

学力確認結果の要旨

報告番号	理工論 第82号		氏名	清瀬 紀彦
審査委員	主査	伊東 祐二		
	副査	隅田 泰生	新留 康郎	
		有馬 一成		
<p>学力の確認は、以下の要領で博士論文の発表会を行い、研究発表内容の質、発表状況、質疑応答の内容を総合的に審査した。博士論文の発表会は、令和5年8月9日の14時00分より鹿児島大学理学部2号館214号室にて開催され、30分の博士論文内容の発表後、約30分間の諮問を含む質疑応答が行われた。具体的な質疑応答の内容の一部を以下に示す。これらの審査委員からの質疑に対して満足すべき回答が得られた。</p> <p>質問1: バイオパンニングで1ラウンドから2ラウンドでライブラリの反応性が急に上がっているが、このような回数での増幅が一般的か。 回答1: 使用する抗原の種類やアルパカの免疫誘導の状況、抗体ライブラリの質等によって、特異的ファージの濃縮が1回のパンニングで十分か、複数回のパンニングが必要となるか変わってくる。</p> <p>質問2: 1種類の抗体で抗原をサンドイッチELISAで検出できている点について、説明をいただきたい。 回答2: 通常、サンドイッチELISAを行うためには、2種類の異なる抗原（エピトープ）を認識する抗体が必要である。しかし、今回の抗原は菌体であり、その表面には、VIII抗体認識する抗原が多数存在すると考えられる。そのため、同じエピトープを認識する抗体を使っても、菌体の上下で挟み込むことによって、サンドイッチELISAでの検出が可能となっていると考えている。</p> <p>質問3: 取得したVIII抗体のターゲットについての情報は無いのか。 回答3: 可溶化した菌体抗原のウェスタンブロッティングの結果では、単離した2つのVHHのうちEnv9については40kDa付近のタンパク質を認識している結果が得られたが、それ以上の解析は進めていない。</p> <p>質問4: ウェスタンブロッティングで検出された抗原の構造情報を使って、抗原の同定は可能ではないのか。 回答4: すでに、レジオネラ菌のゲノム解析は完了しており、抗原候補タンパク質のプロテアーゼ消化・LC-MS・Mascot解析によって抗原の同定は可能と考えられるが、今回は行っていない。</p> <p>質問5: イムノクロマトでコントロールラインが薄い理由として、金コロイド上のVHH量が少ない事を原因として挙げているが、それであればテストラインも出ないのではないか。 回答5: 抗原であるタンパク質は菌体表面上に複数存在するため、金コロイド上にVHH抗体が1分子でも固定されていれば、テストラインでは、金コロイドの集積によりラインが出るが、コントロールラインでは、抗VIIIウサギ抗体による金コロイド上のVIII抗体の認識に依存した集積による検出なので、金コロイド上でのVIII抗体量が少ない場合、結合できずにラインが出ない可能性を考えている。</p> <p>質問6: 市販品のラテックス試薬は特異性・感度に何か問題があるか。 回答6: 環境測定用として問題なく使用できるものである。今回は、市販品で使用しているウサギポリクローナル抗体の試薬と、同等もしくはそれ以上の感度の試薬をVIII抗体で実現可能かの検証を行った。</p> <p>質問7: 今回得られた2つのVHHクローンEnv9とEnv21のそれぞれのホモダイマーを作製しているが、ヘテロダイマーでの結合反応性の試験を行ってみたら感度が上がるのではないか。 回答7: ヘテロな組合せについても実施したが、結果は変わらなかった。おそらく認識している抗原が同じ、もしくは菌体表面上の立体的に近いところにあるため、ヘテロダイマーで効果がなかったと考えている。抗原の異なるVHHクローンの組合せのダイマーを使えば更なる高感度化が望めたかもしれない。</p> <p>なお、語学力については、専門に関する学術論文の英文和訳の課題を与え、適切な和訳がなされていることを確認した。よって、審査委員会は、申請者が博士（理学）の学位を与えるに十分な学力と見識を有するものと判定した。</p>				