

DARPin と機能性小分子蛍光団を活用した activatable 型抗原センサの開発

小 嶋 良 輔*

Activatable Antigen Sensors Utilizing DARPins and Functional Small-Molecule Fluorophores

Ryosuke KOJIMA*

Fluorogenic probes for antigens have valuable applications in medical diagnostics and imaging, but achieving a fast and substantial fluorescence enhancement remains challenging. Here, we present a new class of fluorogenic antigen probes designed using a conjugate of an antibody-mimetic DARPin containing a site-specifically incorporated cysteine and silicon-pyrone (SiP), which undergoes reversible reaction with thiol. Through library screening, we discovered that SiP absorbance and fluorescence are quenched by a cysteine-mediated addition reaction within the DARPin, and this equilibrium shifts toward dissociation upon antigen binding, triggering a rapid fluorescence increase. To demonstrate this design, we developed fluorogenic probes for GFP and EpCAM, achieving 25-fold and 12-fold fluorescence enhancements upon binding, respectively. The EpCAM probe further enabled high-contrast, wash-free imaging of cancer cells.

1. 研究背景・目的

特定の抗原を高感度に蛍光検出する技術は、がんを取り残しなく切除するための蛍光ガイド手術や、体液中の疾患バイオマーカーを検出など、様々な目的に有用である。中でも、抗原に結合することで初めてシグナルを発するようになる activatable 型蛍光プローブを開発することができれば、洗浄操作なしで、低バックグラウンドながん検出が可能になると期待される。一方で、その分子設計の難しさから、高性能の activatable 型抗原蛍光センサはこれまでほとんど報告されていない。そこで、本研究においては新たな設計原理に基づく activatable 型抗原蛍光センサの開発を目指した。

2. 発蛍光性抗原検出蛍光プローブの設計指針

蛍光団は励起光を吸収することで励起状態となり、緩和過程で蛍光を放出する。このため、蛍光の ON/OFF スwitchングは、励起光の吸収を制御するか、緩和過程での蛍光量子収率 (QY) を調整することで実現できる。多くの蛍光プローブは、OFF 状態と ON 状態での QY が大きく変化する、QY 依存型プローブである。これは、光誘起電子移動 (PeT) などを利用して、蛍光プロセスと非放射緩和プロセスの競合を適切に制御し、ターゲット分子を検出した際に QY を大幅に増加させるものである。数少ない蛍光検出發蛍光性プローブである Quenchbodies¹ も、トリプトファンからの PeT の程度を抗原結合に伴って変化させる QY 依存型のプローブであるが、抗原結合前の蛍光消光が十分にかけていないといったケースも多く、大きな蛍光上昇を示すプローブは限られていた。これに対し、吸収依存型プローブは、 π 非共役の完全に無色かつ無蛍光の分子と、 π 共役がつながった、有色な蛍光分子の間の平衡を、ターゲット分子を検出する前には完全に無色の状態に大幅に偏らせ、検出後に有色・蛍光結合後に蛍光を発する状態に逆に大きく偏らせる、という形で設計できるが、一般的に、QY 依存型のプローブよりも大きな activation を示すプローブの開発が可能である。一方、このような吸収依存性蛍光プローブが、抗原センサーに応用された例はほとんどない。我々は、優れた抗原検出プローブの創出を目指し、吸収依存型の抗原検出プローブの設計原理の確立を目指すこととした。

3. DARPin-SiP conjugate を基盤とした activatable 型抗原検出プローブ開発

当研究室において、シリルピロニン (SiP) と呼ばれる蛍光団が、生理的条件下でグルタチオンなどの SH 基を持つ分子と可逆的に反応することで共役が切断され、無色・無蛍光となることが見出されている²。我々は、この色素と、抗原認識タンパク質である DARPin (Designed Ankyrin Repeat Protein) を組み合わせて用いることで、吸収依存型の抗原蛍光センサーに応用することを考案した。すなわち、本来 Cys を有さない DARPin の抗原認識部位の近傍にシステイン (Cys) を導入し、更にこの DARPin の別の部位からリンカーを伸長してチオール (SH) reactive な蛍光団を導入することで、蛍光団が

2025年3月11日 受理

* 豊田理研スカラー

東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻

DARPin 上で、Cys の側鎖の SH 基と反応して可視領域の吸収・蛍光が消失するよう設計する。さらに、蛍光団と SH 基の反応が可逆であることを生かし、DARPin と抗原の結合によって蛍光団の SH 基へのアクセスが阻害されると、蛍光団と SH 基の平衡反応が解離方向に移動し、吸収・蛍光が回復するようにプローブ構造を最適化することを考えた(図 1)。

まず、様々な位置に Cys を導入した DARPin と SiP の conjugate のライブラリーを作製しスクリーニングを行った。GFP をモデル抗原として検討を行ったところ、多くの conjugate は DARPin 上の Cys 側鎖と、SiP の分子内付加反応によって消光可能であることがわかり、ここにさらに GFP を添加することで、即座に最大 25 倍の蛍光上昇を示す蛍光プローブを取得することに成功した(図 1a)。また、GFP 添加前後での SiP の吸収・蛍光変化を測定したところ、吸収・蛍光ともに大きく増強していることがわかり(図 1b)、設計通り吸収依存型の activatable 型蛍光プローブを創出できたことが確かめられた。

