

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：30110

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21686

研究課題名（和文）シリカ不織布と競合FRETを用いた細胞外メッセンジャー・イメージング法の開発

研究課題名（英文）Development of an extracellular messenger imaging method using silica nonwoven fabric and competitive FRET

研究代表者

谷村 明彦（Tanimura, Akihiko）

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：70217149

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、COOH基を付加したシリカ製不織布にBiotin-PEG11-Amineを共有結合させ、そこにアビジンを結合させた高容量シリカ不織布担体を開発した。また蛍光ラベルしたアビジンとビオチンの結合あるいは蛍光ラベルした抗BSA抗体とBSAの結合によるFRETシグナルの発生と競合物質によるシグナルの低下から、競合的蛍光リガンドアッセイ法および競合的蛍光抗原アッセイ法の基本原理を確認した。これらの技術を応用したCOVID-19の診断法を開発するために、SARS-CoV-2のアッセイ法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、アビジンとビオチンの結合や抗BSA抗体とBSAを利用したモデル実験および、SARS-CoV-2のスパイクタンパク質と抗スパイク抗体を使った応用実験で、競合FRET法の実用性が確認された。これらによって、競合FRET法が細胞外の生理活性物質のみならず感染検査への応用が可能であることが確認された。また高容量シリカ不織布担体をセンサー固定用担体として利用することで、フィルター型蛍光センサーという新しい測定ツールの開発に成功した。これによって、免疫クロマトグラフィー等を使った従来の迅速診断に替わる新しい迅速診断・検査法に発展する可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a high-capacity silica nonwoven carriers by covalently bonding Biotin-PEG11-Amine to a COOH group-coupled silica nonwoven fabric on which avidin was bound. The generation of the FRET signal by the binding of fluorescently labelled avidin to biotin or fluorescently labelled anti-BSA antibody to BSA and the reduction of the FRET signal by competing substances confirm the principle underlying the Competitive Fluorescent Ligand Assay and Competitive Fluorescent Antigen Assay methods. To develop a diagnostic method for COVID-19 based on these techniques, a new assay method was developed by using the spike protein ligand-binding domain of SARS-CoV-2, a pseudo-virus expressing the spike protein, and creating recombinant antibodies against the spike protein.

研究分野：薬理学

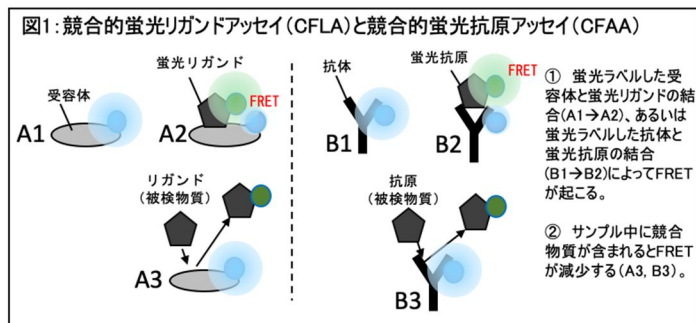
キーワード：蛍光アッセイ 抗原抗体反応 FRET 不織布 COVID-19 リガンド

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、蛍光タンパク質(CFP)とイノシトール三リン酸 (IP3) 受容体のリガンド結合ドメインの融合タンパク質(LBP-CFP)と蛍光リガンド (F-LL) の結合による強い蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用し、

F-LL と IP3 の競合による蛍光変化を利用した新しい測定法を開発した。蛍光標識した被検物質競合分子を使用するこの方法は、受容体とリガンドの結合に加えて、抗原抗体反応などの利用によって、様々な測定への応用が可能である。我々はこれ



らを競合的蛍光リガンドアッセイ(Competitive Fluorescent Ligand Assay=CFLA;図 1A)、および競合的蛍光抗原アッセイ (Competitive Fluorescent Antigen Assay=CFAA;図 1B) と名付け、「被検物質測定 FRET 分子センサー」として特許を取得した(特願 2015-096991, 特許 6551923)。

また我々は、蛍光センサーを固定する担体としてシリカ製不織布の利用を計画し、日本バイリン(株) 研究所との共同研究によって COOH 基を付加したシリカ製不織布 (COOH-不織布: 図 2A) を開発して特許出願した(特願 2018-179893)。COOH-不織布では、活性エステル化した COOH 基とタンパク質のアミノ基を共有結合させることによって、化学的に安定なセンサー担体の作成が可能になった。本研究では、このシリカ製 COOH-不織布をセンサーを固定する足場として利用し、CFLA あるいは CFAA を含む競合 FRET 法を使った細胞外分子の測定技術の開発を計画した。

