

## 戦略的国際共同研究プログラム (SICORP)

### 日本-シンガポール「細胞の動的計測・操作を可能にするバイオデバイスの技術基盤の開発」領域 事後評価結果

#### 1. 共同研究課題名

「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」

#### 2. 日本ー相手国研究代表者名 (研究機関名・職名は研究期間終了時点) :

日本側研究代表者

上田 宏 (東京工業大学科学技術創成研究院・教授)

シンガポール側研究代表者

ショーン・フーン (科学技術研究庁生物医科学研究所・上級研究員)

#### 3. 研究実施概要

細胞外にごく微量で存在する特定の物質が細胞の受容体タンパク質と結合すると、受容体タンパク質が二量体化する。それとともに、細胞内でその物質に特異的な酵素反応 (応答) を生じている。本研究課題は、この分子機構に着想を得て、「特定の分子が人工細胞 (プロトセル) の細胞外にある人工受容体と結合する (受容される) と、2つのペプチド鎖が会合して二量体を形成する。二量体を形成すると、プロトセルの内部で蛍光が生ずる (応答する)」機構を利用した高感度なデジタル新規バイオセンサーを、シンガポール側と協力して創出することを目的としている。

実施計画：日本側は、次のような機能を示す人工的な受容体として、2つのペプチド鎖をデザインして作製する。このペプチド鎖はそれぞれ安定に存在していて、プロトセルの脂質膜を貫通している。プロトセル外には、ある分子とだけ結合する抗体タンパク質のエピトープ識別部分 (特定の物質を抗原として結合する部位) に由来する受容体が露出している。プロトセル内では、 $\beta$ -グルクロニダーゼ (GUS) 酵素または蛍光タンパク質を2つに分割した分子の断片をそれぞれのペプチド鎖が有している。エピトープ識別部分が特定の分子と結合すると、2つのペプチド鎖が会合して、二量体 (三、四量体の場合もある) を形成する。そうすると、プロトセル内の酵素または蛍光タンパク質のものの立体構造が復元することによって、酵素活性あるいは蛍光を発する (応答する) 仕組みになっている。一方、シンガポール側は、脂質単層膜から構成されるプロトセルを構築する。このプロトセルには核や小胞体などは無く、タンパク質合成システムとアミノ酸などを含有している。次に、シンガポール側が構築したプロトセル内で、日本側が作製したペプチド鎖の遺伝子からペプチド鎖を発現させる。

実施状況：日本側は、人工的なペプチド鎖をデザイン、作製したこれまでの豊富

な経験、知識をもとにして、多くのペプチド鎖を作製した。これらのペプチド鎖のうち、試験管内で特定の分子を加えたときにだけ、十分高い酵素活性や蛍光を復元するものを選抜した。シンガポール側はプロトセル作製を担当したが、「単層」膜を有する脂質小胞の作製は予想以上に困難をきわめた。これまでに報告されていた様々な脂質小胞作製のプロトコルをはじめとして、二次元アレイ型に配置したプロトセルの作製など独自の方法も検討した。そして新しい実験条件で作製したプロトセル内で、日本側が作製したペプチド鎖を合成した。ペプチド鎖の合成反応後、膜透過性の蛍光基質を加えて、蛍光顕微鏡で観察した。2つのペプチド鎖がプロトセルで合成されて、プロトセル外に計測対象の分子（この実験では二量体のエピトープ認識抗体）を加えたときにだけ、強い蛍光が観察された。プロトセル外に濃度 1 nM から 100 nM の計測対象分子を加えて、フローサイトメトリーを用いて蛍光を発している（蛍光陽性）プロトセルの数を数えたところ、分子の濃度とともに蛍光陽性のプロトセルが増えた。すなわち、特定の計測対象分子の濃度を、発光したプロトセルの数として（デジタル）検出することに成功した。

