

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 新井 亮一

キメラ蛋白質は、複数の異なった機能を持つ蛋白質を結合して創製する人工蛋白質であり、大量発現・精製系や抗体医薬、免疫測定など様々な分野に応用されている。また、強い緑色蛍光を発するオワンクラゲ由来の Green fluorescent protein (GFP) は、原核、真核生物いずれでも発現し、構造、蛍光活性とも安定な蛍光蛋白質である。近年、蛍光活性を高めた変異体や、蛍光波長が変化した変異体などが開発され、遺伝子発現や生細胞内局在のマーカーなどに応用されている。ここで、GFP を免疫測定へ応用することを考えた場合、一般的な化学蛍光試薬であるフルオレセインなどに比べて蛍光が退色しにくく、抗体や抗体結合蛋白質と遺伝子的に結合できるので化学修飾が不要となる利点があり、有用性が高いと考えられる。しかしながら、これまで GFP を免疫測定に応用した例はほとんどなかった。そこで、本論文では、抗体や抗体結合蛋白質と GFP とのキメラ蛋白質の創製、及び、免疫測定法への応用について検討し、その研究成果を述べている。

第1章では、序論として研究の背景および目的について述べている。

第2章では、抗体結合蛋白質 protein G と蛍光蛋白質 EGFP とのキメラ蛋白質 PG-EGFP の創製、及び、蛍光免疫測定への応用について述べている。従来法では、それぞれの種の抗体を蛍光色素で化学修飾することによって蛍光標識抗体を用意する必要があった。しかし、化学修飾部位の特異性が低いために、抗原結合活性が失活することがあるという問題があった。そこで、野生型 GFP よりも蛍光活性を高めた変異体である EGFP と、多くの種の抗体と抗原結合活性を阻害することなく結合する protein G をキメラ化することにより、より汎用性の高い抗体の蛍光標識試薬の創製を試みた。作製したキメラ蛋白質 PG-EGFP は、蛍光活性及び抗体結合活性を十分に有していた。これを抗体の蛍光標識試薬としてウェスタンブロッティングに応用したところ、1 ng 以下の BSA の検出が可能であった。また、サンドイッチ蛍光免疫測定法へ応用したところ、BSA や IgG などが測定可能であった。これらの結果により、PG-EGFP は、汎用的な抗体の蛍光標識試薬として利用可能であると結論付けている。

第3章では、抗体可変領域  $V_H$ 、 $V_L$  と蛍光蛋白質変異体 EBFP、EGFP とのキメラ蛋白質 Trx- $V_H$ -EBFP、Trx- $V_L$ -EGFP を創製し、オープンサンドイッチ蛍光免疫測定法に応用したことについて述べている。まず、抗ニワトリ卵白リゾチーム(HEL)抗体 HyHEL10 の  $V_H$  と青色蛍光変異体 EBFP、 $V_L$  と緑色蛍光変異体 EGFP のキメラ蛋白質

を大腸菌により発現させ、精製を行った。得られたキメラ蛋白質は、十分な抗原結合活性及び蛍光活性を有し、 $V_H$ 、 $V_L$ とも EBFP, EGFP によりほぼ完全に蛍光標識されていた。次に、これらのキメラ蛋白質混合液に抗原の HEL を添加しながら蛍光スペクトルを測定したところ、HEL の添加量に応じて、EBFP の蛍光が減少し EGFP の蛍光が増大するという FRET に由来する変化が見られた。このことは抗原濃度依存的にキメラ蛋白質の  $V_H$ 、 $V_L$  部分が会合し、その結果 EBFP と EGFP が近接したことを意味している。さらに、EGFP と EBFP のピーク強度比を FRET の指標として HEL の濃度に対してプロットしたところ、HEL 濃度  $1\sim 100\ \mu\text{g/ml}$  の範囲で定量できることが示された。また、96 穴のマイクロプレートを用いて 2 分間で抗原濃度を測定することも可能であった。これらの結果により、抗体断片と GFP とのキメラ蛋白質を用いたオープンサンドイッチ蛍光免疫測定法による多検体迅速測定が可能であると結論付けている。

第 4 章では、抗体可変領域  $V_H$ 、 $V_L$  とウミシイタケ由来の発光酵素(Rluc)、蛍光蛋白質変異体 EYFP とのキメラ蛋白質 Trx- $V_H$ -Rluc, Trx- $V_L$ -EYFP の創製と、発光酵素と GFP 変異体間の発光エネルギー移動(BRET)を利用したオープンサンドイッチ蛍光免疫測定法(OS-BLIA)の開発について述べている。まず、抗 HEL 抗体 HyHEL10 の  $V_H$  と Rluc、 $V_L$  と GFP の黄色蛍光変異体 EYFP のキメラ蛋白質を大腸菌により発現させ、それぞれ精製した。次に、両者のキメラ蛋白質を混合し、HEL と基質セレンテラジンを添加して発光スペクトルを測定したところ、HEL の添加量に応じて、BRET に由来する EYFP の蛍光の増加が見られた。また、EYFP と Rluc のピーク強度比を BRET の指標とした時に、HEL の濃度に対して  $0.1\sim 10\ \mu\text{g/ml}$  の範囲で定量できることが示された。この結果は、前章の FRET の結果と比較して、検出感度が約 10 倍向上したことを示している。これらの結果により、BRET を用いた簡便でより高感度な均一系非競争的免疫測定法の開発に初めて成功したことを示している。

以上、本論文は、種々の GFP キメラ蛋白質を創製し、それらを簡便迅速な免疫測定法へ応用することに成功しており、この成果は、生命工学、特に免疫測定・蛋白質工学分野の進展に寄与するところが大きい。

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。