T2R2 東京工業大学リサーチリポジトリ
Tokyo Tech Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Development of Antibody-based Fluorogenic Probe for p53 that Allows Live-cell Imaging and Sorting
著者(和文)	DAIYANCEN
Author(English)	Yancen Dai
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12231号, 授与年月日:2022年9月22日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上田 宏,久堀 徹,中村 浩之,木村 宏,田中 祐圭,北口 哲也
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12231号, Conferred date:2022/9/22, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

Powered by T2R2 (Tokyo Institute Research Repository)

（博士課程）

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第　　号		学位申請者氏名		DAI YANCEN	
論文審査 審 査 員		氏　名	職　名		氏　名	職　名
	主査	上田 宏	教授	審査員	木村　宏	教授
	審査員	久堀 徹	教授		田中 祐圭	准教授
		中村 浩之	教授		北口 哲也	准教授

論文審査の要旨（2000 字程度）

本論文は「Development of Antibody-based Fluorogenic Probe for p53 that Allows Live-cell Imaging and Sorting」と題し，英語で書かれ 7 章より構成されている。

第 1 章「Introduction」では，抗体を用いた細胞内抗原の検出法について概説している。従来の蛍光修飾抗体の細胞内導入や蛍光タンパク融合抗体の細胞内発現では，抗原結合の有無に関わらず細胞内に蛍光が分布し，これがバックグラウンドとなって高品質な細胞内イメージングが難しかったが，抗体断片を部位特異的蛍光標識することで作製されるクエンチ抗体 Quenchbody (Q-body) は，抗原結合依存的に蛍光を発するため分離なしに標的を検出可能であり，細胞という閉鎖空間内の高感度検出法となりうると述べている。また，今回検出対象としたがん抑制タンパク質 p53 の細胞内での役割とそのがん診断における有用性を，本研究の背景として述べている。

第 2 章「Improvement of anti-p53 scFv (DO-1) secretory expression」では，今回 Q-body 化を試みた p53 抗体の大腸菌での分泌発現効率向上の試みを述べている。p53 の mdm2 結合部位を認識する DO-1 抗体は，研究で汎用される一方，大腸菌発現系を用いて発現を試みた場合，その発現量が極めて少ない問題があったこと、そこで，他の抗体に比較して出現頻度の低い残基を頻度が高い残基に変異させた一本鎖抗体 scFv ライブラリを構築してファージ提示し高い信号を示すクローンを選択した所，分泌発現効率が顕著に向上した C11 が得られたことを述べている。また，そのタンパク質としての安定性向上が，分子動力学計算から示唆されたと述べている。

第 3 章「Preparation of p53 Q-bodies and evaluation of their responses in PBST」では，前章で取得した C11 を材料に高性能な Q-body を構築した過程を述べている。scFv を Fab に変換し，H 鎖 L 鎖の両者の N 末端を GGG となるよう発現精製した Fab に，TAMRA-LPETGG ペプチドと酵素 Sortase A7+を加えて細胞内の還元環境でも安定なペプチド結合を形成させダブルラベル Q-body とした所，緩衝液中で nM 以下の濃度から最大 27 倍のヒト p53 ペプチド依存的な高い蛍光応答が得られたこと，またこれは色素間の安定な H-dimer 形成における深い蛍光クエンチによることについて，蛍光・吸収スペクトル測定の結果を元に述べている。

第 4 章「Visualization of p53 in fixed cells using C11_Fab Q-body」では，細胞内イメージングへの本 Q-body の応用の可能性を探るため，固定化細胞内の p53 の検出が試された結果について述べている。前章で構築された Fab 型 Q-body を用いて固定化・透過処理した結腸がん細胞 HCT116(+/+)を洗浄操作なしで染色した所，従来型の TAMRA 標識 scFv に比べて顕著に高い，p53 ノックアウト細胞 HCT116(-/-)に比べて 8.3 倍の蛍光強度が見られ，これはバックグラウンド蛍光が低減可能な Q-body のイメージングプローブとしての優秀さによるものであると結論している。

第 5 章「Visualization of p53 in living cells using C11_Fab Q-body」では，前章の結果を踏まえて生細胞中での p53 イメージングを試みたことを述べている。具体的には p53 認識 Fab Q-body を電気穿孔法により HCT116(+/+)細胞に導入し，その後時間をおいて細胞を２種類の抗がん剤で処理することにより p53 の細胞内濃度が変化する様子を蛍光シグナルとして経時観察したこと，その結果，Q-body が導入されたほぼ全ての細胞において，p53 の分解因子である Mdm2 の阻害剤 Nutlin-3 は p53 量を増加させたが，DNA 合成阻害剤である cisplatin は p53 量を低下させることが，蛍光イメージングと Western blotting の両者で確認されたことを報告している。すなわち，本 Q-body を用いて生細胞中の p53 量の時空間変化測定に成功したと結論している。

第 6 章「Intracellular antigen-specific live-cell sorting using C11_Fab Q-body」では，前章で成功した生細胞内抗原量測定の結果を発展させ，セルソーターを用いて細胞を p53 発現の有無で分離した結果を示している。すなわち p53 を発現しない HCT116(-/-)細胞と，HCT116(+/+)細胞を混合し蛍光陽性細胞群を分取した所，94％の細胞が発現細胞であったことから，将来の細胞内抗原発現量に基づく細胞分取への道が開かれたと述べている。

第 7 章「結論」においては各章で得られた結果を総括すると共に，細胞医療への応用など今後の展望について述べている。

これを要するに，本論文は優れた発想と綿密な実験操作に基づいて高性能な p53 Q-body の開発に成功するとともに，Q-body をこれまで困難だった生細胞内で機能させる事に成功したもので，工学上貢献する所が大きい。よって，本論文は博士 (工学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」は，東工大リサーチリポジトリ（T2R2）にてインターネット公表されますので，公表可能な範囲の内容で作成してください。