

令和元年6月14日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21060

研究課題名(和文)新規生物発光プローブの開発と生体分子の可視化計測

研究課題名(英文) Development of a novel bioluminescent probe and visualization measurement of biomolecules

研究代表者

福永 圭佑 (Fukunaga, Keisuke)

沖縄科学技術大学院大学・核酸化学・工学ユニット・研究員

研究者番号：80639279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ルシフェラーゼ及びSNAP-tagを融合した一本鎖抗体scFvタンパク質をSNAP-ligandで部位特異的に蛍光標識することにより、抗原に反応して発光スペクトルの変化する新規生物発光プローブを開発することができた。また、市販のモノクローナルIgG抗体のN末端アミノ基及び糖鎖をそれぞれ位置選択的に標識する多重標識技術を確立した。さらに、予定外の成果として、ルシフェラーゼタンパク質に蛍光アミノ酸を部位特異的導入することで、発光極大を長波長側にシフトさせた人工発光タンパク質が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

位置選択的修飾技術を用いて抗体を蛍光標識することにより、抗体を蛍光・発光プローブへと変換する道筋が見えてきた。抗体を位置選択的に(多重)標識する技術は蛍光標識する以外にも用いることができるため、異なる機能を複数併せ持つ人工抗体の作製なども可能である。

研究成果の概要(英文)：A novel bioluminescent resonance energy transfer (BRET) probe was synthesized by site-specific fluorescent labeling of luciferase-SNAP-single chain antibody (scFv) fusion with a SNAP-ligand. The developed BRET probe exhibited a different luminescent spectrum depending on the concentration of antigen. Also, site-selective modification method to functionalize N-terminal alpha amino-groups and N-glycans on monoclonal immunoglobulin G (IgG) antibody was established. On the other hand, artificial luminescent protein that exhibits a red-shifted luminescence was generated by site-specific incorporation of fluorescent amino acid into luciferase.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：生物発光共鳴エネルギー移動 抗体 蛍光 発光プローブ 直交性反応

### 1. 研究開始当初の背景

緑色蛍光タンパク質 (GFP) をはじめとする蛍光分子を利用したプローブは、生命現象を司る生体分子の挙動をリアルタイムで計測・可視化するのに極めて有効である (*Chem. Rev.* **110**, 2620 (2010); *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 357 (2011))。しかしながら、これまでの蛍光プローブは個々のターゲット分子に対して、それぞれプローブの設計・合成・検討を行う必要性が存在した。

一本鎖抗体 scFv の N 末端側に蛍光アミノ酸を導入すると、scFv 内部のトリプトファン残基により蛍光基が消光を受ける一方、抗原の結合により抗体の構造変化が生じ、その結果、蛍光基がトリプトファン残基から解離し蛍光が回復する現象が見出された (*J. Am. Chem. Soc.* **133**, 17386 (2011))。同様に、マルトース結合タンパク質 (MBP) のリガンド結合部位近傍の特定のアミノ酸残基を蛍光アミノ酸に置換すると、リガンド依存的な蛍光消光解消を示す現象が以前にも見出されていた (*ChemBioChem* **10**, 999 (2009))。ただし、scFv 型蛍光プローブは抗体という高度に保存されたタンパク質骨格 (スキヤフォールド) を用いるため、同様の検出原理が異なる抗原分子に対しても利用可能であると期待される。実際、低分子からペプチド等中分子、タンパク質等の高分子に至るまで様々な抗原分子を蛍光強度変化で検出可能であることが示された (*Biochem. Biophys. Acta.* **1844**, 1951 (2014))。

一方で、蛍光プローブを用いた生細胞・生体におけるバイオイメージングでは強力な励起光照射に起因する自家蛍光や光毒性を生ずることが知られており、また、長時間の励起光照射は光退色を生じさせることからリアルタイム検出に適していない。これを代替するものとして期待されているのが生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) プローブである (*Curr. Opin. Chem. Biol.* **27**, 46 (2015))。また近年、スマートフォンやデジタルカメラなどの安価な汎用デバイスで生物発光プローブの発光を検出し、臨床現場などにおける“その場診断” (point of care testing) を行うという試みもある (*Nat. Chem. Biol.* **10**, 598 (2014))。このため、生体分子を検出するための生物発光プローブ開発の重要性が高まっている。