GFP プローブで Proof of Concept を取得することに成功したため、続いてがん表面抗原である EpCAM に対するプローブ(図 1c)を同様の流れでスクリーニングした。結果、EpCAM との結合に伴って、12 倍以上の蛍光上昇を示すプローブを取得することに成功した。複数の抗原に対して本設計法でプローブが開発できたことは、本デザイン手法の汎用性を示している。この EpCAM 検出 activatable 型蛍光プローブを EpCAM 発現がん細胞の生細胞イメージングに適用すると、洗浄なしで、明瞭ながんイメージングが可能であることが確認され、本プローブの有用性が確かめられた(図 1d)。

さらに、我々が開発してきたプローブの作動原理をさらに詳細に議論すべく、GFP, EpCAM に対する activatable probe に関して、計算化学的手法を用いて抗原結合前後での蛍光 OFF form, ON form でのエネルギー的な安定性についても評価を行ったところ、今回見出した activatable 型 probe の場合においてのみ、抗原存在下で ON form が OFF form より有利になることがサポートされ、今後 *in silico* デザインによって優れたプローブを開発できる可能性も示唆された。

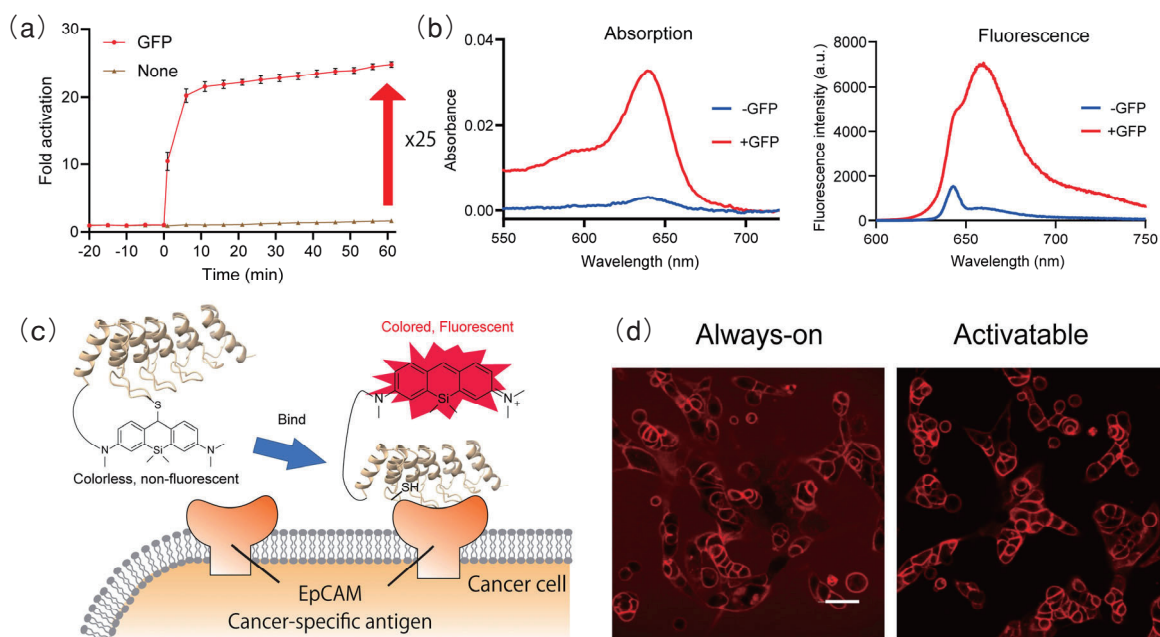


図 1 GFP もしくは EpCAM に結合して初めて光る蛍光プローブの開発。(a) GFP probe の activation. GFP を添加すると、大きく蛍光が上昇する。(b) GFP probe における GFP 添加前後での SiP の吸収・蛍光スペクトル。(c) EpCAM probe の概略。(d) Capan-1 細胞の wash-free imaging. Activatable 型 probe を用いると低バックグラウンドでがん細胞が可視化されていることがわかる。(from Nakadate, Kojima*, *et al.*, *ChemRxiv*, 2024, edited)

4. 最後に

ここまで、DARPin に部位特異的に導入した Cys と、チオール反応性蛍光団である SiP の付加反応を基盤とした発蛍光性抗原センサの開発について紹介した(Nakadate, Kojima* *et al.*, *ChemRxiv* 2024³)。未公開データの関係から、今回の報告では詳細に報告できなかったが、このほかにも DARPin 上の Cys を足場として吸収依存性の環境感受性色素を導入することで抗原を検出するタイプのセンサの開発も進めており、こちらでもがん表面抗原を認識することで、十～数十倍の蛍光上昇を示すプローブの開発にも成功してきている。こちらの技術についても折を見て別途紹介できれば幸甚である。

REFERENCES

- 1) *J. Am. Chem. Soc.*, **133** (2011) 17386-17394.
- 2) *J. Am. Chem. Soc.*, **142** (2020) 9625-9633.
- 3) *ChemRxiv*, 2024, doi:10.26434/chemrxiv-2024-3pplw.