

審査の結果の要旨

氏名 刘 小波 (リュウ シャオボウ)

本論文は、抗体工学的手法を用いて低分子化合物、特に疾患診断ならびに環境保全に重要なステロイドホルモンであるエストラジオール(E2、Mw:272.4)の免疫化学的検出法の性能向上を目指した研究について述べたものであり、5章より構成されている。

第1章は序論であり、本研究の意義を明確にするために、抗体工学、ELISA法に代表される免疫測定に関する既往の研究を中心に、研究の背景が述べられている。

第2章では、本論文の主題となる抗原濃度に依存した抗体の2個の可変領域 $V_H - V_L$ 間の相互作用変化を利用した免疫測定法、オープンサンドイッチ法(OS法)の原理に基づくE2検出系の感度・特異性向上に関して述べられている。従来、E2のような分子量1,000以下の低分子ハプテン認識抗体の選択・取得法としては、生体内外を問わずハプテンキャリア複合体の調製が選択において不可欠であり、このため極めてしばしばハプテンでなく複合体を認識する抗体が取得・濃縮されてしまう問題があった。

この問題を原理的に避けうる選択法として、片方の可変領域断片(V_L)を固相に固定化、もう一方(V_H)をランダム化しM13ファージ粒子上に提示して、低濃度の抗原存在下で V_L に結合する V_H 提示ファージを選択するオープンサンドイッチ選択法を用い、抗E2抗体の親和性向上ならびに測定系の検出感度向上を試みている。具体的には、複製エラーの起こりやすいPCR法により構築した V_H ライブラリより作製したファージライブラリを用いて3ラウンドのOS選択を行い、OS-ELISAでスクリーニングした結果、数個の候補クローンの取得に成功している。これらを検討した結果、うち一つ(Glu85Lys変異体)が野生型より高い検出感度を示したことから、このクローンについて詳細な解析を行っている。

興味深いことに、この変異体はファージOS-ELISAにおいてE2の検出能が向上するのみならず、E2の3位のみが異なる異性体である男性ホルモンtestosterone (TS)をはじめ他のステロイドに対する交差反応性が顕著に低下したクローンであることを見出している。この結果は大腸菌マルトース結合蛋白MBP融合 V_H/V_L を用いたOS-ELISAにおいても再現され、さらに同様の結果が一本鎖抗体(scFv)提示ファージならびに

MBP-scFvを用いた競合ELISAでも得られたと述べている。この原因を探るため、類似の電荷変化を伴う変異体Glu85Argを用いた解析を行ったが、若干の交差反応性向上は見られたものの検出感度はむしろ低下するという結果を得ている。これらの結果を総合して、Glu85Lys変異体の感度と特異性向上は、変異に伴う電荷変化が原因ではなく、V_H断片が変異によって安定化したため実現した可能性があると考えられている。

第3章では、前章で得られたOS選択法をより発展させ、より多様性を高めたライブラリから各種ステロイドに結合する抗体断片を得る試みについて述べられている。具体的には抗E2抗体V_Hの3つの相補性決定領域CDRのアミノ酸配列をSidhuらにより報告されている(Tyr/Ser)残基によりランダム化し、これをファージ提示したライブラリから5種類のステロイドを抗原として前章と同様3ラウンドのOS選択を行い、結合能が向上したクローンの濃縮に成功したと述べている。

第4章では、第2章の結果の考察を深め、さらに検出能を向上させるための網羅的なアミノ酸変異導入とその結果について述べられている。具体的には、第2章で見られた85位に加え、別の変異体で見られた63位にも網羅的にアミノ酸変異を導入し、それぞれの変異の影響を検討している。さらに、両者を同時に変異させたライブラリをOS選択に用いることで、更なる検出感度向上のための変異体の取得を試みた実験結果について述べられている。

第5章では研究全体の総括と、今後の展望が述べられている。

以上、本論文は、抗原キャリア複合体を用いない新規ファージ選択法による、ハプテン認識抗体の性能向上に成功し、さらに安定化した抗体断片を選択することで結果的にこれらの抗体の特異性を向上できる可能性を示したものであり、その成果はケミカルバイオエンジニアリング分野、特に汎用分子認識素子である抗体の蛋白質工学、ならびにこれを用いた分析化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。