

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29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。具体的には、各研究項目に以下の目標を設定して研究を行う。

1. ImPACT 内共同研究のための新たな蛍光プローブの開発

セルロース分解により生成するセルビオースを検出可能なアッセイ系の構築と必要な蛍光プローブを開発する。蛍光プローブが *in vitro* 系で最大到達点 5 倍以上の蛍光強度上昇を示すこと、および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

アルカリホスファターゼをレポーター酵素とし、マイクロデバイスでデジタル ELISA アッセイが充分に実施できる大きなストークスシフトを有する *activatable* 蛍光プローブ（基質）を開発することを達成目標とする。1 種類目の蛍光プローブのデバイスでの評価に応じて、2 種類目の蛍光プローブの開発を行う。

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

TokyoMagenta を母核とし、赤色蛍光を有する、マイクロデバイスへ適用可能である蛍光母核ならびにそれを用いた脱リン酸化酵素活性検出蛍光プローブの開発を行う。In vitro での性能確認後、マイクロデバイスへの適用までを達成する事を目標とする。

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

東大五十嵐グループによるバイオマス糖化スーパー酵素開発に必要とされる蛍光プローブの開発を行った。具体的には、セルロース分解の第一段階に関わるセルラーゼ活性を鋭敏に検出可能なアッセイ系を構築に必要な蛍光プローブの開発を行った。つまり、セルラーゼ酵素反応により生成するセルビオースを検出するべく、セルビオース脱水素酵素 (CDH) による脱水素反応により還元されて強蛍光性になる蛍光プローブを開発した。本項目は当初の計画通り進行した。

2. 簡便迅速 ELISA 分析を可能とする新規 ELISA 用基質の開発

本年度は、ELISA への応用を指向した蛍光プローブとして、アルカリホスファターゼに応答する大きなストークスシフトを有する *activatable* 蛍光プローブの開発に取り組んだ。本プローブ性能のデバイスでの評価は実施中であり、よって 2 種類目のプローブ開発の必要があるかどうかは検討中である。以上のように、本項目は当初の計画通り進行した。

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

TokyoMagenta を母核とし、赤色蛍光を有する、マイクロデバイスへ適用可能である蛍光母核ならびにそれを用いた脱リン酸化酵素活性検出蛍光プローブ開発を行い、その性能を *in vitro* で確認し、マイクロデバイスでのアッセイに適用した。本項目は当初の計画通り進行した。

2-2 成果

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

セロピオース脱水素酵素 (CDH) により、セルピオースがセルピオノラクトンに変換される際に起こるキノン等の電子受容体の還元反応に着目し、キノンの還元反応により蛍光を発する蛍光プローブ Q3-HMRG を合成した。また、CDH との *in vitro* での酵素反応アッセイを行い、Q3-HMRG が CDH により還元され、蛍光色素である HMRG を放出して蛍光を発することを確認した。現在、五十嵐グループにおいて評価中である。

2. 簡便迅速 ELISA 分析を可能とする新規 ELISA 用基質の開発

本年度合成した蛍光プローブの酵素反応特性を評価したところ、アルカリホスファターゼに対して鋭敏に反応し、蛍光波長が 100 nm ほどシフトすることを確認した。この結果より、当初の目標を達成した。

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

開発した赤色蛍光プローブに加えて青色、緑色蛍光を有する蛍光プローブを用い、複数の糖尿病患者検体及び健常者検体について血清中の phosphatase 活性の 3 色による 1 分子マルチカラーイメージングに成功し、検体間の活性パターンに差異を見出した。また、ImPACT 野地プログラム内にて MTA に基づく試料提供を行った。

2-3 新たな課題など

特になし。

3. アウトリーチ活動報告

なし。