

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

奈良女子大学附属中等教育学校

研究背景

糖尿病 血中グルコース濃度（血糖値）が慢性的に高くなる病気



重大な疾患のトリガー

血糖測定に痛みが伴う
測定デバイスが高価



生体非侵襲型
血糖測定デバイス

安価で高性能



1. 遺伝子設計

配列を調査

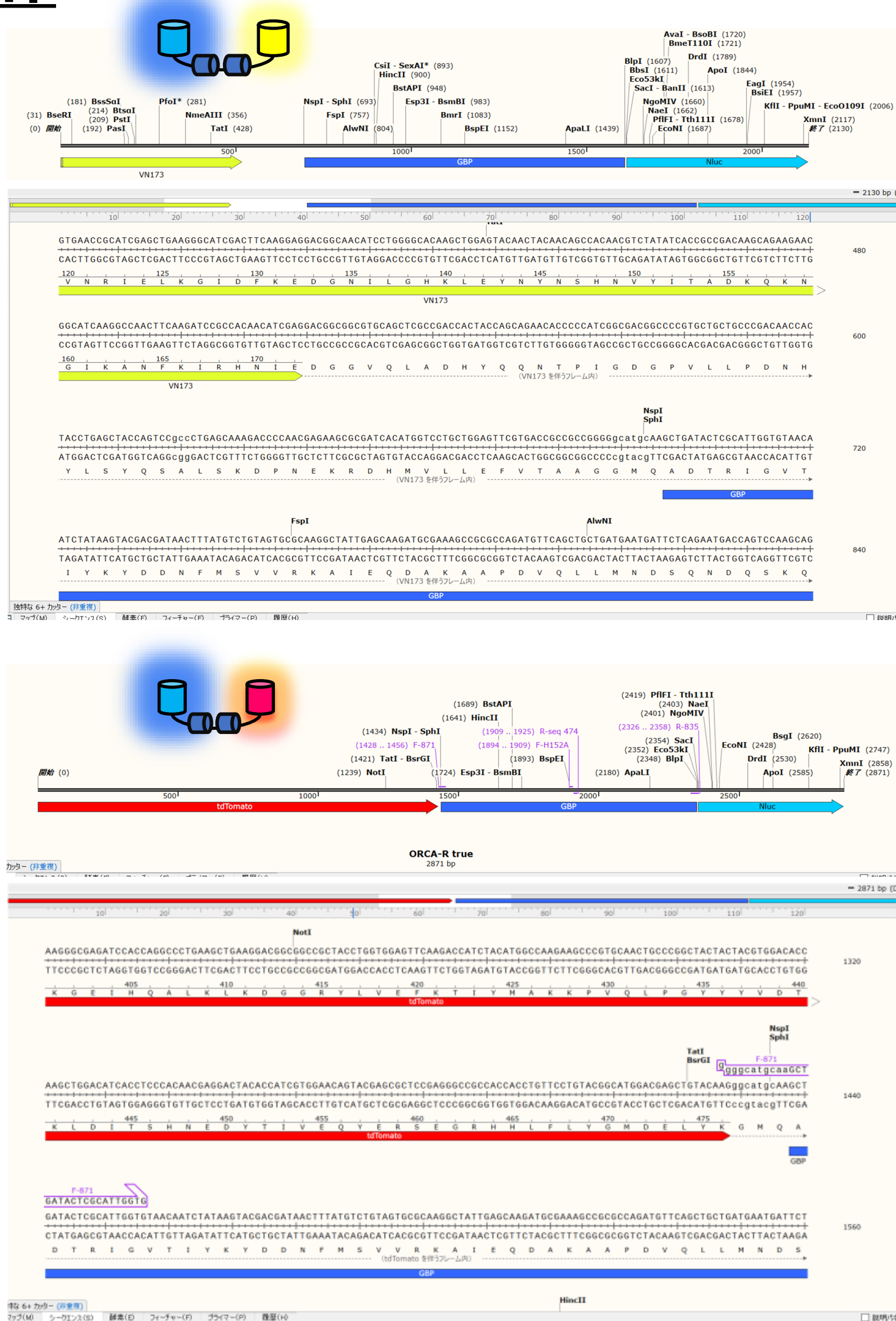
Nanoluc, GBP, Venus Δ10 (tdTomato)の配列を調査

配列を計算

遺伝子配列に基づいて最適なリンカーアミノ酸の塩基配列を計算

制限酵素を決定

遺伝子設計に基づいて用いる制限酵素, DNA Ligaseを決定



2. DNA合成

PCR

With tag
1x Reagent
Primer F,R 1.5μL, ddH2O 11μL
1 × 94°C 2min
30 × 96°C 10sec
55°C 30sec
68°C 1min
1 × 68°C 5min