COVID-19 の感染検査法として、唾液を使った PCR 検査や酵素免疫法 (EIA) を使った抗原検査が認可されたことで診断効率が飛躍的に向上した。一方、一般のクリニック等で実施可能なイムノクロマト法による簡易抗原検査では、唾液サンプルにおける感度の低下が問題となっていた。この状況は若干改善され、2 社製品において唾液を使った簡易検査キットが認可されている。そこで本研究では、このシリカ製 COOH-不織布を含むフィルター類と競合 FRET 法を応用して、唾液を使った感染検査法の開発を試みた。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光センサー分子を結合させる新素材として COOH 基を付加したシリカ製不織布 (COOH-不織布) と、新しい測定原理である競合 FRET を使った測定法を確立し、イメージングや定量解析に発展させることを目的として研究を行った。また本研究は、「生理活性物質と蛍光リガンドの競合」を原理とする競合的蛍光リガンドアッセイ(CFLA)と、「競合的蛍光抗原アッセイ(CFAA)」を実際の測定に活用することを目的とし、センサー分子あるいは被検物質を結合させたフィルターを使った測定法を開発した。さらに唾液を使った抗原検査法の開発に有用な新技術として、SARS-CoV-2 の Spike タンパク質を使ったウイルス検出法を開発した。

3. 研究の方法

(1) CFLA法の確立と応用：

IP3受容体のリガンド結合ドメインと蛍光リガンドを使って確立されたCFLA-IP3の原理が、IP3以外の物質の測定に利用できるか否かを確認するために、Protein Gビーズを使った抗体の定量 (CFLA-IgG) と アビジン・ビーズを使ったビオチンの定量 (CFLA-Biotin) を試みた。

(2) CFAA法の確立：

蛍光ラベルした抗体と蛍光ラベルした抗原ペプチドのFRETを利用して、未ラベルの抗原ペプチド濃度の測定するCFAA法を確立するために、抗BSA抗体とBSAを使ったCFAA法の最適化を行い、その結果に基づいて SARS-CoV-2のスパイクタンパク質に対する抗体とスパイクタンパク質を使ったCFAA-SPの確立を試みた。

(3) 高容量シリカ不織布担体の作成とFRET解析：

Biotin-PEG11-Amineを用いて不織布のCOOH基をビオチン化し、streptavidinを結合させたstreptavidin-不織布(SA-NWF)を作製して実験に用いた。

このSA-NWFをアミン反応性蛍光試薬Chromis 425N (1 μ M) でラベルした後、0.001 ~ 10 μ Mの蛍光ビオチンペプチド (F-SpyT-LHC) の結合を調べた。

4. 研究成果

(1) CFLA法の確立と応用：

CFLA-IgG：Chromis 425NでラベルしたProtein Gビーズに、Stellar Fluor NHSを結合させると、425 nmの励起光で発する525 nmの蛍光が認められた。しかしChromis 425NでラベルしたProtein Gビーズ単独およびStellar Fluor NHS単独の蛍光から、このシグナルはFRETでは無いと考えられた。

CFLA-Biotin：Chromis 425Nでラベルしたアビジン・ビーズに、蛍光ビオチンを結合させると、425 nmの励起光で発する525 nmの蛍光は大きく変化しなかったが、Chromis 425の蛍光が約50%に低下した。この結果から、FRET donorであるChromis 425の蛍光減弱による535nm蛍光の減弱によって蛍光ビオチンのFRETシグナルが相殺されたことがわかった。従って、425nmの励起光で発する蛍光比 (Em480/Em535) を測定することによってFRETを検出できることがわかった。

このCFLA-Biotinを最適化するために、0.01~3 μ Mの蛍光ビオチンを作用させてFRETを調べたところ、0.03 μ M以上の蛍光アビジンで

同等のFRETが起こることがわかった。但し、1 μ Mの蛍光ビオチンを用いた場合は、1時間でほぼ最大の反応が起こったのに対して、0.03 μ Mでは12時間の反応が必要であった。この2つの濃度を用いて、非ラベルビオチンとの競争実験を行ったところ、1 μ Mの蛍光ビオチンを用いた場合は0.3 μ Mのビオチンを検出したのに対して0.03 μ Mの蛍光ビオチンを用いた場合は0.03 μ M以下のビ

