

審査の結果の要旨

氏名 油谷 隆秀

免疫測定法は、基礎研究や臨床診断、環境分析など、さまざまな分野で利用され、欠かすことのできない技術となっている。現在、汎用的に使用されている免疫測定法には、Sandwich ELISA 法と競合 ELISA 法がある。非競合法の Sandwich ELISA 法は、感度が良く測定範囲が広いと、最も一般的に用いられている。しかし、抗原を二種類の抗体で挟むという測定原理上、単価抗原（ハプテン）の測定を行うことができない。そのため、ハプテンの測定には、Sandwich ELISA 法と比較して感度の点で劣る競合法が使用されている。

Open Sandwich ELISA 法は、 V_H/V_L 間相互作用の強弱が抗原の有無によって変化する抗体 F_v を用いて抗原濃度を測定する新規免疫測定法である。Open Sandwich ELISA 法は、Sandwich ELISA 法と比べて測定時間を短くすることができるという利点のほかに、単価抗原濃度を非競合法で測定できるという利点があり、非常に応用性の高い免疫測定法である。本研究は、前半では V_H/V_L 間相互作用の強弱と抗体アミノ酸配列の関係について基礎的な検討結果を、後半では Open Sandwich ELISA 法に適した抗体を選択するための新規ファージディスプレイ法の開発とその応用について述べており、全 7 章で構成されている。

第 1 章は、論文の構成について、第 2 章では、研究の背景と研究の目的について述べている。

第 3 章、第 4 章では、ヒトフレームワークをもつ抗体 F_v をモデル系として、 V_H/V_L 間相互作用の強弱と抗体アミノ酸配列の関係について検討を行っている。第 3 章では、互いに V_H/V_L 間相互作用の強弱が異なる、牛血清アルブミン (BSA) に対する 4 種の抗体 F_v をモデル系として、 V_H/V_L 間相互作用の強弱を決定するアミノ酸残基を、アミノ酸置換とファージディスプレイの手法を用いて同定している。まず、これら 4 種の抗体の V_H 、 V_L の全ての組み合わせについて、 V_H/V_L 間相互作用の強弱を測定することにより、 V_H が相互作用の強弱を決定していることを明らかにした。また、相互作用の強い V_H と弱い V_H で異なる 6 アミノ酸残基に注目し、ファージディスプレイの手法を用いて解析を行ったところ、相補性決定領域 (CDR H3) の最初のアミノ酸が Gly の V_H は全て V_L との相互作用が強いことを見出した。そこで、この残基を他の全てのアミノ酸に置換した 19 種類の変異体を作製し、 V_L との相互作用を ELISA で測定した結果、CDR H3 の最初のアミノ酸が Gly の V_H だけが強い相互作用を持つことを明らかにした。さらに、この V_H が BSA に対する抗体 V_L 以外の、尿由来のポリクローナルな L 鎖に対しても強い相互作用を示したことから、 V_H/V_L 間相互作用の強弱の決

定には、CDR H3 の最初の残基のアミノ酸が重要な役割を担っていると結論している。

第4章では、さらにフレームワークは第3章の抗BSA抗体と同じものを持ち、8アミノ酸のCDR H3のうち最初の5残基がランダムな配列となっているV_Hのファージライブラリを用いて、V_Lとの相互作用について検討を行っている。ライブラリを用いて、V_Lに対してパニングを行い、強弱さまざまなV_H/V_L間相互作用をもったV_Hを多数得ている。そのCDR H3アミノ酸配列を解析した結果、さまざまなCDR H3配列が得られ、CDR H3配列がV_H/V_L間相互作用の強弱に大きく関与していることを示している。

第5章、第6章では、まずOpen Sandwich ELISA法に適した抗体断片を効率良く選択するための新規ファージディスプレイ法を開発している。次にそれを応用して、内分泌攪乱物質Bisphenol A (BPA) に対する4種の抗体の中から、Open Sandwich ELISA法に適した抗体を選択し、選択した抗体のV_Hとアルカリフォスファターゼ (PhoA) の融合タンパク質を用いて、Open Sandwich ELISA法による高感度なBPA濃度測定系を構築している。第5章では、V_H、V_Lを繊維状ファージのマイナーコートタンパク質pIX、pVIIとそれぞれ融合タンパク質とすることで、ファージ上にV_H、V_L断片を提示する系split Fv systemを構築している。このとき、V_L遺伝子とgVIIの間にアンバーストップコドン挿入することによって、ファージディスプレイを行うときの大腸菌ホストのサプレッサー変異の有無によってV_Lの提示の有無を切り替えることができるように設計を行っている。このようなsplit Fv systemを用いて、BPAに対する4種の抗体から、最もOpen Sandwich ELISAに適した抗体を選択し、本提示システムの実用性を示した。

第6章では、第5章で選択した抗体のV_HとPhoAとの融合タンパク質を作製し、これを用いたOpen Sandwich ELISA法により、BPA濃度を1 ng/ml以下という高感度で測定することに成功している。この、Open Sandwich ELISA法の測定感度は同じ抗体Fvを用いた競合法と比較して、約2桁高い感度であった。

第7章では以上の結果をまとめ、Open Sandwich ELISA法を一般化するための研究の今後の展望を述べている。

本論文は、Open Sandwich ELISA法に用いることが可能な抗体Fvに関して、有用な新しい知見を得るとともに、実用的な選択方法を確立したものであり、化学生命工学、特に免疫診断分野、環境分析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。