

## 戦略的国際共同研究プログラム(SICORP)

日本－シンガポール共同研究

## 終了報告書 概要

1. 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. 研究期間：2016 年 1 月～2019 年 3 月
3. 主な参加研究者名：  
日本側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	上田 宏	教授	東京工業大学科学技術創成研究院	計画策定を含む研究全般
研究参加者	北口哲也	准教授	東京工業大学科学技術創成研究院	センサー蛋白構築・研究交流
研究参加者	大室有紀	助教	東京工業大学科学技術創成研究院	発光相互作用検出系構築
研究参加者	蘇 九龍	博士課程学生	東京工業大学生命理工学院	実験全般
研究期間中の全参加研究者数			4 名	

## シンガポール側チーム

	氏名	役職	所属	研究分担
研究代表者	Shawn Hoon	Senior Research Fellow	A*STAR	計画策定を含む研究全般
研究参加者	Cyrus Beh	Research Fellow	A*STAR	デバイス系の検討
研究参加者	Farid Ghadessy	Research Fellow	A*STAR	抗体エンジニアリング
研究参加者	Theresa Seah	Research Associate	A*STAR	デバイス構築
研究期間中の全参加研究者数			4 名	

## 4. 国際共同研究の概要

本研究においては、生体細胞の信号伝達系を模倣した新規バイオセンサー系の確立を目的とした。今回作製を試みたバイオセンサーは、特定の配列を認識して結合する抗体を外部から加える事で内部の酵素が活性化し、蛍光を発することで検出可能となる巨大単層脂質小胞(プロトセルと呼ぶ)からなる。実際にはプロトセル内で、ターゲット抗体が認識するエピトープ配列と膜貫通配列、さらに二量体化により活性化される酵素を無細胞タンパク質合成系を用いて合成しておくことで、プロトセル外にエピトープが提示され、抗体結合により内部の酵素活性が誘導され、これを蛍光検出できる系を構築することができた。プロトセルを用いることで、単独のリガンド結合信号を、活性化したプロトセル数のデジタル計測により洗浄操作なしに高感度に検出できた。

これまで融合タンパク質を用いた数々の抗原検出系を構築してきた日本側チームと、アイディアに富んだシンガポールチームの共同研究により、効果的な国際共同研究が行われた。今後はこの系を更に改良・デバイス化することで、任意のターゲットを安価にデジタル高感度検出できる系の構築が期待され、国際的な権利取得と早期実用化への発展が期待される。

## 5. 国際共同研究の成果

### 5-1 国際共同研究の学術成果および実施内容

シンガポール側チームの提案に基づき、当初の目標である、人工細胞に人工受容体酵素を組み込んだ検出系を構築し、フローサイトメトリーを用いて各種のエピトープ認識抗体量を蛍光陽性細胞数としてデジタル検出することに成功した。さらにエピトープの代わりに **SpyTag** を細胞外に提示することで二量体化した **SpyCatcher** を結合させて検出することにも成功し、近未来の抗原検出系への発展の可能性を示した。

### 5-2 国際共同研究による相乗効果

シンガポール側とは研究開始当初よりほぼ二ヶ月に一回、海外出張と **Skype meeting** 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ィアと実験材料の交換を行う事で独創性の高い成果を得ることができた。特に開始当初に北口博士現東工大准教授が所属した早稲田シンガポール研究所を効率的に利用し、相互交流を行った。また、シンガポール側メンバーを国内に招いて、他学会と共催で沖縄と名古屋で2回の国際シンポジウムを行った。

### 5-3 国際共同研究成果の波及効果と今後の展望

開発したプロトセルセンサーについて、国際共同特許一件を出願した。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、単独で特許出願を行った。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と期待され、今後国内外企業へのライセンスに積極的に取り組みたい。

Strategic International Collaborative Research Program (SICORP)  
Japan—Singapore Joint Research Program  
Executive Summary of Final Report