#### 4. 事後評価結果

##### 4-1. 研究の達成状況、得られた研究成果及び共同研究による相乗効果 （論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況を含む）

日本側は、応答酵素タンパク質として、熱安定化 **GUS** に最適な二量体間変異を導入することにより、非活性化状態では極めて低い活性しか持たないが、抗原あるいは抗 **His-tag** 抗体の添加により野生型酵素に匹敵する活性を示す新たなペプチド鎖 **Fv-GUSm(IV5)** を構築した。このタンパク質システムをプロトセルで発現させて、目標としていたプロトセル外からの抗体結合信号を内部の蛍光信号として観察することに成功した。ローダミン **B** で修飾した脂質を用いて 2 色のフローサイトメトリーを行った結果、まだ目標としていた検出系には感度が不十分であるものの、抗 **His-tag** 抗体を濃度 1-100 nM で検出するデジタル検出系の構築に成功した（事後評価時には、両国研究者の共著論文として投稿中）。

両国研究チームの交流は頻繁に行われた。日本側は初年度（3 カ月間）と 2 年度に早稲田バイオサイエンスシンガポール研究所 (**WABIOS**) に所属していた研究分担者が頻繁にシンガポール側研究室を訪問（延計 100 人日を超える訪問）し、相手側研究者も **WABIOS** を訪問して、相談をしながら研究計画を実施した。また、大学院生がシンガポールに 72 日間滞在して、相手側研究室で実験をおこなった。ほぼ 2 カ月に 1 回、海外出張とテレビ会議で交互の進捗状況を報告しあい、単独では見いだせないアイデアと実験材料の交換を行う事で独創性の高い成果をあげている。

また、共同研究 2 年度には、沖縄で開催された研究会や名古屋で開催された学会にシンガポール側研究者も参加して共同研究の成果について発表をおこなった。本研究課題の成果はすでに両国研究者の共著として、学術論文 1 件、学会

発表2件、シンポジウム2件として公表された。さらに、プロトセルにタンパク質複合体を発現させた人工の受容・信号伝達・応答システム系の作製については、現在、共著論文として投稿中である。また、日本側単独で発表した本研究課題に関連する原著学術論文は6編、国際会議口頭発表は1件、特許出願は6件である。

#### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、わが国の科学技術力強化への貢献

日本側は、このほかの応答システムとして、2つのタンパク質について機能検証に成功した。1つは緑色蛍光タンパク質 (GFP) である。円順列変異させたGFPの両側に2つの抗体可変部位ペプチドを挿入して、立体構造上GFPを分割したペプチドを設計した。すなわち受容タンパク質と分割した光応答タンパク質を一つのペプチドにしたものである。物質を受容すると受容タンパク質の立体構造が変化し、分割したGFPの立体構造が復元して、蛍光を発するという奇抜なアイデアを実現したものである。もう1つは深海エビの発光に関与するルシフェラーゼタンパク質 (Nanoluc®) である。3分割したNanoluc断片と受容タンパク質を組み合わせた3つのペプチドが物質を受容すると、Nanolucタンパク質の立体構造が復元して発光するという仕組みになっており、数~数百nMの濃度の物質を定量することに成功した。いずれの受容・発光システムも本研究課題で利用することはできなかったが、バイオセンサーとしてはとても優れている。将来、生命科学研究領域で、例えば、細胞内物質の定量やイメージングなどで利用されることが期待される。

これら2つの例だけでなく、本研究課題で利用している受容・応答システムは、分割したタンパク質が安定に存在して、そのままでは会合しないが、いったん会合するとタンパク質機能が回復するようにデザインしてある。このようなデザインをするためには、タンパク質の立体構造や機能発現に関する深い知識と経験が必要である。このようなデザインにおいて、おそらく世界中でも、この日本側チームが秀でていよう。

開発したプロトセル・センサーについて、両国研究グループが特許1件を国際共同出願した。近々PCT出願を予定しており、シンガポール側との共同での実用化展開が期待される。また、安定なレポーター酵素の構築にあたって見いだされた重要な二量体界面変異について、日本側単独で特許出願をおこなった。本変異体酵素は通常の免疫測定系を含む各種相互作用検出の簡便化に幅広く応用可能であり、学術研究のみならず産業の現場でも寄与することが期待される。

以上