

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24360336

研究課題名(和文) 蛍光クエンチ解消原理に基づく生物計測の新展開

研究課題名(英文) Novel Expansion of Bioanalysis Based on the Fluorescence Quench-Release Principle

研究代表者

上田 宏 (UEDA, Hiroshi)

東京工業大学・資源化学研究所・教授

研究者番号：60232758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が最近開発した、部位特異的に蛍光修飾した組換え抗体断片を使って各種抗原検出を高感度かつその場で迅速に行うことができる、新規免疫測定素子 Quenchbody (Q-body) の基礎原理の確立と、各種の応用を目的として検討を行った。

従来の無細胞系に加えて細胞系での Fab 型 Q-body 合成に成功し、これらを用いて新規な色素の発見、新規な修飾部位の発見、GFP 変異体を用いた遺伝子にコードされた Q-body 構築原理の発見、ビーズを用いたアッセイの成功、細胞分泌ペプチドの顕微可視化の成功、抗体以外のタンパク質を用いた同様の検出素子 (Q'-body) の構築の成功、といった成果を得た。

研究成果の概要(英文)：We aimed at the elucidation of basic principle of Quenchbody (Q-body) and its application to various fields. Q-body is a site-specifically fluorescence-labeled recombinant antibody fragment, which was recently discovered by ourselves. It can detect various antigens with high sensitivity and rapidity in situ.

We succeeded in synthesizing Fab-type Q-bodies not only using cell-free translation system but also using cell-based system, and found novel suitable fluorescent dyes and novel modification sites on antibody. We also found a way to make genetically encoded Q-bodies using GFP variants, succeeded in a bead-based assay and imaging of osteocalcin peptide secreted from the cells, and in creating a similar biosensor protein based on the other ligand binders called Q'-body.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：antibody fluorescence quenching immunoassay cell-free translation biochip protein engineering chemical biology bioimaging

1. 研究開始当初の背景

最近、研究代表者らにより、無細胞タンパク質合成系を用いて部位特異的に蛍光ラベルを施した一本鎖抗体(V_H と V_L をペプチドリinkerで結合させたもの)が、抗原添加時にその蛍光強度を顕著に強める現象が見出された。この現象は、抗原非存在時に可変領域内における V_H/V_L 相互作用部位近傍のトリプトファンに蛍光色素が近接し、その蛍光強度を低下させる(Quench状態になる)が、抗原結合時は色素がトリプトファンに近づけず、Quench状態が解消するために起こると考えられ、このような抗原依存的なQuench解消現象を起こす蛍光標識抗体断片を「Quenchbody」と呼んでいる(図1)。

すでに上記の低分子化合物やペプチド、蛋白質、あるいはそのリン酸化修飾等を認識する多くの抗体をQuenchbody化可能なことが確認されていること、Quench現象に必要なトリプトファンは、95%以上保存されていることから、汎用的な免疫測定技術となる可能性が高い。

本現象は、 V_H/V_L の部位特異的な蛍光標識を検討した際偶然見出されたものであるが、テトラメチルローダミン(TAMRA)やATTO655などの色素とトリプトファンを混合することで、光誘起電子移動PeTと蛍光クエンチが起こることはすでに報告されており、保存性の高い各Trp残基のPheへの変異により応答性が減少することからその検出原理は確かなものと言える。「抗原不在時に V_H/V_L が解離しやすい」というOS-IAでは必須の条件も、QuenchbodyにおいてはscFvでも実施できることから緩和されており、実際OS-IAに必ずしも適していない抗体によるタンパク質(BSA)の測定に成功している。さらに骨代謝マーカーであるオステオカルシンペプチド(BGP-C)のEC50では、競合ELISAのIC50を凌駕する値が得られている($EC50 = 2.5 \times 10^{-8} M < 8.8 \times 10^{-8} M$)。さらに最近、scFvでなくFabのN末端をラベルすることで、クエンチ状態が安定化し、より高い抗原応答性が得られることも分かってきた。

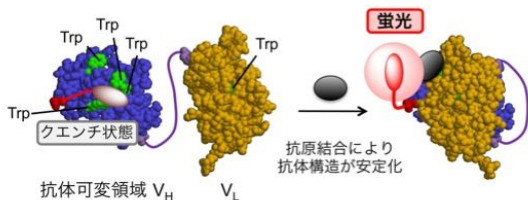


図1 Q-bodyの動作原理

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々のこれまでの抗体工学研究を基盤とした、バイオテクノロジーの幅広い領域で応用可能な新規蛍光免疫測定原理の確立と応用にある。特異性は高いものの測定に時間と手間を要し、特に低分子抗原

