

審査の結果の要旨

氏名 小嶋 美樹

通常のサンドイッチ法では測定が難しい小分子抗原を、高感度な非競合法で、かつ簡便なホモジニアス系にて検出する新規免疫測定法が求められている。その足がかりとして、本研究ではオープンサンドイッチ(OS)ELISA法に適した抗体の新規選択系と、抗体酵素融合蛋白質を用いたホモジニアス測定系の創製を試みた。

新規抗体選択系は、Cre/loxPシステムを用いてscFv提示ファージ発現ベクターの V_L/V_H 間配列を相同的に組換えることにより、 V_L/V_H 各遺伝子をそれぞれマルトース結合蛋白質(MBP)、ファージに提示する発現ベクターに変換する系である。これにより煩雑なクローニング操作なしに簡便かつ短時間で後者のベクターが作製され、小分子抗原を非競合的に高感度かつ迅速に測定できるOS-ELISAを行うことができる。今回は、ニワトリ卵白リゾチーム(HEL)に結合しOS法に適している抗体HyHEL10をモデルとして確認実験を行った。まず、組換え酵素の認識配列であるloxP配列をリンカーとするscFv提示ファージが抗原結合能を保持していることを確認した。次にその発現ベクターと、MBP遺伝子を提供するドナーベクター間での組換えを行い、得られたベクターによるOS-ELISAにも成功した。また、scFv(HyHEL10)提示ファージをHEL結合能のないscFv提示ファージと1:5000の比率で混合したモデルライブラリを作製し、HELに対するパニング1回でHyHEL10ファージを3150倍に濃縮した。以上の結果より期待通りの変換系が作製され、さらにloxP配列をリンカーとするscFv提示ファージでのパニングが可能であることも示唆された。今後はこの系を用いたライブラリを作製することにより、任意抗原に対する抗体を効率よくOS法に応用できると考えられる。

抗体酵素融合蛋白質を用いたホモジニアス測定系の創製においては、円順列変異(cp)または分割(split) β ラクタマーゼ(BLA)と抗体の融合タンパク質を作製した。円順列変異体とは本来のN/C末端を適切な長さのペプチドリンカーで接続し、別の領域に新たな末端を持たせた変異体である。新規アロステリックな融合蛋白質の作製を目指し、基質結合部位近傍に新規末端をもつcpBLAの両端に

ネオニコチノイド系農薬イミダクロプリド(ICP)を認識する抗体の V_H , V_L 断片が挿入された融合蛋白質(Fv-cpBLA)を作製した。この融合蛋白質は、ICP結合により酵素の活性部位近傍コンフォメーションが変化し、酵素活性が制御される可能性がある。Fv-cpBLA発現株を100 $\mu\text{g/ml}$ Ap含有培地中で30時間培養し、1 ng/ml以上のICP添加時に濃度依存的な増殖が確認された。また、培養上清に分泌された酵素の濃縮液を用い、ELISAによるICP結合能、発色基質nitrocefinおよび蛍光基質fluorocillinを用いた酵素活性測定によるICP依存的な酵素活性の上昇を確認した。さらにFv-cpBLAをBLA本来の末端領域にて2つに分割した、Fv-splitBLAを作製した。この系では、抗原が V_H/V_L 相互作用を強めるというOS原理により2つの分割酵素が近接、リフォールディングされ、酵素活性が回復すると考えられる。Fv-splitBLA発現株を低濃度(10 $\mu\text{g/ml}$) Ap含有培地中で45時間培養し、ICP(10 ng/ml)特異的な増殖を確認できた。これらの系は農作物における含有農薬の基準値である20-5000 ng/mlを十分検出できる感度を示した。また、抗体酵素融合蛋白質を用いたセンサー蛋白質を分泌系で作製した初めての例である。この融合蛋白質はBLAのAp加水分解能を利用した高活性な変異体のスクリーニングが容易であるため、今後より高機能な融合タンパク質を作製できると期待される。

本研究により、scFv提示ファージ発現ベクターを V_L -MBP, V_H 提示ファージ発現ベクターに簡便に変換できる抗体選択系と、農薬依存的な活性上昇を示す融合タンパクFv-cpBLAおよびFv-splitBLAの作製に成功した。前者にて使用した組換えシステムを用い、cpBLAまたはsplitBLA遺伝子をコードするドナーベクターとの間で組換えることにより、任意抗体とcpBLA/splitBLAとの融合蛋白質Fv-cpBLA, Fv-splitBLAを簡便に作製できると考えられる。抗体選択系による任意抗原に対する抗体の取得、組換えシステムを用いた融合蛋白質の作製、Ap耐性による高活性な融合蛋白質変異体のスクリーニングを行うことにより、任意抗原に対するセンサー蛋白質を効率的に取得できると期待される。

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。