Miniprep

制限酵素処理

Sph I 0.5μL Sac I 0.5μL

ゲル purification

ライゲーション

Colony PCR

With Go taq
1x Reagent
2x Go Taq mixture 65μL, 10μM primer 1, 2.4μL, ddH2O 57μL
1 × 96°C 5min
50 × 96°C 30sec
50°C 30sec
72°C 1.5min

Sequencing

Miniprep grade plasmid DNA(100-200ng)1.0μL
1.6μM primer 1.0μL, Big Pye 0.5μL,
5x reaction buffer 1.5μL, ddH2O 6.0μL
1 × 96°C 2min
30 × 96°C 10sec
50°C 5sec
60°C 4min

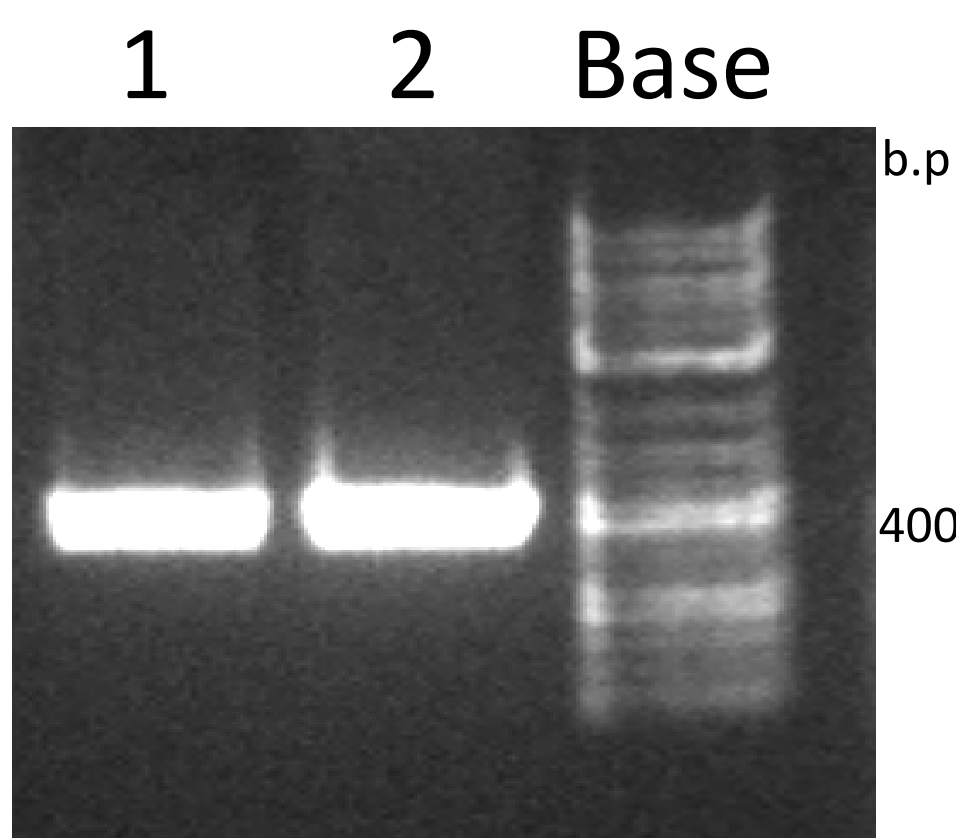
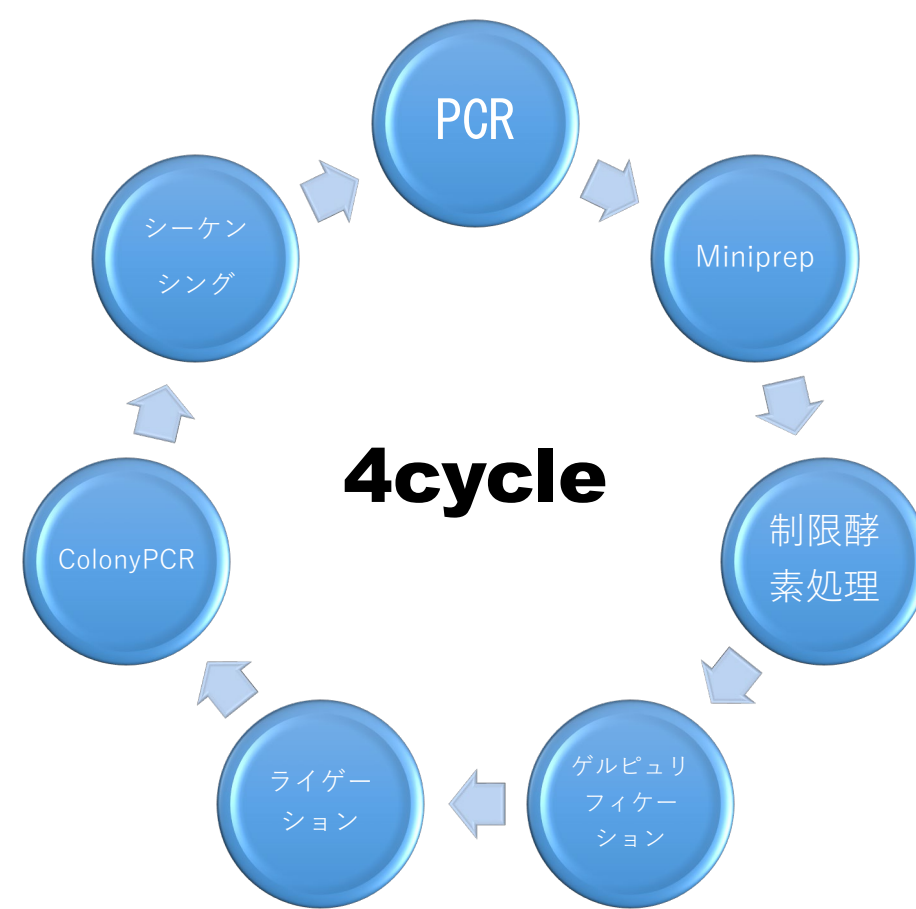