は競合的に測定せざるをえない等多くの問題があった従来法にかわりうる、あらゆる抗原検出を高感度、かつその場で迅速に行うことができる新規免疫測定素子 Quenchbody の開発と、その生物学・生物学への応用を目指す。サンプルと混合し、その場で蛍光強度を測定するだけで高感度に抗原濃度を測定できる本法の特長を生かし、バイオマーカーなど各種抗原を網羅的に蛍光検出できる免疫測定チップの実現をめざした。

3. 研究の方法

(1)クエンチ現象に関する基礎的検討
各種色素の検討、吸光スペクトルの検討、リンカー配列の検討等によりクエンチ機構を考察する。

(2)ライブラリからの各種 scFv の取得
Q-body に適した抗体を各種ライブラリから選択する方法について検討する。

(3) Quenchbody の有用性の更なる向上
無細胞系以外の方法でより手軽に Q-body を構築できないか、検討する。

(4) 診断用プロテインチップの構築
上記の検討によって得られた複数の Q-body をアレイ化し、複数バイオマーカー同時計測の可能性を探る。

(5) 細胞からの物質放出の可視化
洗浄操作なしにその場で抗原の有無が調べられるメリットを生かし、細胞を用いたバイオイメージングへの応用を進める。

(6) 抗体以外のタンパク質への応用
クエンチ解消原理を抗体以外のタンパク質で実現できるか、検討する。

4. 研究成果

(1)クエンチ現象に関する基礎的検討
無細胞系と、後述する細胞系を用いた検討により、これまで試されていなかった ATT0495, Cy3 等の色素を用いて Q-body が構築できること、ダブルラベル Fab 型 Q-body においては色素間の H dimer 形成がクエンチにおいて重要な役割を果たすことが判明した。

また、無細胞系を用いて抗リゾチーム抗体の蛍光応答に関して色素導入位置の最適化を行い、鎖の非 CDR ループ上の残基に TAMRA を導入することで、従来比で約 2 倍の応答を得られる事が判明した(ref.12)。この位置の修飾に関しては今後さらに検討を加える予定である。

(2)ライブラリからの各種 scFv の取得
Q-body 応答の優れた BGP 認識 scFv の CDR を Ser/Tyr/Trp でランダム化したファージ提示ライブラリを構築した。しかし、ライブラリサイズが小さかったためか、高い親和性と特異性、さらにタンパク質としての安定性を示すクローンの取得は困難であった。引き続き、次期の基盤研究で各種の抗原免疫細胞由来ファージライブラリ等を用いたスクリーニングを試みる予定である。

(3) Quenchbody の有用性の更なる向上

生産コストの安い大腸菌発現 Fab 断片を用いた、シングルおよびダブルラベル各色 Q-body の構築に成功した(ref. 15)。この方法で、各種 Fab 型 Q-body の大量生産に成功した。さらに、化学修飾法によらずに GFP 変異体同士の FRET を原理とする、遺伝子にコードされた Q-body の構築に成功した (Open-Flower Immunoassay, 図 2, ref. 6)。また、化学的に抗体 N 末を蛍光ラベルし、Q-body 化することにも予備的な実験ながら成功した。本テーマに関しては、引き続き次期の基盤研究で検討を行う。

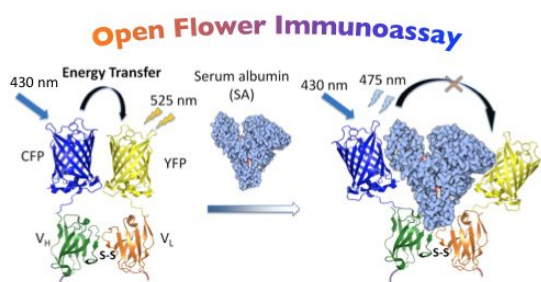


図 2 遺伝子にコードされた Q-body (ref. 6)

(4) 診断用プロテインチップの構築

溶液中でなく、アガロースビーズ上に Q-body を固定化し蛍光測定が可能かどうか検討した結果、顕微鏡および蛍光分光光度計を用いて十分測定可能なことが判明した (ref. 15)。これにより、市販のフローサイトメトリーあるいは蛍光ビーズ測定機 (Luminex など) を用いた、マルチプレックス低分子抗原測定の可能性が示された。

