

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20477

研究課題名（和文）迅速な高性能蛍光免疫センサー構築を指向した直交ペプチドペアの高効率スクリーニング

研究課題名（英文）High-throughput screening of orthogonal peptide pairs for rapid construction of high-performance fluorescent immunosensors

研究代表者

安田 貴信（Yasuda, Takanobu）

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：90963249

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：コイルドコイル形成ペプチドを提示する酵母とファージを作製し両者が相互作用できること、コイルドコイル形成ペプチドを介して相互作用している酵母とファージの集団をFACSで濃縮できることが分かった。また、ペプチドペアの逆平行結合が抑制されるような変異体をデザインし、これを用いることでプローブの性能が向上することも分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で検討した酵母とファージを利用したペプチドのスクリーニング法は、より高効率に目的集団を濃縮できる条件について検討を重ねることで、新しい機能性ペプチドを獲得する手段として利用が期待される。また、今回新たに設計・合成した逆平行結合抑制ペプチドペアは、今後の高性能なQ-bodyの作製に資すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A yeast and phage, carrying coiled-coil forming peptide were successfully fabricated, indicated that they enable to interact with each other and target population was enriched by using FACS. Some mutated peptide pairs suppressed the anti-parallel binding were designed, demonstrated that this mutant improves the performance of a probe.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：抗体 コイルドコイルペプチド バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

抗体は我々哺乳動物の獲得免疫系において体内に侵入した異物(抗原)を特異的に認識し除去する感染防御機構を担っている。抗体のこの特異的認識能は検体中の微量物質を検出する免疫測定法に応用されており、生化学研究や病気の診断などに役立てられている。しかし、現行の免疫測定法は操作が煩雑で測定結果を得るまで時間を要し、測定対象によっては十分な感度での検出が難しい場合も多い。そのため、現在も測定対象や求められる測定感度・時間に応じて新しい免疫測定法の開発が盛んに行われている。こうした背景の下、近年見出された蛍光標識抗体断片 Quenchbody (Q-body) はホルモンなどの低分子からウイルスなどの高分子まで検体と混合するだけで簡便かつ高感度に抗原を検出できることから、従来よりも迅速高感度な免疫測定キットのコア技術として応用が期待されている。Q-body の蛍光色素は抗原不在時では抗体内に取り込まれており近傍のトリプトファン残基 (Trp) からの光誘起電子移動により消光 (クエンチ) 状態となるが、抗原結合に伴い色素が抗体外に暴露され Trp との相互作用が弱まると蛍光が回復する。特に、H 鎖と L 鎖の両方の N 末端に異なる蛍光色素が導入された Fab 断片 (Ultra Q-body) は抗原結合に伴う蛍光の脱クエンチに加えて蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 効率の変化により約 50 倍の高い応答を示す。しかし、このような高い応答の Ultra Q-body を構築するためには均一に H 鎖と L 鎖を蛍光修飾する必要があり、ピンポイント標識が可能な無細胞転写翻訳系 (コスト、収量の面で実用的でない) 以外での構築は困難であった。他方、最近我々は強固なヘテロ二量体 (コイルドコイル) を形成するペプチドペア E4/K4 を利用することで、組換え抗体断片を簡単に Q-body 化する手法を報告している。高い親和性で、かつ互いに直交するコイルドコイル形成ペプチドペアが利用できれば、迅速かつ高効率に Ultra Q-body を作製できると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ファージと酵母を利用した library-versus-library スクリーニング法を新たに開発し、迅速かつ高効率な Ultra Q-body 構築に適した高親和性かつ互いに直交するペプチドペアの創出を目的とした。

3. 研究の方法

これまでの研究で E4/K4 は平行だけでなく逆平行でも二量体を形成することが示唆されており、逆平行での二量体形成は Q-body を構築した際にバックグラウンドシグナル上昇の要因となる懸念があった。そこでまずは、Q-body 構築用に E4/K4 の配列の最適化に着手した。具体的には、逆平行での二量体形成が抑制されるような E4/K4 変異体を既報のコイルドコイル形成ペプチドの設計指針 (H. Gradišar and R. Jerala, *J. Pept. Sci.*, 2010) と bCIPA (<http://www.syntbio.net/bCIPA/>) による Tm 値の推定に基づいて設計し、この変異体を用いて Q-body を作製し、原有無の条件で蛍光強度を測定した。抗体としてはオステオカルシン認識 Fab 断片 (KTM219) を用い、その H 鎖 N 末端側に E4 を融合した。蛍光色素としては TMR を用い、K4 の N 末端あるいは C 末端側に修飾した。

次に、直交ペプチドペアスクリーニングのモデル実験のために、E4 を提示する酵母

と K4 を提示するファージを調製し、両者が提示されていることと相互作用することを確かめた。その後、E4 が提示されている酵母と提示されていない酵母を混合し、K4 提示ファージを使って FACS により酵母/ファージ複合体の選択を試みた。この時、K4 提示ファージを抗 M13 抗体-PE で標識する場合と、抗 M13 抗体-HRP とビオチニルチラミドの反応により酵母表面をビオチン化しストレプトアビジン-PE で標識する場合について検討した。

