

論文 / 著書情報

Article / Book Information

|                   |                                                                                                                                                                                               |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 題目(和文)            | 抗体結合タンパク質を利用した抗体を高性能蛍光センサに変換する手法の開発                                                                                                                                                           |
| Title(English)    |                                                                                                                                                                                               |
| 著者(和文)            | 笹本佳那                                                                                                                                                                                          |
| Author(English)   | Kana Sasamoto                                                                                                                                                                                 |
| 出典(和文)            | 学位:博士(工学),<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第12774,<br>授与年月日:2024年3月26日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:北口 哲也,小畠 英理,田中 寛,岡田 智,田中 祐圭                                                                          |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Engineering),<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第12774,<br>Conferred date:2024/3/26,<br>Degree Type:Course doctor,<br>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：<br>Department of Graduate major in | 生命理工学<br>ライフエンジニアリング<br>コース | 申請学位（専攻分野）：<br>Academic Degree Requested | 博士<br>Doctor of （工学） |
| 学生氏名：<br>Student's Name                   | 笹本 佳那                       | 審査員主査：<br>Chief Examiner                 | 北口 哲也                |

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>免疫測定法とは抗体抗原反応を利用した高い特異性を持つ検出法で、臨床診断・環境分析など広範な分野で用いられている。現在用いられている手法として、酵素反応を利用して検出する ELISA やキャピラリー効果を利用して検出するイムノクロマト法などが知られているが、これらの手法は迅速さと感度の両立が難しかった。そうした背景のもと、当研究室では Quenchbody (Q-body) と呼ばれる蛍光センサが開発された。Q-body は抗体の N 末端を蛍光標識することで構築され、抗原濃度依存的な蛍光応答を示す。洗浄操作がいらないことが特徴で迅速さと感度を両立できるため、従来の免疫測定法に成り代わる手法として期待されている。一方で構築に遺伝子操作が必要であるため、今まで Q-body に適用された抗体は可変領域の配列が既知であるものにほぼ限定されていた。この課題を解決するために当研究室では、PM Quenchprobe (PM Q-probe) が開発された。PM Q-probe はあらゆる抗体の L 鎖に結合する抗体結合タンパク質 Protein M (PM) の C 末端を蛍光標識することで構築される。PM Q-probe は抗体を混合するだけでその抗体自身の遺伝子操作なしに、Q-body 同様の作動原理を持つ蛍光センサに変換できるため、配列情報がない市販抗体にも適用可能である。一方で抗原に対して十分な応答を示す蛍光センサに変換できない抗体も存在した。先行研究から、蛍光応答の大きさは蛍光色素と Trp 残基の位置関係が関与すると考えられている。よってこの位置関係の調節に相当する PM と蛍光色素間のリンカーの調節が行えれば、抗原検出に十分な応答を示す蛍光センサに変換できる抗体の範囲を拡大できる可能性があると考えられた。しかし、PM-蛍光色素間リンカーを検討するためには、検討したいリンカーの数だけ PM 発現用遺伝子の構築、大腸菌での PM 発現、発現した PM の蛍光色素修飾を行う必要があるため多数のリンカーを検討する場合は多大な時間と労力がかかることが予想された。そこで本研究では強固なヘテロ二量体を形成するペプチドペア E4/K4 に着目し、この課題の解決を目指した。</p> <p>初めに、PM と蛍光色素間のリンカーを効率的に調節できる手法を開発した。C 末端にアミノ酸配列の異なるリンカーを介して E4 ペプチドを融合した PM 数種類と、N 末端に長さの異なるリンカーを介して蛍光色素を付加した K4 ペプチド数種類を混合することで、一度に PM-蛍光色素間リンカーが異なる多種類の PM Q-probe (以後この方法で構築した PM Q-probe は Coiled Q-probe : CQ-probe と呼ぶ) を構築した。この多種類の CQ-probe を用いて全長抗体を含む 4 種類の抗体を蛍光センサに変換したところほとんどの抗体において、最適な組み合わせで構築された CQ-probe と抗体の複合体は、従来の PM Q-probe を用いた場合より抗原に対して高い応答を示した。したがって、CQ-probe による PM-蛍光色素間リンカーの迅速な検討手法は、蛍光センサ化できる抗体の範囲を拡大できる手法として有用であることが示された。</p> <p>一方で多種類にリンカーを検討したにも関わらず、小さい応答しか示さない抗体も存在したことから、抗体によっては蛍光センサに適していない場合があることが示唆された。したがって蛍光センサに適した抗体を迅速に取得できる手法の開発できれば、より多種類の抗原に対応する、CQ-probe/抗体複合体を構築できると考えた。そこで、培養するだけで任意の抗体遺伝子に対して変異を導入することができるニワトリ B 細胞株 DT40 細胞から CQ-probe を用いてセンサに適した抗体を取得する系の構築を目指した。今回はその足掛かりとして個々の細胞で異なる抗体提示量の影響を受けない FRET CQ-probe を構築した。FRET CQ-probe を用いて抗 BGP Fab をセンサ化したところ、抗原に対して応答を示したものの CQ-probe よりやや低い蛍光応答を示した。その原因として E4/K4 ペプチドペアが逆平行結合を形成することによりクエンチできない蛍光色素が存在してしまうことが考えられたため、逆平行結合を抑制するペプチドペア E4(Pa)/K4(Pa) を設計した。C 末端に蛍光標識した K4 (Pa) と PM-E4 (Pa) を用いて構築した CQ-probe、すなわち抗体との複合体形成時に蛍光色素が抗体側と逆向きに蛍光色素が向く設計の CQ-probe への抗体・抗原添加時の蛍光強度を調べたところクエンチ、脱クエンチが生じなくなったことから逆平行が抑制できることが示唆された。</p> <p>本研究で構築した CQ-probe は蛍光応答に重要な蛍光色素と Trp 残基の位置関係を容易に調節できるため PM Q-probe と比較し、より多くの抗体を蛍光センサに変換可能である。さらに CQ-probe を用いて DT40 から蛍光センサに適した抗体を取得する系確立のための足掛かりを得た。よって今後はさまざまな抗原に対して高い応答を示す CQ-probe/抗体複合体を構築できることが期待される。</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：<br>Department of, Graduate major in | 生命理工学<br>ライフエンジニアリング<br>コース | 申請学位（専攻分野）：<br>Academic Degree Requested | 博士<br>Doctor of （工学） |
| 学生氏名：<br>Student's Name                    | 笹本 佳那                       | 審査員主査：<br>Chief Examiner                 | 北口 哲也                |