Fig. GBPの電気泳動結果

3. DNA導入とタンパク質合成

ベクターを細胞に添加

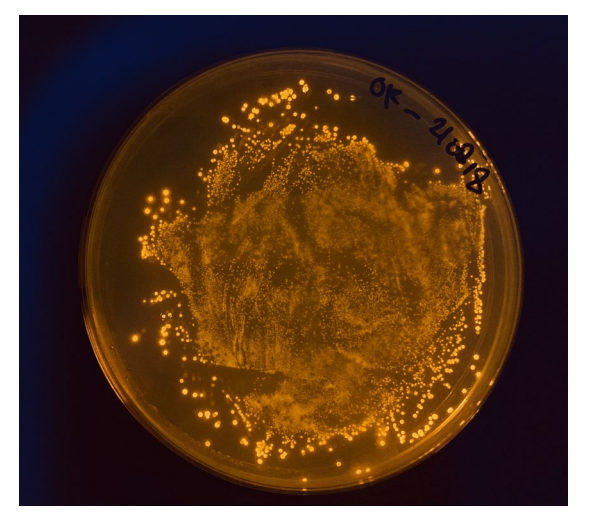
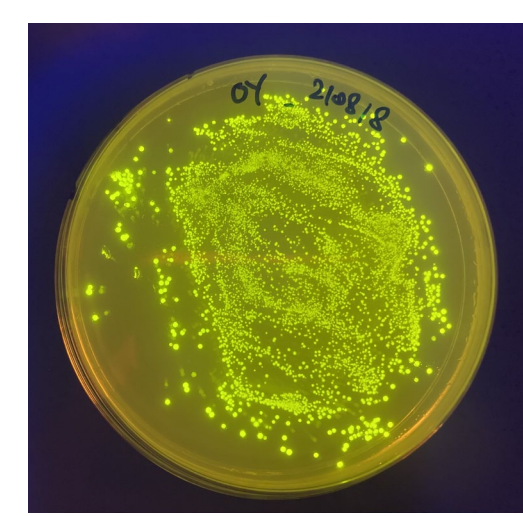
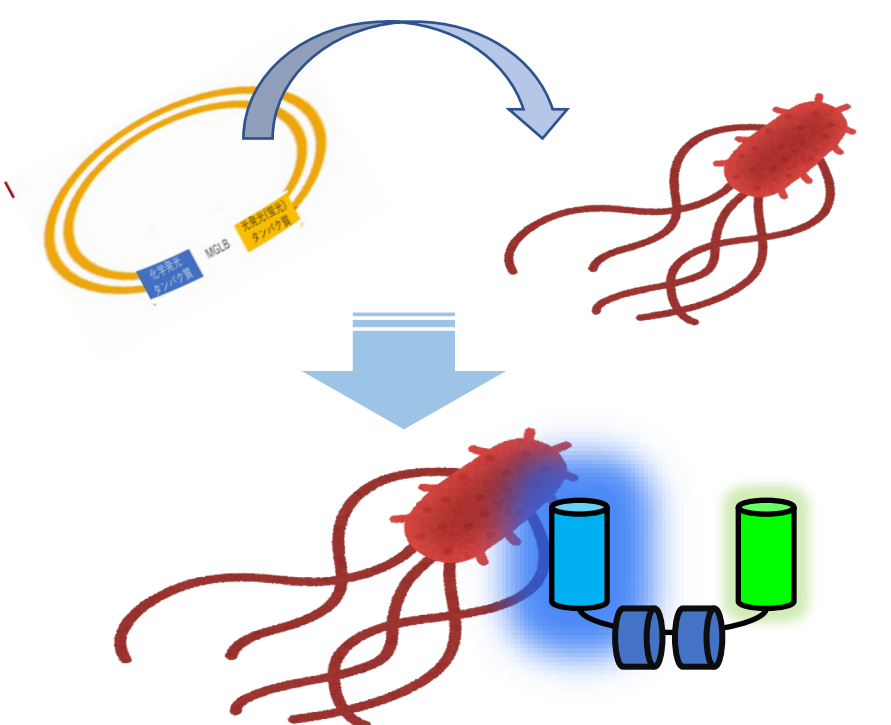
30分間氷上でインキュベート

