

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	頑健な免疫センサー酵素の開発及び人工細胞バイオセンサーへの応用
Title(English)	Creation of a robust immunosensor enzyme and its application to protocell array-based digital immunodetection systems
著者(和文)	蘇九龍
Author(English)	Jiulong Su
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11294号, 授与年月日:2019年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上田 宏,中村 聡,久堀 徹,三重 正和,北口 哲也
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11294号, Conferred date:2019/9/20, 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

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	蘇 九龍 (SU, Jiulong)		
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	北口哲也	准教授
	審査員	中村 聡	教授			
		久堀 徹	教授			
		三重正和	准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「Creation of a robust immunosensor enzyme and its application to protocell array-based digital immunodetection systems」と題し、英文で書かれた5章より構成されている。

第1章は序論であり、本論文で扱う酵素免疫測定法と、検出に用いた酵素βグルクロニダーゼ(GUS)とそのセンサー化、さらに人工細胞系とデジタル計測系に関する既往の知見が簡潔に纏められている。

第2章「Development of a novel immunosensor based on mutant β-glucuronidase」ではGUSを用いた低分子の均相酵素免疫測定系の開発について述べられている。酵素免疫測定法は通常、標識とサンプルを分離するため最低1回の洗浄工程を必要とするが、このため検出のスループットが低下する。また低分子は二つの抗体でサンドイッチ出来ないため、通常は競合免疫測定法によってしか測定出来ない。この二つの問題を解決するため、本章では抗原依存的な2つの抗体断片VH/VLの会合を、不活性なGUS変異体のクロスリンクによる活性化により検出する新規測定系の構築を目指した。このため、本来4量体である大腸菌GUSの2量体間界面に位置する二つの残基の変異体M516K/Y517E(KE)を構築し、このN末側にリンカーを介して低分子抗原NP/NIPあるいはオステオカルシンC末ペプチドBGP-C7を認識する抗体VHあるいはVL断片を結合させた融合タンパク質を大腸菌で発現精製した。VH型、VL型のタンパク質を混合し、基質を添加したところ、抗原依存的なGUS活性が観察され、GUS変異体を用いた低分子の非競合的均相免疫測定系の開発に初めて成功した事が述べられている。

第3章「Optimization of thermostabilized β-glucuronidase mutant」では、前章で開発した系の二つの問題点の解決について述べている。すなわち前章の活性測定時に抗原による多量化誘導なしでも、時間経過に従いバックグラウンド活性が上昇し、高い抗原応答が得られない、またタンパク質が不安定で室温でも分解しやすいという二つの重大な課題が認められた。そこで、既知の熱安定化GUS変異体をもとに、界面変異残基を最適化することで、多量化なしでは活性が非常に低いが、多量化により野生型と同等以上のGUS活性を示す熱安定化酵素スイッチGUS_{IV.5}KWを構築することに成功した。さらに、これをレポーターとしてNPを検出した場合の検出感度が前章に比べて約2倍上昇したこと、またより実用的な応用としてナノボディとも呼ばれるラマ由来抗体断片V_{HH}を用いて各種飲料中のカフェイン濃度を非競合的に簡便に測定できた事が述べられている。

第4章「Creation of a protocell-based biosensor」では、前章で構築したGUS_{IV.5}KWをもとにした人工細胞(protocell)免疫測定系の構築について述べられている。前章の測定系は溶液中で機能したが、本章ではより高感度を実現するため、N末端側に各種タグ配列と細胞膜貫通配列を付加したGUS_{IV.5}KWを巨大単層リポソーム(GUV)中の無細胞タンパク質合成系で合成し、GUV外にタグ配列を提示し、これをタグ認識抗体でクロスリンクすることでGUV内のGUS_{IV.5}KWを活性化し、蛍光で陽性GUVを検出できたことが述べられている。タグとしては6xHis、Myc、HAおよびSpyTagを提示し活性化することができ、さらに陽性GUVをフローサイトメトリーでカウントし、抗タグ抗体濃度依存的に陽性GUV数が増加したことが述べられている。さらに、GUV外からV_{HH}-SpyCatcher融合タンパク質を加えてSpyTagと反応させ、外部の抗原カフェイン濃度に応じて陽性細胞数が増加したことが述べられている。

第5章「Summary and perspectives」では論文の総括と考察、および今後の展望が述べられている。第3章までの結果は今後簡便迅速な各種の免疫測定系や相互作用検出系の構築に有用であること、また第4章の結果は人工受容体タンパク質を用いてGUV膜を介した信号伝達を実現した希な例であり、今後よりサイズの揃ったGUVやマイクロチェンバ系を用いることで、洗浄が不要なデジタル計測系になりうると結論されている。以上を要するに、本論文は免疫測定等に有用な、外部刺激により活性を制御可能な酵素の創出と、その人工細胞系への応用に成功したものであり、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。