1. Project title : 「Protocellular Biosensors – Bioinspired devices that mimic cellular signal transduction machinery」
2. Research period : January 2016 ~ March 2019
3. Main participants :  
Japan-side

	Name	Title	Affiliation	Role in the research project
PI	Hiroshi Ueda	Professor	Tokyo Institute of Technology	Leading Japan team
Collaborator	Tetsuya Kitaguchi	Associate Professor	Tokyo Institute of Technology	Making fluorescent reporters
Collaborator	Yuki Ohmuro-Matsuyama	Assistant Professor	Tokyo Institute of Technology	Making bioluminescent reporters
Collaborator	Jiulong Su	PhD student	Tokyo Institute of Technology	Overall experiments
Total number of participants throughout the research period:				4

Singapore-side

	Name	Title	Affiliation	Role in the research project
PI	Shawn Hoon	Senior Research Fellow	A*STAR	Leading Singapore team
Collaborator	Cyrus Beh	Research Fellow	A*STAR	Making microdevices
Collaborator	Farid Ghadessy	Research Fellow	A*STAR	Antibody engineering
Collaborator	Theresa Seah	Research Associate	A*STAR	Making microdevices
Total number of participants throughout the research period:				4

4. Summary of the international joint research

In this study, we aimed to establish a new biosensor system that mimics the signal transduction system of living cells. The biosensor that we tried to make this time is made of large unilamellar lipid vesicles (protocells) that can detect an antibody recognizing a specific sequence displayed on the protocell, which activates the internal enzyme and emits fluorescence. In practice, the epitope sequence and transmembrane sequence was tethered to the enzyme sequence, which can be activated by dimerization. The protein is synthesized in the protocell, using a cell-free protein synthesis system, and the internal enzyme activity was induced by antibody binding, and we could construct a system capable of fluorescence detection. By using the protocell, single ligand binding signal can be detected with high sensitivity without washing operation by digital measurement of the number of activated protocells.

An effective international collaboration has been conducted by the collaboration between the Japanese team, which has built many antigen detection systems using fusion proteins,

and the Singapore team, which is full of ideas. In the future, further improvement and deviceization of this system is expected, and construction of a system that can detect arbitrary targets inexpensively and with high digital sensitivity is expected, and development of international rights acquisition and early commercialization is expected.

## 5. Outcomes of the international joint research

### 5-1 Scientific outputs and implemented activities of the joint research

Based on the proposal of the Singapore team, we succeeded in getting the primary goal to construct a detection system incorporating artificial receptor enzymes in artificial cells, and using digital detection to digitally detect the amount of various epitope-recognizing antibodies as the number of fluorescence-positive cells. Furthermore, we also succeeded to detect dimerized SpyCatcher by presenting SpyTag instead of an antibody epitope, and showed the possibility of developing an antigen detection system in near future.

### 5-2 Synergistic effects of the joint research

The Singapore and Japan sides report progress alternately with overseas business trips and Skype meetings almost once in every two months from the beginning of the research, and achieves highly creative results by exchanging ideas and experimental materials that cannot be found independently. In particular, the Waseda Bioscience Research Institute in Singapore (WABIOS), to which Dr. Kitaguchi (now in Tokyo Tech) belonged at the beginning of the project, was used efficiently to interact with each other. In addition, we invited members from Singapore side to Japan and held two international symposia in Okinawa and Nagoya jointly with other academic societies.

### 5-3 Scientific, industrial or societal impacts/effects of the outputs

An international joint patent was filed for the developed protocell sensor. We are planning to apply for PCT patent in the near future, and are expecting its commercialization jointly with Singapore. In addition, we filed patent applications for important dimer interface mutations found in the construction of stable reporter enzymes. This mutant enzyme is expected to be widely applicable to simplify the detection of various interactions including conventional immunoassay systems, and we hope to actively work on licenses to companies both in Japan and abroad.