ヒートショック

42°C, 45sec

培養

37°Cで24時間培養 (Glucose添加)



センサータンパク質の大腸菌内での合成に成功

4. センサータンパク質の精製

集菌

8000rpm 15min 遠心分離

粉砕

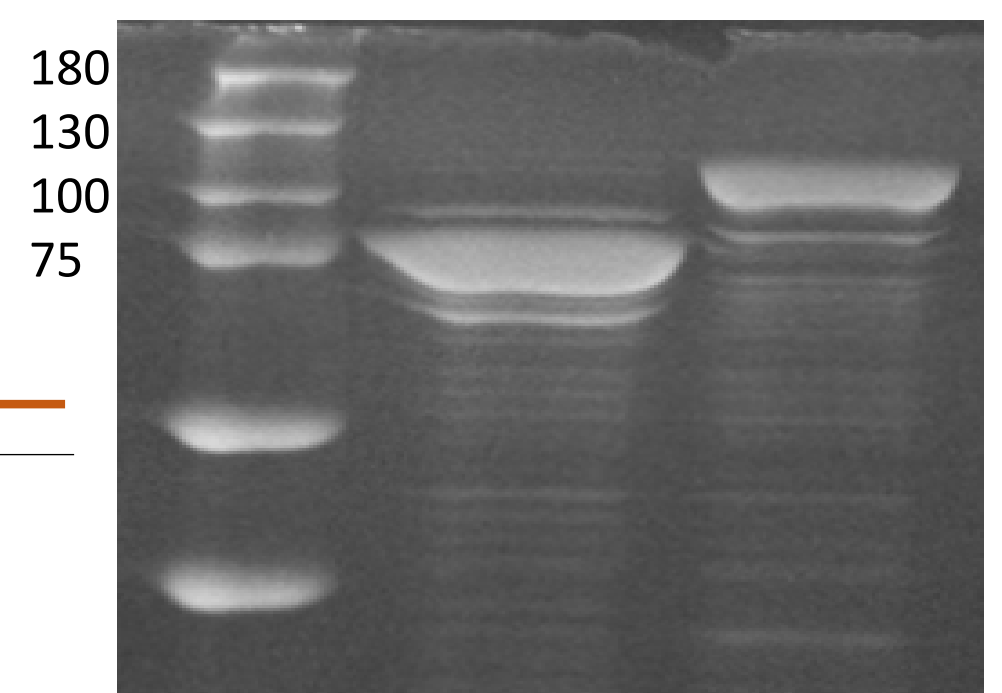
超音波処理(タンパク質を菌体外へ)
8000rpm 20min 遠心分離

タンパク質クロマトグラフィー

不要物の除去
Ni+カラム使用

SDS - PAGE

Base 1 2



理論値
Yellow sensor protein:78kDa
Red Sensor protein:100kDa

結果
Rane1 : 75kDa
Rane 2 :100kDa

センサータンパク質の精製に成功!

5. タンパク質の濃度測定 (bradford法)

BSA溶液(検量線)を作成

BSA standard溶液の作成

吸光度測定

波長 595nm

タンパク質濃度算出

結果
Yellow sensor protein:0.75mg/mL
Red Sensor protein:1.57mg/mL

6. センサータンパク質の性能評価

Samples

100 x 希釈したセンサータンパク質 (黄色、赤色)

