

プログラム名：豊かで安全な社会と新しいバイオものづくり
を実現する人工細胞リアクタ

PM名：野地 博行

プロジェクト名：「つくる」人工細胞デバイス

委 託 研 究 開 発

実 施 状 況 報 告 書 (成 果)

平成28年度

研究開発課題名：

「豊かで安全な社会」の実現に資する蛍光プローブの開発研究

研究開発機関名：

国立大学法人東京大学大学院薬学系研究科

研究開発責任者

浦 野 泰 照

I 当該年度における計画と成果

1. 当該年度の担当研究開発課題の目標と計画

本研究開発では、蛍光プローブの持つソフトとしての「機能」を最大限に活用し、新たなプローブの開発と他参加研究者の持つ種々のハードウェア（マイクロデバイス、人工細胞リアクタなど）と組み合わせにより、「豊かで安全な社会」の実現に貢献する新たな観測・分析ツールの開発・市販化を狙う。本年度は、以下の3つの課題に関する研究を計画した。

1. 野地プログラム内共同研究のための新たな蛍光プローブの開発

新たに野地プログラムで必要とされる蛍光プローブの開発を行う。平成28年度は、研究開発責任者の持つ蛍光プローブの分子設計技術を活用し、pH 5程度の弱酸性環境下、かつ50°C程度の比較的高温条件下で酵素活性に応じて蛍光が上昇するセルラーゼ活性検出蛍光プローブを開発する。具体的には、研究開発責任者がこれまでに見いだしている新規蛍光プローブ母核に適切な置換基を導入し、上記環境下でセルラーゼ活性を鋭敏に検出可能なプローブを設計・開発する。パイロット蛍光プローブの開発に成功し次第、*in vitro*系での機能評価を行い、その後速やかに東京大学五十嵐グループによる酵素開発のためのスクリーニング系での運用を開始する。

具体的には、*in vitro*系での評価によって、最大到達点で5倍以上の蛍光強度上昇を見せるプローブを開発し、その後東京大学五十嵐グループとの共同によるスクリーニング系への適用開始までを達成目標とする。

2. 簡便迅速 ELISA 分析を可能とする新規 ELISA 用基質の開発

平成28年度は alkaline phosphatase をレポーターとする、大きな Stokes' shift を有する新規 ELISA 用基質の作製を目指す。

具体的には、50 nm 以上の Stokes' shift を実現する新規蛍光プローブ母核1種の開発を達成目標とする。さらに alkaline phosphatase をレポーターとする新規 ELISA 用基質の作製も目指す。

3. 単一酵素活性の精密検出による新たな疾患バイオマーカーの発見と臨床技術への応用

マイクロデバイスでの使用が可能な水溶性プローブ母核を開発する。平成28年度は、当研究グループで開発してきた緑色蛍光を発する母核に基づき、水溶性の十分に高い新規母核を開発し、そのマイクロデバイスでの機能検証を行う。

具体的には、緑色蛍光を発する水溶性の十分に高い蛍光プローブ母核1種を開発する。次に脱リン酸化酵素活性検出蛍光プローブを設計・開発し、*in vitro*での性能確認（最大到達点で5倍以上の蛍光強度上昇を見せるかどうか）、東京大学野地グループとの共同によるマイクロデバイスへと適用までを行う。

2. 当該年度の担当研究開発課題の進捗状況と成果

2-1 進捗状況

1. 野地プログラム内共同研究のための新たな蛍光プローブの開発

当研究グループで開発してきた新規蛍光プローブ母核にβ-グルコシドを導入した基質を開発し、*in vitro*酵素活性評価を行った。さらに本基質のマイクロデバイスへの適用を検討した。

2. 簡便迅速 ELISA 分析を可能とする新規 ELISA 用基質の開発

Alkaline phosphatase(ALP)により分解されることにより蛍光特性が変化し、かつその変化を大きなストークスシフトを持って検出可能な蛍光プローブの開発を行った。

3. 単一酵素活性の精密検出による新たな疾患バイオマーカーの発見と臨床技術への応用

マイクロデバイス実験に適合する蛍光母核を開発し、さらに ALP 活性検出用のプローブ開発をおこなった。実際に開発したプローブ群は、既存の蛍光プローブと比較してマイクロデバイス中で大幅な測定精度の向上を実現すること、さらには精製酵素だけでなく、生体サンプル中のアルカリホスファターゼ活性検出に関しても本蛍光プローブ群による活性測定が有用であることを示唆する実験結果を得た。

2-2 成果

1. In vitro での活性評価の結果、中性条件下で 600 倍、弱酸性条件下においても約 10 倍の蛍光上昇を示すことを確認した。さらにマイクロデバイスに適用したところ、 β -グルコシダーゼ活性を検出でき、十分なデバイス適合性があることが示された。

2. 大きな Stokes' shift を見せる新規蛍光母核の創出に成功した。また ALP の添加により大きな蛍光変化が見られる母核の開発にも成功した。

3. マイクロデバイス実験に適合する最適化されたプローブ母核の開発に成功した。さらに本年度の目標にあたる緑色蛍光プローブ群だけでなく、青色蛍光プローブの開発も達成し、これら多色のマイクロデバイス適合性の高い alkaline phosphatase (ALP) 活性検出蛍光プローブに関して特許出願を行った (特願 2017-041149)。実際に本プローブ群は、既存の蛍光プローブと比較してマイクロデバイス中で大幅な測定精度の向上を実現すること、さらには精製酵素だけでなく、生体サンプル中のアルカリホスファターゼ活性検出に関しても本蛍光プローブ群による活性測定が有用であることを示唆する実験結果を得た。

2-3 新たな課題など

なし。

3. アウトリーチ活動報告

なし。