

生物発光タンパク質を用いた唾液中グルコースセンサーの開発

6年B組 大城 彩奈

指導教員 櫻井 昭

1. 要約

現在、多くの糖尿病患者が指先などを穿刺して採血する方法で血糖値を測定しているが、その生体侵襲的な方法を苦痛に感じる患者は多い。血液以外の体液を対象とした非侵襲的で高感度なバイオセンサーの開発は、この問題を解決する有効な手段である。本研究では、唾液中グルコース濃度の測定のための生体非侵襲型かつ高輝度生物発光グルコースセンサーとなるタンパク質の開発を行った。

キーワード グルコースセンシングドメイン(GBP) 発光タンパク質 蛍光タンパク質

2. 背景と目的

糖尿病は血中グルコース濃度(血糖値)が慢性的に高くなる病気で、病気の進行は脳梗塞や心筋梗塞をはじめとする様々な重大な疾患のトリガーとなる。世界における糖尿病患者数は現在5億3700万人であり、成人の10人に1人が罹患している現状があり、我々に非常に身近な現代の生活習慣病である。また、クウェートやポリネシアでは成人総人口の約30%の人々が糖尿病に罹患するなど、先進国だけでなく、発展途上国で特に大きな問題となっている。

糖尿病患者は血糖値を毎日測定し、管理する必要がある。現在多くの糖尿病患者は指先を穿刺して採血する方法で血糖値を測定しているが、その生体侵襲的な方法を苦痛に感じる患者は多く、針の穿刺によって傷口から感染症を引き起こすリスクも有する。また従来の血糖測定デバイスが高価であるため、途上国の人々は購入できず、十分な血糖管理が行えないことも大きな社会問題になっている。

血糖値と唾液中グルコース濃度には強

い正の相関があることを知られており、血液以外の体液を対象とした非侵襲的で高感度なバイオセンサーの開発はこの問題を解決する有効な手段である。今回は上記の課題を解決するため、生物発光タンパク質を用いた唾液中グルコースセンサーの開発に取り組んだ。

3. センサー原理について

3-1. 生物発光タンパク質とは

生物発光タンパク質は大きく分けて2種類、化学発光型タンパク質と蛍光タンパク質に分類できる。化学発光タンパク質はルシフェラーゼ反応により励起光なしで、化学発光を発するタンパク質で、発光基質が含まれていれば、励起光がない環境下でも発光する(図1)。一方蛍光タンパク質は励起光(エネルギー)を受容することによって高輝度で発光する性質がある(図2)。

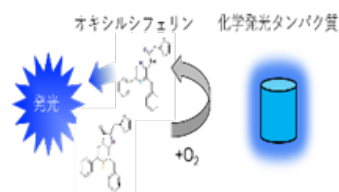


図1 化学発光タンパク質の発光原理

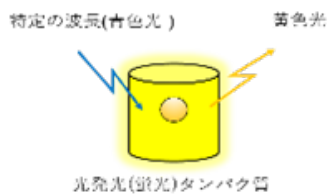


図2 蛍光タンパク質の発光

3-2. グルコース結合タンパク質とは

グルコース結合タンパク質 (GBP, MGLB) は自然界の多くの細菌中に存在し、ヒンジ運動によりグルコースが結合すると構造変化を行うタンパク質である(図3)。

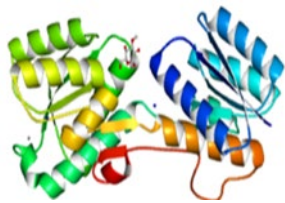


図3 GBP(MGLB)の構造

3-3. センサーの原理

本研究で開発したグルコースセンサーは、2種類の生物発光タンパク質と GBP(グルコース受容タンパク質)をアミノ酸で繋ぎ、連結させた合成タンパク質を用いて、グルコースを検出するプローブとして利用するものである。

まずグルコースがセンサーに加えられることによって GBP の構造が変化する。それによって GBP に連結した蛍光タンパク質と発光タンパク質のタンパク質間距離の変化が起こる。その変化によって化学発光タンパク質の発光エネルギーが共鳴エネルギー移動(BRET)し、蛍光タンパク質を励起、タンパク質の発光波長が変化することで、タンパク質の見かけの色の変化が起こる。加えたグルコース濃度に応じて発光-蛍光タンパク質間で

移動するエネルギー量が異なるため、見かけの発光色も異なる。この色の違いによって、グルコース濃度を検出するタンパク質センサーを開発した(図4)。



図4 センサーの発光色変化原理

4. 先行研究との相違点・新規性

先行研究では、植物体内の Mg イオンや Ca イオンの濃度を察知し、農学分野における利用を目的とした生物発光タンパク質型センサーが開発されている。しかしながら農学分野以外での物質センシングを目的とした生物発光型センサーは殆ど開発されていない。

本研究では先行研究で示された生物発光型センサーの Mg(Ca)イオンドメインをグルコースセンシングドメインに代替することによって、生体内グルコースを検出するセンサーのアイデアを着想した(図5)。また農学分野で広く用いられるセンシング手法を医学分野に応用することを目的とした研究に取り組んだ。

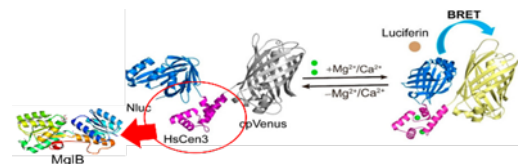


図5 先行研究との相違点

5. 実験

5-1.1. タンパク質の遺伝子設計とアミノ酸配列の検討・決定

本研究では Nanoluc (青色化学発光タンパク質)、GBP(グルコース受容タンパク質)、

ク質)、リンカーアミノ酸、Venus Δ 10
 または TdTomato(蛍光タンパク質)を連
 結させた。連結させる蛍光タンパク質を
 変えて、発光色変化が異なる二種類のセ
 ンサータンパク質(Venus 型、TdTomato
 型)を作製した。Venus Δ 10は黄色に蛍
 光し、Tdtomato は赤色に蛍光する。
 初めにセンサータンパク質の遺伝子を設
 計するため、Protein Data Bank より上
 記 4 種類のタンパク質の塩基配列を調査
 した。その塩基配列をタンパク質のシミ
 ュレーションソフトである Alpha Fold2
 に入力し最適なリンカーアミノ酸配列を
 検討し、それぞれのリンカーアミノ酸配
 列の構造を決定した。

リンカーアミノ酸は Venus 型では
 GACGGCGGCGTGCAGCTCGCCGACC
 ACTACCAGCAGAACACCCCATCGG
 CGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
 AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCgc
 cCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAG
 CGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGT
 TCGTGACCGCCGCGGGGgcatgcAA,
 gagctc の配列、TdTomato 型では
 ggcatgcAA, gagctc の配列に決定した。
 設計に基づいてプライマー、制限酵素、
 ライゲースを決定した。

5-1.2. plasmid 構築

まず GBP、Nanoluc、Venus Δ 10、
 Tdtomato の遺伝子を PCR 法を用いてク
 ローニングした。3つのタンパク質を結
 合させるためにアミノ酸のリンカーを挿
 入した。PCR では KODFXneo(東洋ライ
 フサイエンス社)を用いた。Miniprep を
 行った後に *Sph I*、*Sac I* を用いてシン
 グルダイジェスチョン(制限酵素処理)を 2

回行った。ゲルで分離した後、DNA 断
 片に T4 ライゲースを加え、ライゲーシ
 ョンを行った。その後 LB+Amp プレー
 トに植菌し 37℃で一晩培養した。65 μ l
 の Go Taq を用いて Colony PCR、シー
 ケンシング PCR を行い、plasmid のシー
 ケンシングを行った(図 7,8)。最後に Hi-
 Di ホルムアミドを用いた plasmid の精製
 を行った。



図 7 Tdtomato 型のシーケンス結果(赤色：TdTomato 紫：GBP 水色 Nanoluc)



図 8 Venus 型のシーケンス結果(黄色：Venus 紫：GBP 水色

5-1.3. 形質転換

作成した plasmid ベクターを細胞に添
 加し、30 分間氷上でインキュベートし
 た。その後ヒートショック(42℃、45sec)
 を行い、plasmid を導入した大腸菌をグ
 ルコース添加した LB 培地で (37℃、
 24hour) 培養したところ、二種類のセン
 サータンパク質(Venus 型、TdTomato
 型)を合成させることに成功した(図
 9,10,11)。



図 9 Plasmid を
組み込んでいない大腸菌

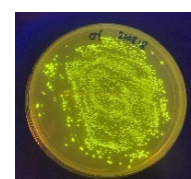


図 10 Venus 型 plasmid を
導入した大腸菌

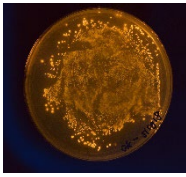


図 11 TdTomato 型 plasmid を導入した大腸菌

5-1.4 精製

センサータンパク質を合成させた大腸菌を遠心分離(8000 rpm、15 min)集菌し、超音波処理によってタンパク質を菌体外に抽出した。その後再度遠心分離(8000 rpm、20 min)し、菌体を除去した後に Ni+カラムを用い、センサータンパク質を抽出した。抽出したタンパク質に対し SDSPAGE を行いタンパク質精製及び分子量測定を行った。その結果、センサータンパク質の分子量の理論値(Venus 型 : 78kDa、TdTomato 型 : 100kDa)と同じ分子量のセンサータンパク質が合成されたことが確認でき、センサータンパク質の精製に成功した(図 12)。

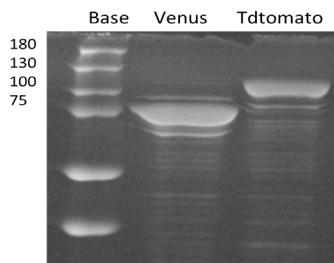


図 12 SDSPAGE で精製したセンサータンパク質

5-1.5 タンパク質量

精製したタンパク質濃度の定量には Bradford 法を用いた。BSA 標準溶液を作成し、タンパク質を添加・混合した後、595nm の波長で吸光度を測定した。吸光度を基にタンパク質を定量すると、Venus 型は 0.75mg/ml、TdTomato 型は 1.57mg/ml であり、センサータンパク質の定量に成功した。

5-2.1 センサータンパク質の性能評価

センサータンパク質のグルコースに対する結合親和性(発光色変化)の評価は、唾液中グルコース検出の最適条件および濃度を決定するために重要である。100 倍希釈したタンパク質をサンプルとして、分光光度計を用いてセンサータンパク質の性能評価を行った。センサータンパク質のグルコース添加前における蛍光波長を 400-650nm の波長を照射することで測定し、10mM のグルコース溶液を添加した。その後添加前と同様に蛍光波長を再度測定した。発光強度(発光量)は、蛍光タンパク質の等値線での強度(Venus λ 10 : 528 nm、TdTomato : 578 nm)と、化学発光タンパク質 Nanoluc の等吸収点(467 nm)での強度比を計算することによって算出した。また、(添加前の発光強度)/(添加後の発光強度)を算出し、センサータンパク質のグルコースに対する結合親和性(発光色変化率)を評価した(図 13,14)。

Venus 型センサーのグルコース添加前の発光強度は 0.608、添加後の発光強度は 0.48 を示した。また結合親和性(発光色変化率)は 0.267 と算出された。即ち 26.7%、発光色が変化するセンサータンパク質が作成できたことが確認できた。

TdTomato 型センサーのグルコース添加前の発光強度は 0.438、添加後の発光強度は 0.359 を示した。また結合親和性(発光色変化率)は 0.219 と算出された。即ち 21.9%、発光色が変化するセンサータンパク質が作成できたことが確認できた(図 15,16)。以上のことから、性能評価を通じてセンサータンパク質の作動が確認できた。

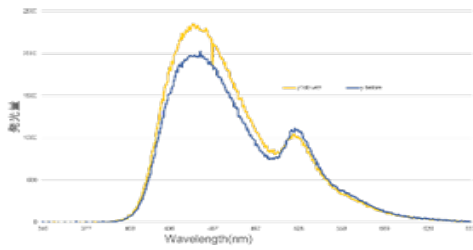


図 13 Venus 型センサーの励起波長と発光量

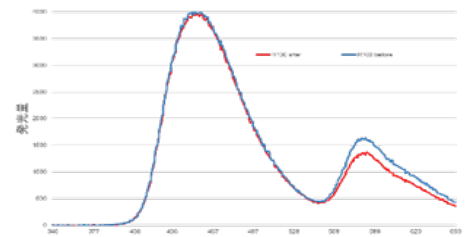


図 14 TdTomato 型センサーの励起波長と発光量

	Yellow		Red
Glucose(-)	0.608	Glucose(-)	0.438
Glucose(+)	0.48	Glucose(+)	0.359
Ratio Change	0.267	Ratio Change	0.219

図 15 Venus 型タンパク質のグルコース添加前後における発光強度と結合親和性

図 16 TdTomato 型タンパク質のグルコース添加前後における発光強度と結合親和性

6. 考察とまとめ

実験より、センサータンパク質の遺伝子在设计し、センサータンパク質を *in vivo* で合成させることに成功した。またセンサータンパク質の精製と定量に成功し、グルコース添加によって *in vitro* においても発光色変化すること、センサーの作動が確認できた。

7. 改善点

本研究では、グルコースに結合することで発光色変化するセンサータンパク質の合成に成功したが、発光色変化率は両センサー共に 30%以下であり精度が低い。また実用化に際してはグルコースに対するセンサー感度は数十倍に向上させる必要がある。

また、本研究ではグルコースセンシングドメインとして GBP を用いたが、

GBP 自体の精度が低く生体内グルコース濃度をセンシングする感度を保持していない可能性がある。その為、グルコースセンシングドメインとして GBP 以外のタンパク質の利用を検討する必要がある。加えて遺伝子設計段階でリンカーアミノ酸配列を計算、配列を選択したが、用いるリンカー配列を再検討し、再度タンパク質を作製することが必要である。

8. 今後の展望

今後はセンサーのグルコース反応精度を向上させるとともに、グルコース濃度によってセンサーの発光色がどのように変化するか調べたい。

本センサーはターゲットサンプルのタグとして、励起光源を必要としないため、スマートフォンと組み合わせることで、小型で携帯性の高い生体物質検査デバイスを実現できる。また、携帯端末を用いた簡便な検査技術の実用化により、血液ではなく唾液で、安価に簡便に血糖を測定できるセンサーを実現できる

9. 謝辞

永井教授、永井研の皆様、櫻井先生には温かいご指導を賜りました。この場をお借りして心より感謝申し上げます。

10. 参考文献

- 1) Sempionatto et al., Touch-based Fingertip Blood-Free Reliable Glucose Monitoring: Personalized Data Processing for Predicting Blood Glucose Concentrations, ACS Sensors, 6(5),1875-1883, 2021