## 国際共同研究における主要な研究成果リスト

### 1. 論文発表等

＊原著論文（相手側研究チームとの共著論文）

・査読有り：発表件数：計 1 件

1. J. Su, C. Beh, Y. Ohmuro-Matsuyama, T. Kitaguchi, S. Hoon and H. Ueda "Creation of stable and strictly regulated enzyme switch for signal-on immunodetection of various small antigens" *J. Biosci. Bioeng.* **2019**, in press.

・査読無し：発表件数：計 0 件

＊原著論文（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの論文）：発表件数：計 6 件

・査読有り：発表件数：計 6 件

1. H. Iwai, M. Kojima-Misaizu, J. Dong and H. Ueda "Creation of a ligand-dependent enzyme by fusing circularly permuted antibody variable region domains" *Bioconj. Chem.* **2016**, 27, 868-873 DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00040.
2. D. Wongso, J. Dong, H. Ueda and T. Kitaguchi "Flashbody: a next generation Fluobody with fluorescence intensity enhanced by antigen binding" *Anal. Chem.* **2017**, 89, 6719-6725 DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00959.
3. Y. Ohmuro-Matsuyama and H. Ueda "Homogeneous noncompetitive luminescent immunodetection of small molecules by ternary protein fragment complementation" *Anal. Chem.* **2018**, 90, 3001-3004 DOI: 10.1021/acs.analchem.7b05140
4. J. Su, J. Dong, T. Kitaguchi, Y. Ohmuro-Matsuyama and H. Ueda "Noncompetitive homogeneous immunodetection of small molecules based on beta-glucuronidase complementation" *Analyst* **2018**, 143, 2096-2101 DOI: 10.1039/C8AN00074C
5. Y. Ohmuro-Matsuyama, T. Yamashita, K. Gomi, H. Yamaji and H. Ueda "Evaluation of protein-ligand interactions using the luminescent interaction assay FlimPIA with streptavidin-biotin linkage" *Anal. Biochem.* **2018**, 563, 61-66 DOI: 10.1016/j.ab.2018.10.010
6. R. Dale, Y. Ohmuro-Matsuyama, H. Ueda and N. Kato "Non-steady state analysis of enzyme kinetics in real time elucidates substrate association and dissociation rates: demonstration with analysis of firefly luciferase mutants" *Biochemistry* **2019**, in press. DOI: 10.1021/acs.biochem.9b00272

・査読無し：発表件数：計 0 件

該当なし

＊その他の著作物（相手側研究チームとの共著総説、書籍など）：発表件数：計 0 件

該当なし

＊その他の著作物（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの総説、書籍など）：発表件数：計 6 件

1. Jinhua Dong and Hiroshi Ueda "ELISA-type assays of trace biomarkers using microfluidic methods" *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, e1457 DOI: 10.1002/wnan.1457
2. Jinhua Dong and Hiroshi Ueda "Open sandwich immunoassay and its applications" in *Advances in Medicine and Biology*, **2017**, 125. (ed. L.V. Berhardt) pp. 123-159 (Nova Science Publishers Inc., New York).
3. Ohmuro-Matsuyama and H. Ueda "Ultrasensitive Firefly luminescent intermediate-based Protein-protein Interaction Assay (FlimPIA) based on the functional complementation of mutant firefly luciferases" *Methods Mol. Biol.* **2017**, 1596, 119-130 DOI: 10.1007/978-1-4939-6940-1\_8

4. H. Iwai, M. Kojima-Misaizu, J. Dong and H. Ueda "Creation of antigen-dependent  $\beta$ -lactamase fusion protein tethered by circularly permuted antibody variable domains" *Methods Mol. Biol.* **2017**, 1596, 149-165 DOI: 10.1007/978-1-4939-6940-1\_10
5. Yuki Ohmuro-Matsuyama and Hiroshi Ueda "A Novel Protein-Protein Interaction Assay Based on the Functional Complementation of Mutant Firefly Luciferases: Split Structure Versus Divided Reaction" in *Protein-Protein Interaction Assays* (ed. Mahmood-Ur-Rahman Ansari) **2018**, 11-27 (IntechOpen, London) DOI: 10.5772/intechopen.75644
6. Yuki Ohmuro-Matsuyama and Hiroshi Ueda "Protein-protein interaction assays using split-NanoLuc" in *Bioluminescence* (ed. Hirobumi Suzuki) **2019**, in press (Intech Open, London) DOI: 10.5772/intechopen.86122

