

Title	抗原の蛍光レシオ検出が可能な遺伝的にコードされた新規抗体バイオセンサーの開発
Author(s)	Huynh Nhat, Phuong Kim
Citation	
Issue Date	2016-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/13532
Rights	
Description	Supervisor: 芳坂 貴弘, マテリアルサイエンス研究科, 博士

氏名	HUYNH NHAT PHUONG KIM		
学位の種類	博士(マテリアルサイエンス)		
学位記番号	博材第 396 号		
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 24 日		
論文題目	Novel genetically encoded antibody-based biosensors for fluorescence ratio detection of antigens (抗原の蛍光レシオ検出が可能な遺伝的にコードされた新規抗体バイオセンサーの開発)		
論文審査委員	主査	芳坂 貴弘	北陸先端科学技術大学院大学 教授
		大木 進野	同 教授
		高村 禅	同 教授
		筒井 秀和	同 准教授
		山口 浩靖	大阪大学 教授

論文の内容の要旨

Fluorescence biosensor is an indispensable method for tracking of small biomolecules or biological processes not only *in vitro* but also in living cells. Recently, Quenchbody, a novel fluorescence biosensor consists of an N-terminal fluorescently labeled antibody single-chain variable domain (scFv) has been reported. This biosensor allowed detection of antigen based on antigen-dependent removal of quenching effect on the labeled fluorophore. However, fluorescence intensity of single labeled Quenchbody depends on not only concentration of antigen but also amount of the biosensor in measuring sample. In addition, Quenchbody requires the incorporation of fluorophore-labeled nonnatural amino acid in a cell-free translation system, thus, limit its application in live-cell imaging. In this study, a new strategy for construction of antibody-based fluorescence biosensor in combination of Förster (or fluorescence) resonance energy transfer (FRET) and fluorescence quenching mechanisms was introduced to overcome the limitations of Quenchbody. First, fluorescence biosensors for detection of phosphotyrosine-containing peptides were developed by incorporation fluorophore-labeled nonnatural amino acid into the N-terminus of anti-phosphotyrosine scFv. This biosensor showed antigen-dependent fluorescence increase upon addition of phosphotyrosine-containing peptides. Fusion of fluorescent protein (FP) to the labeled scFv generated double labeled biosensors which allowed FRET between FP and labeled fluorophore and detection of antigen based on antigen-dependent enhancement of fluorescence ratio of fluorophore/FP. Next, genetically-encoded antibody-based fluorescence biosensors were constructed by substituting fluorophore-labeled nonnatural amino acid by protein-tag and its fluorescent ligands. The obtained biosensors exhibited fluorescence enhancement in the presence of antigens. In addition, type of fluorophore, linker length between fluorophore–ligand and orientation of protein-tag to scFv largely

affected fluorescence enhancement. Fusion of FP to protein-tag-scFv resulted in double labeled biosensors which showed FRET between FP and labeled fluorophore as well as antigen-dependent enhancement of the fluorophore, allowing fluorescent ratiometric detection of antigen. Finally, an application of the novel genetically-encoded antibody-based ratiometric fluorescent biosensor was demonstrated by expression of the biosensor on the surface of mammalian cells for detection of extracellular antigen. The advantage of the present strategy over conventional strategy for FRET-based biosensor construction is that no conformational change of backbone protein upon binding to analyte is required. Therefore, it is potentially applicable for various antigen-antibody pairs in not only diagnostic analysis but also live-cell imaging.

Key words: single-chain antibody, nonnatural amino acid, fluorescence biosensor, protein-tag, live-cell imaging.

論文審査の結果の要旨

蛍光分子を側鎖に持つ非天然アミノ酸のタンパク質への導入は、タンパク質の部位特異的蛍光標識を可能にしており、例えば一本鎖抗体に導入することで抗原の結合を蛍光強度変化により検出手法などへ応用されている。この検出手法は、抗原非存在下では一本鎖抗体に導入された蛍光分子は抗体内部のトリプトファン残基によって消光されるが、抗原の結合によりトリプトファン残基が内部に埋もれて蛍光消光が解消されることに基づいている。しかしながら遺伝コード化が可能な蛍光タンパク質とは異なり、この手法では細胞内で直接タンパク質を発現させることが困難であり、その応用範囲は限られていた。そこで本研究では、遺伝コード可能な抗体由来のバイオセンサー分子を新たに開発することを試みた。

まず、蛍光標識アミノ酸の導入と蛍光タンパク質の融合を組み合わせることで、蛍光強度および蛍光強度比の変化により抗原を検出できる抗体の合成を行った。リン酸化チロシンに対する一本鎖抗体に対して蛍光標識アミノ酸を無細胞翻訳系を用いて導入したところ、抗原を蛍光強度変化として検出できることを確認した。また、抗体に緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を融合することで、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) と蛍光消光を組み合わせ、抗原の結合を EGFP と蛍光分子の蛍光強度比の変化として検出できることも示した。このような蛍光強度比による検出は蛍光標識抗体の濃度には依存しなくなるため、細胞などの不均一系での測定に有用となる。

続いて、タンパク質タグとその蛍光標識リガンドを用いることで、細胞内で直接発現可能な抗体由来バイオセンサー分子の合成を試みた。SNAP タグタンパク質を一本鎖抗体に融合して蛍光標識リガンドを結合させたところ、従来法と同様に抗原の添加により蛍光強度が増加することが確認できた。さらに蛍光分子の種類やリンカー長を最適化した上で EGFP を融合させることで、抗原を蛍光強度比の変化として検出できることも確認された。そこで次に、この EGFP-SNAP タグ一本鎖抗体の融合タンパク質を細胞で発現させて、標的分子の蛍光イメージングへの応用を試みた。Hela 細胞の細胞膜上に発現させて抗原を添加した場合、抗原の結合を蛍光強度比変化としてイメージングできることが示された。さらに、骨肉腫由来細胞上に発現させ細胞分化に伴うオステオカルシン (骨形成バイオマーカー) の分泌を蛍光イメージングできる

ことも実証された。従来、特定の標的分子をイメージングするためにはそれを基質とする結合タンパク質を基にして蛍光タンパク質センサーを試行錯誤的に設計・合成する必要があったが、本手法では抗体を用いているために様々な標的分子（抗原）に対して汎用的に応用できると期待される。

以上、本論文は、遺伝コード化が可能でありつつ抗原の結合を蛍光強度比変化として検出可能な新たな抗体由来バイオセンサーの開発に初めて成功したものであり、学術的に貢献するところが大きい。よって、博士（マテリアルサイエンス）の学位論文として十分価値あるものと認めた。