

日本—シンガポール国際共同研究「バイオデバイス」 平成 27 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”
研究代表者氏名	上田 宏
研究代表者所属・役職	東京工業大学資源化学研究所・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

ワークパッケージ①	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	
氏名	所属機関・部局・役職	役割
上田 宏	東京工業大学・資源化学研究所・教授	研究計画策定を含む全般
董 金華	東京工業大学・資源化学研究所・助教	タンパク質発現精製を含む実験全般
北口 哲也	早稲田大学・重点領域研究機構・主任研究員	タンパク質の進化を含む実験全般

ワークパッケージ②	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	
氏名	所属機関・部局・役職	役割
上田 宏	東京工業大学・資源化学研究所・教授	研究計画策定を含む全般
董 金華	東京工業大学・資源化学研究所・助教	タンパク質発現精製を含む実験全般

ワークパッケージ③	新規相互作用検出系に基づく人工受容体の開発	
-----------	-----------------------	--

氏名	所属機関・部局・役職	役割
上田 宏	東京工業大学・資源化学研究所・教授	研究計画策定を含む全般
大室 有紀	東京工業大学・資源化学研究所・助教（着任予定）	タンパク質発現精製を含む実験全般

ワークパッケージ⑤	プロトセル内信号増幅系の開発	
氏名	所属機関・部局・役職	役割
上田 宏	東京工業大学・資源化学研究所・教授	研究計画策定を含む全般
大室 有紀	東京工業大学・資源化学研究所・助教（着任予定）	タンパク質発現精製を含む実験全般

2. 日本側研究チームの実施概要

本年度は研究開始年度であり、年頭に他業務で訪問するシンガポールでミーティングを行い、今後の方針を確認した。その後も、月一回東工大ーA*STAR 間で Skype を用いたミーティングを行い、緊密な情報交換を行った。

主な成果としては、プロトセルへ適用する際にモデルとなるセンサー蛋白質として、抗原添加によりその蛍光強度が増大する融合タンパク質の構築が挙げられる。骨代謝マーカーであるオステオカルシンを認識する抗体 KTM219 の一本鎖可変領域 scFv を用いて、リンカー部分に円順列変異 GFP を挿入し、抗原依存的に最大 4 倍の蛍光増加を示す融合タンパク質を構築することに成功した。

また、プロトセルに適用可能な免疫測定用酵素として、大腸菌βグルクロニダーゼ(GUS)遺伝子の N 末側に、低分子抗原を認識する抗体の二つの可変領域ドメイン VH, VL をリンカーを介して結合させた、二つの融合タンパク質を作製した。この際、元来 4 量体で存在する GUS のドメイン間相互作用を弱めるため、その界面に存在する 2 残基に変異を導入し、抗原非存在時の相互作用を低減させた。モデル低分子 NP (4-hydroxy-3-nitrophenacetyl) に対する抗体を用いた 2 種類のコンストラクト(VH-GUSm, VL-GUSm)を大腸菌で発現・精製し、抗原有無の条件で酵素活性を吸光・蛍光基質で測定したところ、抗原依存的な最大 5 倍の活性上昇が、発色ならびに蛍光基質を用いた活性測定で観察された。また比活性も野生型酵素の 50%程度保持されており、測定時間は最短で 10 分程度であったことから、今後のプロトセル系への応用が期待できる。