(5) 細胞からの物質放出の可視化

骨肉腫細胞 U2OS は、ビタミン D3 依存的に骨芽細胞に分化し、オステオカルシン BGP 産生量が増加する。この過程を細胞系で構築した Fab 型 Q-body で洗浄操作なしにイメージングすることに成功した (ref. 15)。

(6) 抗体以外のタンパク質への応用

免疫抑制剤ラパマイシン依存的に二量体形成する FKBP12-FRB 各ドメインを V_H/V_L と見なし、ここから無細胞系を用いて scFv 型 Q-body (Q'-body) を構築した。結果、ラパマイシン依存的な蛍光強度増加によりその迅速高感度な検出に成功した (図 3, ref. 3)。

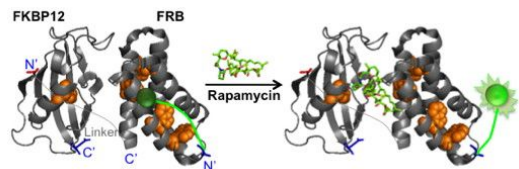


図 3 Q'-body for Rapamycin (ref. 3)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 27 件)

- 1) 大室(松山)有紀, 上田 宏 "生物発光・蛍光消光を利用した新規計測技術の開発" 化学工業 (査読無) 66, 2015, 61-66.
- 2) H. Veisi, J. Gholami, H. Ueda, P. Mohammadi, and M. Noroozi "Magnetically palladium catalyst stabilized by diaminoglyoxime-functionalized magnetic Fe₃O₄ nanoparticles as active and reusable catalyst for Suzuki coupling reactions" J. Mol. Catal. A: Chemical (査読有) 396, 2015, 216-223, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcata.2014.10.012>
- 3) H.J. Jeong, S. Itayama, and H. Ueda "A signal-on fluorosensor based on quench-release principle for sensitive detection of antibiotic rapamycin" Biosensors (査読有) 5, 2015, 131-140, <http://dx.doi.org/10.3390/bios5020131>
- 4) K. Hayashi, Y. Tomozoe, K. Nagai, K. Matsuba, M. Mitsumori, Y. Hiraishi, T. Matsumura, H. Ueda, and N. Kamiya "固相免疫測定を目的とした融合タンパク質試薬の設計とヒト培養細胞による生産プロセスの最適化" 化学工学論文集 (査読有) 41, 2015, 38-42, https://www.jstage.jst.go.jp/A_PRedirectJournalInit/-char/ja/?sryCd=kakorobunshu&noVol=41&noIssue=1&kijCd=4114wh066&screenID=AF06S010
- 5) J. Dong, T. Kojima, H. Ohashi, and H. Ueda "Optimal fusion of antibody binding domains resulted in higher affinity and wider specificity" J. Biosci. Bioeng. (査読有) in press, 2015, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.03.014>
- 6) C.I. Chung, R. Makino, J. Dong, and H. Ueda "Open flower fluoroimmunoassay: a general method to make fluorescent protein-based immunosensor probes" Anal. Chem. (査読有) 87, 2015, 3513-3519, <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.analchem.5b00088>
- 7) 董 金華, 上田 宏 "生物発光タンパク質センサーを用いた薬剤のモニタリング" 実験医学 (査読無) 33, 2015, 583-584,
- 8) 上田 宏 "タンパク質の部位特異的修飾法の最近の進展" 化学 (査読無) 69, 2014, 64-65.
- 9) Y. Sasajima, Y. Kohama, M. Kojima-Misaizu, N. Kurokawa, Y. Hara, J. Dong, M. Ihara, and H. Ueda