### 2. 研究の目的

生物発光プローブを設計・合成する一般的手法を確立することで、様々な生体分子を発光計測することが本研究の目的である。酵素標識法や化学修飾法など部位特異的・位置選択的標識技術を駆使することで、抗体分子 (scFv 及び IgG) を任意の抗原分子に応答して発光スペクトルが変化する BRET プローブへと変換し、また、抗原となる生体分子を試験管内で発光計測する。

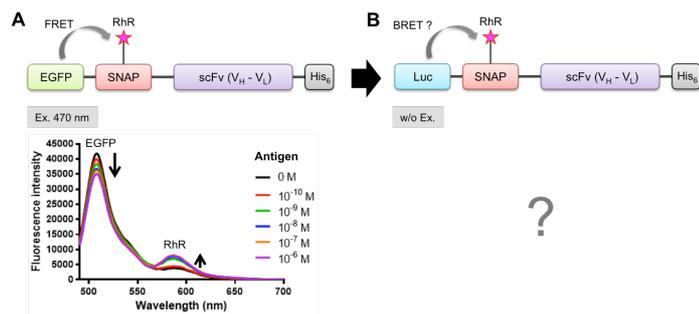


図1: SNAP-tag/SNAP-ligand 標識系を用いた抗原応答性 (A) FRET プローブ 及び (B) BRET プローブの作製

### 3. 研究の方法

#### (1) scFv 型プローブの開発

SNAP-tag/SNAP-ligand 標識系を用いることにより、非天然アミノ酸を用いることなく scFv を部位特異的に蛍光標識可能であること、また、蛍光標識された SNAP-scFv が抗原依存的な蛍光消光解消を示すことが所属グループにより見出されていた (Huynh Nhat KP *et al.*, *unpublished results*)。さらに、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を融合した EGFP-SNAP-scFv は抗原応答性の蛍光レシオプローブとして機能することから (図 1A)、EGFP 部分をルシフェラーゼに置換することで BRET プローブが作製可能であることが示唆された。このため、抗オステオカルシン scFv の N 末端側にルシフェラーゼ、及び SNAP-tag を融合したタンパク質を大腸菌無細胞タンパク質合成系 (S30) で発現させた。また、RhodamineRed-SNAP ligand を用いて scFv の蛍光標識を行った (図 1B)。試験管内で発光測定を行い、抗原依存的な発光スペクトル変化を示すか検討を行った。

