

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06920

研究課題名(和文) 蛋白質間相互作用検出系FlimPIAの高感度多色細胞内検出系への発展

研究課題名(英文) Development of sensitive multi-colour detection using the protein-protein interaction assay, FlimPIA

研究代表者

大室 有紀(松山有紀)(Yuki, Ohmuro)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：30571088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質相互作用検出系は、生命現象の理解、及び疾病原因の解明、さらには病原菌・ウイルス等を検出するためのバイオセンサーを構築するために、必要不可欠な技術である。そのため、汎用性が広く、使いやすい技術が求められている。

本研究では、以前我々が構築したタンパク質間相互作用検出系FlimPIAを改良し、より実用性が高いタンパク質間相互作用検出系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FlimPIAにおけるプローブの熱安定性の向上：FlimPIAにおけるプローブの熱安定性を向上させることで、測定値の安定性が低く、またプローブの保存条件がやや厳しいという短所をなくす。

最小レポータータンパク質を利用したタンパク質間相互作用検出系の構築：ホタル由来発光酵素よりも小さなレポータータンパク質を利用することで、立体障害が小さく、プローブ作製が容易なタンパク質間相互作用検出系を構築する。

研究成果の概要(英文)：Protein-protein interaction assay is a key technology to understand life phenomena, make clear causes of diseases and create biosensors for detecting pathogenic bacterium and viruses. Therefore, wide usages and user-friendly procedures are desirable for protein-protein interaction assay.

In this study, we improved the protein-protein interaction assay, FlimPIA developed previously, and FlimPIA became a significantly practical method.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：タンパク質間相互作用 発光酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質相互作用検出系は、生命現象の理解、及び疾病原因の解明、さらには病原菌・ウイルス等を検出するためのバイオセンサーを構築するために、必要不可欠な技術である。そのため、汎用性が広く、使いやすい技術が求められている。

我々が構築したタンパク質間相互作用検出系 **FlimPIA** は、ホタル発光酵素の発光酵素の原理を利用している。ホタル由来発光酵素の発光反応では、2つの基質ルシフェリンと ATP のアデニル化反応により、反応中間体アデニル化ルシフェリンが産生され、続いて酸化的発光反応が起きる。本系では、酸化的発光反応が遅いが、アデニル化反応はほぼ正常なホタル由来発光酵素変異体 **Donor** と、逆にアデニル化反応が遅いが、酸化的発光反応はほぼ正常なホタル由来発光酵素変異体 **Acceptor** の2つを作製して、用いた。 **Donor・Acceptor** を相互作用タンパク質に各々融合させる。相互作用をしていない場合、 **Donor・Acceptor** の発光値は低い。一方、相互作用時、 **Donor・Acceptor** が近接するため、 **Donor** が産生するアデニル化ルシフェリンを用いて、 **Acceptor** が酸化的発光反応を起こすため、発光値が上昇する。

FlimPIA は、高いシグナルバックグラウンド比を有する、検出限界濃度が低いため微量な相互作用検出が可能である、従来法よりも大きなタンパク質の相互作用を検出できる、といった長所を持つ。

しかし、タンパク質間相互作用検出系の従来法の1つ、酵素を分断してプローブとして利用する **Protein-fragment Complementation Assay** と比較して、全長タンパク質を利用する **FlimPIA** では、37°Cの条件下で、同じホタル由来発光酵素を利用したプローブの熱安定性は4倍程度となったものの、熱安定性が低いホタル由来発光酵素の変異体を利用しているため、測定値の安定性が低く、またプローブの保存がやや厳しいという使いにくさがあった。加えて、ホタル由来発光酵素は比較的サイズが大きいタンパク質であるため、検出したい相互作用に対し、立体障害を起こす、あるいは、大腸菌等を利用したプローブ（ホタル由来発光酵素融合標的タンパク質）の発現・作製時に正しい形のタンパク質ができない可能性があった。

