を用いて、抗原である MV-H のヘッド領域との相互作用を解析した。その結果、2F4-scFv は MV-H に μM 程度の解離定数 K_D で特異的に結合することが分かった。この相互作用は 2F4-Fab、および受容体 SLAM と nectin-4 の細胞外ドメインとの相互作用に比べて弱いことも明らかにした。更に SPR を駆使した阻害実験の結果、2F4-scFv は受容体 SLAM、および nectin-4 と競合的に MV-H と相互作用すること、結合能が低いため濃度を必要とするものの SLAM、および nectin-4 と MV-H との結合を阻害する可能性があることを見出した。

さらに、従来法である細胞融合実験を、各受容体発現細胞株を用いて実施したところ、10 μM と高濃度の 2F4-scFv を用いることで MV-H と受容体の結合により誘導される細胞融合を阻害でき

ることを明らかにした。以上の結果より、本研究では、作製した 2F4-scFv が MV-H と宿主受容体との結合を直接的かつ競合的に阻害できること、それによって細胞膜融合を阻害できることを明らかにした。本研究で作製した 2F4-scFv を用いることで今後さらなる MV-H と受容体との相互作用を通したウイルス侵入の阻害機構の解明が進むことが期待される。将来的には、麻疹の感染に対するより有効性の高いワクチンや抗ウイルス薬の開発へとつながる成果と言える。

このように、本論文は、麻疹ウイルスの中和抗体についての新知見を得たものであり、麻疹ウイルスの侵入の基本メカニズムの解明に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。