

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)	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	伊藤 良浩		
論文審査 審査員		氏名	職名		氏名	職名
	主査	北口 哲也	准教授	審査員	西山 伸宏	教授
	審査員	中野 秀雄	教授		石田 忠	准教授
		和地 正明	教授			
		中村 浩之	教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「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」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、バイオ医薬品タンパク質製造に微生物分泌生産系が広く用いられていることを解説し、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、タンパク質生産に寄与する多くの遺伝子改変の導入が必要であり、開発が長期に及ぶことを課題として指摘している。課題解決の方法として、マイクロドロップレットを用い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を提案している。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るが、種々のバイオセンサー技術が構築されているが、先行研究では、バイオセンサーの汎用性及び検出感度、検出時間に課題があることを示している。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、検出感度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 **Quenchbody (Q-body)** が有望と考え、本研究の目的として **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行った事が述べられている。

第二章「**Q-body** をバイオセンサーとした微生物分泌タンパク質の検出」では、微生物が培養液に分泌生産したタンパク質の **Q-body** を用いた検出について記されている。抗 **Bone Gla Protein (BGP) scFv Q-body** を使用し、エピトープである 7 アミノ酸残基から成る **BGPc7** 配列を検出用のタグとして、モデルターゲットである **Fibroblast growth factor 9 (FGF9)** に融合することで、抗原濃度依存的な検出が可能であることが示されている。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** を用いて検出に成功したことが述べられている。

第三章「**Q-body** を用いたエマルジョン内タンパク質濃度の測定」では、マイクロドロップレットの一種である **Water-in-Oil-in-Water (W/O/W)** エマルジョン作製条件確立、および **Q-body** を用いたエマルジョン内のタンパク質濃度の選別検討について述べられている。マイクロ流体装置を用いて粒径均一性の高い **W/O/W** エマルジョン作製条件を確立したことが記されている。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** エマルジョンを明確に識別することに成功し、エマルジョン内において **Q-body** を用いた濃度依存的な蛍光検出が可能であることが述べられている。

第四章「エマルジョン培養と **Q-body** を用いたタンパク質分泌株スクリーニング法」では、**Q-body** とエマルジョン培養を用いたタンパク質分泌生産株の選択的回収について述べられている。対照株及び **BGPc7** 配列融合 **FGF9** 分泌生産株を混合してエマルジョン培養を行い、**Q-body** の蛍光を指標にして **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、エマルジョン培養と **Q-body** を用いたタンパク質分泌生産株スクリーニング法を確立したことが述べられている。

第五章「エマルジョン培養と **Q-body** を用いたタンパク質高分泌株のスクリーニング」では、確立したスクリーニング法を用いたタンパク質高分泌生産株の取得について述べられている。**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用いて約 10^5 個の変異株をスクリーニングし、有意に **BGPc7** 配列融合 **FGF9** 分泌量が增加した変異株の取得に成功したことが記されている。これらの検討結果から、**Q-body** とエマルジ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と述べられている。

第六章「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、本論文はバイオセンサー **Q-body** とエマルジョン培養を用いたスクリーニング法

について初めて報告したものであり、ハイスループットかつ汎用性及び検出感度を兼ね備えたスクリーニング法の開発に成功しており、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。

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。