UTokyo

PRESS RELEASE

東京大学

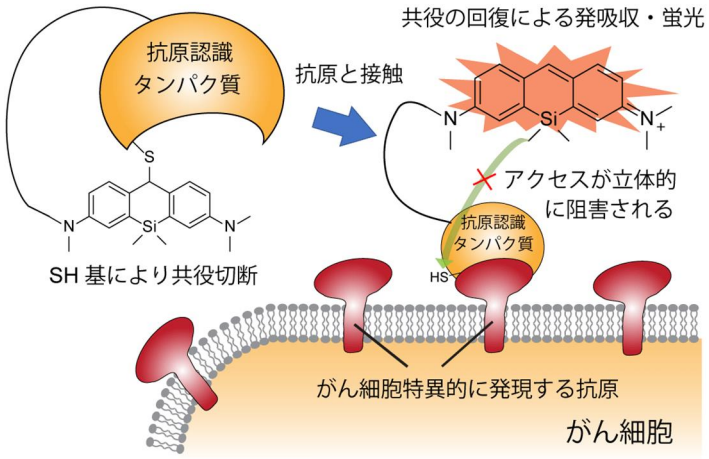
抗原に結合して初めて光る蛍光プローブの新規設計法
――チオールと蛍光団の可逆的付加反応を抗原検出に応用する――

発表のポイント

◆チオールと可逆的に反応する小分子蛍光団と抗原認識タンパク質を組み合わせて用いる独自のアプローチにより、がん表面抗原などの標的タンパク質に結合して初めて光る蛍光プローブの設計法を確立しました。

◆抗原に結合することで初めて光る蛍光プローブは、がんのイメージングや疾患の診断など様々な目的に有用だと期待されますが、その設計の難しさから抗原結合に伴って大きな蛍光上昇を示すプローブの開発は困難でした。本研究はこの問題を解決する新しいプローブ設計法を考案したものです。

◆開発したプローブは、手術中にがんを取り残しなく切除するためのがん検出蛍光プローブとして利用できると期待される他、確立したプローブ設計法は、様々な抗原の検出法の開発に応用できると期待されます。



開発したがん表面抗原検出プローブの概要。抗原結合前には蛍光が OFF で、抗原結合後に蛍光が ON になる。

概要

東京大学大学院医学系研究科の中館眞美子大学院生(研究当時)、小嶋良輔准教授、同大学大学院薬学系研究科の清家直樹大学院生、橘椋助教、浦野泰照教授(同大学大学院医学系研究科兼担)らによる研究グループは、がん表面抗原などの標的抗原に結合するだけで大きな蛍光増強を示す蛍光プローブ(注 1)の新たな設計法を開発しました。本研究では、チオールとの可逆反応によって蛍光の ON/OFF が切り替わる蛍光団 SiP(注 2)と、部位特異的にシステインを導入した抗原認識タンパク質 DARPin(注 3)を組み合わせて用いました。SiP と DARPin を適切な形で複合体にすることで、抗原非存在下では DARPin 中のシステイン側鎖のチオールと SiP が付加反応して、蛍光を OFF にすることができる一方で、DARPin が標的抗原に結合すると、チオールと SiP の付加反応の平衡が解離方向に移動し、蛍光を ON することができることを見出しました。本研究は全く新しい化学的メカニズムに基づいて、”activatable”に抗原を蛍光検出することを可能にするものです。

発表内容

特定の生体分子と反応して初めて光る”activatable”型の蛍光プローブは、がんの蛍光ガイド手術や、疾患バイオマーカーの高感度な検出など様々な場面で活用できる有用なツールです。これまで、設計の容易さから、特定の疾患や細胞を特徴づける加水分解酵素を標的とした activatable 型蛍光プローブが多数開発されてきましたが、特別な活性を持たない任意の抗原に対しても、これを認識するだけで光る蛍光プローブが創出できれば、検出できるがんや疾患の種類が大きく拡張できると期待されます。一方で、抗原を認識するだけで光るプローブは、その設計の難しさからほとんど報告がなく、また既存のプローブに関しても、抗原認識に伴う蛍光の上昇度が十分でないという課題がありました。そこで本研究では、抗原を activatable に蛍光検出する新たな蛍光プローブの設計原理を確立することを目指しました。