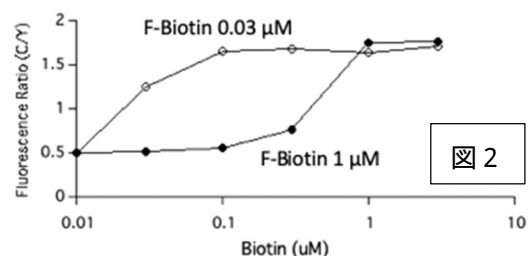


図 2

オチンを検出できることが確認された(図2)。

(2) CFAA法の確立:

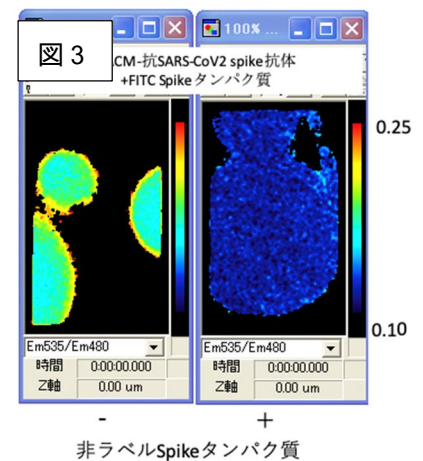
CFAA-BSA: FRET donorの最適化のために抗BSA抗体をChromis 425NとDACMで蛍光ラベルした後、Protein Gビーズに結合させて蛍光抗体ビーズを作成した。これにStella Fluore-NHSでラベルした蛍光BSAを結合させたところ、425 nmの励起による480nm蛍光が約30%低下し、535nm蛍光が2.5倍に増加した。またこの蛍光強度の変化はBSAの添加によって消失した。その結果、蛍光比480nm/525nmは、1から2.5に増大した。抗BSA抗体をChromis 425Nでラベルするとより強い蛍光が得られたが、蛍光BSAの結合によるFRET donorの蛍光減弱は認められなかった。従って、抗体のラベルはDACMを用いる事にした。

CFAA-SP: 上記の方法を用いてDACMラベルした抗SARS-CoV2 spike抗体をProtein Gビーズに結合させ、FITCラベルした recombinant Spikeタンパク質 (AA319-541) を結合させた。イメージング装置を使ってこのビーズの蛍光比(425nmの励起による535nmと480nmの蛍光比)を解析すると、recombinant Spikeタンパク質の結合によるFRETが、ラベルしていないSpikeタンパク質の添加によって妨害されて、蛍光比が低下することが確認された。特に抗原抗体反応が起こりやすいビーズの表面付近で蛍光比の増加が起こっていることが確認された(図3)。

抗体: $0.5\mu\text{g}$ (3.3×10^{-12} moles) / $100\ \mu\text{L}$;

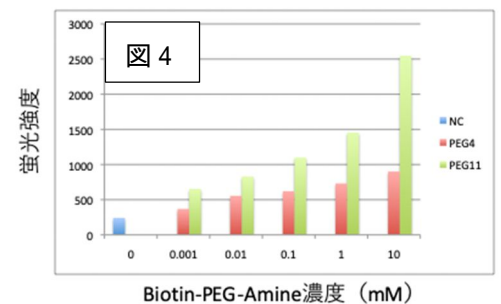
蛍光抗原: $0.18\mu\text{g}$ (5×10^{-12} moles) / $100\ \mu\text{L}$

非ラベル抗原: $1.8\mu\text{g}$ (5×10^{-11} moles) / $100\ \mu\text{L}$

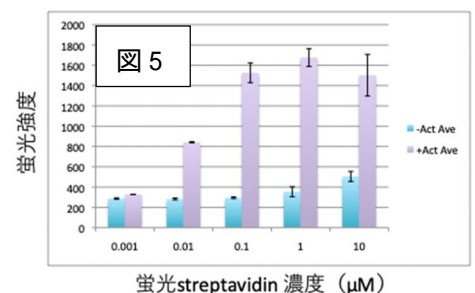


(3) 高容量シリカ不織布担体の作成:

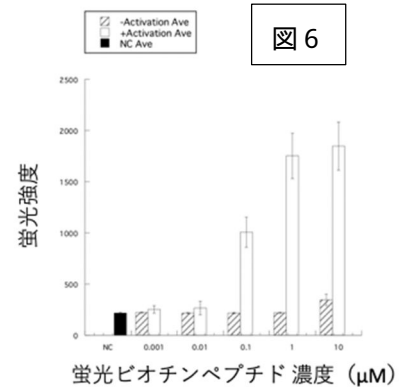
Biotin-PEG11-Amineとstreptavidinの濃度を最適化するために、シリカ製不織布に0.01~10 mMのBiotin-PEG11-Amineを作用させた後、1 μM の蛍光streptavidinを作用させて蛍光を測定した結果、Biotin-PEG11-Amineの濃度を上げてても非特異的結合を増加させることなく特異的蛍光が増加することがわかった(図4)。



