

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	抗体結合タンパク質を利用した抗体を高性能蛍光センサに変換する手法の開発
Title(English)	
著者(和文)	笹本佳那
Author(English)	Kana Sasamoto
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12774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,小畠 英理,田中 寛,岡田 智,田中 祐圭
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12774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)	要約
Type(English)	Outline

論文の要約

生命理工学院 ライフエンジニアリングコース

笹本 佳那

指導教員：北口哲也

本論文は「抗体結合タンパク質を利用した抗体を高性能蛍光センサに変換する手法の開発」と題し、日本語で書かれ、5章より構成されている。

第一章「イントロダクション」では、まず抗体について概説した。次に抗体抗原反応を利用した微量物質検出法すなわち免疫測定法と現在主に利用されている免疫測定法の特徴を説明した。一方でこれらの免疫測定法は迅速さと感度、低分子への応用可能かの可否を両立できていないことを指摘した。そうした背景のもと、当研究室で開発された **Quenenchbody (Q-body)** はタンパク質のような高分子からホルモンのような低分子まで広範な物質を測定可能である上、洗浄操作が不要であるため迅速かつ簡便な測定ができ、従来の免疫測定法に成り代わる可能性のある手法であることを説明した。一方で **Q-body** の構築には抗原を認識する領域すなわち可変領域の配列情報の取得と遺伝子操作が必要であることから **Q-body** 構築には多大な時間と労力が必要であるため、**Q-body** 構築に適用される抗体は可変領域の配列情報が既知であるものにほぼ限定されていることを指摘している。この課題を解決するため当研究室で開発された、抗体の遺伝子操作なしに抗体自身を **Q-body** 同様の原理を持つセンサに変換できる **PM Quenchnprobe (PM Q-probe)** は配列情報のない市販抗体もセンサに変換できることを記載した。一方で、抗体によっては十分な応答を示すセンサに変換できないことを指摘している。そこで本研究は **PM Q-probe** による蛍光センサ化をあらゆる抗体に適用可能にすることを目的としたことを最後に述べた。

第二章「コイルドコイル形成ペプチドペアを用いた迅速なリンカー最適化手法の開発」では、蛍光応答に重要である **PM-蛍光色素間** のリンカーを効率的に検討する手法について記されている。強固なヘテロ二量体を形成する **E4/K4** ペプチドペアを利用し、リンカーの異なる多種類の **PM Q-probe** を迅速に構築できる手法の開発を目指したことを述べている。戦略としては、強固なヘテロ二量体を形成する **E4/K4** ペプチドペアを用いて多種類の **PM Q-probe (CQ-probe)** を効率よく構築する手法を開発したことを記している。リンカーの異なる4種類の **PM-E4** と6種類の蛍光色素-**K4** をそれぞれの組み合わせで混合することで一度に24種類の **CQ-probe** を構築することに成功したことを述べられている。24種類の **CQ-probe** で全長抗体を含む4種類の抗体を蛍光センサ化したところ、最適な組み合わせの **CQ-probe** を用いた場合、ほとんどの抗体が **PM Q-probe** の時と比較して高い応答を示す蛍光センサに変換できたことが示されている。このことから本手法を用いたリンカー調節の効率化により、十分な応答を示す蛍光センサに変換できる抗体の範囲を広げること成功したことが述べられている。

第三章「免疫細胞を用いた抗体選抜系の構築」では蛍光センサに適した抗体を取得する系の構築を試みたことを述べた。まず、第二章の検討により十分な応答を示す蛍光センサ化できる抗体の範囲を拡大

できたが、多数のリンカーを検討しても従来の PM Q-probe を用いた場合と応答が変わらない抗体も存在したことを指摘している。よって蛍光センサに適す抗体とそうではない抗体が存在する可能性があると考えられ、蛍光センサに適した抗体を取得する手法を開発すれば、より多くの抗体をセンサ化できると予想されることを述べている。そこで CQ-probe を用いて、培養しているだけで自律的に B 細胞ライブラリを構築できるニワトリの免疫細胞 DT40 細胞から蛍光センサに適した抗体を提示する細胞を取得する系の開発を目指したことが記されている。その足掛かりとして、個々の細胞で異なる抗体提示量に影響されない FRET CQ-probe を作製したことが述べられている。また、DT40 細胞上の抗体に FRET CQ-probe が結合できることが、蛍光顕微鏡の観察結果から示されている。三章の最後には DT40 細胞から蛍光センサに適したモノクローナル抗体を取得する系の確立の基盤を構築できたため、今後、この系で蛍光センサに適した抗体を選択することが期待されることが記されている。

第四章では、逆平行結合を抑制する E4 (Pa)/K4 (Pa) を設計したことを述べている。第三章で構築した FRET CQ-probe は CQ-probe と比べて応答が低いことが分かり、その原因として E4/K4 が逆平行結合を形成することでクエンチしない蛍光色素の数が増えていると考えていることが記されている。そこで、逆平行結合抑制型の E4 (Pa)/K4 (Pa) を設計したところ、逆平行結合抑制に成功したことが示唆されたことが述べられている。4 章の締めとして今後は FRET CQ-probe と抗体複合体の抗原に対する蛍光応答を向上させられることが期待されることを示している。

第五章「結論」においては、各章で得られた研究結果を総括すると共に、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、PM Q-probe による抗体の蛍光センサ変換手法が利用できる抗体の範囲を広げること成功した。さらに、これまでなかった免疫細胞から蛍光センサに適した抗体を取得する系を確立する基盤の開発に成功している。