### 要旨（英文 300 語程度）

Thesis Summary (approx.300 English Words )

PM Q-probe, a fluorescent probe is constructed by fluorescent-labeling the C-terminus of Protein M (PM), an antibody-binding protein, and convert an antibody without genetic manipulation into a fluorescent sensor which show antigen concentration-dependent fluorescent responses. However, not all antibodies are converted into sensors with sufficient fluorescence response. To solve this problem, it was considered to regulate the linkers between Trp residues and fluorophores, which are important for fluorescence response, but it was expected to be time-consuming and labor-intensive, requiring the construction of many plasmids for PM expression.

In this research, I developed a PM Q-probe (CQ-probe) with a coiled-coil peptide pair E4/K4. The CQ-probe consists of PM with E4 and K4 with a fluorophore, and CQ-probe variants with various linkers are easily produced. Optimal linkers were investigated for four different antibodies using multiple CQ-probes, and most of the antibodies were successfully converted to sensors with the PM Q-probe to improve the fluorescence response compared to the PM Q-probe. On the other hand, one of the antibodies with CQ-probe had little fluorescence response to the antigen comparable to that of PM Q-probe, despite the many kinds of linkers examined, suggesting that some antibodies may not be suitable for sensors. Therefore, we examined the construction of a method that obtain antibodies suitable for sensors. Here, we aimed to develop a system to select antibodies from DT40 cells, which can autonomously construct a library of B cells displaying distinct antibodies, using CQ-probe. As a first step, we constructed a FRET CQ-probe that converts an antibody into a ratiometric sensor. The FRET CQ-probe/antibody complex showed a fluorescence ratio change between the two fluorochromes to the antigen, but it was smaller than the fluorescence response of the CQ-probe/antibody complex.. We hypothesized that this was due to the presence of unquenched fluorophores caused by the antiparallel binding of the E4/K4 peptide pair, and constructed a peptide pair that inhibited the antiparallel binding, suggesting inhibition of the antiparallel binding. The CQ-probe was constructed with labeling the C-terminus of K4 (Pa) and PM-E4 (Pa), and no significant change in fluorescence intensity was observed upon addition of antibody/antigen, suggesting inhibition of antiparallel binding.

This research succeeded in expanding the range of antibodies for which the PM Q-probe method of converting antibodies into sensors and obtained a foothold for establishing a system for acquiring antibodies suitable for sensors.

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).