我々は、当研究室においてこれまでに開発したチオールと可逆的に反応し蛍光団である SiP に注目しました。SiP は、チオールと反応することで、π 共役(注 4)が切断され、可視光領域における吸収と蛍光が OFF になる一方、この反応は可逆であるため、周辺のチオール濃度が低下すると、蛍光性を回復します。我々は、元来システインを持たない抗原認識タンパク質である DARPin に部位特異的にシステインを導入しておき、この DARPin に別途適切な形で SiP を導入しておくことで、抗原が存在しないときは、DARPin 中のシステイン側鎖のチオール基が SiP に付加して π 共役が切断される一方で、DARPin が抗原と結合すると立体構造の変化などにより SiP がチオールにアクセスできなくなり、この反応が解離方向にシフトし、蛍光が ON となるのではないかと仮説を立て(図 1)、このプローブデザインを検証することにしました。

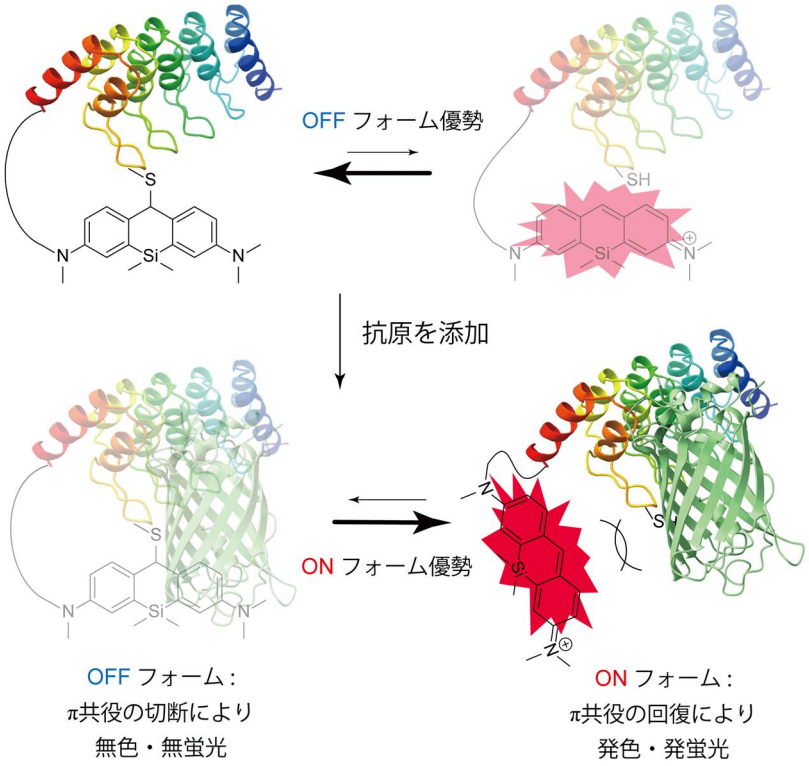


図 1：プローブ開発のコンセプト

抗原非存在下では DARPin 中のシステイン側鎖のチオールが SiP と反応して、無色無蛍光のフォームが優勢になる。抗原存在下では SiP とシステイン側鎖のチオールの反応が阻害され、平衡が偏って発色し、蛍光性を示す。

まず、緑色蛍光タンパク質 GFP をモデル抗原として、GFP に結合する DARPin を用いて検討を行いました。抗原認識部位の周辺のアミノ酸を一つずつシステインに置換した DARPin 変異体の C 末端にリンカーを介して SiP を結合した DARPin-SiP 複合体のライブラリーを用意し、抗原添加前後での蛍光特性を精査しました。すると、多くの複合体において抗原非存在下で DARPin に結合した SiP の可視光領域における吸収・蛍光が OFF になることがわかりました。さらに、特定の位置にシステインを導入した複合体は、GFP の添加に伴って瞬時に 25 倍もの蛍光上昇を示すことを見出し、本プローブデザインが有効であることが示されました(図 2a)。