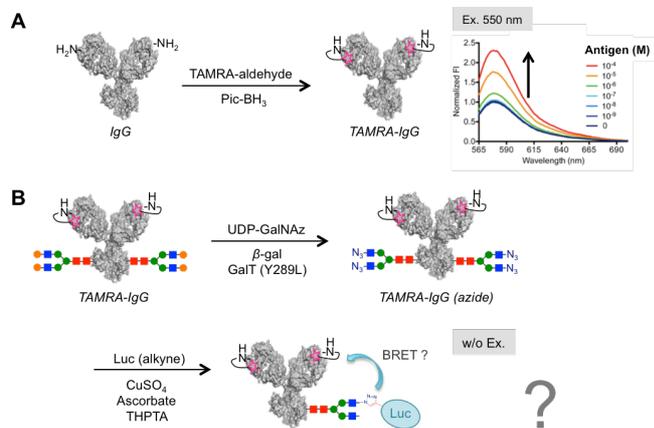


図2: IgG 抗体の位置選択的的化学修飾による (A) 蛍光回復プローブ及び (B) BRET プローブの作製

## (2) IgG 型プローブの開発

市販のモノクローナル IgG 抗体の N 末端  $\alpha$ -アミノ基を位置選択的に蛍光標識することで、抗原依存的な蛍光消光を示すことを近年見出した (図 2A)。そこで、N 末端蛍光標識 IgG に対してさらに位置選択的修飾を加え、BRET プローブ化することを試みた。具体的には、Qasba らの抗体糖鎖への酵素化学的直交性官能基導入法を利用した (*Bioconj. Chem.* **26**, 2170 (2015))。アジドを直交性官能基として有するガラクトースを糖鎖末端へと導入した後、非天然アミノ酸としてアルキンを導入したルシフェラーゼを別に調製し、ヒュスゲン環化付加反応により IgG にルシフェラーゼをコンジュゲートすることを試みた (図 2B)。

## 4. 研究成果

### (1) scFv 型プローブの開発

骨代謝マーカーであるオステオカルシンを抗原とする、抗オステオカルシン scFv の N 末端側にルシフェラーゼ・SNAP-tag を融合した人工タンパク質 (図 1B) を大腸菌無細胞タンパク質合成系 (S30) で調製し、SNAP-ligand を介してアクセプターとなる蛍光色素 (RhodamineRed) を部位特異的に標識した BRET プローブを開発した。基質となるルシフェリンを添加して発光測定を行ったところ、ドナー・アクセプター双方の発光ピークが観察され BRET が生じている事が確認された (図 3A)。また、抗原エピトープである BGP-C7 ペプチドの濃度に依存して僅かに BRET 効率が変化したことから、フェルスター距離に変化が生じていると推定された。ドナー・アクセプター双方の発光強度比から抗原を定量的に検出することに成功した (図 3B)。アクセプターである蛍光色素を直接励起してスペクトル測定したところ、抗原濃度に依存して発光強度が変化したことから蛍光消光も生じていることが明らかとなった。また、以前報告されているように (*Bull. Chem. Soc. Jpn.* **85**, 576 (2012))、BRET はルシフェラーゼ近傍の蛍光色素に対してのみ生じるため、遊離の蛍光色素が混在した夾雑系においても発光測定が可能であった。

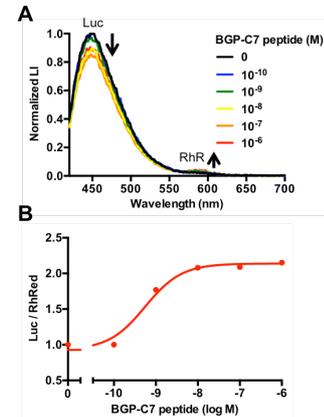


図 3: Luc-SNAP-scFv(BGP) の (A) 発光スペクトル、及び (B) 抗原滴定曲線

### (2) IgG 型プローブの開発

IgG 抗体の N 末端  $\alpha$ -アミノ基を位置選択的に蛍光標識することで、抗原応答型の蛍光プローブを作製する手法 (図 2A) について英国王立化学会誌に論文投稿を行い受理された。この IgG 型蛍光プローブを用いて、生体分子であるサイロキシン T4・サイロニン T3 (甲状腺機能マーカー) (*Chem. Commun.* **54**, 12734 (2018))、及び、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (妊娠マーカー) (*unpublished results*) を励起光存在下で発光検出することに成功した。

上記の技術を用いて作製した N 末端 TAMRA 標識 IgG をさらに別の分子で標識することを試みた。まず、モデル系としてアルキンを誘導体化した RhodamineGreen (RhG) をヒュスゲン環化付加反応により IgG 糖鎖末端へと導入した。電気泳動後にゲル蛍光イメージングで標識を確認したところ、重鎖・軽鎖はそれぞれ TAMRA で標識されている一方、RhG は糖鎖が存在する重鎖にのみ標識されていた (図 4A)。また、PNGaseF 処理により RhG が糖鎖に対して部位特異的に付加したことを確認した (図 4B)。つまり、IgG の N 末端及び糖鎖末端を選択的に多重標識する技術を確立することができた。RhG-TAMRA 二重蛍光標識 抗 FLAG IgG 抗体のドナーを 490 nm で励起したところ、ドナー・アクセプター双方の発光ピークが観察され、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) が生じている事が確認された。抗原を添加したところ、アクセプターの発光強度は抗原濃度依存的に増大する一方、ドナーの発光スペクトルは変化しなかった。

