

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	高性能な蛍光免疫センサー構築のための探索手法と分子設計基盤の確立
Title(English)	
著者(和文)	井上 暁人
Author(English)	Akihito Inoue
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12773号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:北口 哲也,丸山 厚,西山 伸宏,門之園 哲哉,中田 和秀
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12773号, Conferred date:2024/3/26, 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

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	井上 暁人	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	北口 哲也	准教授	中田 和秀	教授
	審査員	丸山 厚	教授		
		西山 伸宏	教授		
門之園 哲哉		准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「高性能な蛍光免疫センサー構築のための探索手法と分子設計基盤の確立」と題し、日本語で書かれ、7章より構成されている。

第一章「序文」では、まず抗体を使ったバイオセンサー(免疫センサー)の開発に必要な抗体の作製方法と、測定原理の分類について概説し、使用するエピトープの数によってサンドイッチ法(非競合法)と競合法に分けられ、洗浄操作が必要か否かによって、ヘテロジニアス法とホモジニアス法に分けられることを述べている。それを踏まえて、**Quenchbody (Q-body)** は非競合-ホモジニアス法に位置づけられるため、低分子からタンパク質までを迅速かつ簡便に測定することができ、細胞内やドロップレット系でも利用可能な画期的な蛍光免疫センサーであると説明している。**Q-body** 法は多くの抗体の配列中に保存された **Trp** 残基によるクエンチに由来しており、これまでに **20** を超える報告例があることを述べている。一方で、実用的な蛍光応答を示す **Q-body** を構築することは容易ではなく、既存の **Q-body** 構築法では適した抗体の探索に多大な時間と手間を要することを指摘している。

第二章「酵母表層系を用いた **Q-body** スクリーニング法の開発」では、抗体の **Q-body** としての機能をハイスループットに評価する新たな探索手法の開発について述べている。まず酵母表層提示系とコイルドコイル形成ペプチドを組み合わせて、酵母表層で **Q-body** を構築することを着想し、抗がん剤メトトレキサート (**MTX**) を認識するナノ抗体で蛍光応答を評価している。さらにヒト血清アルブミン(**HSA**) を認識するナノ抗体群をモデルとして、このスクリーニング法を応用した結果、有望な抗体を選択し、さらに大腸菌で発現精製した場合にも機能することを確かめている。最後に酵母表層と大腸菌で発現精製した場合での蛍光応答の差異に着目し、その原因を調べた結果、酵母表層を模倣したビーズ上において、酵母表層と同様の蛍光応答の向上が見られることを見出している。

第三章「**Trp** 変異ライブラリによる **Q-body** 用抗体の改変」では、**Trp** 残基の数を増やしたコンビナトリアルライブラリ(**Trp** 変異ライブラリ)からの **Q-body** に適した抗体の選択について述べている。**CDR** 領域に対して部位特異的に **Trp** 残基の数を増やし、クエンチ能によるスクリーニングを行うことで最適な **Trp** 変異の組み合わせを探索した結果、**2** 種類のナノ抗体でクエンチ能を向上させる **Trp** 変異の組み合わせを発見している。さらに **C** 末端に同じ抗原に対する別のナノ抗体を融合したタンデムナノ抗体によって親和性を補填し、**Q-body** としての機能を最大化する設計指針の知見を得ている。

第四章「機械学習を用いたクエンチ能予測モデルの構築」では、機械学習を用いて、*in silico* で抗体のクエンチ能を予測する分類器を作成し、より効率的かつ効果的な抗体配列の改変について述べている。まず学習用のデータセットを作成するため、ナノ抗体の人工ライブラリから、クエンチを示す抗体を選別している。続いてタンパク質言語モデルを用いることで、クエンチ能と抗体のアミノ酸配列の関係を機械学習し、クエンチ能を予測する分類器を作成している。さらに *in silico* で **Trp** スキャンングおよび一飽和変異の効果を予測し、それに基づいて変異導入を行うことで、**SARS-CoV-2** を認識する **2** 種類の **Q-body** のクエンチ能を向上させている。このうち抗原結合能を維持した変異体については蛍光応答も向上させている。

第五章「多量体化によるクエンチ現象の解析と応用」では、第二章において発見した酵母表層におけるクエンチのメカニズムについてのより詳細な解析に基づいた、抗体の配列に依存しない **Q-body** の構築について述べている。まず酵母表層を模倣したいくつかの多量体化状態を比較することで、二量体の状態が最も蛍光応答が向上することを突き止めている。さらに二量体化によるクエンチ現象は酵母表層と相関があることがわかり、二量体化による蛍光応答の向上に重要なアミノ酸を同定している。最後に他のナノ抗体にも応用できるようにリンカー長や色素の種類を検討することで、もともと蛍光応答を示さなかったがん細胞表面の抗原を認識する **Q-body** の蛍光応答を向上させている。

第六章「*In vivo* 連続分子進化による迅速なクエンチ能の進化」では、より多様な配列空間を探索できる、*in vivo* 連続分子進化への応用について述べている。まず酵母細胞内で抗体配列にランダム変異が導入される酵母表層でも、**MTX** を認識する **Q-body** の蛍光応答を評価できることを確認している。次に、元々クエンチを示さなかった

4つのナノ抗体でクエンチ能の分子進化を実施したところ、Tyr 残基が Cys 残基に変わる変異が濃縮され、Q-body の *in vivo* 連続分子進化が可能であることを証明している。さらに濃縮された変異体は二量体化することでクエンチ能を向上させ、N 末端と新たに導入された Cys 残基に蛍光色素を修飾してダブルラベル化することで4倍近い蛍光応答へと向上させている。

第七章「結論」においては各章で得られた結果を総括するとともに、今後の展望について述べている。

以上を要するに、本論文は独創的な発想に基づき、これまでになかった蛍光免疫センサーのスクリーニング手法の開発している。さらに予測や複合体形成に基づいて、実用的な Q-body を創出する上での基盤を確立しており、工学上貢献するところが大きい。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。