

化学拡張進化分子工学による蛍光センサー分子の構築原理の実証

研究代表者

伊藤嘉浩 国立研究開発法人理化学研究所



1. 研究の背景と達成目標

本研究では、従来の現存の生物機能を模倣するバイオミメチック発想ではなく、生物の生存戦略である「進化」を模倣することで新しい分子技術の方法論を確立し、任意の分子を感知し、信号発信できるセンサー分子への応用を図る。特に、生体分子だけでなく新たに機能を導入した人工分子のモノマー単位も組合せ、様々な配列のハイブリッド高分子を調製することにより配列特有の分子構造をもつ高分子ライブラリーを調製し（自然界の「突然変異」）、その中から機能化分子認識素子を選び（自然界の「淘汰」）、増幅する（自然界の「増殖」というプロセスを繰り返す（自然界の「進化」）方法論を確立する。従来、生体分子モノマーだけから行われてきた進化分子工学を、人工分子も含む系へ化学拡張する。そして、標的分子を精緻に分子認識し、蛍光信号を発する診断薬や分析試薬の創成へと応用展開する。

具体的には、環境変化によって蛍光を発する蛍光基、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)現象が生じるようなドナー、アクセプター基、あるいはシグナルを発信できる官能基を人工アミノ酸として、進化分子工学過程に組み込み、標的分子を分子認識できるペプチド配列を得る。選別された配列に基づき蛍光基導入ペプチドを有機合成し、標的分子との相互作用によって蛍光が発生、変化することによって信号を発する分子を構築できる原理の実証を行う。標的には、病原体、がんマーカーなどの臨床分析上重要なものを選ぶ、検体に混ざらただけで瞬時に蛍光測定できたる「その場」測定を可能にする。

主な研究成果と社会、学術へのインパクト

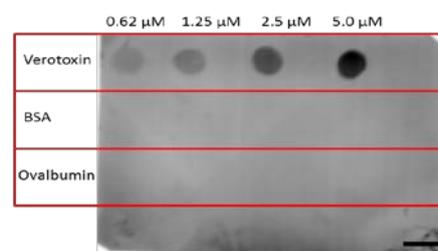
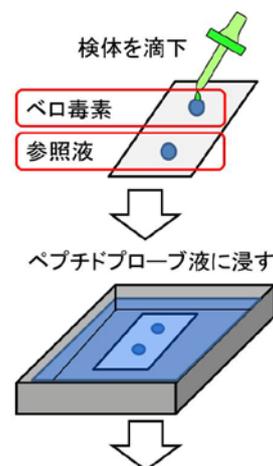
- ① 標的にベロ毒素タンパク質を用い、環境応答性蛍光分子導入系について進化分子工学選別し、標的との相互作用によって蛍光変化が起こることを明らかにした。がんマーカーとして HSP90 を用いた場合についても標的との相互作用で蛍光変化が起こることを明らかにした。
- ② 標的に不活化インフルエンザを用い、FRET 機構での検出を可能にする蛍光分子を選別した。
- ③ 電気化学重合可能な成分を導入して、インフルエンザを標的として検出可能なシステムの構築に成功した。

・研究成果

- ・ O-157 や O-111 に代表される食中毒を引き起こす腸管出血性大腸菌は、人の腸内においてベロ毒素というタンパク質を放出する。ベロ毒素は他のタンパク質の合成を阻害するため、激しい腹痛を引き起こし、血中にベロ毒素が取り込まれた場合には死に至ることもある。
- ・ 今回我々はベロ毒素を感知できるセンサーを作成することを目指して、ベロ毒素に対して特異的に結合し、結合すると蛍光強度が変化するペプチドプローブの開発に成功した。
- ・ 分子進化法を用いて、 10^{10} 程度の様々なペプチド配列の集団の中から、ベロ毒素に結合しやすいペプチド配列を

選出した。得られたペプチドプローブはペロ毒素と混合すると蛍光強度が低下する一方で、他のタンパク質等と混合しても蛍光強度に変化はなく、固相上でも検出可能となった。

- ・ 世の中のグローバル化とともに、エボラ出血熱ウイルスのようにアフリカでの感染症も国際的に急拡大するようになった。感染症ウイルスの早期検出は、感染拡大を防ぐ有効な方法である。
- ・ 我々はインフルエンザを例に、電化化学的に迅速に検出できる方法を開発した。チオフェンを結合したアミノフェニルアラニンをもつtRNAに担持し、無細胞翻訳系でランダム配列のペプチドライブラリーを作成し(リボソーム・ディスプレイ)、インフルエンザを結合したビーズを用いてアフィニティ・セレクションを行った。
- ・ 探索されたペプチド配列情報に基づき、ペプチドを合成し、インフルエンザ・ウイルスへの特異的結合が観測された。
- ・ 合成したペプチドのチオフェンは、そのままでは電気重合して電極表面に重合物が沈着して電流値を下げるものの、インフルエンザ存在下では重合が阻害され、重合物が生じず、インフルエンザ量に応じて直線的に電流値が上がるようになることがわかった。全く新しいタイプのセンシング・システムにすることができた。



ペロ毒素をスポットした点ではペプチドプローブ由来の蛍光強度が低く抑えられているものの、他のタンパク質をスポットした点ではペプチドプローブの蛍光強度に変化はない。

2. 今後の展開

抗体のように任意の標的を分子認識できるような分子を自由に作れる技術は、この四半世紀でアプタマーとして可能となってきたが、抗体の代替えでしかなかった。本研究では、抗体機能のもつ結合機能だけでなく、結合と同時に信号も発することができるというこれまでにない全く新しい機能を付与することに成功した。これは、有機化学とバイオテクノロジーを融合させた独創的な「バイオものづくり分子技術」といえる。本研究の人工分子を含んで任意の分子認識を創成できる概念は、これまでの化学、生物工学を超えた高いインパクトを生むことが期待できる。具体的には、生物学におけるバイオイメージングの研究領域や分析化学の研究領域に影響を与えるとともに、応用としては、医療分野はもちろん、環境分析などでも広く展開が期待できる。

3. 発表実績

論文発表（1件）

Yasodha Manandhar, Tara Bahadur K.C., Wei Wang, Takanori Uzawa, Toshiro Aigaki, and Yoshihiro Ito, "In vitro selection of a peptide aptamer that changes fluorescence in response to verotoxin", *Biotechnol. Lett.*, **37**(3), 619-625 (2015)

講演(5件)

Yoshihiro Ito, "Molecular evolutionary engineering for creation of functionally molecular recognizable peptides", ICSS meeting, Hong Kong, December 8, 2014. 他

特許出願(1件)

特願 2014-204677、伊藤嘉浩、多田誠一 「アプタマーを用いた被検物の電気化学検出法」、出願日：2014/10/03