4 . 研究成果

調製した E4-Fab と K4-TMR (あるいは TMR-K4) を混合し抗原有無の条件で蛍光強度を測定したところ、TMR-K4 を用いた場合でも抗原添加による輝度変化が観察され E4/K4 が逆平行状態で結合することが示唆された。続いて、このような E4/K4 の逆平行の結合形成を抑制する目的で 3 つの変異を導入した E4(3mut)/K4(3mut)を設計した。この変異体についても上述の試験と同様に評価したところ、TMR-K4 を用いた場合には抗原添加による蛍光輝度変化は観察されず E4/K4 の逆平行状態の結合の抑制が示唆された。さらに、E4 を融合した抗体結合タンパク質 Protein M と蛍光色素を修飾した K4 を混合することで抗体を蛍光免疫センサーに変換できるプローブ Coiled Q-probe について、E4(3mut)/K4(3mut)を用いてオステオカルシンを認識する IgG (KTM219) をセンサー化した時に従来 4 倍であった蛍光応答が 13 倍まで向上することも分かった。また、K4 と蛍光色素の間の最適なリンカーを探索する過程で、同じリンカーで 5-TMR あるいは 6-TMR を修飾した K4-TMR を調製し、E4-Fab と混合し抗原有無の条件で蛍光強度を測定したところ、5-TMR と 6-TMR の場合で抗原応答に 2.5 倍の差が見られ、わずかな構造の違いが抗原応答に影響を与えることが分かった。

次に、直交ペプチドペアスクリーニングのモデル実験のために、Aga2p に HA タグを介して E4 が提示される酵母を調製し、Alexa Fluor 488 で標識された抗 HA 抗体あるいは N 末端側が FITC、C 末端側が TMR で標識された K4 を用いて酵母表層に E4 が提示されていることを FACS で確認した。また、g3p に His タグを介して K4 が提示されるファージを調製し、E4 が固相化された ELISA により実際に E4 が提示されていることを確認した。そして、抗 HA 抗体を固相化し E4 提示酵母を反応させ、洗浄後に K4 提示ファージを反応させ、HRP で標識された抗 M13 抗体で検出を行ったところ、E4 提示酵母を反応させた場合でシグナルの上昇が見られ、E4 提示酵母と K4 提示ファージが相互作用できることが示唆された。続いて、E4 提示酵母と K4 提示ファージを混合し FACS で分析したところ、抗 M13 抗体-PE とストレプトアビジン-PE のいずれの場合でも K4 提示ファージが存在する時に PE 由来と思われるシグナルを示す集団が見られた。この集団を回収し、培養を行ったのち再び FACS による分析を行ったところ、抗 M13 抗体-PE を用いて標識した場合で E4 提示酵母がより高い割合で濃縮されていることを確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasamoto Kana, Yasuda Takanobu, Zhu Bo, Ueda Hiroshi, Kitaguchi Tetsuya	4. 巻 148
2. 論文標題 Efficient and rapid linker optimization with heterodimeric coiled coils improves the response of fluorescent biosensors comprising antibodies and protein M	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 5843 ~ 5850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d3an01499a	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 安田 貴信、北口 哲也	4. 巻 55
2. 論文標題 互いに引き合う螺旋状ペプチド ~二量体形成から細胞療法まで~	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 749 ~ 753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 安田 貴信、北口 哲也	4. 巻 8
2. 論文標題 互いに引き合う螺旋状ペプチド ~二量体形成から細胞療法まで~	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 安田貴信、笹本佳那、北口哲也、上田宏
2. 発表標題 逆平行結合抑制ペプチドペアを用いたクエンチ抗体の構築と評価
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上暁人、鈴木大凱、YANG Yinghui、安田貴信、朱博、北口哲也、上田宏
2. 発表標題 コルチゾール認識ナノ抗体の蛍光免疫センサー化
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉田晴生、安田貴信、北口哲也、上田宏
2. 発表標題 発光タグを付加したペプチドを用いた免疫センサーの構築
3. 学会等名 化学工学会第53回秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笹本佳那、安田貴信、北口哲也、上田宏
2. 発表標題 逆並行結合抑制型ペプチドペアによる抗体を蛍光免疫センサに変換するプローブタンパク質Coiled Q-probeの蛍光応答向上
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上暁人、安田貴信、北口哲也、村上明一、上田宏
2. 発表標題 酵母提示系によるナノ抗体由来の蛍光免疫センサnano Q-bodyの分子進化法の開発
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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

1. 発表者名 Akihito Inoue, Takanobu Yasuda, Tetsuya Kitaguchi, Akikazu Murakami, Hiroshi Ueda
2. 発表標題 Selection and Trp-mutation evolution of a nanobody-based fluorescent immunosensor "nano Q-body" by yeast surface display
3. 学会等名 Biosensors2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kana Sasamoto, Takanobu Yasuda, Tetsuya Kitaguchi, Hiroshi Ueda
2. 発表標題 Development of "Coiled Q-probe" that can effectively convert antibodies into fluorescent immunosensors
3. 学会等名 Biosensors2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安田貴信、朱博、上田宏、北口哲也
2. 発表標題 抗体結合タンパク質を利用した全長抗体の生物発光センサー化
3. 学会等名 化学工学会第54回秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笹本佳那、安田貴信、朱博、上田宏、北口哲也
2. 発表標題 順平行コイルドコイルペプチド型蛍光プローブによる蛍光免疫センサの応答の向上
3. 学会等名 第12回日本生物工学会東日本支部コロキウム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 安田貴信、朱博、上田宏、北口哲也
2. 発表標題 蛍光酵素断片のトラップ&リリースに基づく抗原検出法
3. 学会等名 化学工学会第89回年会
4. 発表年 2024年

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回年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------