

学位論文の要旨

氏名

清瀬 紀彦

学位論文題目

VHH抗体の抗体工学によるレジオネラ検出系の開発研究

本論文は、次世代抗体として注目されているラクダ科動物重鎖抗体由来のアルパカVHH抗体の診断薬等での産業応用を目的とし、モデル抗原であるレジオネラのアルパカへの免疫と免疫VHHファージライブラリの構築、レジオネラ特異的VHHクローンの単離、性状解析、さらに化学修飾抗体工学による多価化VHHを用いたレジオネラ検出アッセイの構築と高感度化手法をまとめたものである。

第1章は、研究背景を述べており、次世代抗体として注目されているラクダ科動物の持つ重鎖抗体の抗原結合ドメイン由来のVHH抗体の特徴とVHH抗体を取得するための方法であるファージライブラリの概要、モデル抗原として使用したレジオネラについて記載した。

第2章は、アルパカVHH免疫ライブラリの構築とそこから得られるVHH抗体の評価を行った。モデル抗原（レジオネラ菌体）のアルパカへの免疫を行い、免疫後のアルパカの末梢血リンパ球を用い、アルパカVHH免疫ファージライブラリを構築した。このライブラリから、VHH抗体の単離手法であるバイオパンニングによって、このレジオネラに対して特異的に結合するVHH抗体の単離を行い、その性状解析を行った。

第3章は、第2章で得られたVHH抗体について、2つの手法にてアッセイの高感度化へ向けた抗体工学を行った。1つ目の方法が、遺伝子工学を用いて、VHH抗体をリンカーで連結した2量体化であり、2つ目が、VHH抗体のC末端にシステイン残基を導入し、システイン残基を用いてVHH抗体を配向制御した状態でキャリアタンパク質とコンジュゲーションさせる多量体化法である。作製した各フォーマットのVHH抗体について、抗原との結合活性などの性状解析を行った。

第4章は、第2・3章で作製した各VHH抗体を用いてレジオネラ抗原検出に向けたELISA、イムノクロマト、ラテックス凝集検出法の構築について検討した。これら3つの検出アッセイにおける測定条件を、検出感度の向上に向け最適化した。最終的に、多量体化したVHHコンジュゲートを用いて、ラテックス凝集系による高感度化されたレジオネラの検出システムの開発に成功した。

第5章は、診断薬等での産業応用を目指したアルパカVHH抗体の応用の方法論についてまとめ、本論文を総括した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Development of immunoassay for Legionella through antibody engineering of VHH antibody

Name: Norihiko Kiyose

This thesis mainly aimed at the industrial applications of alpaca VHH antibodies expected as next generation antibody. Especially, this paper comprised the constructions of VHH phage libraries from alpaca immunized with Legionella, the isolations and characterizations of Legionella-specific VHH clones and the development of a highly sensitive detection method of Legionella using chemically modified and engineered/multimerized VHH.

Chapter 1 describes the research background including the characteristics of an antigen binding domain VHH derived from the heavy chain antibodies of camelid species, an overview of the phage library technique employed for constructing VHH antibodies, and also a bacteria Legionella used as a pathogenic antigen.

Chapter 2 described the construction and evaluation of alpaca VHH immune library. The VHH phage library was constructed from the blood of animals immunized with antigen. From the library, the specific VHH clones were isolated by biopanning method, and their basic properties were characterized.

Chapter 3 describes the antibody engineering of VHHs obtained in Chapter 2 and their chemical modification for implementation into detection system. Using genetic engineering, VHH antibodies are connected with a linker peptide forming the dimerized VHH to enhance the apparent affinity. VHH was mutated with Cys at the C terminal region to conjugate with the carrier protein (BSA or KLH) in an orientation-controlled fashion. The generated conjugation was analyzed for the optimized use of assay.

In Chapter 4, the construction of detection system for Legionella and its sensitivity evaluation were described in ELISA, immunochromatography and latex aggregation assays. In three detection systems, the measurement conditions were optimized to enhance sensitivity in detection. Finally, the highly sensitive detection system for Legionella bacteria was successfully developed in latex aggregation assays using engineered multimeric VHHs.

In Chapter 5, the results of this study were summarized and discussed for usefulness of VHH in diagnostic applications.