OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ウイルス様粒子を用いた生物模倣化学センシング系の開発
Author(s)	串田, 祐輝
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73491
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　串田　祐輝　）	
論文題名	ウイルス様粒子を用いた生物模倣化学センシング系の開発

論文内容の要旨

第一章　緒論

生物は進化の過程において優れた化学物質センシング系を獲得している。このセンシング系をセンサーに利用できれば、感度・選択性の高い、多様な化学センサーの実現が期待できる。生物の選択的感知能を担う重要なタンパク質の１つが、受容体と呼ばれる膜タンパク質である。様々な生物種において同定されており、その情報を基に検出したい化学物質を認識する受容体を選びだすことも可能となってきた。しかし、受容体を生体内と同様の機能を維持したまま取り出し、センサーに応用することは課題が大きい。

本博士課程研究では、生物の持つ感知機能を利用した化学センサーの基盤となる、非生物系における受容体を用いた反応検出系の確立を目指した。

第二章　ウイルス様粒子を用いたリガンド依存性受容体活性検出系の構築

本研究では、ウイルス様粒子（VLP）を用いた化学物質検出システムの基盤構築を行った。VLPが、細胞の膜タンパク質を外殻上に保持することに着目し、VLPに受容体を担持させ、VLP上でのリガンド結合による受容体活性化検出を行うこととした。

多くの受容体がリガンドの結合により細胞内Ca^{2+}の増大が誘起することから、まずVLP内部へのCa^{2+}流入検出系の構築を行った。HIV-1のGagタンパク質をHEK293FT細胞に発現させることでVLPの作製を試み、動的光散乱法を用いて、VLPの形成を確認した。次に、VLP内部のCa^{2+}濃度変化を検出するため、カルシウムインジケーター（GECI）のVLPへの導入を行った。そこで、細胞膜結合型のGECIがVLPに効率的に内包されることを明らかにした。さらに、VLP内のCa^{2+}濃度が細胞質よりも高濃度であることを明らかにした。得られた結果を元に、適したGECIとして、Ca^{2+}との解離定数の大きなR-CEPIA1を選定し、その細胞膜結合型を用いることでVLP内へのCa^{2+}流入を観測できることを示した。

確立したVLP内へのCa^{2+}流入検出系を用いて、マウス（*Mus musculus*）の環状ヌクレオチド依存型チャネル（CNG）およびキイロショウジョウバエ（*Drosophila melanogaster*）の嗅覚受容体共受容体（ORCO）のVLPへの組み込みと応答検出を試みた。この際、VLPへのORCOの取り込みを増大させるため、細胞膜局在性を向上させた改変型ORCOの開発を行った。膜移行シグナルを付与することによりORCOの細胞膜局在性が向上することを明らかにした。VLPにおいてCNG、ORCOと膜移行型ORCOがリガンドに対して応答し、またORCOは膜移行型のほうが強く応答することを明らかにした。以上のように、VLP内部へのCa^{2+}流入検出系を用いることで、哺乳類、昆虫といった異なる生物種の受容体を、VLPを用いた化学センシング系に応用できることを示した。

第三章　総括と展望

本研究の成果は、センサーデバイス化の困難な受容体を、培養細胞から非細胞系へと切り出し、化学センサの感応材料に受容体を用いる生物模倣化学センシング系を構築したことである。本成果を元にさらに多様な受容体に展開することにより、検出対象を広げることができると期待する。今後さらに、用途に応じて受容体を選択することで、安全安心な生活環境の提供、食味定量化による食産業への貢献、呼気による非侵襲診断といった、様々な場面への展開が可能な化学センサー開発に大きく寄与するものと考える。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　串田　祐輝　）

	(職)	氏　名
論文審査担当者		
主 査	教授	永井　健治
副 査	教授	内山　進
副 査	教授	福崎　英一郎
副 査	教授	村中　俊哉
副 査	教授	紀ノ岡　正博
副 査	教授	渡邉　肇
副 査	教授	藤山　和仁
副 査	教授	大政　健史

論文審査の結果の要旨

本論文では、生物の持つ化学物質感知能に着目し、その中心的な役割を果たす受容体をウイルス様粒子（VLP）に担持させそのリガンドとの結合を蛍光イメージングにより検出できるようにしたことで開発された、センサーデバイスへの応用が期待できるセンシング系の構築について記述されている。

第一章には、本研究の背景として、生物の持つ化学感知能の概要および特徴、現在実用化あるいは研究されている化学物質を感知するセンサーについて記述されている。化学感知能は高等生物の味覚・嗅覚から、比較的低級な粘菌における走性の発揮にまで関与し、多くの場合、感知能を持つ細胞の細胞膜上に存在する膜タンパク質の受容体によって、その選択的な化学検知が行われている。一方で、実用化されている無機・有機材料を用いた化学センサーは、検出対象を選択的に識別する感応材料の開発が困難であるため、選択性に課題がある。その解決に向け提案されている受容体を用いた従来の検出方法は、受容体が膜タンパク質であるがゆえに安定的に機能を維持することが困難であった。

第二章では、第一章に記載された課題を解決しうる方法として、ウイルス様粒子（VLP）に受容体と、蛍光タンパク質ベースCa^{2+}センサータンパク質（GECI）とを取り込ませ、受容体の活性化を蛍光により検出できるようにしたセンシング系について述べられている。ウイルス様粒子には、ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）のGagタンパク質により形成されるものを採用した。VLPにおいて、細胞質型のGECIに対して細胞膜結合型のGECIがより効率的に取り込まれることを実験的に明らかにし、またVLP内部のCa^{2+}濃度が高濃度であるがために細胞質に用いられるGECIではVLP内のCa^{2+}濃度上昇を検出することが困難であることを見出した。以上のVLPの特徴から、受容体を介したVLP内へのCa^{2+}流入を観測するために適したGECIとして、Ca^{2+}に対して低結合性を示すR-CEPIA1の細胞膜結合型改変体を採用し、VLPに内包されたR-CEPIA1によりVLP内部へのCa^{2+}流入を蛍光強度変化として検出できることを示した。さらに受容体として、マウスの環状ヌクレオチド依存性チャネル（CNGチャネル）およびキイロショウジョウバエの嗅覚受容体共受容体（ORCO）をそれぞれ細胞膜結合型R-CEPIA1とともにVLPに担持させ、それぞれのアゴニストに対する受容体を介したCa^{2+}流入を蛍光強度変化から可視化することに成功し、VLPを用いた生物模倣化学センシング系の実証を行った。

第三章では、総括として、今後の研究の方向性、化学センサーが適応しうる応用先について述べている。

総じて、本論文は、受容体を化学センサーとして用いるための、VLPを用いた新たな方法を提供しており、今後、本論文の内容を基盤として研究開発が進展することによって、従来の方法では不可能であった、多様な化学物質に対して、生物のような選択的な化学センサーの実現が期待できる。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。