

審査の結果の要旨

氏名 鍾 蟬 伊

本論文は、細胞で発現可能な蛍光抗体プローブタンパクの開発、そのバイオマーカー測定と蛍光イメージングへの応用を目指したものであり、全 5 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、バイオマーカー測定法、抗体プローブと蛍光共鳴エネルギー移動を利用する測定法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ている。そして本研究の目的が、抗体と抗原との特異的結合と、蛍光タンパク質を利用して、混合物中の微量物質を、選択的にかつ分離操作を行わずに蛍光を用いて測定する手法の開発にあることを述べている。

第 2 章では、低分子抗原のモデルとして骨疾患マーカーの一種、オステオカルシン(BGP)に対する蛍光抗体プローブを作製している。検出原理として Open-Sandwich 原理を利用し、抗体可変領域 V_H と V_L のそれぞれのアミノ(N)末端に蛍光蛋白質 CFP と YFP をそれぞれ結合させて大腸菌で発現させ、抗原が結合するとこれらが会合し蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が起きる系を作成した。この結果、YFP と CFP の蛍光強度比から評価した FRET 効率は、抗原濃度依存的に顕著に上昇し、その EC50 は従来のファージ ELISA のものとほぼ一致した。これは本抗体に蛍光蛋白を融合させても、親和性は大きい影響を受けなかった事を示しており、かつその検出限界は 3.1 nM と、診断薬に応用可能なレベルであった。さらにこのプローブを用いてヒト骨肉腫細胞 U2OS からの BGP 分泌の観察を試みた結果、BGP 産生を誘導するビタミン D₃ で細胞の前処理を行った場合にのみ細胞表面近傍に蛍光が観察され、蛍光強度と FRET 効率が共に高くなり、分泌後に細胞周辺に沈着した BGP の観察に成功したと述べている。

第 3 章では、肝機能マーカーである血清アルブミン(Serum Albumin, SA)に対する蛍光抗体プローブの作製と、高分子抗原の検出に適した新規免疫測定法 Open-Flower fluoroimmunoassay (OF-FIA)の開発について述べている。一般に、タンパク質を認識する抗体は抗原非存在時の V_H - V_L 間相互作用が強く、Open-Sandwich 原理でのプローブの作製は難しい。本研究では、発想を変えて V_H と V_L のフレームワーク領域に変異を導入し、SA を認識する CFP- V_H と YFP- V_L をジスルフィド結合させ、安定な FP2-dsFv を作製した。この結果、SA

が存在しない場合の YFP と CFP の蛍光強度比は約 14 であったが、SA 濃度を増加させると、この比が 3 近傍まで減少した。またその検出感度は臨床検査における肝機能診断に十分応用可能なものであった。その作動機構を解析するため、蛍光タンパク質 (FP) の二量体形成に重要な Ala206 を Lys に変異させた所、FRET 効率が顕著に低下し、その SA 濃度応答性が失われた。また、抗体断片と FP の間に長いリンカーを導入した場合、抗原への応答性が低下したことから、FP の二量体形成率の重要性が示唆された。最後に、低蛍光 YFP 変異体を用いることで FRET 由来の蛍光をクエンチし、SA が結合した場合にそのクエンチ効果が解除されて蛍光する、Open-Flower 原理に基づく signal-on 型蛍光プローブの作製にも成功した。

第 4 章では、ヒストンの翻訳後修飾検出のための一分子 FRET プローブの構築について述べている。このため、細胞内で発現可能なヒストン H3 Lys9 アセチル化特異的一本鎖抗体 scFv と二種の FP を融合させ、数種のプローブ発現ベクターを作製した。これらを U2OS 細胞内で発現させ、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (Trichostatin A, TSA) 処理による FRET 効率変化を測定した所、あるプローブで、TSA 依存的な核内の FRET 効率上昇が観測された。scFv の特異性を変更すると TSA 依存的な FRET 効率変化は失われた事から、反応の特異性が示され、さらに FRET プローブを生細胞内で発現させ、TSA 添加後の核内 FRET 効率上昇のライブイメージングにも成功した。以上より、蛍光抗体プローブによるヒストン H3 Lys9 アセチル化の動態変化を生細胞内で FRET で検出することに成功した。以上をまとめるに、本研究は抗体を用いた一分子 FRET プローブを生細胞内の抗原動態観測に応用した最初の例と結論づけている。

第 5 章では、上記を総括し、今後の展望について述べている。本論文で述べた化学修飾操作の不要な蛍光抗体プローブによる測定法は、簡便に調製できるのみならず抗原の分子量を問わず今後各種診断マーカーの簡便な検出に適用可能なこと、さらに同じ技術を用いて、蛍光イメージングによる細胞内外の各種抗原検出への応用が可能であること、が述べられている。

以上、本論文では様々な抗原に対して蛍光抗体プローブタンパク質を構築し、均一系で抗原を検出することに成功した。特に FP2-dsFv プローブは蛍光タンパク質の二量体形成能に基づく新しい抗原検出原理を提唱するもので、今後体外診断や細胞内生理現象研究に広く応用可能と考えられる。すなわち本論文では抗体工学・免疫測定分野、バイオイメージング分野に資する多くの知見が得られており、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。