

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	微小ドロップレット培養とバイオセンサーを用いたタンパク質高生産株スクリーニング法の開発
Title(English)	
著者(和文)	伊藤良浩
Author(English)	Ito Yoshihiro
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12498号, 授与年月日:2023年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:北口 哲也,中村 浩之,西山 伸宏,和地 正明,石田 忠,中野 秀雄
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12498号, Conferred date:2023/6/30, 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

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 ライフエンジニアリング	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	伊藤 良浩		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	北口 哲也 准教授	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

バイオ医薬品タンパク質の製造においては、コストが安価であること、動物由来成分を含まないなどの利点から微生物分泌生産系が広く用いられている。しかしながら、バイオ医薬品タンパク質を高分泌生産する微生物株の樹立には、プロテアーゼ欠失や翻訳、転写に関わる因子の発現強化など多くの遺伝子改変の導入が必要であり、従来の手法では開発期間が長期に及ぶことが課題であった。この課題を解決する手法として、マイクロドロップレットを培養リアクターとした並列培養評価により、大規模な遺伝子改変株ライブラリからタンパク質高分泌生産株を迅速に選別するスクリーニング手法が注目されている。マイクロドロップレットスクリーニングでは、ドロップレット内で分泌されたタンパク質をバイオセンサーによって蛍光シグナルに変換する必要があり、種々のバイオセンサー技術が構築されているが、これまでの先駆的な研究では、バイオセンサーの汎用性及び検出の簡便性に課題があった。本研究では、マイクロドロップレットスクリーニングにおける新たなバイオセンサーとして、測定簡便さ及び汎用性の高さから抗体を基盤としたイムノセンサー-Q-body が有望と考え、Q-body を用いたマイクロドロップレットスクリーニング法の確立を目指した。

初めに、Q-body を用いて微生物が分泌生産したタンパク質の検出が可能であることを実証した。本研究のバイオセンサーとして抗 BGP scFv Q-body を選択し、エピトープである 7 アミノ酸残基から成る BGPC7 配列を Q-body 検出用の小さなタグとして、モデルターゲットである FGF9 に融合し、Q-body を用いて抗原濃度依存的に検出できることを示した。次いでグラム陽性細菌 *Corynebacterium glutamicum* を宿主として BGPC7 配列融合 FGF9 分泌生産株を構築し、培養液に分泌された FGF9 を Q-body を用いて検出することに成功した。

次いで、スクリーニングのもう一方のコア技術であるマイクロドロップレットの作製条件を確立し、Q-body を用いたマイクロドロップレット内のタンパク質濃度による選別を目指した。本研究におけるマイクロドロップレットとして、内封したタンパク質の外部漏洩が生じにくい W/O/W エマルションを選定した。マイクロ流体装置を用いた作製検討を行い、粒径均一性の高い W/O/W エマルション作製条件を確立した。更に Q-body の蛍光を指標に、BGPC7 配列融合 FGF9 を 3 段階の濃度で封入した W/O/W エマルションをそれぞれ明確に識別することに成功し、エマルション内において Q-body を用いた濃度依存的な蛍光検出が可能であることを実証した。

Q-body とエマルション培養を用いたタンパク質分泌生産株スクリーニング法の確立を目指した。対照株及び BGPC7 配列融合 FGF9 分泌生産株を Q-body と共に封入してエマルション培養し、BGPC7 配列融合 FGF9 分泌生産株封入エマルションが高い蛍光強度を示したことから、Q-body を用いたエマルション培養でタンパク質分泌生産株を検出可能であった。更に、対照株と BGPC7 配列融合 FGF9 分泌生産株を混合し、エマルション培養を行い、Q-body の蛍光を指標に選別回収を行った。BGPC7 配列融合 FGF9 分泌生産株を選択的に回収することに成功しエマルション培養と Q-body を用いてタンパク質分泌生産株を選択的に回収するスクリーニング法を確立した。

スクリーニング法の有用性を実証すべく、タンパク質分泌生産能が向上した菌株取得を検討した。BGPC7 配列融合 FGF9 分泌生産株を変異処理したランダム変異株ライブラリを調製し、約 10^5 個の変異株を Q-body の蛍光を指標にスクリーニングした。取得した変異株群を培養し、有意に BGPC7 配列融合 FGF9 分泌量が増加していることが認められ、最大で分泌量が 3 倍に増加していた。以上から、Q-body とエマルション培養を用いたスクリーニング法によって、大規模ライブラリから迅速にタンパク質高分泌生産株を取得可能であることが示された。

本研究で確立したバイオセンサー-Q-body とエマルション培養を用いたスクリーニング法は、小さなタグ配列の融合で広範なタンパク質に適用可能かつ、Q-body を培地に加えるのみで分泌されたタンパク質の検出が可能であり、高い汎用性と簡便性を兼ね備えている。また約 10^6 個の菌株を 3 日間でスクリーニング可能であり、極めて高いスループット性を併せ持っている。今後、本研究で確立したスクリーニング法を微生物を宿主とするバイオ医薬品タンパク質の開発に応用することで、タンパク質を高分泌する工業用微生物株の開発期間の大幅な短縮が期待され、需要が高まっている様々なバイオ医薬品タンパク質の安価な供給に貢献できる。

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

系・コース： 生命理工学 系
Department of Graduate major in ライフエンジニアリング コース
学生氏名： 伊藤 良浩
Student's Name

申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員 (主)： 北口 哲也 准教授
Academic Supervisor(main)
指導教員 (副)：
Academic Supervisor(sub)

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

In biopharmaceutical protein production, microbial secretory production is widely used due to its low-cost advantages and free animal-derived components. However, the establishment of highly genetically modified industrial strains that secrete the large amount of protein of interest is time-consuming.

In this research, a simple and versatile high-throughput screening method for protein-secreting strains is newly developed. A library of microbial cells with different genotypes is encapsulated in a microemulsion and cultured to secrete the proteins in the emulsion. The secreted protein of interest is detected as a fluorescence signal by the fluorescent immunosensor Q-body, and the flow cytometer is used to select emulsions containing improved protein-secreting strains based on the fluorescence intensity.

Various verifications were carried out for the establishment of the screening method, and it was shown that Fibroblast growth factor 9 (FGF9) secreted by Gram-positive bacteria *Corynebacterium glutamicum* (*C. glutamicum*) into the culture medium could be detected as fluorescence signals using Q-body. Next, FGF9-secreting strains were selectively recovered from a mixture of control strains and FGF9-secreting strains using Q-body and emulsion culture, and the screening method was established. Finally, more productive strains of FGF9 were screened from random mutagenesis library, the mutant with a 3-fold increase in FGF9 secretion was successfully obtained. These results demonstrated the usefulness of the established screening method.

The screening method established in this research can be applied to a wide range of proteins by fusing a small detection tag, and detection is a highly simple process that requires only the addition of Q-body to the medium and does not require the addition of any substrates or chemical treatments. It will be expected to contribute to shortening the development period of industrial strains for biopharmaceutical protein production.

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).