次に10 mMのBiotin-PEG11-Amineで処理したシリカ製不織布を用いて、0.01~10 μM の蛍光streptavidinを結合させて最適化を行った結果、1 μM の蛍光streptavidinが良い事がわかった(図5)。



そこで10 mMのBiotin-PEG11-Amineと1 μ Mの streptavidinを用いて作成したstreptavidin-不織布(SA-NWF)を用いて、0.001~10 μ Mの蛍光ビオチンペプチド (F-SpyT-LHC) の結合を調べた結果、1 μ Mで最大の結合が得られることがわかった(図6)。



(4) 高容量シリカ不織布担体を使ったFRET解析:

次にこの実験系でChromis 425NラベルしたstreptavidinとF-SpyT-LHCの結合によるFRETを確認した(図7)。A,B,Cは、各々(A)Chromis 425N, (B)F-SpyT-LHC、(C) Chromis 425N+F-SpyT-LHC+FRETのシグナルである。

図7CはChromis 425ラベルしたstreptavidinにSpyT-LHCが結合しても蛍光強度は変化せず、F-SpyT-LHCの結合によってシグナルが増強することが明らかになった。

さらにChromis 425ラベルしたstreptavidinは、SpyT-LHCが結合しても蛍光が変化しないがF-SpyT-LHCの結合によって蛍光が低下した(図7A)。これはChromis 425とF-SpyT-LHCの間のFRETによって、蛍光DonorであるChromis 425の蛍光が低下したものと考えられた。また図7Bは、この蛍光ラベルの条件がstreptavidinとF-SpyT-LHCの結合に影響を与えない事が確認された。

	Ex436/Em485	Em485/Em535	Ex436/Em535		
NC	737	279	238	16	6
CH425-SpA	2743	297	483	165	4
F-STLHC	789	460	305	14	39
SAw/F-S	757	967	435	12	67
CH425-SpA	2759	284	470	147	5
CH425-SpA	1933	922	826	161	65

