

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	高性能な蛍光免疫センサー構築のための探索手法と分子設計基盤の確立
Title(English)	
著者(和文)	井上 暁人
Author(English)	Akihito Inoue
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12773号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:北口 哲也,丸山 厚,西山 伸宏,門之園 哲哉,中田 和秀
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12773号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命工学 ライフエンジニアリング	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	井上 暁人		審査員主査： Chief Examiner	北口 哲也	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

<p>本論文は「高性能な蛍光免疫センサー構築のための探索手法と分子設計基盤の確立」と題し、日本語で書かれ、7章より構成されている。</p> <p>第一章「序文」では、微量な物質の特異的な検出を得意とする免疫測定法について、その開発に必要な抗体の作製方法と測定原理の分類について概説した。免疫測定法は使用するエピトープの数によってサンドイッチ法 (非競合法)と競合法に分けられ、洗浄操作が必要か否かによって、ヘテロジニアス法とホモジニアス法に分けられる。Quenchbody (Q-body) は非競合-ホモジニアス法に位置づけられるため、標的物質を迅速かつ簡便に測定することができ、低分子であっても高感度に検出できる画期的な免疫測定法である。Q-body法は多くの抗体の配列中に保存された Trp 残基によるクエンチに由来しており、これまでに 20 を超える成功例が示されている。しかし実際には実用的な蛍光応答を示す Q-body を構築することは容易ではなく、既存の Q-body 構築法では適した抗体の探索に多大な時間と手間を要することを述べた。</p> <p>第二章「酵母表層系を用いた Q-body スクリーニング法の開発」では、抗体の Q-body としての機能をハイスループットに評価する新たな探索手法の開発について述べた。まず酵母表層提示系とコイルドコイル形成ペプチドを組み合わせて、酵母表層で構築することを志し、抗がん剤メトトレキサート (MTX) を認識するナノ抗体で蛍光応答を評価することに成功した。さらにヒト血清アルブミン(HSA) を認識するナノ抗体群をモデルとして、このスクリーニング法を応用した結果、有望な抗体の選択に成功し、さらに大腸菌で発現精製した場合にも機能することを確かめた。最後に酵母表層と大腸菌で発現精製した場合での蛍光応答の差異に着目し、その原因を調べた結果、酵母表層を模倣したビーズ上において、酵母表層と同様の蛍光応答の向上が見られることを発見した。</p> <p>第三章「Trp 変異ライブラリによる Q-body 用抗体の改変」では、Trp 残基の数を増やしたコンビナトリアルライブラリ (Trp 変異ライブラリ) からの Q-body に適した抗体の選択について述べた。CDR 領域に対して部位特異的に Trp 残基の数を増やし、クエンチ能によるスクリーニングを行うことで最適な Trp 変異の組み合わせを探索した結果、2 種類のナノ抗体でクエンチ能を向上させる Trp 変異の組み合わせを発見した。さらに C 末端に同じ抗原に対する別のナノ抗体を融合したタンデムナノ抗体によって親和性を補填し、Q-body としての機能を最大化する設計指針の知見を得た。</p> <p>第四章「機械学習を用いたクエンチ能予測モデルの構築」では、機械学習を用いて、<i>in silico</i> で抗体のクエンチ能を予測する分類器を作成し、より効率的かつ効果的な抗体配列の改変について述べた。まず学習用のデータセットを作成するため、ナノ抗体の人工ライブラリから、クエンチ能を示す抗体を選別した。続いてタンパク質言語モデルを用いることで、クエンチ能と抗体のアミノ酸配列の関係を機械学習し、クエンチ能を予測する分類器を作成することに成功した。さらに <i>in silico</i> で Trp スキャニングおよび一飽和変異の効果予測し、それに基づいて、変異導入を行うことで、SARS-CoV-2 を認識する 2 種類の Q-body のクエンチ能を向上させた。このうち抗原結合能を維持した変異体については蛍光応答も向上させることに成功した。</p> <p>第五章「多量体化によるクエンチ現象の解析と応用」では、第二章において発見した酵母表層におけるクエンチのメカニズムについてのより詳細な解析に基づいた、抗体の配列に依存しない Q-body の構築について述べた。まず酵母表層を模倣したいくつかの多量体化状態を比較することで、二量体の状態が最も蛍光応答が向上することを突き止めた。さらに二量体化によるクエンチ現象は酵母表層と相関があることがわかり、二量体化による蛍光応答の向上に重要なアミノ酸を同定することに成功した。最後に他のナノ抗体にも応用できるようにリンカー長や色素の種類を検討することで、もともと蛍光応答を示さなかったがん細胞表面の抗原を認識する Q-body の蛍光応答を向上させることに成功した。</p> <p>第六章「In vivo 連続分子進化による迅速なクエンチ能の進化」では、より多様な配列空間を探索できる、<i>in vivo</i> 連続分子進化への応用について述べた。まず酵母細胞内で抗体配列にランダム変異が導入される酵母表層でも、MTX を認識する Q-body の蛍光応答を評価できることを確認した。次に、元々クエンチを示さなかった 4 つのナノ抗体でクエンチ能の分子進化を実施したところ、Tyr 残基が Cys 残基に変わる変異が濃縮され、Q-body の <i>in vivo</i> 連続分子進化が可能であることを証明した。さらに濃縮された変異体は二量体化することでクエンチ能を向上させ、N 末端と新たに導入された Cys 残基に蛍光色素を修飾してダブルラベル化することで 4 倍近い蛍光応答へと向上させた。</p> <p>第七章「結論」においては各章で得られた結果を総括するとともに、今後の展望について述べた。</p> <p>以上、本論文では Q-body 用抗体の探索手法を開発し、半合理的な分子設計より、あらゆる Q-body の蛍光応答を向上させることができるようになった。</p>
--

