

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成30年度研究進捗評価用〕

平成27年度採択分
平成30年3月19日現在

進化工学を利用した蛍光プローブの開発研究

Development of Fluorescent Probes with Molecular
Evolution Engineering

課題番号：15H05723

中井 淳一 (NAKAI JUNICHI)

埼玉大学・大学院理工学研究科・教授



研究の概要

蛍光タンパク質およびそれを応用した可視化技術は生物、医学分野で非常に重要な技術となっている。ペプチドアダプターは特定の分子と特異的に結合するペプチドであるが、本研究では（1）機能的アダプターを用いた蛍光プローブ開発、（2）ランダム配列を持つアダプターを用いた蛍光プローブの開発、および（3）高速スクリーニング法の確立を行う。

研究分野：複合領域

キーワード：脳機能プローブ、蛍光、分子進化、分子認識

1. 研究開始当初の背景

2008年にノーベル化学賞を受賞した下村博士が発見した緑色蛍光タンパク（GFP）がクローン化されてから、蛍光タンパク質およびそれを応用した可視化技術は生物、医学分野で非常に重要な技術となっている。我々はGFPをもとに蛍光Ca²⁺プローブG-CaMPや赤色蛍光カルシウムプローブ（R-CaMP）を開発してきた。これらのプローブは線虫、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウス、等多くのモデル生物で利用され、神経細胞の活動のモニターや、再生医療の基礎研究でも分化した細胞の活動のモニターに応用されている。一方、ペプチドアダプターは特定の分子と特異的に結合するペプチドで、通常ランダム配列の巨大なライブラリー中から選び出してくる。アダプターは近年、分子認識が可能な生体物質として、生物工学的応用、薬剤への応用が検討されている分子である。

2. 研究の目的

本研究ではG-CaMPの蛍光リポーター部分を用い、分子認識部分にペプチドアダプターを結合させ、種々の分子を認識できる蛍光プローブを迅速に作成する技術を開発する。

3. 研究の方法

本研究では（1）機能的アダプターを用いた蛍光プローブ開発、（2）ランダム配列を持つアダプターを用いた蛍光プローブ開発、および（3）高速スクリーニング法の確立、の3つの研究を行う。G-CaMPのリポーター部分にすでに基質に結

合することが確かめられている機能的アダプターや、ランダム配列を持つアダプターを結合させ、高速スクリーニング法により基質と結合する蛍光プローブをスクリーニングする。

4. これまでの成果

（1）機能的アダプターを用いた蛍光プローブ開発

緑色蛍光Ca²⁺プローブG-CaMPの蛍光素子部分を基に作製した改変GFPの両端に、リンカーペプチドを介して基質に結合する2種類のペプチドアダプターを遺伝子工学的に連結したライブラリーを作製した。今後、基質に対する結合活性を指標としてスクリーニングをおこなうことにより、基質結合活性を持つGFP融合アダプターを作成する。

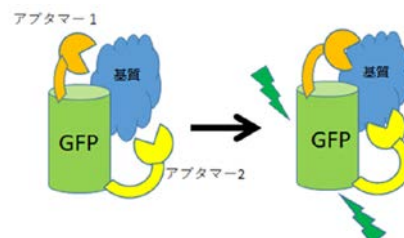


図1 ペプチドアダプターが基質に結合すると蛍光を発する蛍光プローブの模式図

また、アダプターの代わりに抗体を用いることによっても、機能分子プローブをシステムティックに作成できると考えられるため、このタイプのプローブについても作成し、蛍光特性を計測した結果、プローブとして有効であることを確認した。

(2) ランダム配列を持つアプタマーを用いた蛍光プローブ開発

一般に、プローブのスクリーニングのために核酸とタンパク質の対応づけを行う。この目的のために、しばしば核酸とタンパク質を融合させることが行われる。この過程で融合率が低いとライブラリーの収率の低下やライブラリーサイズの低下を引き起こす。我々は electrophoresis mobility shift assay (EMSA) を用いて融合効率を上げる検討を行った。その結果タンパク質と融合させる核酸の配列を選択することにより、融合効率を高めることができることを見出した (成果論文 3)。種々の融合手法を検討した結果、これまでよりも高効率に DNA 配列を、目的タンパク質をコードする DNA に結合させた DNA ライブラリーを作成できるようになった。

