

戦略的創造研究推進事業 さきがけネットワーク
研究課題「1 分子機能カウンティングから紐解く
高次生命科学」

研究終了報告書

研究期間 平成29年12月～平成31年3月

研究代表者：渡邊力也
(国研)理化学研究所、主任研究員

§ 1 実施概要

(1) 実施概要

本研究課題では、生体内のタンパク質を1分子ごとの機能レベルから理解する“1分子機能カウンティング技術”の概念提唱とその実装を目指した研究をおこなった。特に、理工・薬学の異分野の研究者から成るチームを形成し、分野融合によって上記を達成することを目指し、そのプロトタイプとなる技術開発を達成した。一部の成果については論文未発表であるが、タンパク質の機能を個々の分子ごとに理解して構成的な全体像の理解、特に疾患と関わる機能異常の理解を助ける方法論の提案という本研究の目的を達成する成果が得られたと考えている。以下に、それぞれの研究者の成果の概要を述べる。

(渡邊グループ)

高次生命現象の理解を推進すべく、膜タンパク質の網羅的な1分子機能解析法の実現を目指した。はじめに、従来法では定量計測が困難であった複数の膜タンパク質に関して、マイクロチップ技術を基盤とした1分子単位での機能計測法を開発した(*PNAS* 2018b:1 部未発表)。また、細胞機能を理解すべく、細胞内1分子計測を実現するマイクロチップ技術も開発し、1分子単位の計測から細胞運動の詳細に迫る研究成果を挙げた(*PNAS* 2018a, *eLife* 2018)。更に、物質の濃度勾配を定量的に形成できる新規技術をマイクロチップへ実装することに成功し、マイクロチップを利用した1分子計測法の汎用性・網羅性を高めることにも成功した(*Lab Chip* 2018: 特許出願済)。

(小松グループ)

酵素の機能に着目して、血液などの生体サンプル中のタンパク質を機能別に分類して一分子レベルで検出する機能カウンティング法の実現を目指した。はじめに、これに用いることができるレポーター分子の設計原理を確立し、実際に、アルカリホスファターゼをはじめとする疾患関連酵素を、サブタイプ別、1分子で検出定量するアッセイ法を確立した(特許出願済)。更に、この方法論を拡充するため、より多様なタンパク質の検出に本手法を利用できる仕組みを整備し、医療系研究者との共同研究を通じて、血液サンプルを用いた新規バイオマーカー探索の研究へと歩を進めた。この結果、これまでに報告のない、血中にごく微量存在する疾患関連タンパク質の発見と同定をおこない、その概念実証に十分に成功した(論文投稿準備中)。

(2) 顕著な成果

➤ 新規1分子機能カウンティング技術の開発

1. 物質濃度勾配の形成機構を実装したデジタル計測用マイクロチップの開発

1分子機能カウンティングの超並列化を実現すべく、物質濃度勾配の形成機構を実装したマイクロチップを開発した。当該技術を利用すると、基質濃度依存性などの情報を1枚のチップから簡便に取得することができるため、1分子機能カウンティングの汎用性を高める基盤技術の1つであると確信している。

原著論文

- ・ ***Watanabe, R.**, Komatsu, T., Sakamoto, S., & *Noji, H. “High-throughput single-molecule bioassay using micro-reactor arrays with a concentration gradient of target molecules” *Lab Chip* (2018) 18, 2849-2853

特許

- ・ マイクロリアクタチップ上での濃度勾配形成方法およびマイクロリアクタチップ
出願国：日本．出願番号：特願 2018-84809（2018 年 4 月 26 日）
発明者：渡邊 力也, 野地 博行

2. 脂質輸送体による脂質輸送の 1 分子計測技術の開発

非対称な脂質分布をもつ新規マイクロチップを開発し、脂質輸送体による脂質輸送活性の 1 分子計測に世界に先駆けて成功した。

原著論文

- ・ ***Watanabe, R.**, Sakuragi, T., *Noji, H., & *Nagata, S. “Single molecule analysis of phospholipid scrambling by TMEM16F” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2018) 115, 3066-3071

3. 細胞内の 1 分子計測を実現する新規マイクロデバイスの開発

細胞外基質のマイクロパターンニングデバイスや走化性誘導物質の濃度勾配をマイクロスケールで形成するマイクロデバイスを開発し、神経細胞の走触性・走化性に関わる生体分子の挙動を細胞内で 1 分子計測できる新規技術基盤を確立した。

原著論文

- ・ Baba, K., Yoshida, W., Toriyama, M., Shimada, T., Manning, C., Saito, M., Kohno, K., Trimmer, J., **Watanabe, R.**, & *Inagaki, N. “Gradient-reading and mechano-effector machinery for netrin-1-induced axon guidance” *eLife* (2018) 7, e34593.
- ・ Abe, K., Katsuno, H., Toriyama, M., Baba, K., Mori, T., Hakoshima, T., Kanemura, Y., **Watanabe, R.**, & *Inagaki, N. “Grip and slip of L1-CAM on adhesive substrates direct growth cone haptotaxis” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2018) 115, 2764-2769

4. 酵素機能カウンティングの方法論の確立と診断への利用

血中のバイオマーカーとなり得るリン酸エステル加水分解酵素を、その活性に応じて分類しつつ 1 分子ごとに検出する蛍光プローブ群を開発し、血液サンプル中の酵素活性検出とこれに基づく疾患の判別の可能性を示した（論文投稿準備中）。

特許

- ・ アルカリフォスファターゼ検出用蛍光プローブ及びその使用

出願国：PCT 出願. 出願番号：特 PCT/JP2018/ 7993 (2018 年 3 月 2 日)

発明者：浦野 泰照, 小松 徹, 坂本 眞伍, 野地 博行, 渡邊 力也, 張 翼

5. 酵素活性の網羅的検出の新たなアッセイ系の開発

酵素活性の網羅的検出 (enzymomics) に用いるアッセイ用の装置を開発し, 抗がん剤の代謝に関わる酵素活性の網羅的解析を実施した.

原著論文

- ・ *Komatsu, T., Shimoda, M., Kawamura, Y., Urano, Y. & *Nagano, T. “Development and validation of an improved diced electrophoresis gel assay cutter-plate system for enzymomics studies” *Biochim. Biophys. Acta* (2019) 1867, 82-87

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「渡邊」グループ

研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	渡邊 力也	理化学研究所	主任研究員	H29. 12～

研究項目

- ・ 膜タンパク質の1分子解析から高次細胞機能の理解を目指すボトムアップ型の研究

② 「小松」グループ

研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	小松 徹	東京大学 大学院薬学系研究科	特任助教	H29. 12～

研究項目

- ・ 疾患に由来する生体サンプル中の未知の疾患関連タンパク質を超高感度分析によって見出す
トップダウン型の研究

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・ シンポジウム開催（渡邊力也、小松徹）
 1. 第56回 日本生物物理学会年会シンポジウム
「1分子計測に立脚した新しいバイオ分析の潮流」
 2. 第91回 日本生化学会大会シンポジウム
「物理、化学の力で生物を理解する」