

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	高性能な蛍光・発光免疫センサー創出のための分子設計とその解析
Title(English)	
著者(和文)	安田貴信
Author(English)	Takanobu Yasuda
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11822号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上田 宏,中村 浩之,小島 英理,柳田 保子,小倉 俊一郎,北口 哲也
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11822号, Conferred date:2022/3/26, 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	生命理工学 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 (工学) Doctor of (Engineering)
学生氏名： Student's Name	安田 貴信 Takanobu Yasuda		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	上田 宏 Hiroshi Ueda
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	北口 哲也 Tetsuya Kitaguchi

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は「高性能な蛍光・発光免疫センサー創出のための分子設計とその解析」と題し、日本語で書かれ、6章より構成されている。

第一章「序論」では、抗体を用いた試料中の微量物質の検出法である免疫測定法について概説し、タンパク質などの高分子抗原に対してはサンドイッチ法の適用により高感度測定が可能な一方、低分子抗原の高感度検出は難しいことを述べた。その点、部位特異的蛍光標識抗体 **Quenchbody (Q-body)** は、検体と混合するだけで標的抗原を高分子・低分子問わず迅速かつ簡便に検出可能であり、新たな免疫測定法のコア技術となりうると期待される。一方、現状の **Q-body** の問題として、構築に手間と時間がかかること、測定に励起光照射が必須であること、抗体中の **Trp** 残基による蛍光クエンチが起きる抗体と色素の組み合わせが必要な事などについて指摘した。

第二章「コイルドコイル形成ペプチドを用いた抗体断片の迅速バイオセンサー化」では、リンカー長調節や色素の選択といった **Q-body** の応答向上に必要な検討の効率化を指向した、組換え抗体断片の迅速 **Q-body** 化法の開発について述べた。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、抗原として **BGP (bone Gla protein)** を認識する **E4** 融合 **Fab** 断片と蛍光標識 **K4** ペプチドを調製して両者を混合したところ、1 工程 10 分以内に **Q-body** が得られることが見出され、こうして作製される **Q-body** を **Coiled Q-body (CQ-body)** と命名した。本法は、これまで用いられてきた **Q-body** 調製法と比較して迅速でかつ、色素修飾後の精製操作が不要であるためサンプルロスがないことも特徴である。さらに **Donor** として **Fluorescein** を **N** 末端に、**Acceptor** として **TAMRA** を **C** 末端に導入した二色標識 **K4** ペプチドを用いることで、**FRET** 型 **CQ-body** を構築した所、抗原依存的な **FRET** 効率上昇により蛍光応答が向上することも明らかにした。またこの **CQ-body** 構築法は、抗がん剤メトトレキサート認識重鎖抗体断片 **V_{HH}** にも適用可能であり、汎用性が高い手法であると言える。

第三章「発光酵素の融合による生物発光共鳴エネルギー移動 **BRET** に基づく **Q-body** の応答性向上」では、以前に報告された外部励起光を必要としない発光酵素 **Nluc** 融合クエンチ抗体 **BRET Q-body** において、通常の **Q-body** より抗原応答が向上するメカニズムの理解を目的とした検討について述べた。色素とリンカー長の異なる計 15 種類の **BRET Q-body** 変異体を用いて検討した所、色素として **TAMRA** が最も抗原結合による **BRET** 効率変化を受けやすいこと、発光酵素 **Nluc** と **TAMRA** の間のリンカー長はいずれの長さでも一定以上応答が向上することを明らかにした。また、検討中に一本鎖抗体 **scFv** の二量体形成が要因と思われる **TAMRA** の **H-dimer** 形成量が抗原の有無で変化する現象が観察され、蛍光応答向上への応用の可能性が示唆された。

