

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 鈴木 智香子

抗体（免疫グロブリン）を利用した免疫測定法は基礎研究や臨床診断に欠かすことのできない測定技術である。現在、最も一般的に用いられている Sandwich ELISA 法は、高い選択性と感度の良さを併せ持つが、測定に際して数回の反応と洗浄を繰り返す必要が有るため、1回の測定に数時間かかる。また測定法の原理上、最低2種類の抗体が必要であるため、抗体結合部位を1つしか持たない小分子の測定には適用できないという制約がある。免疫測定法の簡便性、迅速性および適用性を高めるという観点から、Sandwich ELISA 法の改良が望まれていた。

本論文では免疫測定法の改良を目的として抗体分子の一部分とレポーター分子との融合タンパク質を作製している。すなわち、抗体分子のうち、実際に抗原との結合に関わる抗体可変領域（Fv）と大腸菌由来アルカリホスファターゼ（PhoA）との種々の融合タンパク質を作製し、このような人工抗体を用いた新規免疫測定法の開発を行ない、その簡便性、迅速性を検証している。前半部分では抗ハプテン一本鎖抗体-PhoA 融合タンパク質の作製と免疫測定への応用について、後半部分では抗体可変領域モノドメイン-PhoA 融合タンパク質の作製とこれを用いた新規免疫測定法について述べている。

第1章は序論、第2章では研究の背景、既往の研究および研究の目的について述べている。

第3章では、抗 NP（4-hydroxy 3-nitrophenyl acetic acid）一本鎖抗体-PhoA 融合タンパク質（ScFv(NP)-PhoA）の作製とその機能評価について述べている。すなわち、抗 NP 抗体 ScFv 及び大腸菌由来アルカリホスファターゼ遺伝子をクローニングし、これを用いて人工抗体 ScFv(NP)-PhoA を作製している。さらに、この人工抗体が PhoA 酵素活性、抗原結合能のいずれについても、野生型とほぼ同等の機能を保持していることを明らかにしている。また、この人工抗体を NP-BSA 濃度の測定に適用し、抗体を用いた従来法と比較して、測定感度は従来法とほとんど変わらないものの、1回の結合反応と、洗浄操作が省略できる簡便な測定法であることを示している。

第4章では抗 DIG（Digoxin）一本鎖抗体-PhoA 融合タンパク質の作製、及びこれを用いた DIG-BSA の定量について述べている。作製した融合タンパク質 ScFv(DIG)-PhoA は菌体内にインクルージョンボディとして蓄積された。このため、様々な条件でリフォールディングを行ない、最終的に塩酸グアニジンでタンパク質を可溶化した後、段階希釈で塩酸グアニジン濃度を下げるという方法により、融合タンパク質の抗原結合能、酵素活性が共に回復することを見出している。また、リフォールディング後の ScFv(DIG)-PhoA は、ScFv(NP)-PhoA と同じく免疫測定用の人工抗体として応用可能であり、これを用いた ELISA 法により DIG-BSA 濃度を簡便に、感度良く定量できることを明らかにしている。

第5章では抗ニワトリ卵白リゾチーム（HEL）抗体 VH-/VL-PhoA 融合タンパク質の作製と、これらを用いた Open Sandwich ELISA 法について述べている。Open

Sandwich ELISA 法は抗体可変領域の分子内相互作用を利用した新規免疫測定法であり、1回の結合反応と洗浄操作で抗原濃度測定が可能であるため、従来の Sandwich ELISA 法と比較して大幅な測定の簡略化、迅速化が期待される。ここでは抗 HEL 抗体 HyHEL-10 の VH とレポーター分子としての PhoA との融合タンパク質 VH(HEL)-PhoA を作製している。これを酵素標識 2 次抗体として、また、ビオチン化 VL を固相 1 次抗体として用いる Open Sandwich ELISA 法により、HEL 濃度の測定が迅速、かつ高感度に行えることを示している。さらに、VH(HEL)-PhoA の PhoA 活性中心近傍に変異をかけて PhoA 比活性の高い変異体を作製し、これを用いることにより発色反応時間を従来の約 1/4 に短縮することに成功している。

第 6 章では Open Sandwich ELISA 法のハプテン濃度測定への応用の可能性について述べている。Open Sandwich ELISA 法の大きな特色の一つに、ハプテンのような単価抗原濃度を Sandwich ELISA 法により定量できる可能性が挙げられる。ここでは、単価抗原モデルとして第 2 章で用いた NP に着目し、抗 NP 抗体 VH-PhoA 融合タンパク質および抗 NP 抗体 VL-Protein G 融合タンパク質を作製している。これらの 2 種類の人工抗体を用いて、人工抗体の可変領域 VL、VH の相互作用およびこれら VL、VH と抗原 NP の相互作用を測定したところ、2 種類の人工抗体が溶液中に同時に添加された場合には両者が会合して Fv の形となり、固相に固定化された抗原に結合するのに対して、VL(NP)-Protein G、VH(NP)-PhoA のどちらか一方を固定化した Open Sandwich ELISA 法では、抗原結合能が著しく低下することを見出している。さらに、この結果に基づいて、抗 NP 抗体と抗 HEL 抗体 (HyHEL-10) とで抗原結合に関する挙動が異なる理由について考察している。すなわち、抗体の抗原認識には HyHEL-10 に代表されるものと抗 NP 抗体に代表されるものとの 2 つの型式が存在し、抗体が HyHEL-10 型の抗原認識をする時のみ Open Sandwich ELISA 法が可能になるのではないかと推測している。また、本章では、Open Sandwich ELISA 法を利用した NP 濃度測定系を確立するための抗 NP 抗体可変領域の改変に関する戦略についても言及している。

第 7 章では、第 5 章、第 6 章の結果を踏まえ Open Sandwich ELISA 法を用いた NP 定量系を確立するために、部位特異的変異を抗 NP 抗体可変領域に導入している。VH 領域 33 番目の Trp を Leu に置換することにより、親和性を上げた変異体 VH(W33L)-PhoA を作製し、これを用いて Open Sandwich ELISA を行ったところ、再現性良く NP が定量された。本研究は Open Sandwich ELISA 法でハプテン定量が可能であることを示しており、これはマイクロプレートを用いた非競合ハプテン定量法としては、初めての報告である。

第 8 章は本論文の総括と結言である。

以上、本論文は種々の抗体可変領域-アルカリホスファターゼ融合タンパク質を作製し、その機能を評価するとともに、これらを用いた簡便性、迅速性に富む新規免疫測定法を示したものである。特に後半部分では抗体可変領域モノドメイン-アルカリホスファターゼ融合タンパク質を用いた新規免疫測定法を確立しており、この成果は化学生命工学、特に免疫測定、免疫診断分野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。