センサーの蛍光波長計測

400-650nm波長におけるタンパク質の発光量計測

グルコース添加

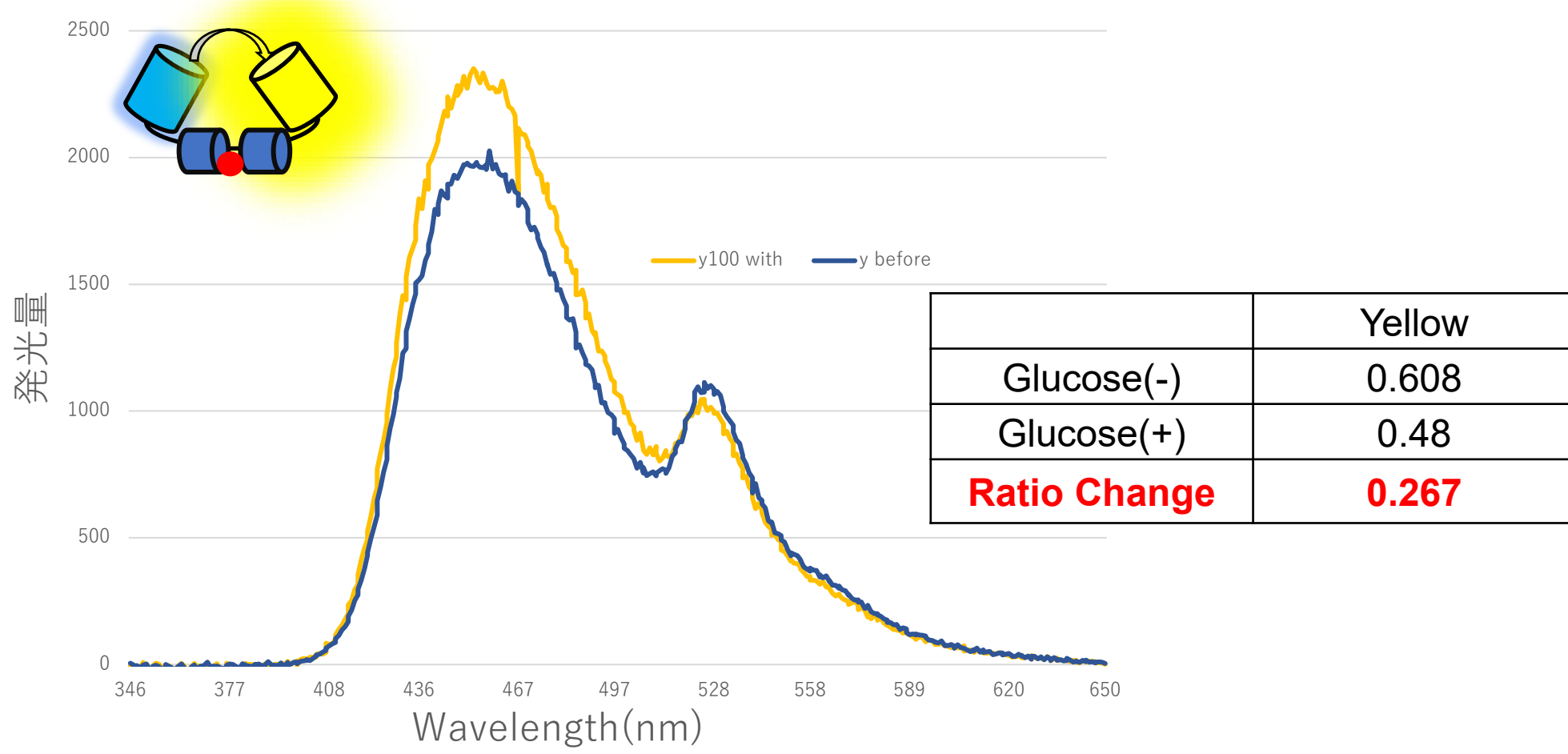
10mM グルコース

蛍光波長計測

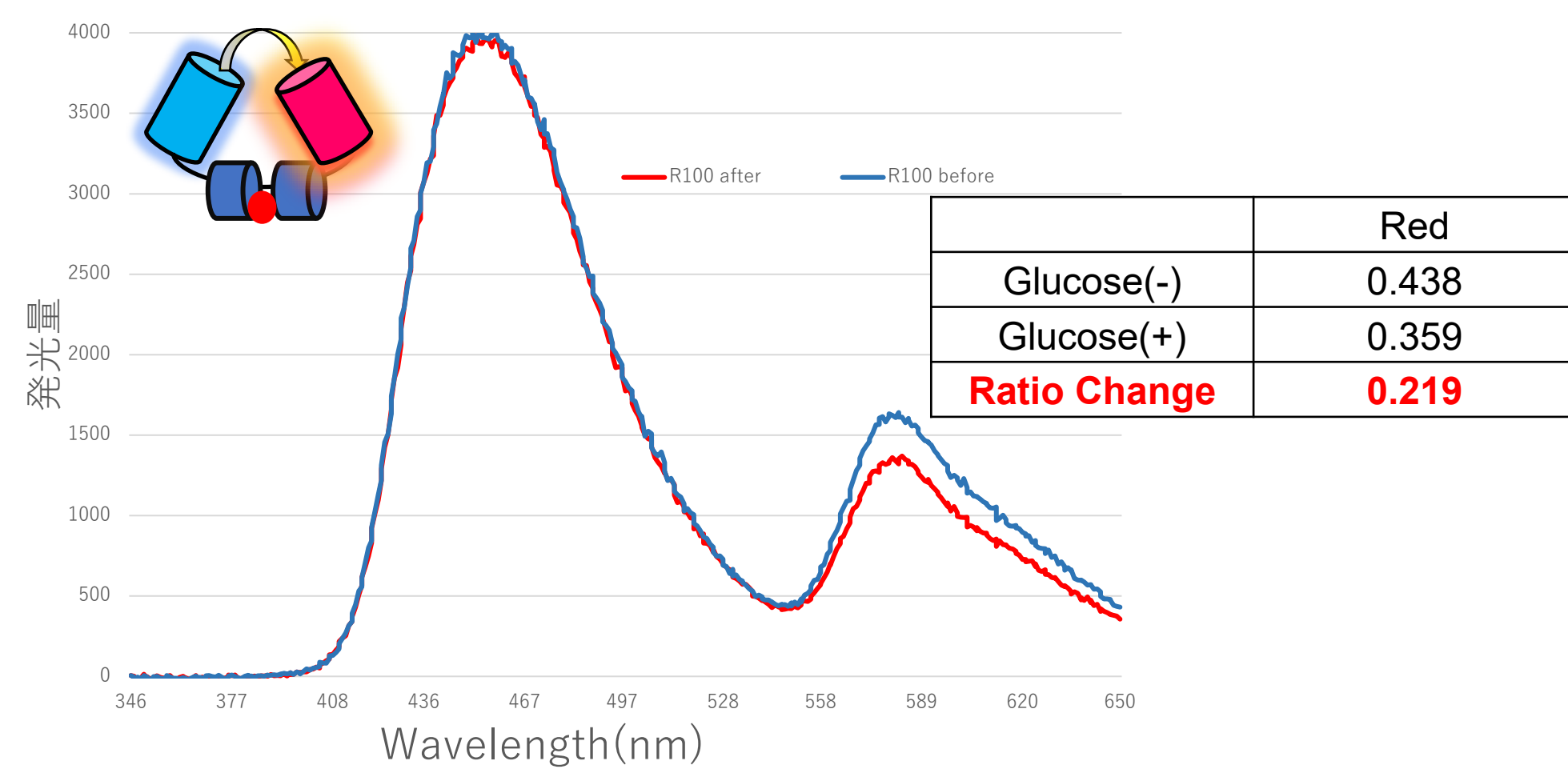
400-650nm波長におけるタンパク質の発光量計測