次に、特定のがん細胞の表面に発現する抗原である EpCAM(注 5)を標的としたプローブも開発し、こちらも抗原結合にともなって、迅速に 12 倍以上の蛍光上昇を示すことを見出しました。複数抗原に対して同様のデザインでプローブが開発できたことから、本研究で提案する抗原検出プローブのデザインの汎用性が示されたと言えます。さらに、EpCAM 検出プローブを用いて、洗浄操作なしで、鮮明に EpCAM 発現がん細胞をイメージングできることを見出しました(図 2b)。 これは、常に蛍光シグナルを発する従来型の抗原認識タンパク質と蛍光団の複合体を用いる際には、余剰のプローブを洗い流さないとバックグラウンド蛍光が残ってしまうのと対照的であり、がんの術中蛍光イメージングへの応用などが期待できます。

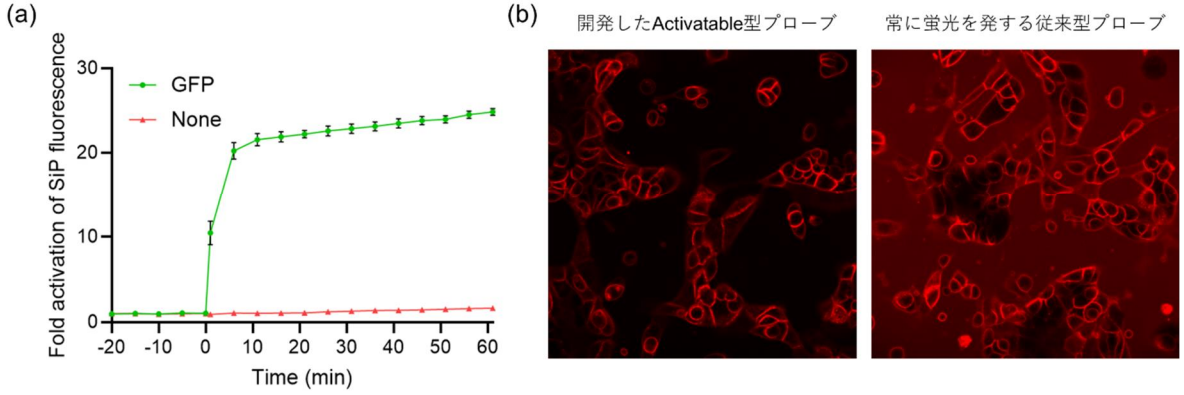


図 2：開発した抗原検出 Activatable 蛍光プローブのパフォーマンス

(a) Activatable GFP probe の、GFP 添加に伴う SiP の蛍光上昇 (b)EpCAM 陽性 Capan1 細胞(ヒトすい臓がん由来)の洗浄なしイメージング。開発した Activatable 型 probe を用いると、低バックグラウンドでイメージングできることがわかる。

さらに我々は、本プローブの OFF/ON メカニズムについて、量子化学計算を用いた構造モデリングも行いました。これにより、スクリーニングでヒットとなったプローブは、DARPin に導入したシステイン側鎖のチオールと SiP の反応性が、抗原結合時に立体障害などの要因により変化し、蛍光 OFF のフォームが抗原結合に伴って不安定化することで、ON 状態へと移行することが示唆され、本プローブがデザイン通りに機能していることが支持されました。

以上のように、本研究は、抗原に結合して初めて光る”activatable”型の蛍光プローブの設計原理を新たに開拓したものです。小分子とタンパク質のハイブリットによる新たな分子センサーの設計原理を拡張したという点で、化学的にインパクトのある成果であることに加え、今後標的抗原の拡張によって、多様な種類のがんイメージングをはじめとした様々な応用が期待されます。