第四章「蛍光偏光法を用いた高速かつ高精度な抗原検出法」では、蛍光消光が起こらない抗体と色素の組み合わせにおいても、抗原の抗体への結合を色素の運動性の変化として検出できれば、多くの抗体を疑似的に **Q-body** として活用できる可能性があると考え、**Q-body** における抗原依存的な蛍光色素の運動性の変化に基づく抗原検出法の確立を目指した。すでに抗原依存的な運動性増大が報告されている **TAMRA** に加え、**BDP-TMR** を用いて検討した所、**BDP-TMR** 標識 **Q-body** においてより顕著な蛍光異方性変化が観察された。今後、より多くの抗体と同様の現象が認められれば、汎用的な原理として免疫センサー構築に応用しうると考える。

第五章「**NMR** による新規免疫センサー **Hibody** の抗原結合に伴う発光活性増大機構の解明」では、**N** 末端に **Q-body** の色素の代わりに融合する事で抗体断片をセンサー化可能なタグ配列 **HiBiT** を利用した **HiBiT** 融合抗体断片 **Hibody** の抗原依存的な発光活性増大機構の解明を目的とし、**NMR** 法を用いた **BGP** 認識 **Hibody** の抗原結合に伴う動態変化の解析について記した。結果として、**HiBiT** タグは抗原不在時には **scFv** の **V_H**, **V_L** 界面に取り込まれており、抗原結合に伴って抗体外に放出されることが明らかにされた。今後、様々な抗体を高い応答を示す **Hibody** とするにあたり、本章で得られた知見は **HiBiT** タグと抗体の具体的な相互作用部位を明らかにする際の足掛かりになると期待される。また、凝集の起こしやすさから取り扱いが難しい **Hibody** について、**NMR** 試料の調製方法を確立したことも成果の一つと言える。

第六章「結論」においては各章で得られた結果を総括すると共に、今後の展望について述べた。

以上、本論文では組換え抗体断片を迅速に免疫センサー化する手法の開発に成功するとともに、これまで報告のあった原理・現象についての解析から実用的な **Q-body** を創出する上で基盤となる知見を得た。

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。

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。

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース : Department of, Graduate major in	生命理工学 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 (工学) Doctor of (Engineering)
学生氏名 : Student's Name	安田 貴信 Takanobu Yasuda		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	上田 宏 Hiroshi Ueda
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)	北口 哲也 Tetsuya Kitaguchi

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Quenchbody (Q-body) is an antibody-based fluorescence biosensor that can rapidly and easily detect various targets such as protein, virus, and small molecules by just mixing with sample. However, in conventional Q-body, there are some challenges to expanding a practical tool. First, construction of the Q-body is time consuming. Second, excitation light is necessary for the Q-body assay. Third, the fluorescence of dye has to be quenched by intrinsic Tryptophan (Trp) of the antibody.

To overcome these limitations, in chapter 2, rapid and efficient method for fabrication of Q-body was developed. Anti-BGP (bone Gla protein) Fab fragment and anti-methotrexate V_{HH} were converted to Q-body by 1 step within 10 min using stable coiled-coil peptide pair E4/K4. Also, FRET type Q-body which led to precise target detection was obtained from E4-tagged antibody fragments using dual-color K4.

In chapter 3, regarding previously reported novel immunosensor BRET Q-body which fused luciferase enzyme (NanoLuc, Nluc) to the Q-body as a BRET (bioluminescence resonance energy transfer) donor and work without an external light source, it was revealed that TAMRA was suitable fluorescent dye for the BRET Q-body. In addition, tolerance of linker length between Nluc and TAMRA for improving antigen response was also clarified.

In chapter 4, as a detection mean of antigen-antibody interaction using Q-body, taking advantage of fluorescence polarization was proposed. A notable fluorescence anisotropy change upon antigen binding for BDP-TMR labeled Q-body was observed.

In chapter 5, about Hibody which fused HiBiT-tag (a part of the Nluc) instead of fluorescent dye to the antibody fragment, the mechanism of luminescence augmentation upon antigen binding was elucidated by NMR. A possibility of constructing pseudo-Q-body that working mechanism is independent Trp was suggested.

These results create a path toward design and generating practical Q-body which enable 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 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).