2. 研究の目的

以上の問題点を解決するため、下記の目的を掲げ、研究開発を行った。

1) FlimPIAにおけるプローブの熱安定性の向上：

FlimPIA におけるプローブの熱安定性を向上させることで、測定値の安定性が低く、またプローブの保存条件がやや厳しいという短所をなくす。

2) 最小レポータータンパク質を利用したタンパク質間相互作用検出系の構築：

ホタル由来発光酵素よりも小さなレポータータンパク質を利用することで、立体障害が小さく、プローブ作製が容易なタンパク質間相互作用検出系を構築する。

3. 研究の方法

1) FlimPIAにおけるプローブの熱安定性の向上：

従来の **FlimPIA** には、北米ホタル由来発光酵素を利用していたが、北米ホタル由来発光酵素よりも熱安定性が高いヘイケボタル由来発光酵素に、さらに熱安定性変異を導入した発光酵素を利用して、 **FlimPIA** のためのプローブを作製した。そのために、北米ホタル由来発光酵素の **Donor・Acceptor** と同様な変異をヘイケボタル由来発光酵素に導入したが、北米ホタル由来発光酵素を用いた **FlimPIA** と同様な性能を示さなかった。そこで、北米ホタル由来発光酵素の各変異導入位置と同じ位置のアミノ酸残基について、飽和ライブラリーを作製し、スクリーニングを行うことによって、プローブ (**Donor・Acceptor**) を作製した。

2) 最小レポータータンパク質を利用したタンパク質間相互作用検出系の構築：

サイズが大きく、複雑なタンパク質構造を持つホタル由来発光酵素を利用してプローブを作製することが難しい、迅速・簡便、かつ高感度な免疫測定系を構築するために、比較的発現が難しい抗体可変領域の VH-VL 間の抗原依存的な相互作用検出ができるプローブの開発を目指した。この抗原依存的な HV-VL 間の相互作用測定法をオープンサンドイッチ免疫測定法と呼ぶ。本法は、低分子でも非競合的に測定が可能な、高感度かつ広い濃度範囲で検出ができるという長所を持つ。

レポータータンパク質として、ホタル由来発光酵素のサイズが約 60 kDa であるのに対し、サイズが 19 kDa と小さく、さらにホタル由来発光酵素の 100 倍程度の発光値を示す NanoLuc を利用した。まず、NanoLuc を 18 kDa の LgBiT と 1 kDa の SmBiT に分割し、相互作用タンパク質にそれぞれ融合させると、相互作用時に LgBiT と SmBiT が近接するために、元の NanoLuc の構造が構成され、発光値が上昇するというメカニズムであるタンパク質間相互作用検出系 NanoBiT を用いてみた。そのために、VH に LgBiT、VL に SmBiT を融合させたプローブを大腸菌を用いて作製した。しかし、抗原を加えても VH-VL 間の相互作用検出ができなかった。

そこで、18 kDa の LgBiT を VH に融合させたため、正しいタンパク質の構造を持つプローブが作製できなかった可能性、または VH-VL の相互作用に対し、立体障害が起きた可能性を考え、LgBiT を 1 kDa の LcBiT と残り部分の LnBiT に分割し、VH に LnBiT を融合させ、VL に SmBiT を融合させた。その結果、添加した抗原濃度依存的に発光値の上昇が認められた。

しかし、NanoLuc は、同定されている発光酵素の中で最も発光値が高いことが最大の長所であるにも関わらず、相互作用による発光値は NanoLuc の発光値よりも著しく低かった。そのため、Dixon *et al.* の報告から、LgBiT との親和性が SmBiT よりも高い、複数の SmBiT 変異体を VL と融合させ、相互作用検出を試みた。その結果、ほぼ Signal/Background 比を維持し、高い発光値を示したことから、試みた変異体の中で最も LgBiT との親和性が高い HiBiT を選択した。

4. 研究成果

1) FlimPIA におけるプローブの熱安定性の向上 :

熱安定性変異導入ヘイケボタル由来 Donor と熱安定性変異導入ヘイケボタル由来 Acceptor の組み合わせで、抗生物質 rapamycin 依存的な FKBP12 binding protein 12 (FKBP12) と FKBP12-rapamycin binding domain (FRB) の相互作用検出を行った結果、Signal/Background 比は 3.5 であった。また、従来の北米ホタル由来 Donor と熱安定性変異導入ヘイケボタル由来 Acceptor の組み合わせで、FKBP12-FRB 間の rapamycin 依存 t 系相互作用を検出した結果、Signal/Background 比は 5.4 であった。

