

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

(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	杉原 努	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	小島 英理	教授	三重 正和	准教授
	審査員	糸 昭苑	教授		
		山口 雄輝	教授		
上田 宏		教授			

### 論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「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」と題し、5 章より構成されている。

第 1 章「序論」では、生物・医療分野において急速に利用されつつあるナノ粒子の構造及びその機能について概説した後、エラスチン様ポリペプチド (ELPs) を核とするタンパク質ナノ粒子の粒子表面に抗体結合機能を提示した新規ナノ粒子 (ELP-D-C/micelle) の設計コンセプト、並びにバイオアッセイ系への応用展開の可能性を示すことで、本研究の目的と意義を述べている。

第 2 章「抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子の遺伝子工学的合成」では、ナノ粒子を構成する新規タンパク質 (ELP-D-C) の大腸菌を用いた遺伝子工学的合成手法と立体構造の評価結果について述べている。なお、ELP-D-C は疎水性の高いエラスチン様ポリペプチドユニット (ELP : (PAVGV)<sub>42</sub>)、親水性の高いポリアスパラギン酸ユニット (D : (D<sub>11</sub>L)<sub>4</sub>)、Protein G に由来する抗体結合機能ユニット (C : (IgG binding domain)<sub>3</sub>) から構成される。ELP-D-C は、CD スペクトル解析により 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 構造を有すること、また蛍光スペクトル解析によりトリプトファンに由来する蛍光を発することを明らかにしている。

第 3 章「抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子の物理化学的性質の評価」では、第 2 章で合成した ELP-D-C のナノ粒子形成過程と粒子表面に提示された抗体結合機能の評価結果について述べている。動的光散乱法による詳細な解析により、ELP-D-C は 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) を形成することを明らかにしている。また、疎水性領域に結合して蛍光を発する ANS を用いた解析により、ELP-D-C は、40°C 付近でまず疎水性相互作用により ELP ユニットの核にして micelle 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、より安定なナノ粒子を形成しているものと考察している。このナノ粒子形成過程で行う加熱により、ELP-D-C の二次構造は一旦崩れるものの、冷却後は加熱前と同等の二次構造に巻き戻ることを示している。また、このナノ粒子形成に伴い、N 末側のトリプトファンが micelle 内部に取り込まれたことを、蛍光スペクトル法で明らかにしている。さらに、抗体結合機能ユニット (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ることを明らかにしている。

第 4 章「抗体結合機能提示型タンパク質ナノ粒子のバイオアッセイ系への応用」では、第 3 章で構築した ELP-D-C/micelle の応用例として、免疫比濁法への適用を検討している。ELP-D-C/micelle に抗体、抗原の順に作用させたところ、抗原濃度依存的に溶液の濁度変化が観察されたことから、ELP-D-C/micelle は溶液の濁度を指標に直接的に溶液の抗原濃度を測定できる免疫比濁法の材料として利用可能であることを明らかにしている。次に、蛍光免疫測定法における蛍光標識物質を取り込む支持体としての利用を検討している。マイクロプレート上に固定した抗原に抗体、ELP-D-C/micelle の順に作用し、さらに蛍光物質 (fluorescein isothiocyanate) を作用させたところ、抗原濃度の対数値に依存的に蛍光強度が増大したことから、ELP-D-C/micelle は疎水性相互作用による物理吸着で蛍光色素を粒子内部に取り込める支持体として蛍光免疫測定法に利用できることを明らかにしている。

第 5 章「結論」では、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、抗体結合機能を粒子表面に提示したタンパク質ナノ粒子は、バイオアッセイ系に利用可能であることを明らかにし、今後の更なる簡便かつ Throughput の高い微量分析法の開発に資する多くの知見を得たものであり、工学上および工業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。