

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14468

研究課題名（和文）蛍光免疫センサータンパク質の感度を短期間で向上させるための汎用ツールキットの開発

研究課題名（英文）Development of a generalizable toolkit for rapidly improving the sensitivity of fluorescent immunosensor proteins

研究代表者

朱 博（Zhu, Bo）

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：70886605

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、Quenchbodyの性能を迅速に向上させるためのツールキットを開発しました。このツールキットには、分子ディスプレイを用いた超高速スクリーニングシステム（uHTS）、Quenchbodyの検出限界を向上させるための切断可能な蛍光色素リンカー設計、およびクラウディング剤を含む反応バッファーが含まれています。このツールキットを使用して、SARS-CoV-2 Quenchbodyを含む複数のバイオセンサーが最適化され、実用的な性能に達しました。特に、このuHTSは、Quenchbodyなど抗体複合体の開発プロセスを革新し、緊急事態において迅速にバイオセンサーを開発することを可能にします。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオセンサーおよび関連する均一系イムノアッセイは、診断や食品安全の分野において、ターゲットバイオ分子の迅速かつ高感度な検出において極めて重要な役割を果たしています。本研究では、Quenchbodyバイオセンサーの迅速な設計と開発のためのツールキットを開発しました。このツールキットは、従来の手法に比べて設計および最適化プロセスを大幅に効率化し、短時間でバイオセンサーを作成することを可能にします。これにより、将来的にパンデミックなどの緊急事態に迅速かつ効果的に対応できる社会の実現に寄与することが期待されます。

研究成果の概要（英文）：In this project, a toolkit for rapidly improving the performance of Quenchbody biosensors has been developed. It includes a biomolecular display-based ultra-high-throughput screening system, a cleavable fluorophore linker design for increasing the detection limit of the biosensor, and a reaction buffer with optimized crowding agents. Several Quenchbody biosensors, including the SARS-CoV-2 N protein biosensor, were optimized using this toolkit and rapidly reached a performance level suitable for the detection of analytes in practical applications. This toolkit, especially the uHTS screening method, will change the development process of Quenchbody biosensors or similar antibody conjugates, allowing the creation of biosensors in a timely manner under emergency circumstances in the future.

研究分野：高速分子進化

キーワード：biosensor uHTS quenchbody mRNA display phage display

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1 . 研究開始当初の背景

Immunoassay is an important approach for the detection of pathogens and small molecules, such as drugs, peptides, hormones, food additives, etc., in clinical diagnostics, food and environmental safety control, and research fields. Quenchbody (Q-body) was invented through the linking of a fluorescent dye to the engineered antibodies, e.g., scFv (J Am Chem Soc, 2011, 133, 17386-94). The linked fluorescent dye will be quenched by the Trp residues nearby and illuminates after ligand binding-triggered conformational change. This type of fluorescent immunosensor allows rapid and simplified detection of targets, which makes the development of on-site and low-cost assays possible.

Same as most antibody-based detection methods, the Q-body responds to the target in a one-to-one manner. Therefore, the sensitivity of the Q-body is limited by the kinetics feature of its parental antibody. Due to this limit, when the sensitivity is not enough for practical application, the parental antibody needs to be replaced, which is not always available in a short time. The Q-body has the potential to be tuned to a linker-cleavable type through the cleavage of fluorophore linker by helper protease after the ligand-binding triggered conformational change. This match-candle model could improve the sensitivity by introducing the turnover to the Q-body-based immunoassay. Another limit of the Q-body development is the low-throughput design and optimization process, which reduced the efficiency of the biosensor development under emergency circumstances.

2 . 研究の目的

In this research, the applicant planned to develop a toolkit for rapidly improving the sensitivity and or performance of a Q-body. In detail, the toolkit contains the following three parts: (1) A mRNA display or phage display-based ultra-high-throughput screening (uHTS) system for rapidly fine-tuning the fluorophore-linker and antibody framework, improving the response, and even directly screening of parental antibody suitable for Q-body conversion; (2) cleavable-fluorophore linker designs for improving the sensitivity of the Q-bodies; (3) the reaction buffer with crowding agents for improving the speed and sensitivity of the response. This toolkit will be applied to SARS-CoV2 N protein Q-body, S protein Q-body and thyroxine (T4) Q-body (thyroid function biomarker) to improve their feasibility in practical applications.

