

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※ 甲	第 10589 号
------	-----	-----------

氏 名 杉田 智哉

論文題目

Antibody Binding Peptides and its Applications to Antibody Purification and Homogeneous Detection

(抗体結合ペプチドの探索と抗体精製及びホモジニアス検出への応用)

論文審査担当者

主査	名古屋大学	教授	本多 裕之
委員	名古屋大学	教授	堀 克敏
委員	名古屋大学	教授	中野 秀雄
委員	名古屋大学	准教授	大河内 美奈

論文審査の結果の要旨

杉田智哉君提出の論文、“Antibody Binding Peptides and its Applications to Antibody Purification and Homogeneous Detection (抗体結合ペプチドの探索と抗体精製及びホモジニアス検出への応用)”は、ペプチドアレイを用いて抗体を認識するペプチド配列を探索し、それを抗体精製用リガンドとして、また抗体検出用プローブとして応用したものである。本論文は、抗体結合ペプチドの探索と抗体精製を行った2章、ホモジニアス抗体検出へのプローブ開発に関する研究をまとめた3~4章、そして序章と結言を加えた合計5章から構成されている。

第1章では、本論文の研究背景を述べており、抗体を認識するペプチドの応用例と現状の問題点を概説し、本研究の着想にいたった経緯と本論文の目的を示した。

第2章では、Protein Aに替わる新規リガンドの開発を目的とし、IgGに対して高結合性を有するペプチドの探索とそのペプチドのIgG精製用リガンドとしての有用性を評価した。IgG-Fc gamma Receptorの細胞外ドメイン配列を切り出したペプチドライブラリを元に、3ステップのスクリーニングを実施することで、IgGのFc領域に高結合する2種類のペプチド配列(NKFRGKYK, NARKFYKG)の取得に成功した。この2種類のペプチドのIgG精製能評価を実施し、IgGの選択的な吸着とpH4.0の酢酸緩衝液による回収に成功し、これらのペプチドがIgGの精製用リガンドとして有用であることを示した。

第3章では、IgG抗体をホモジニアスに検出する系の開発を目的とし、第2章で得られた蛍光ラベル化IgG結合ペプチド(Atto655-NKFRGKYK)に、相補的に結合することで消光を誘導する相補クエンチペプチド(WWWG-DIAVEWES)をデザインし、その2分子を用いたホモジニアス抗体検出系を構築した。この検出系では、IgG非存在下ではペプチド同士(Atto655-NKFRGKYKとWWWG-DIAVEWES)が結合することによって蛍光分子とクエンチャーが近接するため消光する一方で、IgG存在下ではそのペプチド間の相互作用が阻害されるため蛍光を発する。その結果、10分で10nMからのホモジニアス抗体検出が可能であることを示した。

第4章では、第3章同様にIgGのホモジニアス検出を目的とし、第2章で得られたNKFRGKYKと第3章で得られた相補ペプチド(DIAVEWES)を一分子として合成したペプチドビーコンを開発した。N末端とC末端に、それぞれAtto655とトリプトファンを付加させることで、抗体非存在下ではモレキュラービーコンの様に閉じた構造で消光し、抗体存在下では開いた構造をとり蛍光を発するペプチドビーコン(Atto655-NKFRGKYK-(GGS)2-DIAVEWEW-GWWWW)の開発に成功した。このペプチドビーコンを用いて、pH3.0の溶液中にて抗体を検出することができ、50nMからの検出に成功した。

このように、本論文では、抗体をターゲットとし、抗体精製用ペプチドリガンドの開発と簡易で迅速な抗体検出用ペプチドプローブの開発を行った。探索したペプチドリガンド、設計したペプチドプローブは、これまでにない利便性があり、特に、ペプチドビーコンは、今後の簡易・迅速診断ツールとして大いに期待できるものである。この成果は機能性ペプチドの新たな展開を示しただけでなく、ペプチド-ペプチド間相互作用に関する学術的に重要な知見を得ることに成功しており、学術上工業上寄与するところが極めて大きい。よって、本論文提出者、杉田智哉君は博士(工学)の学位を受けるのに十分な資格があるものと判定する。