

バイオセンシングのための生体触媒創成を目的とした細胞表層上への微小反応場の構築

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2010-11-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 末, 信一郎, 榎波, 康文 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/2811

バイオセンシングのための生体触媒創成を目的とした 細胞表層上への微小反応場の構築

研究代表者：末 信一郎（工学研究科、教授）

電話：0776-27-8914、メールアドレス：suyeb10@u-fukui.ac.jp

研究協力者：榎波 康文（広島大学ナノデバイス・バイオ融合研究所、特任教授）

概 要	改変型蛍光タンパク質（EGFP）ー有機リン加水分解酵素（OPH）の2種類のタンパク質を細胞表層工学技術により酵母の細胞表層に発現させ、各種検出デバイスと組み合わせることによって高感度な有機リン化合物検出のためのセンシングシステムを構築した。細胞表層に発現した OPH の作用により、有機リン化合物が加水分解（pH 8 付近で最適）され、有機リン酸と <i>p</i> -ニトロフェノールを生成することで細胞表層近傍の pH が酸性側へシフトする。細胞表層上の EGFP は波長 480nm の励起光によって 505 nm の蛍光を発するが、この pH の低下により減光する。さらにハイブリッド型ポリマ光導波路を蛍光検出デバイスとして用いることに着目し光導波路のコア部分に細胞をトラップし、ダイオードまたはレーザー光源からの励起光を照射し、有機リン化合物は蛍光の減少という形で検出するためにコアの素材を検討した。微弱な pH の変化を蛍光分子信号の変化に転換する反応場を酵母細胞表層上にナノレベルで構築することで高感度な蛍光検出システムの実現が期待される。
関連キーワード	有機リン、光デバイス、細胞表層工学、光導波路、バイオセンシング

研究の背景と目的

神経毒である有機リン化合物（OPs）は世界中で農薬として広く利用されている。しかし、現在、日本では毒性の強い一部の有機リン化合物の製造、使用が禁止されているが、発展途上国ではいまだに製造や使用が認められていたり、違法に使用されているケースも多い。輸入農作物については、こうした有機リン系農薬の残留汚染の問題がしばしば持ち上がっている。そのため、農作物中に残存する有機リン化合物の迅速かつ簡便で高感度な検出方法の確立が求められている。本研究室では OPH が有機リン化合物を加水分解する際に、酵素近傍の pH を酸性に傾ける性質と、この局所的な pH 変化をモニターするために pH の変化で消光する性質をもつ蛍光タンパク質である EGFP を組み

合わせることに着目した。OPH と EGFP の局所的な反応を円滑にするため、酵母の細胞表層に目的のタンパク質を発現し、それをそのまま固定化タンパク質として利用できる細胞表層工学の技術を用いることで、両タンパクが表層発現した改変酵母を創製した。今回は、改変酵母の有機リン検出活性を上昇させるために融合タンパクとして両タンパクの発現を図った。また、光導波路のコア素材として従来用いていたジルコニウムとシリカを混合したゾルゲル溶液には、pH と溶液の浸透性の問題がありパラオキシソンに対する EGFP の蛍光応答の減少は見られていなかった。そこで、ゾルゲルガラスの素材についても新たに検討を行った。

研究の成果

1. OPH-EGFP 共発現のためのプラスミドの構築

酵母細胞表層への OPH と EGFP の発現は凝集

性タンパク質であるフロキュリンをアンカータンパクとして用いて別々にプラスミドを構築して形質転換することで共発現に成功した。しかし、共発現では、細胞表層上での配座に制限されて、活性の向上が期待できない。そこで、OPHとEGFPを融合タンパクとして細胞表層上に提示することを試みた。構築したプラスミドを酵母を宿主として形質転換した。形質転換体の蛍光は蛍光顕微鏡観察にて確認されたが、細胞内で粒状となっており表層発現まで至っていなかった。適切なプロモーターの選択などが課題として残される。

2. 光導波路コアの素材選択と改変酵母の固定化

次にデバイス用の素材として、ケイ酸ナトリウムを用いたゾルゲル法を検討した。ケイ酸ナトリウム溶液に水とイオン交換樹脂を加え、攪拌し、減圧ろ過後のろ液に1M塩酸を添加し、これをゾルゲル溶液とした。そこに、塩化コバルトを含むpH7のbufferをゾルゲル溶液の1/5量添加し、室温で5日間乾燥した。調製したゾルゲルガラスは約12.5nmの細孔をもち、シリカとジルコニウムを用いたゾルゲルシリカと表面積を比較すると、約340倍の表面積を有することがわかった。次に、ゾルゲル光導波路のコア中でのEGFPの蛍光を確

認する目的で、共発現酵母をゾルゲル溶液の1/5量添加しカットしたスライドガラスに滴下し、2,000 rpm、45 sでスピコート後、4 °C、24時間エイジングした。作製したゾルゲルガラスチップのEGFPの蛍光を蛍光顕微鏡で確認することができた。次に、作製したチップ上に20 mMパラオキシソンを添加し、カバーガラスをかぶせ、蛍光顕微鏡を用いてパラオキシソン添加に伴うEGFPの蛍光減少を観察した。その結果、速やかに蛍光が減少していくことがわかった。また、0.02 mMパラオキシソン添加でも、約4分で完全に消光することがわかった。これは、ケイ酸ナトリウムを用いたゾルゲルは初発のpHが10であるためにOPH活性を維持できたことと、約12.5 nmの細孔をもつために溶液が浸透が容易であったからと考えられる。pH4のMcIlvaine bufferの添加によるEGFPの蛍光強度への影響はほとんど見られず、細胞表層上の局所的なpH変化がEGFPの蛍光強度減少に有効であることがわかった。改変酵母を固定化したガラスチップは45日後でも活性は充分維持していた。今後は、このゾルゲルと光導波路を組み合わせて、迅速かつ簡便で高感度な有機リン検出システムの構築を目指す。

特記事項・発表論文など

「特記事項」

本研究の成果を受けて、平成22年度文部科学省科学技術振興調整経費に応募した。

学会発表については、国内3件、国際1件、国内招待講演1件を行った。

「本研究に関わる発表論文」

1. S. Suye, K. Tsuchiya, et al., Single cell analysis for organophosphorus compounds sensing using organophosphorus hydrolase and EGFP displayed arming yeast. *J. Biosci., Bioengineer.*, 108, S1, S148 (2009) Asia Pacific Biochemical

Engineering Conference 2009 (Kobe)

2. T. Fukuda, S. Suye, et. al., Improvement in organophosphorus hydrolase activity of cell surface-engineered yeast strain using Flo1p anchor system.. *Biotechnol. Lett.*, in press.
4. T. Fukuda, S. Suye, et. al., Yeast co-displaying enhanced green fluorescent protein and organophosphorus hydrolase in combination with a cell chip for detection of organophosphorus compounds. *Biotechnol. J.*, in press.