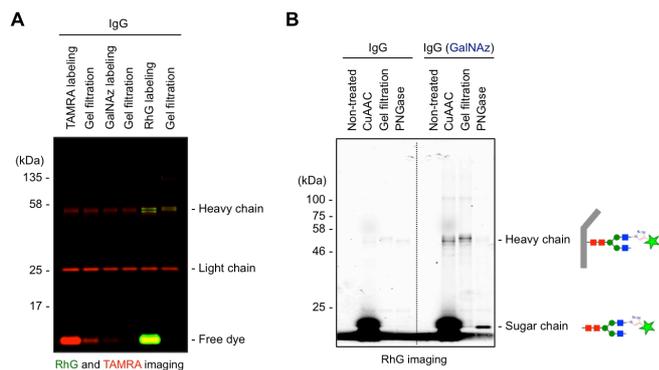


図 4: (A) 二重蛍光標識 IgG のゲルイメージング (B) PNGaseF 処理による糖鎖蛍光標識の確認

次に、IgG 糖鎖部分へコンジュゲートするためのアルキンを導入ルシフェラーゼの調製を試みた。古細菌由来のピロリシン tRNA 合成酵素及びアンバーサプレッサー tRNA を大腸菌内で共発現させることで、propargyl-Lysine が部位特異的に導入されたタンパク質が得られる手法 (*J.*

*Am. Chem. Soc.* **131**, 8720 (2009) をまず検討したが、作製したコンストラクトではルシフェラーゼタンパク質は十分に産生されるものの、非天然アミノ酸の導入は確認できなかった。そこで次に、大腸菌無細胞タンパク質合成系 (S30) を用いたアルキン導入ルシフェラーゼの *in vitro* 発現を試みた。 $\alpha$ -アミノ基が Boc で保護された propargyl-Lysine に対してクロロアセトニトリルを反応させ、カルボキシル基の活性化を行った。さらに、ジヌクレオチド pdCpA と反応させ、脱 Boc 化反応によりアミノアシル化 pdCpA を合成した。さらに、別に調製した古細菌由来 tRNA<sub>CUA</sub> 断片 3 種類とアミノアシル化 pdCpA を T4 RNA Ligase を用いてライゲーションすることにより、アミノアシル化 tRNA<sub>CUA</sub> の作製を行った。GFPuv5 を発現レポーターとしてアンバーサプレッサー法により、無細胞タンパク質合成系における非天然アミノ酸の導入効率を検討した。いずれの古細菌由来 tRNA を用いても propargyl-Lysine をタンパク質に導入することができたが、導入効率には差があった。次に、Gaussia 由来ルシフェラーゼの N 末端、あるいは C 末端にそれぞれ propargyl-Lysine を導入することを試み、ウェスタンブロット解析及び発光測定により発現を確認した。

propargyl-Lysine の代わりに蛍光アミノ酸 (BODIPY-FL-amino-phenylalanine) をルシフェラーゼに導入して発光測定したところ、高効率で BRET が生じており (図 5)、任意の分子に対する応答能は無いものの、ルシフェラーゼに蛍光アミノ酸を導入することにより発光の多色化が可能であることが示唆された。

予め調製しておいた糖鎖アジド基導入・N 末端蛍光標識 IgG 抗体に対してクリック反応によるルシフェラーゼ標識を行い、発光測定を行ったものの発光を観察することはできなかった。電気泳動後にゲル蛍光イメージングで IgG 抗体の分子量サイズの確認を行った結果、重鎖の分子量が変化しておらず、ルシフェラーゼが抗体にコンジュゲートされていないことが判明した。His-tag が配位子 (THPTA) と競合するという報告があり、別の精製用タグを使った系の検討が今後の課題である。