## 2. 学会発表

＊口頭発表（相手側研究チームとの連名発表）

発表件数：計 2 件（うち招待講演：0 件）

＊口頭発表（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表）

発表件数：計 15 件（うち招待講演：7 件）

＊ポスター発表（相手側研究チームとの連名発表）

発表件数：計 2 件

＊ポスター発表（相手側研究チームを含まない日本側研究チームの発表）

発表件数：計 10 件

## 3. 主催したワークショップ・セミナー・シンポジウム等の開催

1. SICORP 共催 第 7 回 ネオバイオ分子研究会, ネオバイオ分子研究会（根本直人・埼玉大学教授）/JST-SICORP, 沖縄県青年会館, 那覇市, 日本, 2017 年 7 月 6 日, 参加者数 25 名程
2. SCEJ 49th Autumn Meeting Symposium SY-73 - New Trends of Creation of Protein Peptides with Novel Functions, 化学工学会バイオ部会（中野秀雄・名古屋大学教授）, /JST-SICORP, Nagoya University, Nagoya, Japan, 2017/9/23, 参加者数 25 名程

## 4. 研究交流の実績（主要な実績）

### 【合同ミーティング】

- ・2016 年 1 月 6 日：キックオフミーティング、A\*STAR、シンガポール
- ・両国のチームメンバーを交えて Skype ミーティングを 2 月に 1 回開催した。

### 【学生・研究者の派遣、受入】

- ・2016 年 1 月～3 月：日本から学生 1 名が、約 3 ヶ月間相手研究機関に留学し、共同研究に関わる遺伝子組み換え等を行った。

## 5. 特許出願

研究期間累積出願件数：6 件

## 6. 受賞・新聞報道等

### 受賞

第1回日本生物工学会東日本支部長賞 大室 有紀, 2016/8/19

平成 28 年度酵素工学奨励賞 大室 有紀, 2016/10/7

第 25 回生物工学論文賞 董 金華, ジョンヒジン, 上田 宏, 2017/9/11

竹田国際貢献賞, 北口 哲也, 上田 宏, 2017/11/15

### 報道

2016/1/1 科学新聞, 日本とシンガポール, バイオデバイス開発で共同 JST が新規 3 課題決定

2017/6/23 日刊工業新聞低分子の抗原検出 東工大が蛍光たんぱくセンサー

2018/3/13 日経産業新聞 たんぱく質 高感度検出 発光酵素を混ぜるだけ 東工大が新手法血液検査に応用

政府広報誌 Highlighting Japan 2017/1 p.22-23 「違法薬物を光らせる」 2017/1/13 上田宏  
[http://www.gov-online.go.jp/eng/publicity/book/hlj/html/201701/201701\\_09\\_jp.html](http://www.gov-online.go.jp/eng/publicity/book/hlj/html/201701/201701_09_jp.html)

日経バイオテク バイオイメーキング最前線「蛍光蛋白質センサーをテーラーメイド化」  
2017/7/24 北口哲也 <https://bio.nikkeibp.co.jp/atclac/report/17/07/21/00089/>

Atlas of Science "Assaying protein-protein interaction by the complementation of firefly luciferase catalytic steps" 2017/12/12 大室有紀, 上田宏  
<http://atlasofscience.org/assaying-protein-protein-interaction-by-the-complementation-of-fire-fly-luciferase-catalytic-steps/>

## 7. その他

特になし