- "Simultaneous retention of thermostability and specific activity in chimeric human alkaline phosphatases" *Mol. Biotechnol.* (査読有) 56, 2014, 953-961, <http://dx.doi.org/10.1007/s12033-014-9774-9>
- 10) Y. Ohmuro-Matsuyama, Y. Hara, and H. Ueda "Improved protein-protein interaction assay FlimPIA by the entrapment of luciferase conformation" *Anal. Chem.* (査読有) 86, 2014, 2013-2018, <http://dx.doi.org/10.1021/ac403065v>
- 11) 大室(松山)有紀, 上田 宏, "ホタル発光酵素の反応機構を利用したタンパク質間相互作用検出系の開発" *バイオサイエンスとインダストリー* (査読無) 72, 2014, 113-116.
- 12) H.J. Jeong, and H. Ueda "Strategy for making a superior Quenchbody to proteins: effect of the fluorophore position" *Sensors* (査読有) 14, 2014, 13285-13297, <http://dx.doi.org/10.3390/s140713285>
- 13) H. Ueda, and J. Dong "From Fluorescence Polarization to Quenchbody : Recent Progress in Fluorescent Reagentless Biosensors Based on Antibody and Other Binding Proteins" *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics* (査読有) 1844, 2014, 1951-1959, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.06.005>
- 14) 上田 宏 "免疫反応を測れる光る抗体" *現代化学* (査読無) 518, 2014, 32-36.
- 15) R. Abe, H.J. Jeong, D. Arakawa, J.H. Dong, H. Ohashi, R. Kaigome, F. Saiki, K. Yamane, H. Takagi, and H. Ueda "Ultra Q-bodies : quench-based antibody probes that utilize dye-dye interactions with enhanced antigen-dependent fluorescence" *Sci. Rep.* (査読有) 4, 2014, 4640, <http://dx.doi.org/10.1038/srep04640>
- 16) Y. Tone, M. Kawahara, D. Kawaguchi, H. Ueda, and T. Nagamune "Death signalobody: Inducing conditional cell death in response to a specific antigen" *Hum. Gen. Ther. Methods* (査読有) 24, 2013, 141-150, <http://dx.doi.org/10.1089/hgtb.2012.147>
- 17) Y. Ohmuro-Matsuyama, K. Nakano, A. Kimura, K. Ayabe, M. Ihara, T. Wada, and H. Ueda "A protein-protein interaction assay based on the functional complementation of mutant firefly luciferases" *Anal. Chem.* (査読有) 85, 2013, 7935-7940, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902573>
- 18) Y. Ohmuro-Matsuyama, C.I. Chung, and H. Ueda "Demonstration of protein-fragment complementation assay using purified firefly luciferase fragments" *BMC Biotechnol.* (査読有) 13, 2013, 31, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23536995>
- 19) H.J. Jeong, Y. Ohmuro-Matsuyama, H. Ohashi, F. Ohsawa, Y. Tatsu, M. Inagaki, and H. Ueda "Detection of vimentin serine phosphorylation by multicolor Quenchbodies" *Biosens. Bioelectron.* (査読有) 40, 2013, 17-23, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.030>
- 20) S. Hasan, J. Dong, Y. Hara, Y. Morizane, F. Shibasaki, and H. Ueda "Protein-based open sandwich immuno-PCR for sensitive detection of small biomarkers" *Anal. Sci.* (査読有) 29, 2013, 871-876 (Hot Paper Award), <http://www.jsac.or.jp/analsci/abst.php/29/9/871/>
- 21) 阿部亮二, 大橋 広行, 上田 宏 "新規蛍光免疫測定素子(Q-body)による各種分子の迅速・簡便な検出法" *実験医学* (査読無) 31, 2013, 2153-2157.
- 22) Y. Hara, J. Dong, and H. Ueda "Open-sandwich immunoassay for sensitive and broad-range detection of a shellfish toxin gonyautoxin" *Anal. Chim. Acta* (査読有) 793, 2013, 107-113, <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.07.024>
- 23) C. Han, M. Ihara, and H. Ueda "Expression of an antibody-enzyme complex by the L-chain fusion method" *J. Biosci. Bioeng.* (査読有) 116, 2013, 17-21, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.012>
- 24) J. Dong, A. Sakurai, N. Nomura, E.Y. Park, F. Shibasaki, and H. Ueda "Isolation of recombinant phage antibodies targeting the hemagglutinin cleavage site of highly pathogenic avian influenza virus" *PLOS ONE* (査読有) 8, 2013, e61158, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061158>
- 25) K. Saka, M. Kawahara, H. Ueda, and T. Nagamune "Activation of target signal transducers utilizing chimeric receptors with signaling-molecule binding motifs" *Biotechnol. Bioeng.* (査読有) 109, 2012, 1528-1537, <http://dx.doi.org/10.1002/bit.24421>

- 26) K. Minami, M. Ihara, S. Kuroda, H. Tsuzuki, and H. Ueda "Open-sandwich molecular imprinting: making a recognition matrix with antigen-imprinted antibody fragments" *Bioconj. Chem.* (査読有) 23, 2012, 1463-1469, <http://dx.doi.org/10.1021/bc3000782>
- 27) X. Liu, M. Eichenberger, Y. Fujioka, J. Dong, and H. Ueda "Improved detection sensitivity and selectivity attained by Open-Sandwich selection of an anti-estradiol antibody" *Anal. Sci.* (査読有) 28, 2012, 861-867, <http://dx.doi.org/10.2116/analsci.28.853> (Hot Paper Award 受賞)