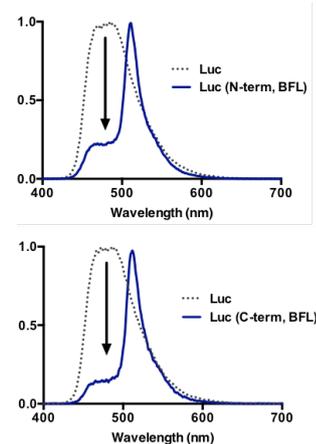


図5: BFL 導入ルシフェラーゼの発光スペクトル

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- 1) K. Fukunaga, T. Watanabe, D. Novitasari, H. Ohashi, R. Abe and T. Hohsaka., Antigen-responsive fluorescent antibody probes generated by selective N-terminal modification of IgGs. *Chem. Commun.* **54**, 12734-12737 (2018), 査読有り  
DOI: 10.1039/C8CC07827K

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 福永圭佑、Dian Novitasari、渡邊貴嘉、芳坂貴弘、抗原依存的蛍光変化を示す N 末端蛍光標識抗体の開発、日本化学会 第 98 春季年会、千葉、2018/3/20-23
- 2) K. Fukunaga, D. Novitasari, T. Watanabe and T. Hohsaka., A novel IgG-based fluorescent probe showing increased fluorescence upon binding of antigen. 6th International Conference on "Dynamic ordering of bimolecular systems for creation of integrated functions", Shizuoka, 2018/1/20-21
- 3) 芳坂貴弘、福永圭佑、Dian Novitasari、渡邊貴嘉、N 末端蛍光標識 IgG による抗原の蛍光検出、ConBio2017、神戸、2017/12/6-9
- 4) K. Fukunaga, D. Novitasari, T. Watanabe and T. Hohsaka., A novel IgG-based fluorescent probe showing increased fluorescence upon binding of antigen. ICBS2017, Shanghai, 2017/10/17-20
- 5) 福永圭佑、Novitasari Dian、渡邊貴嘉、芳坂貴弘、抗原応答性蛍光プローブ抗体の開発、第 11 回バイオ関連化学シンポジウム、東京、2017/9/7-9
- 6) 芳坂貴弘、福永圭佑、Dian Novitasari、渡邊貴嘉、阿部亮二、大橋広行、N 末端蛍光標識 IgG による抗原のリアルタイム蛍光検出、第 17 回日本蛋白質科学会年会、宮城、2017/6/20-22
- 7) 福永圭佑、渡邊貴嘉、Novitasari Dian、芳坂貴弘、IgG 抗体の N 末端選択的化学修飾による抗原応答性蛍光プローブの開発、日本ケミカルバイオロジー学会 第 12 回年会、北海道、2017/6/7-9
- 8) 福永圭佑、渡邊貴嘉、Novitasari Dian、阿部亮二、大橋広行、芳坂貴弘、N 末端蛍光標識抗体プローブを用いた抗原の蛍光検出、第 68 回日本生物工学会大会、富山、2016/9/28-30
- 9) 福永圭佑、渡邊貴嘉、Novitasari Dian、阿部亮二、大橋広行、芳坂貴弘、抗体の N 末端選択的蛍光標識による蛍光抗原センサーの開発、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、

- 石川、2016/9/7-9
- 10) 芳坂貴弘、Huynh Nhat Kim Phuong、吉越健輔、福永圭佐、渡邊貴嘉、部位特異的蛍光標識抗体の合成と抗原の蛍光検出、第 10 回バイオ関連化学シンポジウム、石川、2016/9/7-9
  - 11) 福永圭佐、渡邊貴嘉、Novitasari Dian、阿部亮二、大橋広行、芳坂貴弘、抗体のN末端選択的蛍光標識による蛍光抗原センサーの開発、第 4 回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム、石川、2016/9/6

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

- ① ICBS2017 トラベルアワード受賞

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。