3 . 研究の方法

- (1) Establish the mRNA and phage display system for displaying the functional Q-body for selection
- (2) Generate the Q-body libraries and select using the established screening system
- (3) Rational design of the fluorophore linker cleavable Q-body and evaluate the sensitivity changes
- (4) Investigation of the effect of the crowding agents on the response speed of the Q-body
- (5) Verify the uHTS screening method on the T4 Q-body development

4 . 研究成果

- (1) Display functional Q-body on mRNA and M13 phage

The functional display of Q-body on mRNA or M13 phage is the first and most critical step during the establishment of the uHTS for Q-body. The scFv of the KTM219 anti-BGP antibody was successfully displayed on mRNA and M13 phage with binding activity, and the Q-body function was confirmed after the TAMRA fluorophore labeling. The displayed wild-type BGP Q-



Fig. 1. Phage-displayed BGP Q-body after TAMRA labeling.

body (Fig. 1) showed a 4-fold response which is comparable to the free BGP-Q-body.

(2) Selection of the BGP Q-body library using the uHTS

The linker library was constructed and selected using phage display-based uHTS. Through 2 rounds of selection, the overall response of the library was increased. The DNA pools of the round 2 and round 0 outputs were analyzed by next-generation sequencing. One of the top enriched variants showed around a 10-fold response, which was for the first time achieved for scFv type Q-body. This result confirmed the feasibility of using the established uHTS for rapid and effective Q-body development.

(3) Rational design of the cleavable linker for BGP Q-body

The Fxa protease cleavage site was inserted into the fluorophore linker of the Q-body. Several locations and the surrounding sequences have been tested to find the best design for improving the sensitivity of the BGP Q-body. One of the variants could reduce the detection limit of the BGP Q-body to less than 0.5 nM, which was 2-3 nM for conventional Q-body without detection turnover. This design has been applied to create other switch-type antibody conjugates for broader applications than biosensing. The paper and patent about the above content are under preparation.

(4) Development of SARS-CoV-2 Q-bodies and the performance improvement by the crowding agent

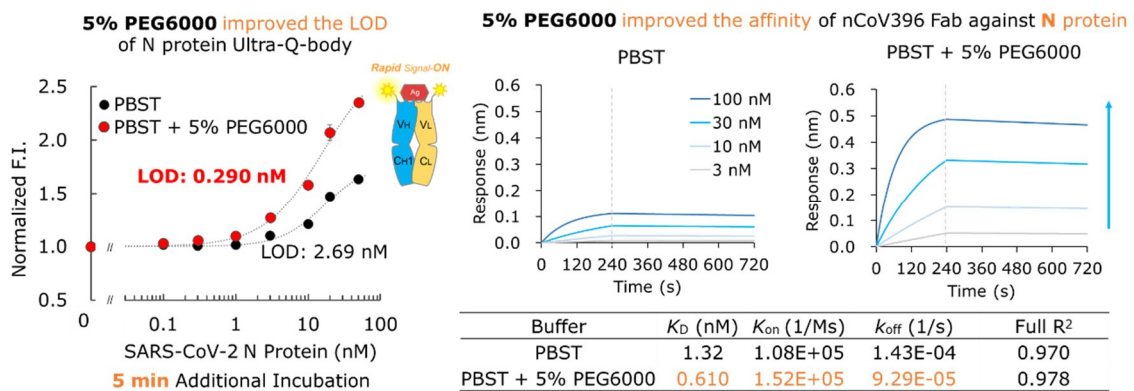


Fig. 2. Dose-dependency of the SARS-CoV-2 N protein Q-body and the performance improvement with PEG6000 crowding agents.

