

日本—シンガポール 国際共同研究「バイオデバイス」 平成 29 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）	Protocellular Biosensors – Bioinspired devices that mimic cellular signal transduction machinery
日本側研究代表者氏名	上田 宏
所属・役職	東京工業大学 科学技術創成研究院・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

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
北口 哲也	東京工業大学・化学生命科学研究 所・特任准教授	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
大室 有紀	東京工業大学・化学生命科学研究 所・助教	細胞膜を介した発光検出系の構築・評価
蘇 九龍	東京工業大学・生命理工学院・ 博士課程学生	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

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に優先順位をつけてプロトセル系を構築し、それぞれの特性を見極めつつ、最終年度にいずれかの系を実現することを目標とする。なお、継続予定であったワークパッケージ③は、現状では発光強度的にプロトセルでの検出が難しいと判断されたため中断し、代わりにより強力な発光が得られる発光酵素 NanoLuc を用いた検出系の開発をワークパッケージ①にて行う。

3. 日本側研究チームの実施概要

本年度は主に3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。本年度は、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発光酵素 Nanoluc を用いた人工受容体を構築し、精製タンパク質を調製、あるいは無細胞系で発現させて抗原添加による信号伝達を検討した。この結果、溶液中において抗原結合により発光強度が 50~300 倍上昇し、発光が裸眼でも確認出来る系の構築に成功した(Ohmuro-Matsuyama et al., *Anal. Chem.*)。

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を構築し、論文発表(Su et al., *Analyst*)したほか、酵素の安定化とバックグラウンド信号低減に成功した。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。

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 PUREflex 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方法で、WP1 で構築した人工受容体系のプロトセルへの組込みを行った。この結果、合成した二つのタンパク質に膜貫通配列を介して付加した Nanoluc 由来ペプチドのうち一方は、効率よく膜提示されていることを示唆する結果が得られた。今後、もう一方のペプチドタグの配列を変更することで、応答を保ちつつ提示率が高まる配列の取得を目指したい。

また、WP には含まれないが A*STAR p53 Lab と、がん細胞における p53 検出系に関する共同研究を新たに開始した。

研究交流としては、日本側から修士課程学生の A*STAR 訪問を含む延べ 20 日以上の訪問と、シンガポール側から日本への 13 日の訪問、さらに数回の Skype ミーティングを含む研究打ち合わせ、2 回の合同シンポジウム等を行い相互理解を深めた。