

日本—シンガポール国際共同研究「バイオデバイス」 平成 28 年度 年次報告書	
研究課題名（和文）	細胞信号伝達機構を模倣した人工細胞系バイオセンサーの開発
研究課題名（英文）	“Proto-cellular Biosensors – Bioinspired devices that mimic cellular signal transduction machinery”
研究代表者氏名	上田 宏
研究代表者所属・役職	東京工業大学 科学技術創成研究院 化学生命科学研究所・教授
研究期間	平成 28 年 1 月 1 日～平成 31 年 3 月 31 日

## 1. 日本側の研究実施体制

ワークパッケージ①	既存の分割蛍光蛋白質・酵素系を用いた人工受容体の創出	
氏名	所属機関・部局・役職	役割
上田 宏	東京工業大学・化学生命科学研究所・教授	研究計画策定を含む全般
董 金華	東京工業大学・化学生命科学研究所・助教	タンパク質発現精製を含む実験全般
北口 哲也	早稲田大学・重点領域研究機構・主任研究員	タンパク質発現系構築を含む実験全般

ワークパッケージ②	新規ホモジニアス免疫測定系に基づく人工受容体の開発	
氏名	所属機関・部局・役職	役割
上田 宏	東京工業大学・化学生命科学研究所・教授	研究計画策定を含む全般
董 金華	東京工業大学・化学生命科学研究所・助教	タンパク質発現精製を含む実験全般

蘇 九龍	東京工業大学・大学院総合理工学研究科・修士課程学生	タンパク質発現精製を含む実験全般
------	---------------------------	------------------

ワークパッケージ③		新規相互作用検出系に基づく人工受容体の開発
氏名	所属機関・部局・役職	役割
上田 宏	東京工業大学・化学生命科学研究科・教授	細胞膜を介した発光検出系の計画策定
大室 有紀	東京工業大学・化学生命科学研究科・助教	細胞膜を介した発光検出系の構築・評価

ワークパッケージ④		プロトセルへの受容体組込みと信号伝達確認
氏名	所属機関・部局・役職	役割
上田 宏	東京工業大学・化学生命科学研究科・教授	受容体提示プロトセル作製の計画策定
董 金華	東京工業大学・化学生命科学研究科・助教	受容体提示プロトセル作製の構築

## 2. 日本側研究チームの研究目標及び計画概要

本研究の目的は、生体細胞の信号伝達系を模倣した新規バイオセンサーを確立することにある。具体的には巨大単層脂質小胞(プロトセルと呼ぶ)に酵素活性を持つ人工受容体を再構成し、リガンド存在下で発光あるいは蛍光を発する系を構築する。

これまで融合タンパク質を用いた数々の抗原検出系を構築してきた日本側チームと、細胞およびプロトセルの扱いとデジタル計測技術に長けたシンガポールチームとの共同研究により、効果的な国際共同研究の発展が期待される。

本年度は、複数の原理に基づいた人工受容体・プロトセル系を構築し、それぞれの特性を見極めつつ、来年度以降に注力すべき方向を見極めることを目標とする。

## 3. 日本側研究チームの実施概要

本年度は4つのワークパッケージ(WP)について研究を実施した。

WP1 “既存の分割蛍光蛋白質・酵素系を用いた人工受容体の創出”においては、分割タンパク質の再構成による活性化、あるいは不活性化単量体の二量体形成による活性化に基づく人工受容体のプロトセルへの再構成に基づくセンサーの構築を目指した。具体的には、細胞外ドメインとして抗体可変領域、細胞内ドメインとしてチロシンリン酸化型受容体を用いた人工受容体を構築し、真核細胞に発現させて抗原添加による増殖信号伝達を検討した。信号伝達が確認できたため、今後細胞内ドメインを分割酵素に変更することで多様なリガンドに応答する人工受容体の構築

を目指す。また、蛍光タンパク質と抗体との単量体融合タンパクに抗原応答能を付与することにも成功した(Wongso et al., *Anal. Chem.* in press)。

WP2 “新規ホモジニアス免疫測定系に基づく人工受容体の開発”においては、大腸菌βグルクロニダーゼ(GUS)変異体の多量体形成による活性化を原理とする人工抗原受容体系の構築を目標とした。本年度は、骨代謝マーカーとして用いられるオステオカルシン(BGP)ペプチド検出系の構築を行った。抗 BGP 抗体抗体可変領域に GUS 変異体を融合した 2 種類のプローブの抗原依存的な多量体形成による GUS 活性化により、BGP の検出に成功した。今後、膜貫通型プローブを構築することで、プロトセル型バイオセンサーへの適用を目指す。

WP3 “新規相互作用検出系に基づく人工受容体の開発”においては、ホタルルシフェラーゼ Fluc の 2 つの反応（アデニル化と酸化的発光）を変異導入によって分割し、2 つの変異体（中間体ドナー、中間体アクセプタ）の近接を発光で検出する FlimPIA 系の利用を検討した。具体的には、反応分割をより完璧に行いシグナル/バックグラウンド(S/B)比を高めるため、中間体アクセプタの酸化的発光活性を高める変異を見いだした。これをプローブとして用いた相互作用検出において、従来より高い S/B 比を得る事に成功した。

WP4 “プロトセルへの受容体組込みと信号伝達確認”においては、プロトセルへの効率的かつ機能的な人工受容体再構成法確立に関する検討を行った。本年度は、無細胞タンパク質合成系 PUREfrex をリン脂質を含む油相中で攪拌することで Water-in-oil(W/O)リポソームに封入し、遠心力によりこれを水相に移行させ W/O/W リポソーム中でプローブタンパク質合成を行わせる事を試みた。この結果、水相に蛍光基質を加えることで、野生型 GUS 遺伝子を系に加えた場合のみ蛍光を発する直径数ミクロンの粒子を観察することができた。今後、系の最適化により WP1~3 で開発中のプローブのプロトセル化を試みる予定である。

研究交流としては、日本側から博士課程学生の 2.5 ヶ月短期留学を含む延べ 80 日人以上の訪問と、シンガポール側から早稲田シンガポール研究所への 10 日人の訪問により、研究打ち合わせ、実験等を行い相互理解を深めた。