To combat the COVID-19 pandemic, I successfully developed the Q-bodies against both the N protein (Fig. 2) and S proteins of the SARS-CoV-2. The detection limit of the N protein Q-body reached the pM level after optimizing the crowding agents in the reaction buffer, which makes the practical application of the Q-body for the rapid swab specimen measurement possible (Fig. 3). This is the first case study of a Q-body for the virus infection detection in a real specimen, which demonstrated the feasibility of the Q-body biosensors for combating future pandemics,

(5) Rapid development of the T4 Q-body using the developed uHTS system

To verify if the developed toolkit is useful for rapidly developing Q-body, I perform the uHTS for creating a functional T4 Q-body at the end of this project. The anti-T4 scFv used in this screening could not be converted into Q-body with a conventional Q-body design strategy. Notably, only after 2 rounds of screening, a functional T4 Q-body was discovered in the top enriched variants. The total operation period of this process is less than 1 month, which demonstrates the rapidness of the toolkit for the development of Q-body against a new target analyte.

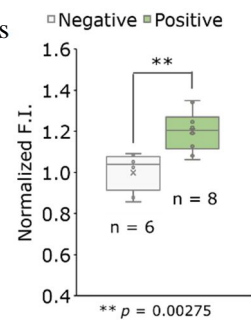


Fig. 3. Distinguish the positive and negative specimens of the COVID-19 patients.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Zhu Bo, Du Zhe, Dai Yancen, Kitaguchi Tetsuya, Behrens Sebastian, Seelig Burckhard	4. 巻 13
2. 論文標題 Nanodroplet-Based Reagent Delivery into Water-in-Fluorinated-Oil Droplets	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biosensors	6. 最初と最後の頁 768 ~ 768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bios13080768	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhu Bo, Nosaka Nobuyuki, Kanamaru Shuji, Dong Jinhua, Dai Yancen, Inoue Akihito, Yang Yinghui, Kobayashi Kaori, Kitaguchi Tetsuya, Iwasaki Hiroshi, Koike Ryuji, Wakabayashi Kenji, Ueda Hiroshi	4. 巻 147
2. 論文標題 Rapid and sensitive SARS-CoV-2 detection using a homogeneous fluorescent immunosensor Quenchbody with crowding agents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 4971 ~ 4979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2AN01051H	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Li Haimei, Zhu Bo, Li Baowei, Chen Limei, Ning Xuerao, Dong Hang, Liang Jingru, Yang Xueying, Dong Jinhua, Ueda Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Isolation of a human SARS-CoV-2 neutralizing antibody from a synthetic phage library and its conversion to fluorescent biosensors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-19699-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhu Bo, Qian Cheng, Tang Haoxuan, Kitaguchi Tetsuya, Ueda Hiroshi	4. 巻 62
2. 論文標題 Creating a Thermostable α -Glucuronidase Switch for Homogeneous Immunoassay by Disruption of Conserved Salt Bridges at Diagonal Interfaces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 309 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.2c00165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Su Jiulong, Zhu Bo, Inoue Akihito, Oyama Hiroyuki, Morita Izumi, Dong Jinhua, Yasuda Takanobu, Sugita-Konishi Yoshiko, Kitaguchi Tetsuya, Kobayashi Norihiro, Miyake Shiro, Ueda Hiroshi	4. 巻 219
2. 論文標題 The Patrol Yeast: A new biosensor armed with antibody-receptor chimera detecting a range of toxic substances associated with food poisoning	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 114793 ~ 114793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2022.114793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Dai Yancen, Sato Yuko, Zhu Bo, Kitaguchi Tetsuya, Kimura Hiroshi, Ghadessy Farid J., Ueda Hiroshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Intra Q-body: an antibody-based fluorogenic probe for intracellular proteins that allows live cell imaging and sorting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 9739 ~ 9748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2SC02355E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Rani Abdul Qawee, Zhu Bo, Ueda Hiroshi, Kitaguchi Tetsuya	4. 巻 148
