

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	高性能な蛍光・発光免疫センサー創出のための分子設計とその解析
Title(English)	
著者(和文)	安田貴信
Author(English)	Takanobu Yasuda
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11822号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上田 宏,中村 浩之,小畠 英理,柳田 保子,小倉 俊一郎,北口 哲也
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11822号, Conferred date:2022/3/26, 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	安田 貴信		
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	柳田 保子	教授
	審査員	中村 浩之	教授		小倉 俊一郎	准教授
小島 英理		教授	北口 哲也		准教授	

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「高性能な蛍光・蛍光免疫センサー創出のための分子設計とその解析」と題し、日本語で書かれ、6章より構成されている。

第一章「序論」では、抗体を用いた検出法である免疫測定法について概説しており、タンパク質などの高分子抗原に対してはサンドイッチ法の適用により高感度測定が可能である一方、低分子抗原の高感度検出は難しいとしている。その点、部位特異的蛍光標識抗体 **Quenchbody (Q-body)** は、検体と混合するだけで標的抗原を高分子・低分子問わず迅速かつ簡便に検出可能であり、新たな免疫測定法のコア技術となりうると述べている。一方、現状の **Q-body** の問題として、構築に手間と時間がかかること、測定に励起光照射が必須であること、抗体中の **Trp** 残基による蛍光クエンチが起きる抗体と色素の組み合わせが必要な事などが、研究の背景として書かれている。

第二章「コイルドコイル形成ペプチドを用いた抗体断片の迅速バイオセンサー化」では、リンカー長調節や色素の選択といった **Q-body** の応答向上に必要な検討の効率化を指向した、組換え抗体断片の迅速 **Q-body** 化法の開発について述べられている。強固なヘテロ二量体を形成するペプチドペア **E4/K4** に着目し、抗原として **BGP (bone Gla protein)** を認識する **E4** 融合 **Fab** 断片と蛍光標識 **K4** ペプチドを調製して両者を混合したところ、1 工程 10 分以内に **Q-body** が得られることが見出され、こうして作製される **Q-body** を **Coiled Q-body (CQ-body)** と命名している。本法は、これまで用いられてきた **Q-body** 調製法と比較して迅速でかつ、色素修飾後の精製操作が不要であるためサンプルロスがないことも特徴と記されている。さらに **Donor** として **Fluorescein** を **N** 末端に、**Acceptor** として **TAMRA** を **C** 末端に導入した二色標識 **K4** ペプチドを用いることで、**FRET** 型 **CQ-body** を構築した所、抗原依存的な **FRET** 効率上昇により蛍光応答が向上することを見出している。またこの **CQ-body** 構築法は、抗がん剤メトトレキサート認識重鎖抗体断片 **V_{HH}** にも適用可能であり、汎用性が高い手法であると述べられている。

第三章「蛍光酵素の融合による生物発光共鳴エネルギー移動 **BRET** に基づく **Q-body** の応答性向上」では、以前に報告された外部励起光を必要としない発光酵素 **Nluc** 融合クエンチ抗体 **BRET Q-body** において、通常の **Q-body** より抗原応答が向上するメカニズムの理解を目的とした検討について述べている。色素とリンカー長の異なる計 15 種類の **BRET Q-body** 変異体を用いて検討した所、色素として **TAMRA** が最も抗原結合による **BRET** 効率変化を受けやすいこと、発光酵素 **Nluc** と **TAMRA** の間のリンカー長はいずれの長さでも一定以上応答が向上することを明らかにしている。また、検討中に一本鎖抗体 **scFv** の二量体形成が要因と思われる **TAMRA** の **H-dimer** 形成量が抗原の有無で変化する現象を見いだしており、蛍光応答向上への応用の可能性が述べられている。

第四章「蛍光偏光法を用いた高速かつ高精度な抗原検出法」では、蛍光消光が起こらない抗体と色素の組み合わせにおいても、抗原の抗体への結合を色素の運動性の変化として検出できれば、多くの抗体を疑似的に **Q-body** として活用できる可能性があるとし、**Q-body** における抗原依存的な蛍光色素の運動性の変化に基づく抗原検出法の確立を目指している。すでに抗原依存的な運動性増大が報告されている **TAMRA** に加え、**BDP-TMR** を用いて検討した所、**BDP-TMR** 標識 **Q-body** においてより顕著な蛍光異方性変化が観察されたとしている。今後、より多くの抗体で同様の現象が認められれば、汎用的な原理として免疫センサー構築に応用しようと述べられている。

第五章「**NMR** による新規免疫センサー **Hibody** の抗原結合に伴う発光活性増大機構の解明」では、**N** 末端に **Q-body** の色素の代わりに融合する事で抗体断片をセンサー化可能なタグ配列 **HiBiT** を利用した **HiBiT** 融合抗体断片 **Hibody** の抗原依存的な発光活性増大機構の解明を目的とし、**NMR** 法を用いた **BGP** 認識 **Hibody** の抗原結合に伴う動態変化の解析について記されている。その結果、**HiBiT** タグは抗原不在時には **scFv** の **V_H**, **V_L** 界面に取り込まれており、抗原結合に伴って抗体外に放出されることが明らかにされている。今後、様々な抗体を高い応答を示す **Hibody** とするにあたり、本章で得られた知見は **HiBiT** タグと抗体の具体的な相互作用部位を明らかにする際の足掛かりになると述べられている。また、凝集の起こしやすさから取り扱いが難しい **Hibody** について、**NMR** 試料の調製方法を確立したことも成果の一つとしている。

第六章「結論」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、本論文は独創的な発想に基づき組換え抗体断片を迅速に免疫センサー化する手法の開発に成功するとともに、これまで報告のあった原理・現象についての解析から実用的な **Q-body** を創出する上で基盤となる知見を得ており、工学上ならびに工業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。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」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。