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) H. Ueda "How can we transform uni-functional proteins to sensors?", *20th YABEC symposium*, National Chung Cheng University, Chiayi, Taiwan (11/7, 2014) (招待講演)
- 2) 上田 宏. "生物発光・蛍光消光を利用した新規計測技術の開発", 生物発光化学発光研究会第 31 回学術講演会, 信州大学繊維学部(長野県上田市) (11/1, 2014) (招待講演)
- 3) 上田 宏. "発光酵素の反応分割による迅速高感度な相互作用検出系の開発", 日本生物工学会第65回大会, 広島国際会議場 (9/20, 2013) (招待講演)
- 4) 児島智樹, 大橋広行, 阿部亮二, 上田 宏 "複数結合ドメインの最適配置による高性能抗体結合素子の構築" 第 86 回日本生化学会大会 (ワークピア横浜, 9/11-13, 2014) (口頭発表)
- 5) 上田 宏, 阿部亮二, ジョンヒジン, 荒川 大, 山根亨介, 高木広明, 芳坂貴弘. "抗原結合により光る蛍光標識抗体断片 Quenchbody (Q-body)の開発", 第 13 回日本蛋白質科学会年会, 鳥取とりぎんホール (6/14, 2013) (招待講演)
- 6) 上田 宏, 阿部亮二, 高木広明, 芳坂貴弘. "抗原結合により光る蛍光標識抗体 Quenchbody (Q-body)の開発", 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場 (12/14, 2012) (招待講演)
- 7) 上田 宏, 阿部亮二, 大橋広行, 高木広明, 芳坂貴弘. "新規蛍光免疫素子 Quenchbody による各種バイオマーカーの迅速高感度検出", 日本プロテオーム学会 2012 年大会, 東京, 日本科学未来館 (7/27, 2012) (招待講演)
- 8) H. Ueda, R. Abe, H. Ohashi, H. Takagi, T. Hoshaka "Quenchbodies": quench-based antibody probes that fluoresce upon antigen binding", *Biosensors 2012*, Cancun, Mexico (5/16,

2012) (招待講演)

〔図書〕(計 5 件)

- 1) 阿部 亮二, 上田 宏 "抗体断片の蛍光技術を用いた迅速・簡便な検査キットの開発" 『最先端バイオマーカーを用いた診断薬 / 診断装置開発と薬事対応』第 12 章第 2 節 420 頁(p.335-338) ((株)技術情報協会, 東京; 2015). http://www.gijutu.co.jp/doc/b_1804.htm
- 2) 生物化学的測定研究会, 小林典裕, 上田 宏, 三宅司郎, 荒川秀俊編 "免疫測定法 ~基礎から先端まで" 335 頁 (41-46, 108-113, 158-166, 189-192), 講談社, 2014, <http://bookclub.kodansha.co.jp/product?isbn=9784061543850>
- 3) 上田 宏, 鄭 熙陳 "抗原結合により光る抗体 Quenchbody による,細胞周期依存的タンパク質リン酸化の検出" 実験医学増刊号「ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期 2013」 Vol.31, 222 頁 (p.194-200), 羊土社, 2013. <http://www.amazon.co.jp/実験医学増刊-Vol-31-No-2-ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期2013~がん治療と生命現象の解明をめざして-Vol/dp/4758103283>
- 4) 上田 宏 他, 「化学実験における事故例と安全」(田村昌三編著)386 頁(p.146-155) (オーム社, 東京; 2013).
- 5) 上田 宏 他, 第 7 版 化学便覧 応用化学編, Vol. 1. (日本化学会編) 1652 頁 (p.483-486) (丸善出版(株), 東京; 2013).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ

<http://www.ueda.res.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 宏 (UEDA, Hiroshi)
東京工業大学・資源化学研究所・教授
研究者番号：60232758

(2) 研究分担者

董 金華 (DONG, Jinhua)
東京工業大学・資源化学研究所・助教
研究者番号：80527838
(平成26年度より分担研究者)

(3) 連携研究者

松山 有紀 (OHMURO-MATSUYAMA, Yuki)
神戸大学・大学院工学研究科・
特命助教
研究者番号：30571088

(4) 研究協力者

阿部 亮二 (ABE, Ryoji)
ウシオ電機・研究員