

未来社会創造事業 探索加速型
「世界一の安全・安心社会の実現」領域
終了報告書(探索研究)

令和2年度
終了報告書

平成30年度採択研究開発代表者

[研究開発代表者名：上田 宏]

[東京工業大学 科学技術創成研究院・教授]

[研究開発課題名：食中毒から生活者を解放する人工抗体提示細胞]

実施期間：平成30年11月15日～令和3年3月31日

§ 1. 研究実施体制

(1)「上田」グループ(東京工業大学)

① 研究開発代表者: 上田 宏 (東京工業大学 科学技術創成研究院、教授)

② 研究項目

- ・抗体提示パトロール酵母の構築
- ・上記による各種抗原検出の条件検討
- ・測定前に細胞破壊を必要としないパトロール酵母の構築

(2)「三宅」グループ(麻布大学)

① 主たる共同研究者: 三宅 司郎 (麻布大学 生命・環境科学部、教授)

② 研究項目

- ・腸管出血性大腸菌認識単クローン抗体の取得
- ・不活化大腸菌の調製と上記の結合活性評価

(3)「小林」グループ(神戸薬科大学)

① 主たる共同研究者: 小林 典裕 (神戸薬科大学 薬学部、教授)

② 研究項目

- ・腸管出血性大腸菌認識抗体遺伝子の取得
- ・上記遺伝子の特性評価

§ 2. 研究実施の概要

本研究開発においては、細胞膜表面に食品中の各種有害物質を認識する抗体を発現させた酵母（以下パトロール酵母と称する）を構築し、これらの酵母を細胞内のレポーター酵素活性の上昇で検出可能なセンサーとすることで、現場で利用可能な新たな食品安全技術として提案することを目的とした。

これまで、同様のレポーター細胞を動物細胞あるいは大腸菌を用いて構築した例は数例報告されているが、それらは培養と測定の条件設定が厳密である必要があったり、機能的な抗体発現には必ずしも向いておらず汎用性に欠ける問題があった。今回は、安全で培養も容易な真核細胞である酵母を用いて、その細胞膜上に抗体を発現させ、抗原結合時にそれらがクロスリンクされ転写因子が活性化される事でレポーター遺伝子由来の蛍光・発光などが簡便に検出可能な系の構築を目指した。

本研究は大きく、1) 材料となる抗体遺伝子の準備（麻布大学、神戸薬科大学）、2) 低分子（ペプチド、カフェイン、アフラトキシン）検出用パトロール酵母の構築とその性能評価、3) 高分子（腸管出血性大腸菌 0157）検出用パトロール酵母の構築とその性能評価、4) 細胞破碎を要しない検出法の開発に分けることが出来る。

1) では、麻布大学と東工大にてアフラトキシン認識抗体遺伝子を、麻布大学と神戸薬科大学で 0157 認識抗体遺伝子を取得し、その抗原結合能が十分高く特異的である事を確認した。またその他の抗体遺伝子については現有のものを利用した。

2) 低分子検出用酵母は、抗体の二つの抗原認識断片(VH/VL, カフェイン検出系においては二つの VHH)

が、抗原存在時に二量体を形成する現象（オープンサンドイッチ原理）を利用し、これらの膜上での抗原依存的相互作用を、基本的には市販の細胞内ユビキチン再構成を利用して検出する系（DUALmembrane Yeast two hybrid システム）を用いて検出した。なおこの際、低分子は細胞膜の外側にあるペプチドグリカンからなる細胞壁を通過できると考えて検討を進めた。この結果、予想通り抗原を添加し一晩培養した後、対応するパトロール酵母細胞内の LacZ 活性の上昇が認められた。特にアフラトキシン認識抗体 VH/VL を用いた場合、エリスロポエチン受容体細胞外ドメイン D2 を付加したコンストラクトを用いた場合に 10 pM（アフラトキシン B1）という市販の ELISA キットの検出限界を大きく下回る検出限界を得ることに成功した。

- 3) 高分子検出用酵母は、大腸菌 0157 上の糖鎖抗原を認識する一本鎖抗体 scFv を、細胞膜上相互作用検出系に融合して構築した。通常、抗体を酵母提示する際には抗原結合が容易な細胞壁上に提示する場合が多い。しかしこの方法で信号伝達に成功した例は報告されていないため、今回は、酵母細胞培養中に少量の細胞壁破壊酵素 Zymolyase で処理することで、細胞壁を部分的に破壊しつつ 0157 と共培養し、細胞膜上の抗体受容体から信号伝達させる事を試みた。検出条件を最適化した結果、最大 10 倍以上の 0157 依存的 LacZ 活性上昇を得る事に成功した。これは酵母で外部から加えた高分子を用いてレポーターの活性化に成功した初めての例と考えられる。
- 4) 市販のレポーターを利用する場合、 β ガラクトシダーゼに対する膜透過性の発光基質の入手が困難なため測定前に細胞を破砕する必要がある、これが実用上の問題となる問題があった。このため、より短時間で測定が可能な細胞壁上へのカフェインセンサー抗体酵素の構築と発現、さらに分泌型発光酵素レポーターの構築と発現、さらにこれらを利用したカフェイン検出を試み、これらいずれにも成功した。

主要成果

1. Jiulong Su, Tetsuya Kitaguchi, H. Ueda et al., “Transmembrane signaling on a protocell: Creation of receptor-enzyme chimeras for immunodetection of specific antibodies and antigens” *Scientific Reports* **9**, 18189 (2019).
2. J. Dong, C. Miyake, Kitaguchi, N. Kobayashi, H. Ueda et al. “PM Q-probe: A fluorescent binding protein that converts many antibodies to a fluorescent biosensor” *Biosensors and Bioelectronics* **165**, 112425 (2020).
3. A. Inoue, Y. Ohmuro-Matsuyama, T. Kitaguchi and H. Ueda, “Creation of a nanobody-based fluorescent immunosensor mini Q-body for rapid signal-on detection of small hapten methotrexate” *ACS Sensors* **5**(11), 3457-3464 (2020).