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： 生命理工学 系
Department of Graduate major in ライフエンジニアリング コース
学生氏名： 井上暁人
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of
審査員主査： 北口哲也
Chief Examiner

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Quenchbody (Q-body) is an antibody-based fluorescence biosensor for detecting various molecules ranging from protein to small hapten by just mixing with sample. However, to achieve the practical sensitivity, the suitable antibody has to be explored, which is time-consuming and labor-intensive for two reasons. Firstly, conventional method for Q-body construction is low throughput. Secondly, there is no guarantee that the suitable antibody will always be found.

To overcome these problems, the original screening method for Q-body was developed. When Q-body was constructed on yeast surface by N-terminal labeling using coiled-coil forming peptide, an antibody suitable for Q-body was successfully selected based on quenching and de-quenching from a small nanobody library. I confirmed that these antibodies work as Q-body when constructed from purified protein produced in *E. coli* using the conventional method. I next developed the method of antibody engineering for constructing a highly responsive Q-body.

Firstly, a combinatorial library containing site-specific Trp mutations in the CDR region of the antibody was generated, and the best combination of Trp residues was explored. After the screening based on quenching, several Trp combinations with deeper quenching were found.

Secondly, the model to predict effective mutation on quenching was developed by learning the relationship between quenching and antibody sequence. Then, the quenching of two anti-SARS-CoV-2 nanobodies was improved by introducing the predicted mutation. Among the quenching mutants, some mutants with comparable antigen binding activity to wild-type exhibited the improvement of fluorescence response.

Thirdly, the quenching mechanism by multimerization was explored by comparing the dimer, trimer, and tetramer of Q-bodies. I found that the dimer shows the deepest quenching. Then, two anti-cancer antibodies with little response were successfully converted to Q-body by dimerization.

Finally, directed evolution for improving quenching was performed by autonomous hypermutation yeast surface display (AHEAD) to explore extended sequence space. When the evolution was performed using four no-quenching nanobodies, one of them showed remarkable enrichment of Cys mutation, and the mutants were found to improve the quenching by dimerization.

These results create a path toward the semi-rational design of practical Q-body which enables rapid diagnosis in a wide range of fields.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).