

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子の構築とバイオアッセイ系への応用
Title(English)	Construction of protein-based nanoparticle displaying antibody binding domains applying for bioassay system
著者(和文)	杉原努
Author(English)	Tsutomu Sugihara
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10970号, 授与年月日:2018年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小島 英理,桑 昭苑,山口 雄輝,上田 宏,三重 正和
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10970号, Conferred date:2018/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生命情報	専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	杉原 努		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	小島 英理	
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)		

### 要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

ナノ粒子は直径 1~100 nm からなる球状の粒子で、生物、医療、食品、化粧品、農業、環境、電気など様々な分野で急速に利用されつつある。ナノ粒子の出発原料として、金属、シリカ、カーボン、有機ポリマー、脂質、タンパク質などが例示されるが、この中でもタンパク質は他の物質に比べ、より複雑かつ高度な機能を発揮するナノ分子を創製できる可能性を秘めている。そこで本研究では、このタンパク質を出発材料とし、表面に抗体結合機能を提示するナノ粒子（抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子）の構築を行った。具体的には、疎水性の高いエラスチン特有の配列（Elastin-like polypeptides をモチーフにしたポリベンタペプチド（Pro-Ala-Val-Gly-Val）を 42 回繰り返した配列、以下「ELP」と称す）、親水性の高いポリアスパラギン酸配列（Asp<sub>11</sub>-Lys を 4 回繰り返した配列、以下「D」と称す）、抗体結合機能を有する配列（Protein G に由来する抗体結合ドメインを 3 回繰り返した配列、以下「C」と称す）を組み合わせた新規タンパク質（ELP-D-C）を設計した。

初めに、本研究で設計した ELP-D-C 配列をコードするプラスミドを構築し、これにより大腸菌 BLR (DE3) 株を形質転換して強制発現させた後、その可溶性画分から ELP-D-C を精製した。ELP-D-C の二次構造を CD スペクトル法で解析したところ、ELP ユニット特有の  $\beta$ -spiral 構造、C ユニットに由来する  $\alpha$ -helix 及び  $\beta$ -sheet 構造を強く反映したスペクトルが得られた。さらに三次構造を蛍光スペクトル法で解析したところ、トリプトファンに由来する 344 nm 付近に極大を持つスペクトルが得られた。

次に ELP-D-C のナノ粒子形成過程を、動的光散乱法を用いて測定したところ、20°C では 10 nm 程度の分子（ELP-D-C/monomer）として存在するものの、40°C 付近を境に急速に集合し、平均粒子径 40 nm 程度の micelle 状のナノ粒子（ELP-D-C/micelle）を形成することが示された。また、疎水性領域に結合して蛍光を発する 1,8-ANS を用いて解析したところ、50°C 以上において ELP-D-C/micelle の蛍光強度の最大値の上昇が認められた。このことから ELP-D-C は、40°C 付近でまず疎水性相互作用により ELP ユニットの核を形成し、50°C 以上でさらに ELP ユニットが持つコアセルベーションと呼ばれる特有の分子間相互作用により、安定なナノ粒子を形成したと考えられた。このナノ粒子形成過程で行う加熱による ELP-D-C の二次構造への影響を CD スペクトル法で解析したところ、50°C 以上で一旦  $\beta$  構造が崩れ、スペクトルが大きく変化するものの、冷却後は加熱前と同等のスペクトルが得られた。一方、ELP-D-C の三次構造を蛍光スペクトル法で解析したところ、N 末側のトリプトファンが micelle 内部に取り込まれたことにより、蛍光強度が大きく低下した。抗体結合ユニット（C）の抗体結合能は Protein G と同等であり、ナノ粒子形成後も維持された。

このように調製した ELP-D-C/micelle の応用例として、免疫比濁法への適用を検討した。ELP-D-C/micelle に抗体、抗原の順に作用させたところ、ELP-D-C/micelle はナノ粒子表面に提示された抗体結合ユニット（C）を介して抗体を結合し、さらに抗原を介してナノ粒子間で相互作用することにより、より大きな凝集体を形成することを、溶液の濁度変化として確認した。このときの濁度変化は抗原濃度依存的であることから、ELP-D-C/micelle は濁度を指標に直接的（Homogeneous）に溶液の抗原濃度を測定できる免疫比濁法（Turbidity immunoassay）の材料として利用可能であることが明らかとなった。

以上の結果から、本研究で設計したタンパク質 ELP-D-C は、加熱により抗体結合ユニットを粒子表面に提示する抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子（ELP-D-C/micelle）を形成することが示された。さらにこの抗体結合ユニットを介して抗体をナノ粒子表面に提示することにより、抗原濃度測定を目的とした免疫比濁法に適用できることが示された。今後、構築したタンパク質ナノ粒子の更なる高感度化、高機能化を図ると共に、薬剤、サイトカインなど機能性低分子のキャリアーとして医療・臨床分野への応用が期待される。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、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。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)  
Doctoral Program

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	生命情報	専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	杉原 努		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	小島 英理	
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)		

要旨（英文 300 語程度）

Thesis Summary (approx.300 English Words )

Nanoparticles are generally defined small size-controlled particles from 1 to 100 nm diameters and characterized by their structure, base material and functional units displayed on their surfaces. Herein, we designed and synthesized protein based nanoparticles displaying antibody binding domains on their surfaces. The constituent fusion protein, namely ELP-D-C, consisted of 42 repeats of the sequences of the elastin-like pentapeptide PAVGV as a hydrophobic unit (ELP unit), 4 repeats of the sequence of aspartic acid-rich polypeptide as a hydrophilic unit (D unit), and 3 repeats of the IgG binding domain derived from Protein G as the functional unit (C nit).

ELP-D-C was expressed in *E. Coli*. BLR(DE3) transformed by the plasmid encoding ELP-D-C and then purified. ELP-D-C were found to exist in monomeric form (ELP-D-C/monomer) at low temperature. Above the phase transition temperature around 40°C, however, ELP-D-C was found to rapidly self-assemble to form spherical micelles (ELP-D-C/micelle) about 40 nm diameter with a hydrophobic core. Furthermore, ELP-D-C/micelle were shown to display antibody binding domains on their surfaces, which allowed for immobilization of antibodies. In spite of these heat treatment, the second structure of ELP-D-C was refolded and antibody binding activity of ELP-D-C was maintained on the same level as that of Protein G after cooling.

ELP-D-C/micelle was able to form large, visually detectable complexes in the presence of target molecule (antigen), whose sizes increased in proportion to the target molecule concentration. The observed target molecule concentration-dependent complex formation suggests that ELP-D-C/micelle may be useful as base particles in applications such as homogeneous turbidity immunoassays. ELP-D-C/micelle is expected to improve more sensitive by peptide unit design and apply for the clinical field as drug delivery carrier.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、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。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).