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)	バイオプロセスで生産される組換えタンパク質検出のための蛍光バイオセンサーQ-bodyの構築
Title(English)	Construction of fluorescent biosensor Q-body for detecting recombinant proteins produced in bioprocess
著者(和文)	ネイセツジョウ
Author(English)	Xuerao Ning
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12125号, 授与年月日:2021年9月24日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上田 宏,田中 寛,中村 浩之,三重 正和,吉村 奈津江,北口 哲也
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12125号, Conferred date:2021/9/24, 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	寧 雪じょう(NING Xuerao)	
論文審査 審 査 員		氏　名	職　名	氏　名	職　名
	主査	上田　宏	教授	吉村 奈津江	准教授
	審査員	田中　寛	教授	北口 哲也	准教授
		中村 浩之	教授		
		三重 正和	准教授		

論文審査の要旨（2000 字程度）

本論文は “Construction of fluorescent biosensor Q-body for detecting recombinant proteins produced in bioprocess（バイオプロセスで生産される組換えタンパク質検出のための蛍光バイオセンサーQ-body の構築）” と題され、英語で書かれ、全５章より構成されている。

第１章 “Introduction” においては、近年多くの有用物質がバイオプロセスによって組換えタンパク質の形で生産されているにも拘わらず、未だにその生産物をリアルタイムに検出する手頃な手法がない事が述べられている。高品質な製品を得るためには、生産プロセスの監視と制御の重要性が認識されてきた一方、既存のセンサーは温度や溶存酸素などの環境変数を対象とするのみで、生産物そのものの分析においては時間のかかる精製や濃縮ステップが必要な方法しかなかった事、またもし培養液中の目的タンパク質量を直接モニターできるセンサーが開発されれば、変異体スクリーニングによる生産性の最適化や、大規模生産時のプロセス制御の効率化に役立つと考えられる事が書かれている。一方、生産される組換えタンパク質の多くは、固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）で目的タンパク質を精製するためのポリヒスチジン(His6)タグを持っており、これを使う事でマイルドな条件で高純度のタンパク質製品を得ることができる事、さらに変化が激しい例えば微生物を発現宿主とするバイオプロセスにおいて、His6 タグ付き組換えタンパク質を迅速に検出できるセンサーが構築されれば魅力的である事が述べられ、そのため筆者は本論文において抗体断片の N 末端が部位特異的に蛍光標識された蛍光免疫センサーである Quenchbody (Q-body)を用いてその実現を試みた事が述べられている。

第２章 “Evaluation of single- and double-labeled Q-body’s performance” では、タンパク質の C 末端にある His6 タグを認識する Q-body を、構造既知の 3D5 抗体の一本鎖抗体 scFv と Fab 断片の N 末端に付加した配列を蛍光修飾することで構築を試みた事が述べられている。一般に、Q-body 中の蛍光色素は、抗体内部のトリプトファン（Trp）残基や他の色素によって、光誘起電子移動（PeT）効果により消光され、抗原が Q-body に結合するとこの消光効果が弱まり、蛍光が増加する。しかし最初に構築した TAMRA 標識 scFv 型 Q-body はこの性質を示さなかった事から、抗体 H 鎖と L 鎖の両者の N 末近傍に TAMRA を導入した Fab 型 Q-body を構築した所、有意なクエンチが認められた事が述べられ、しかしながら抗原である His6 ペプチドへの蛍光応答は２倍程度と、実用上十分でなかった事が述べられている。

第３章 “Effect of aromatic amino acid mutation in the VH-CDR1 region of Q-body”においては、前章の問題を解決するため、抗原結合部位近傍にある Trp と構造類似の芳香族アミノ酸チロシン(Tyr)に着目し、H 鎖超可変領域 CDR1 中に２個連続する Tyr である Y35 と Y36 をそれぞれ Trp に変異させた YW, WY, WW の変異体を Fab 型 Q-body 化した所、特に YW と WW 変異体においてクエンチ向上のみならず抗原結合能と蛍光検出感度の上昇という予想外の現象が認められた事が、BLI 法による結合解離速度測定と蛍光測定の結果として述べられている。また興味深い事に未修飾時には WW 変異体の抗原結合能が高いが修飾後はおそらく TAMRA とのより高い相互作用により抗原結合が阻害され YW 型の方が若干高い感度を示す事が判明した事、さらに変異導入による抗原結合能変化が構造を元にした分子動力学法によるエネルギー計算の結果と合致した事が述べられている。

第４章 “Application of Q-body in bioprocess monitoring” においては前章にて開発した２種の変異体 Fab と更にもう 1 種類の色素 ATTO520 を用いて作製した 4 種類の Q-body を用いてグラム陽性菌 *Brevibacillus choshinensis* より分泌される SARS-CoV-2 認識ナノ抗体 VHH-His の培養上清中の濃度定量を試みた結果が述べられている。発現系、培養液、および測定法を最適化した結果、富栄養培地で前培養した菌体を最少培地に移して本培養しこれを 1/2 希釈して測定した場合に最も高い蛍光応答が見られ、培地中に分泌された VHH-His を 1.5-4 μM の濃度範囲で精度良く定量出来た事が述べられている。

第５章 “Conclusion” においては各章で得られた結果を総括すると共に、今後の展望について述べている。

これを要するに、本論文は簡便迅速に His6 タグを付加した組換えタンパク質を迅速検出できる蛍光免疫センサー蛋白質の開発について初めて報告したものであり、工業上有用な新規な分析技術の開拓に成功しており、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。