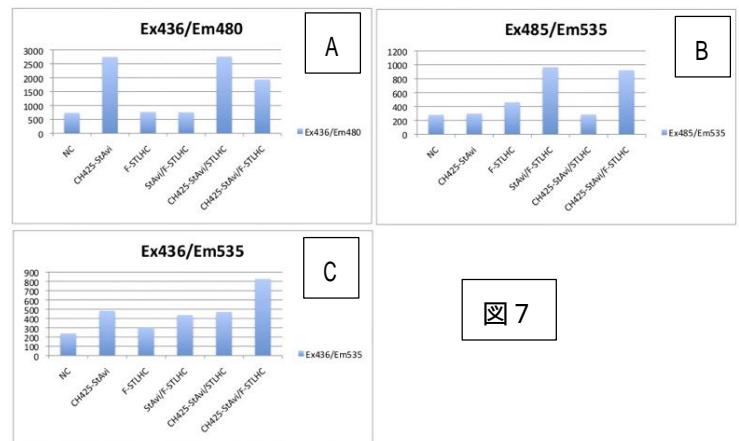


図7

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Minowa Erika, Hayashi Yoshinobu, Goh Kenji, Ishida Narumi, Kurashige Yoshihito, Nezu Akihiro, Saitoh Masato, Tanimura Akihiko	4. 巻 58
2. 論文標題 Enhancement of receptor mediated calcium responses by phenytoin through the suppression of calcium excretion in human gingival fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 274 ~ 282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.13089	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 AKTER MST Tahmina, NEZU Akihiro, AKAMATSU Tetsuya, TANIMURA Akihiko	4. 巻 44
2. 論文標題 Role of aquaporin 5 and glandular blood flow in the acetylcholine-induced secretion of saliva in rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 51 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.44.51	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 Jahan Azmerree, Akter MST Tahmina, Takemoto Kiwamu, Oura Tai, Shitara Akiko, Semba Shingo, Nezu Akihiro, Suto Satoshi, Nagai Takeharu, Tanimura Akihiko	4. 巻 108
2. 論文標題 Insertion of circularly permuted cyan fluorescent protein into the ligand-binding domain of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor for enhanced FRET upon binding of fluorescent ligand	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Calcium	6. 最初と最後の頁 102668 ~ 102668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ceca.2022.102668	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 ISHIDA Narumi, MURATA Kaori, MORITA Takao, SEMBA Shingo, NEZU Akihiro, TANIMURA Akihiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Spontaneous calcium responses of SF2 rat dental epithelial cells stably expressing the calcium sensor G-GECO	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.42.193	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 Takahashi Shigeru, Nezu Akihiro, Tanimura Akihiko, Nakamichi Yoshiyuki, Yamamoto Tsuneyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Responses of salivary glands to intake of soft diet	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 S1349-0079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2022.03.006	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 Yanuar Rezon, Semba Shingo, Nezu Akihiro, Tanimura Akihiko	4. 巻 66
2. 論文標題 Muscarinic acetylcholine receptor-mediated phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in HSY salivary ductal cells involves distinct signaling pathways	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 447-455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2024.02.002	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 Shimatani Mari, Morita Takao, Yanuar Rezon, Nezu Akihiro, Tanimura Akihiko	4. 巻 66
2. 論文標題 Local anesthetics inhibit muscarinic acetylcholine receptor-mediated calcium responses and the recruitment of -arrestin in HSY human parotid cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 465-472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2024.04.002	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 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 根津顕弘、MST Tahmina Akter、谷村明彦
2. 発表標題 AQP5レベルの異なるラット系統を用いた唾液分泌機構の薬理的解析
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rezon Yanuar, Shingo Semba, Akihiro Nezu, Takao Morita and Akihiko Tanimura
2. 発表標題 Carbachol and Pilocarpine activate ERK signaling via distinct mechanism
3. 学会等名 第66回日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 根津顕弘, 森田貴雄, 石井久淑, 谷村明彦
2. 発表標題 アセチルコリン刺激による顎下腺全体で起こるCa ²⁺ オシレーションと血流振動の制御メカニズム
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tahmina Akter, Akihiro Nezu, Akihiko Tanimura
2. 発表標題 Role of blood flow changes on acetylcholine-induced salivary secretion in rat strains with different level of aquaporin 5
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rezon Yanuar, Shingo Semba, Akihiro Nezu, Akihiko Tanimura
2. 発表標題 Muscarinic receptor agonists activate ERK signaling via distinct mechanism in salivary cells
3. 学会等名 第35回薬物作用談話会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷村明彦
2. 発表標題 ムスカリン受容体を介する細胞内シグナルと唾液分泌能の回復・維持・促進
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tahmina Akter, Akihiro Nezu, Akihiko Tanimura.
2. 発表標題 Elucidation of salivary secretion mechanism and development of novel treatments for dry mouth using different AQP5 expression rat strains.
3. 学会等名 第34回北海道薬物作用談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tahmina Akter, Akihiro Nezu, Akihiko Tanimura.
2. 発表標題 Acetylcholine-induced blood flow changes play important role for salivary secretion in different AQP5 expression rat strains.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根津顕弘、森田貴雄、石井久淑、谷村明彦.
2. 発表標題 アセチルコリン刺激によって生じる顎下腺のCa ²⁺ と血流オシレーションとその調節機構.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島谷真梨, 根津顕弘, 谷村明彦.
2. 発表標題 透明化技術を用いた扁平上皮癌細胞による骨破壊と骨形成抑制のイメージング解析.
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tahmina Akter, Akihiro Nezu, Akihiko Tanimura
2. 発表標題 Role of blood flow changes on acetylcholine-induced salivary secretion in rat strains differentially expressing AQP5
3. 学会等名 第65回日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根津顕弘, 森田貴雄, 石井久淑, 谷村明彦
2. 発表標題 アセチルコリン刺激により生じる顎下腺のCa ²⁺ オシレーションと血流振動の調節機構
3. 学会等名 第65回日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根津顕弘, 森田貴雄, 石井久淑, 永井健治, 谷村明彦
2. 発表標題 ラット顎下腺におけるアセチルコリンによる組織全体の同期するCa ²⁺ オシレーションと血流変動の関係
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Azmerree Jahan, Akihiro Nezu, Akihiko Tanimura.
2. 発表標題 Development of fluorescent biosensors using competitive FRET analyses.
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学位術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究分担者	根津 顕弘 (Nezu Akihiro) (00305913)	北海道医療大学・歯学部・准教授 (30110)	
研究分担者	森田 貴雄 (Morita Takao) (20326549)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	仙葉 慎吾 (Senba Shingo) (40466496)	北海道医療大学・歯学部・助教 (30110)	

	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
研究協力者	島谷 真梨 (Shimatani Mari)	北海道医療大学・歯学部・大学院生 (30110)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------