(3) 高速スクリーニング法の確立

セルソーターを用いたスクリーニング法は高速に多数の細胞や細菌、酵母、リポソームなどをスクリーニングし分取することができる。分子をスクリーニングするために、しばしば細胞やリポソームの表面に分子を固定化することが行われる。我々はリポソームにアンカーする新規ペプチドを開発した (成果論文 4)。このペプチドを用いて分子を細胞膜やリポソーム膜に効率的に固定化することが可能となった (図 2)。

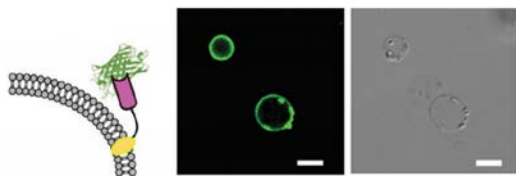


図 2 リポソーム膜にアンカーするペプチド (黄色の部分) を用いて GFP をトラップした (成果論文 4)

5. 今後の計画

(1) 機能性アプタマーを GFP に結合させた融合タンパク質は、今後蛍光特性についてより詳細に調べるとともに、分子進化の手法を用いてより高性能なプローブへと進化させていく。(2) ランダム配列を持つアプタマーを用いた蛍光プローブ開発に関して、今後さらに高収率なライブラリー作成法を検討していく。(3) 高速スクリーニング法開発について、セルソーターによる高速スクリーニング法の詳細を検討して、個々の実験者の実験手技の違いによる影響を少なくした精度の高いスクリーニング法を開発していく。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Gengyo-Ando K, Kagawa-Nagamura Y,

Ohkura M, Fei X, Chen M, Hashimoto K, Nakai J: A new platform for long-term tracking and recording of neural activity and simultaneous optogenetic control in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. **J Neurosci Methods**, 286, 56-68, 2017.

2. Sato M, Motegi Y, Yagi S, Gengyo-Ando K, Ohkura M, Nakai J: Fast varifocal two-photon microendoscope for imaging neuronal activity in the deep brain. **Biomed Opt Express**, 8, 4049-4060, 2017.

3. Takahashi K, Sunohara M, Terai T, Kumachi S, Nemoto N: Enhanced mRNA-protein fusion efficiency of a single-domain antibody by selection of mRNA display with additional random sequences in the terminal translated regions. **Biophys Physicobiol**, 14, 23-28, 2017.

4. Kobayashi S, Terai T, Yoshikawa Y, Ohkawa R, Ebihara M, Hayashi M, Takiguchi K, Nemoto N: *In vitro* selection of random peptides against artificial lipid bilayers: a potential tool to immobilize molecules on membranes. **Chem Commun (Camb)**, 53, 3458-3461, 2017.

5. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, Ogasawara T, Okada K, Shiba N, Sakamoto K, Ido D, Shiina T, Ohkura M, Nakai J, Uno N, Kazuki Y, Oshimura M, Minami I, Ikeda U: Allogeneic transplantation of iPSC cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. **Nature**, 538, 388-391, 2016.

6. Monai H, Ohkura M, Tanaka M, Oe Y, Konno A, Hirai H, Mikoshiba K, Itohara S, Nakai J, Iwai Y, Hirase H: Calcium imaging reveals glial involvement in transcranial direct current stimulation-induced plasticity in mouse brain. **Nat Commun**, 7:11100, 2016.

7. 大倉正道, 中井淳一: 高性能な赤色蛍光 Ca^{2+} プローブタンパク質. **化学工業**, 67, 13-20, 2016.

8. 熊地重文, 根本直人: 試験管内進化を加速する cDNA display システム. **酵素工学ニュース**, 76, 21-25, 2016.

9. 根本直人: cDNA ディスプレイによる機能性ペプチドアプタマーの創出. **生物学会誌**, 94, 481-484, 2016.

10. 安藤恵子, 中井淳一: カルシウムシグナル. **生体の科学 [増大特集]「細胞シグナル操作術」**, 66, 388-389, 2015.

ホームページ等

<http://subsi.saitama-u.ac.jp/>