発光色変化率計算

添加前の発光量/添加後の発光量(発光強度)を算出



黄色センサータンパク質の発光量の変化

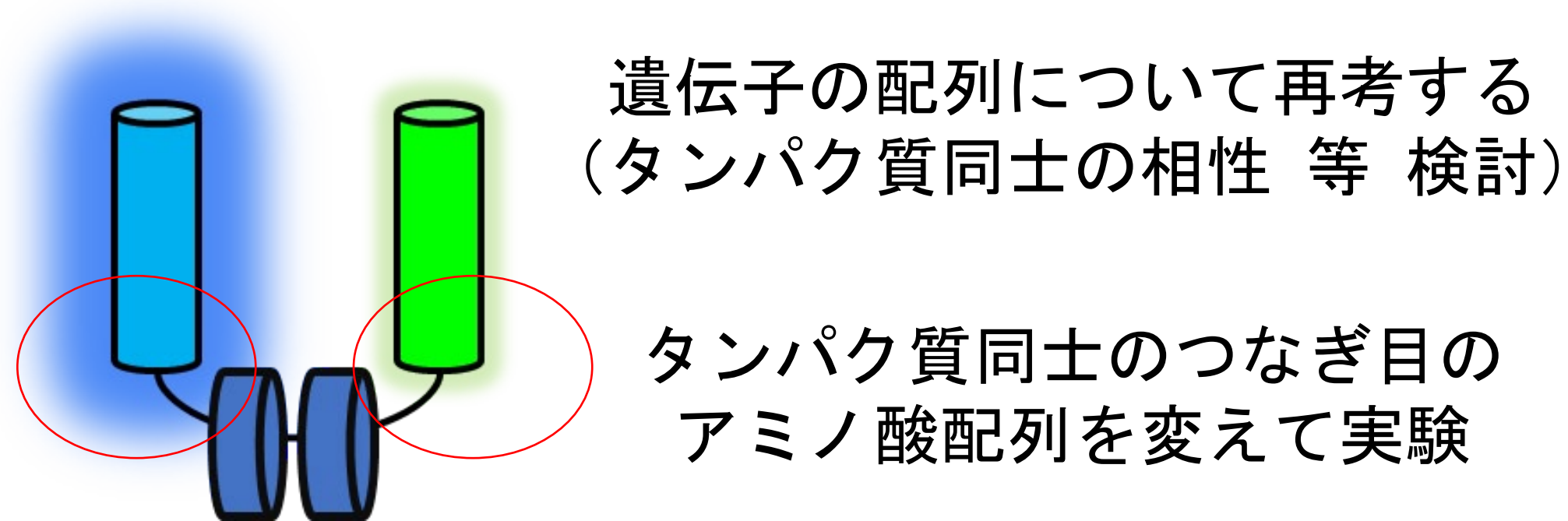


赤色センサータンパク質の発光量の変化

センサータンパク質の作動が確認できた

7. 改善点

どうすればもっと高精度のセンサーが作成できるのか？