発表者・研究者等情報

東京大学
　大学院医学系研究科
　　中館　眞美子　博士課程大学院生（研究当時）
　　小嶋　良輔　准教授

　大学院薬学系研究科
　　清家　直樹　博士課程大学院生
　　橘　椋　　助教
　　浦野　泰照　教授
　　兼任：東京大学　大学院医学系研究科　教授

論文情報

雑誌名：*Journal of the American Chemical Society*
題　名：Design of Antigen-Targeting Fluorogenic Probes Utilizing Intramolecular Addition Reaction of Protein-Dye Hybrids
著者名： Mamiko Nakadate, Ryosuke Kojima*, Naoki Seike, Ryo Tachibana, Kyohhei Fujita, Reiko Tsuchiya, Mako Kamiya, Andreas Plückthun, Yasuteru Urano*
DOI：doi.org/10.1021/jacs.5c04193
URL：https://doi.org/10.1021/jacs.5c04193

研究助成

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業(科研費) (課題番号：20H02874,24K01642, 24H00868, 22H04919)、JST 創発的研究支援事業(課題番号：JPMJFR214N)、JST さきがけ(課題番号：JPMJPR17H5)、JST 未来社会創造事業(課題番号：JPMJMI24G2) 、JST ムーンショット型研究開発事業(課題番号：JPMJMS2022)、Human Frontier Science Program (課題番号：CDA-00008/2019-C)、持田記念医学薬学振興財団研究助成、豊田理化学研究所研究助成、中谷財団研究助成、第一三共生命科学研究振興財団研究助成の支援により実施されました。

用語解説

（注 1）蛍光プローブ：蛍光色素に、特定のターゲット分子(可視化したいもの)に応答したときに蛍光シグナルが変化するような機能を付与したものを総称して、蛍光プローブと呼ぶ。
（注 2）SiP：我々は、以前に、細胞内に多く含まれる抗酸化剤であるグルタチオンのチオール基と可逆的に反応する色素, SiP650 を報告した。(関連情報:プレスリリース①) 本プレスリリース内では、省略して SiP と呼称する。
（注 3）DARPin : Designed Ankyrin Repeat Protein の略称。チューリッヒ大学の Andreas Plückthun 教授(本論文の共著者)らが開発した抗原認識タンパク質で、小さく、安定で、強い抗原結合能を持つ。抗体などの汎用される抗原認識タンパク質は通常システインを有し、これがタンパク質の立体構造保持などに重要な役割を果たしているが、DARPin は一般的にシステインを持たず

に機能する。この特性を生かして、本研究では、システインを DARPin に部位特異的に挿入することで、その側鎖のチオール基と SiP の反応の精密制御を狙った。
（注 4）π 共役：有機化合物において、二重結合と単結合が交互に連なることで、π 電子が分子全体に広がって非局在化する現象。適切な π 共役を持つ化合物は、可視光領域の光を吸収する特性を持つ(すなわち、色を持つ)一方、π 共役が切断されると、その特性が失われる(無色になる)。蛍光団は、励起光を吸収して励起状態になった後、ここからの緩和過程で蛍光を放出するが、π 共役が失われると、励起光を吸収できなくなる。このため、π 共役の切断・回復を、蛍光の OFF/ON のスイッチングに利用できる。
（注 5）EpCAM：Epithelial Cell Adhesion Molecule (上皮細胞接着因子)の略。細胞表面に存在する膜貫通型の糖たんぱく質で、細胞間の接着に関与する。特定のがん細胞で高発現することが知られるため、がんの診断や治療の標的として研究されている。

〇関連情報：
「プレスリリース① 細胞内物質を利用して”ひとりでに瞬く”蛍光色素～生きた細胞内の超解像イメージングに応用～」（2020/07/17）
https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/z0508_00053.html

問合せ先

（研究内容については発表者にお問合せください）

東京大学大学院医学系研究科
准教授　小嶋　良輔(こじま　りょうすけ)
Tel：03-5841-3568　E-mail：kojima@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院薬学系研究科/大学院医学系研究科
教授　浦野　泰照 (うらの　やすてる)
Tel：03-5841-3601　E-mail：uranokun@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院医学系研究科 総務チーム
Tel：03-5841-3304　E-mail：ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院薬学系研究科 庶務チーム
Tel：03-5841-4702　E-mail：shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp