

VII-78 ランダム変異導入法による高感度および臭気選択的 バイオセンサーの開発に関する研究

東北学院大学大学院	学生員	大槻 文弘
東北学院大学	正員	石橋 良信
前沢工業（株）	正員	及川 栄作

1.はじめに

上水におけるかび臭は主に湖沼の富栄養化に伴い、ある種の藍藻が異常増殖し二次代謝産物として産生する物質に起因するもので、全国で毎年1000万人を越える人々に不快な異臭味水の被害を与え、おいしい水供給の観点から解決に急を要する大きな問題になっている。

我々はかび臭物質2-メチルイソボルネオール（2-MIB）と構造が良く似たカンファールの分解遺伝子として同定されているcamオペロンが2-MIBを分解することや、2-MIBによって遺伝子発現誘導されることを明らかにして来た。さらにこれらの事実を応用して遺伝子操作で2-MIBを定量検出できるバイオルミネッセントセンサーを開発した。このセンサーの2-MIB検出感度は組換え体大腸菌の培養温度が20℃でM9培地で培養したとき、培地中の2-MIBの終濃度100ng/mlまで定量検出され、1ng/mlまで定量できないものの検出できるレベルであった。

本研究は先に開発した臭気バイオセンサーの感度を上げる目的で野生型の遺伝子を人工的に改変することによって、より効果的な機能を有した遺伝子を構築する進化分子工学的手法に従い、本センサーの臭気物質を認識している遺伝子領域に変異原処理して、DNAにランダムに塩基置換などの変異を導入した大腸菌変異株ライブラリーを作製した。次に変異株ライブラリーから野生株より反応性の高い有用な変異株の選択を行った。この結果について報告する。

2.方 法

1) ランダム変異の導入と変異株ライブラリーの作製は次の方法によって行った。camオペロンの遺伝子発現を制御している領域であるcamR抑制遺伝子とオペレーター・プロモーター（o/p）領域を含むDNAをプラスミド上にクローン化した大腸菌を作製した。この組換え体の保有するプラスミドをヘルパーファージを用いた方法により一本鎖DNAに調整した。この一本鎖DNAを亜硝酸ナトリウム溶液に混合し室温で10～60分反応して変異を導入した。変異を導入した一本鎖DNAを逆転写酵素を用いて再び二本鎖とした後に遺伝子発現を制御している領域を制限酵素で切断し、これを電気泳動して断片を回収した。回収した断片を発光遺伝子群luxオペロンの導入されているpUCD615プラスミドベクターに組み込み、大腸菌に形質転換して変異株ライブラリーを作製した。

2) 変異株ライブラリーからの有用な変異株の選択は次の方法によって行った。寒天培地上に生育したライブラリーをナイロンメンブランフィルターに移し取りこのレプリカフィルターを2-MIBを予め塗抹した寒天培地上に移した。暗所、室温で一時間程度静置し発光遺伝子の発現を誘導した。その後ただちにろ紙の上にフィルターを貼り、ラップでおおい、暗所でX線フィルムを載せ、カセットに入れ、10～20分露光した。フィルムを現像し、野生株をコ

ントロールにしてこれより同濃度の2-MIBに対する発光強度の高いクローンを選択した。得られた単一のクローンを液体培地で培養し、培養液の一部をマイクロプレートに分取し、発光測定装置（ルミノメーター）を使用して発光強度を測定した。

3. 結 果

1) 高感度に反応する臭気バイオセンサーを開発するために、臭気バイオセンサー大腸菌（野生株）の保有するプラスミド由来の臭気物質を認識し、発光遺伝子の発現を制御している *camR* と *o/p* 領域に変異原性物質を用いてランダムに遺伝子に変異を導入し、変異株ライブラリーを作製した。そこから野生株より2-MIBに対して発光強度の高い有用な変異株を単離することができた。

2) 図-1に示すように変異株F6は30℃でM9培地で培養した時、野生株より2-MIBやカンファーおよび2-MIB生合成における前駆物質とされているボルネオールのいずれにおいても発光強度が高まり、特に2-MIBは野生株より9倍程度高い発光強度が得られた。今後この変異株を2-MIBの定量実験に用いることによって以前の野生株で行った場合より感度の高いデータが得られるものと期待される。

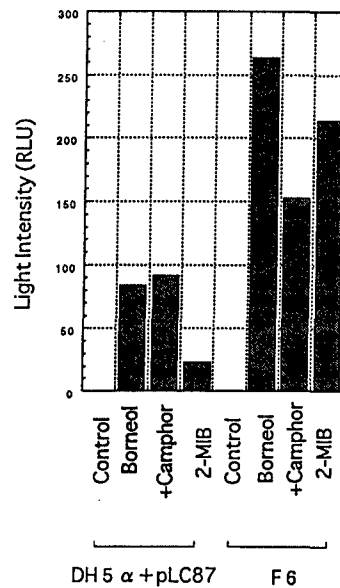


図-1 変異株F6の基質特異性

3) 進化分子工学的手法によって今までに酵素の基質特異性の改変や熱安定性を向上させた例は知られているが、バイオセンサーの反応性を高めることに応用した例は知る限りなく、今後多くの分野に適用できると考えられる。

4. おわりに

今後は塩基配列決定によって変異株の *camR* 抑制遺伝子の構造改変部位の同定を行う予定である。本研究で使用している *cam* オペロンは堀内忠郎教授（創価大学）、相良康弘教授（高知医科大学）より譲り受け、また *lux* オペロンの導入されている pUCD615 プラスミドベクターは 広岡卓氏（日本農薬（株））より譲り受けたことを記し、感謝申し上げる。