8. 研究のまとめ

センサータンパク質の遺伝子設計

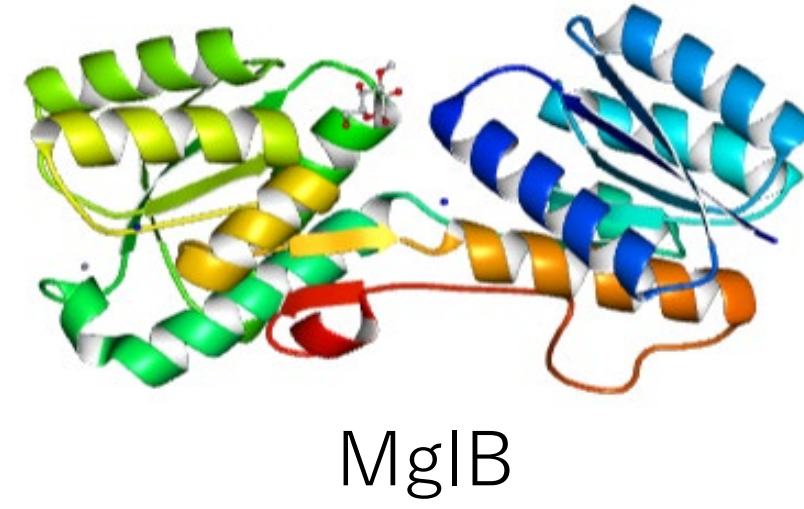
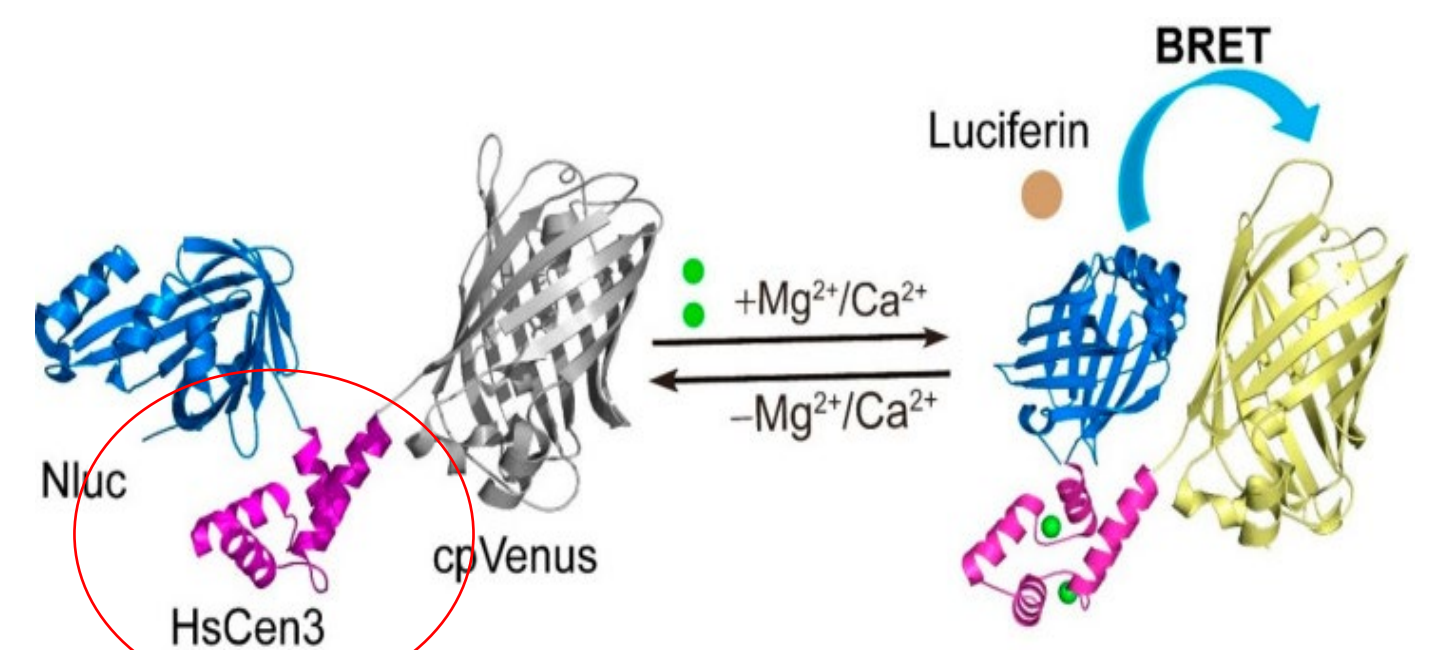
センサータンパク質の大腸菌内での合成 (In vivo)

センサータンパク質の精製

センサータンパク質の反応確認 (In vitro)