2. 論文標題 Recent progress in homogeneous immunosensors based on fluorescence or bioluminescence using antibody engineering	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 1422 ~ 1429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D2AN01913B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Akihito, Yasuda Takanobu, Zhu Bo, Kitaguchi Tetsuya, Murakami Akikazu, Ueda Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Evaluation and selection of potent fluorescent immunosensors by combining fluorescent peptide and nanobodies displayed on yeast surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-02022-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 井上暁人; 朱博; 安田貴信; 水谷圭佑; 小林健; 北口哲也
2. 発表標題 タンパク質言語モデルを用いた一変異効果予測による蛍光免疫センサーの機能向上
3. 学会等名 化学工学会第89年会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 水谷圭佑; 小林健; 朱博; 井上暁人; 北口哲也
2. 発表標題 教師なしクラスタリングを用いたタンパク質機能予測
3. 学会等名 第26回情報論的学習理論ワークショップ
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Bo Zhu, Zhirou Qiu, Keisuke Mizutani, Ken Kobayashi, Hiroshi Ueda, Tetsuya Kitaguchi
2. 発表標題 Rapid development of single fluorescent protein-based immunosensor Flashbody through ultra-high-throughput screening and cell-free protein synthesis
3. 学会等名 第75回日本生物工学会大会
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Bo Zhu
2. 発表標題 Development of diverse immunosensors through rapid molecular evolutions and deep learning
3. 学会等名 日本生物工学会東日本支部 賀詞交換会（招待講演）
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Bo Zhu
2. 発表標題 Molecular and whole-cell immunosensors developed by directed evolution for applications in diagnostics and food-safety control
3. 学会等名 Biotechnology Institute Seminar 2023 Fall, University of Minnesota (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Bo Zhu, Haimei Li, Yancen Dai, Akihito Inoue, Yinghui Yang, Kaori Kobayashi, Tetsuya Kitaguchi, Jinhua Dong, Hiroshi Ueda
2. 発表標題 Rapid construction of homogeneous immunosensors for SARS-CoV-2 nucleocapsid and spike proteins using Quenchbody and Quenchprobe technology
3. 学会等名 Bioanalytical Sensors Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 朱博, 野坂 宜之, 董 金華, 北口 哲也, 小池 竜 司, 若林 健二, 上田 宏
2. 発表標題 Converting antibodies to rapid response SARS-CoV-2 homogeneous immunosensors via Quenchbody technology and crowding agent
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 塘 知子, 朱 博, 北口 哲也, 上田 宏
2. 発表標題 蛍光免疫センサー-Quenchbodyのシグナル増幅と高速スクリーニング法の探索
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Dai Yancen, Sato Yuko, Zhu Bo, Kitaguchi Tetsuya, Kimura Hiroshi, Farid J. Ghadessy, Ueda Hiroshi
2. 発表標題 Intra Q-body: an antibody-based fluorogenic probe for intracellular proteins that allows live-cell imaging and sorting
3. 学会等名 Bioanalytical Sensors Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 井上暁人, 安田貴信, 朱博, 北口哲也, 村上明一, 上田宏
2. 発表標題 酵母細胞表面提示系を用いたナノ抗体由来 "nano Q-body" のTrp変異進化
3. 学会等名 化学工学会第88年会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 朱博, 董金華, 寧雪じょう, 井上暁人, 北口哲也, 上田宏
2. 発表標題 Quenchbodyを用いた1分間SARS-CoV-2及び変異株の検出法
3. 学会等名 化学工学会第52回秋季大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Dai Yancen, 朱博, 佐藤優子, 木村宏, Ghadessy Farid J, 北口哲也, 上田宏
2. 発表標題 細胞内腫瘍マーカーp53可視化のための免疫蛍光プローブQ-bodyの開発
3. 学会等名 化学工学会第87年会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 寧 せつじょう、安田 貴信、朱 博、北口 哲也、上田 宏
2. 発表標題 培養液中の組換えタンパク質が検出可能な蛍光免疫センサの構築
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>臨床検体中のコロナウイルスタンパク質を蛍光抗体で迅速定量することに成功 https://www.titech.ac.jp/news/2022/065515 Quenchbodies Pave the Way to COVID-19 Diagnostics https://www.titech.ac.jp/english/news/2022/065498</p>

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
中国	Weifang Medical University		