さらに、より簡易な測定を目指し、キッコーマン社が食品工場におけるバクテリア検査に用いている約 250 g のポータブル測定器、ルミテスターで測定した結果、後者の組み合わせで、Signal/Background 比、2.1 を得た。

熱安定性については、37°C で 20 分間、プローブをプレインキュベーションした結果、熱安定性変異導入ヘイケボタル由来 Donor と熱安定性変異導入ヘイケボタル由来 Acceptor の組み合わせ、北米ホタル由来 Donor と熱安定性変異導入ヘイケボタル由来 Acceptor の組み合わせで、インキュベーション前と比較した発光値は 58%, 72% であり、37°C で 20 分間、プローブをプレインキュベーションした結果、15%, 40% であった。

これらの結果から、感度向上のため Signal/Background 比の向上が課題となるものの、保存条件が通常の冷蔵庫程度で十分であり、さらに測定結果がばらつかない FlimPIA が構築されたと考えられる。

本研究の成果から、今後、診断・検査・公衆衛生等、FlimPIA が実用的に利用されることが期待される。

3) 最小レポータータンパク質を利用したタンパク質間相互作用検出系の構築 :

VH 融合プローブのサイズを小さくすることで、相互作用検出が可能になることを狙い、VH 融合プローブを 1 kDa の LcBiT に変更し、抗原 BGP-C7 (骨粗しょう症マーカー等として利用されるオステオカルシン (BGP) C 末 7 アミノ酸) を添加した結果、抗原濃度依存的発光値が顕著に上昇した。500 nM の濃度の BGP-C7 を添加することによる発光値の上昇は、50 倍以上であった。

さらに、再構成率を向上させるために、SmBiT を LgBiT と親和性が高い変異体に変更したところ、抗原応答性を保ちつつ、発光値が約 300 倍上昇した。さらに特筆すべき点として、50 nM 以上の抗原濃度で肉眼による観察が可能になった。今後、スマートフォン等による簡便な検出系への応用に繋りうる結果である。

1 kDa というサイズは、タンパク質間相互作用検出系のためのプローブにおいて、最小サイズである。そのため、検出したい相互作用に対し、立体障害を起こす、あるいは、大腸菌等を利用したプローブの発現・作製時に正しい形のタンパク質ができないといった問題を最小限にする。さらに、この成果は、簡便かつ、広い抗原検出濃度域を有するホモジニアスオープンサンドイッチ免疫測定法の実現でもある。さらに現在、LcBiT の配列最適化により感度が向上しつつある。