先行研究

リンカーの構造変化により両者の距離が変化 発光エネルギー共鳴移動BRETが生じ 発光色変化

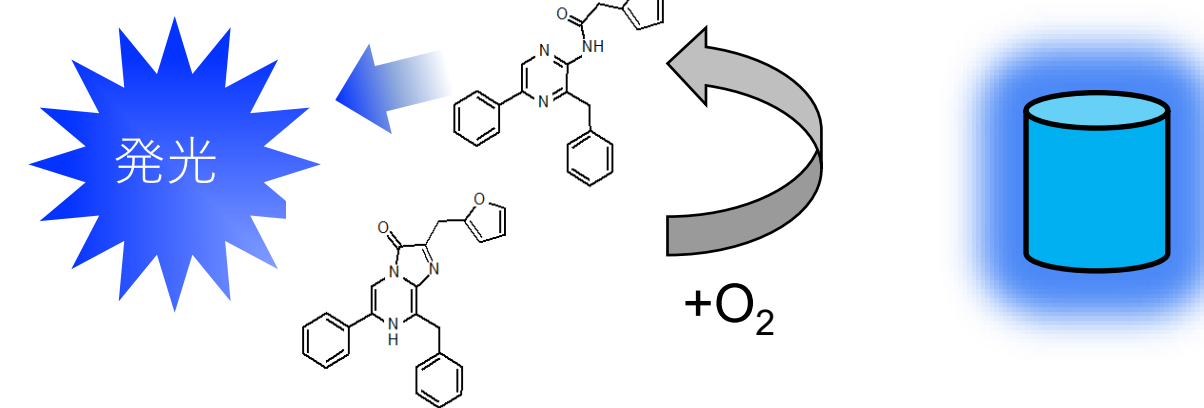


グルコースセンシングドメインとして MGLBタンパク質を、化学発光タンパク質と蛍光タンパク質を繋げるリンカーとして利用する。MgIBはグルコースが結合することで構造が変化する

発光タンパク質

化学発光タンパク質

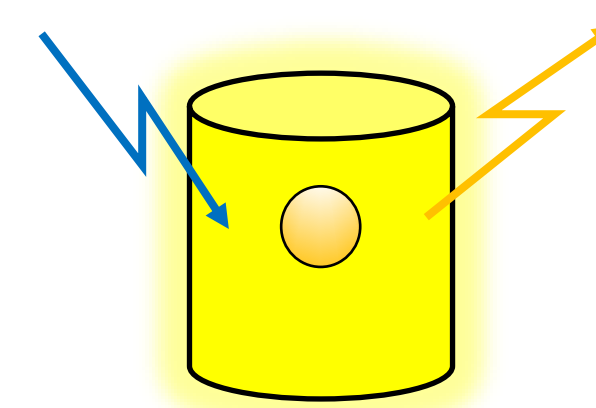
オキシルシフェリン 化学発光タンパク質



化学発光タンパク質ルシフェラーゼが酵素として発光基質ルシフェリンを酸化することで、オキシルシフェリン (励起状態) となり、基底状態へ戻る際にエネルギーが光となって放出される。

蛍光タンパク質

特定の波長(青色光) 黄色光



光発光(蛍光)タンパク質

蛍光タンパク質(蛍光物質)に特定の波長の光を当てることにより内部の発色団が励起され、基底状態に戻る際に放出されるエネルギーの一部が光として放出される。

今後の展望

センサーのグルコース反応精度の向上

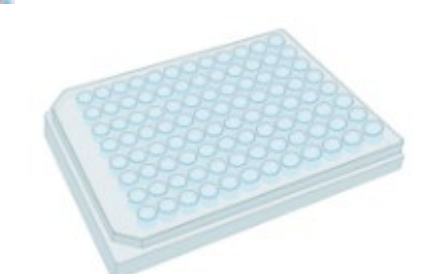
濃度による発光色変化率の調査

人の唾液を用いて色の変化を観察

新たな唾液検査



発光プローブと発光基質



1. 簡便な糖尿病診断

2. 血ではなく唾液

3. 専用の機械ではなくスマホ

唾液とプローブを混合
↓
スマホで発光写真を撮る
↓
写真で濃度測定



疾患の進行具合(かゆみの強さ等)の数値化など様々な技術への応用、発展に貢献

(References)

[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
 [2] 山口昌樹 他, 血糖値と唾液糖値の相関に関する検討, *糖尿病*, 40巻6号, 1997
 [3] Dzhan et al., Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) Based Nanostructured Biosensor for Tear Glucose Detection, *TANN'17*, 122, 2017
 [4] Arakawa et al., Mouthguard biosensor with telemetry system for monitoring of saliva glucose, *Biosens. Bioelectron.*, 84(15), 106-111, 2009
 [5] Hattori et al., Method for Detecting Emission Spectral Change of Bioluminescent Ratiometric Indicators by a Smartphone, *Method. in Mol. Biol.*, 2274, 295-304, 2021