

## 審査の結果の要旨

氏名 ジョン ヒジン

本論文は、新規免疫センサー蛋白質 Quenchbody (Q-body)の機能向上と、その免疫測定への応用を目指したものであり、全6章から構成されている。

第1章は序論であり、免疫測定法と Q-body に関する既存の研究と知見を中心に本研究の背景と意義を述べ、本研究の目的と本論文の構成を示している。

第2章では、Q-bodyを合成する際に用いる無細胞転写翻訳試薬の作製とその性能確認結果について述べられている。従来の Q-body は、市販の大腸菌無細胞転写翻訳系を使用して作製されてきた。そこで、各種 Q-body 実験を行う上で十分な量の合成試薬を確保するため、転写・翻訳に必要な酵素類やアミノ酸を含む緩衝液類の作製方法を検討している。具体的には、骨疾患の診断マーカーであるオステオカルシン (BGP) の C 末ペプチド認識抗体を用いてテトラメチルローダミン (TAMRA) 標識 Q-body を作製して試薬の性能を評価し、市販試薬を使用した場合と比較した結果、ほぼ一致することを確認している。

第3章では、抗ニワトリ卵白リゾチーム (HEL) Q-body を作製し、標識蛍光色素およびドメイン順の検討結果について述べている。HEL を認識する抗体の一つである HyHEL-10 はその立体構造が解明されているため、蛍光消光の要因とされるトリプトファン残基と蛍光色素間の相互作用について新たな知見が加えられる可能性に着目し、HyHEL-10 を用いて Q-body を作製している。また、Q-body の更なる機能拡張のため、TAMRA に加えてローダミン 6G (R6G) も標識蛍光色素として使い、その性能を検討している。その結果、TAMRA 標識および R6G 標識 Q-body 両方において、HEL 濃度依存的な蛍光強度の増加の観察に成功し、蛋白質検出における Q-body の適用可能性を確かめている。また、 $V_H$  と  $V_L$  のドメインの連結順序によって異なる HEL 濃度応答性を示したことから、これらの相違についても論じている。

第4章では、細胞分裂後期と中期それぞれに観察されるビメンチンのセリン71リン酸化 (PS71) とセリン82リン酸化 (PS82) を Q-body を用いて検出する方法について述べている。細胞骨格の中間径フィラメント構成蛋白質の一つであるビメンチンは細胞周期依存的にリン酸化され、リン酸化されたビメンチンは定常な細胞分裂において構造変化を起こす。そこで、まず PS71 Q-body を作製し、さらにその応答性の向上のため、色素の検討および反応液とビメンチンのセリン71とセリン82を含むペプチド添加前のプ

レインキュベーション処理の最適化を行っている。なお、Q-body の N 末端近傍に加えて  $V_H$  と  $V_L$  のドメイン間のリンカー中にもう 1 ヶ所蛍光色素を取り込ませた結果、その蛍光強度が最大 4.0 倍まで増加し、Q-body で PS71 の検出が可能であることを見出している。次に、抗 PS82 Q-body を合成し、特に、 $V_H$  と  $V_L$  のドメインの連結順序を逆 ( $V_L$ - $V_H$ ) にしてダブル標識を行うことで、その蛍光強度を最大 6.7 倍に増加させることに成功している。以上より、Q-body 法によって蛋白質リン酸化の検出が可能であり、色素、反応条件および Q-body 構造の最適化を行うことで蛍光応答性を顕著に向上できると結論づけている。

第 5 章では、Q-body を細胞イメージング等、プローブ量を必要とする応用に用いるため、大腸菌で未修飾の抗体 Fab 断片を大量に発現・精製し、後から蛍光色素修飾して構築する方法について検討を行い、併せて細胞イメージングへの応用を試みたことについて述べられている。具体的には、TAMRA、ATTO520 を修飾した抗 BGP Q-body でそれぞれ 2.5 倍、5.5 倍の蛍光強度の増大が見られ、本方法を用いた Q-body 構築に成功している。次に、アガロースビーズに Q-body を結合させ、抗原を加えた場合にのみ顕著な蛍光が観察されたことから、抗原によるクエンチ解除を蛍光顕微鏡で観察することが可能であったと述べている。さらに、Q-body を用いて生きたヒト骨肉腫細胞からの BGP 分泌の観察を試みた結果、BGP 分泌を誘導するビタミン  $D_3$  で細胞の前処理を行い、かつ外部より Q-body を加えた場合にのみ細胞膜表面近傍に蛍光が観察され、分泌後に細胞の周辺に沈着した BGP の観察に成功したと述べている。

第 6 章では、上記を総括し、今後の展望について述べている。Q-body を用いた測定法は各種診断マーカー・環境汚染物質を含めた多くの低分子の高感度検出に適用されると期待され、さらに同様の技術により各種病原体検出への応用が可能であると述べている。

以上、本論文では未だその可能性が未知であった蛍光免疫測定素子 Q-body に関して、その高性能化ならびにイメージング分野への応用に資する多くの新しい知見を得ている。その成果は抗体タンパク質の部位特異的かつ適切な蛍光修飾法の確立によるものであり、化学生命工学の進展に寄与するところ大である。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。