今後、従来測定が難しかった、様々なタンパク質における相互作用検出系、並びに各種

抗原の検出への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Ohmuro-Matsuyama Y, Yamashita T, Gomi K, Yamaji H, Ueda H. | 4. 巻 563 |
| 2. 論文標題 Evaluation of protein-ligand interactions using the luminescent interaction assay FLimPIA with streptavidin-biotin linkage. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Anal Biochem. | 6. 最初と最後の頁 61-66 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ab.2018.10.010. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 大室有紀・上田宏 | 4. 巻 90 |
| 2. 論文標題 Homogeneous Noncompetitive Luminescent Immunodetection of Small Molecules by Ternary Protein Fragment Complementation | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Analytical Chemistry | 6. 最初と最後の頁 3001-3004 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.analchem.7b05140 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 大室有紀・山下貴宏・Lin Huan・山地秀樹・上田宏 | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Improved sensitivity of firefly luminescent intermediate-based protein interaction assay using Ser 440 mutant with lower adenylation activity. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Luminescence | 6. 最初と最後の頁 125-130 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bio.3381. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件／うち国際学会 4件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hiroshi Ueda, Yuki Ohmuro |
| 2. 発表標題 Homogeneous noncompetitive immunological detection of small molecules by ternary luciferase fragment complementation (OS-BLIA) |
| 3. 学会等名 International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hiroshi Ueda, Yuki Ohmuro |
| 2. 発表標題 Mutant firefly luciferase with enhanced oxidative luminescent activity improved the response of protein-protein interaction assay FliMPIA |
| 3. 学会等名 International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuki Omuro, Hiroshi Ueda |
| 2. 発表標題 A Novel Protein-Protein Interaction Assay Based on the Functional Complementation of Mutant Firefly Luciferases: Split Structure Versus Divided Reaction |
| 3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大室有紀 |
| 2. 発表標題 発光酵素を用いたタンパク質相互作用検出系 |
| 3. 学会等名 LiHUB第5回創薬塾「創薬を目指した分子デザイン」(招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 大室有紀・上田宏 |
| 2. 発表標題 発光酵素を利用した蛋白質間相互作用検出系・免疫測定法 |
| 3. 学会等名 第4回化学発光イメージングワークショップ(招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大室有紀・五味恵子・山地秀樹・上田宏 |
| 2. 発表標題 発光酵素を用いたタンパク質相互作用検出系FlimPIAとストレプトアビジンビーズを用いた相互作用検出系の構築 |
| 3. 学会等名 生物発光化学発光研究会第34回学術講演会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大室有紀・五味恵子・山地秀樹・上田宏 |
| 2. 発表標題 ストレプトアビジンビーズを用いたタンパク質間相互作用検出系FlimPIAの応用 |
| 3. 学会等名 酵素工学研究会第80回講演会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大室 有紀 |
| 2. 発表標題 Development of ternary protein-protein interaction assay using peptide tags made from NanoLuc. |
| 3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大室 有紀・上田 宏 |
| 2. 発表標題 Mutant firefly luciferase with enhanced oxidative luminescent activity improved the response of protein-protein interaction assay FlimPIA |
| 3. 学会等名 ISBC2018（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大室 有紀・上田 宏 |
| 2. 発表標題 DEVELOPMENT OF RAPID IMMUNOASSAY USING NANOLUC-DERIVED PEPTIDE TAGS |
| 3. 学会等名 生物発光化学発光研究会第33回学術講演会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大室有紀・蘇九龍・高橋里帆・上田宏 |
| 2. 発表標題 NanoLuc由来ペプチドタグを用いた簡便迅速な免疫測定法の開発 |
| 3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大室有紀・上田宏 |
| 2. 発表標題 蛋白質間相互作用検出系FlimPIAにおける発光値の向上 |
| 3. 学会等名 酵素工学研究会第78回講演会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大室有紀・上田宏 |
| 2. 発表標題 DEVELOPMENT OF RAPID IMMUNOASSAY USING NANOLUC-DERIVED PEPTIDE TAGS |
| 3. 学会等名 Enzyme Engineering XXIV (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大室有紀・蘇九龍・上田宏 |
| 2. 発表標題 Development of rapid bioluminescent immunoassay using Nanoluc-derived peptide tags |
| 3. 学会等名 生物発光化学発光研究会第33回学術講演会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Yuki Omuro, Hiroshi Ueda | 4. 発行年 2018年 |
| 2. 出版社 IntechOpen | 5. 総ページ数 17 |
| 3. 書名 Protein-Protein Interaction Assays | |

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 大室有紀・上田宏 | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 SpringerLink | 5. 総ページ数 12 |
| 3. 書名 Method in Molecular Biology | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>日経産業新聞 大室有紀 助教、上田宏 教授 http://www.res.titech.ac.jp/news/award_release/release/20180313uk.html 極小サイズのペプチドタグで、蛋白質間相互作用を光で検出 http://www.res.titech.ac.jp/news/research/20190312uk.html 3タンパク質断片相補による均相系での低分子の非競合発光免疫測定系の構築 http://five-star.tagen.tohoku.ac.jp/results/distinguished_achievements.html FlimPIAについての新聞掲載 http://www.res.titech.ac.jp/news/award_release/release/20180313uk.html FlimPIAについての新聞掲載 http://www.res.titech.ac.jp/english/news/award_release/release/20180313uk.html FlimPIAの紹介 https://atlasofscience.org/assaying-protein-protein-interaction-by-the-complementation-of-firefly-luciferase-catalytic-steps/</p> |
|--|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|