

VII-65

表面プラズモン共鳴法を応用したかび臭バイオセンサー
によるかび臭物質の測定

東北学院大学大学院	渡部 英	前澤工業（株）	及川栄作
東北学院大学大学院	阿部隆弘	奈良先端大学院	加藤竜司
前澤工業（株）	木村憲司	東北大学大学院	西野徳三
国立公衆衛生院	国包章一	○東北学院大学工学部	石橋良信

1. はじめに

かび臭は毎年全国で1,000万人以上の人々に異臭味被害を与え、おいしい水供給の観点から大きな問題になっている。かび臭被害対策の現状はおもに浄水場での高度処理等による対策によっているが、さらに水源でのかび臭発生状況を正確にかつ迅速に把握するための監視システムを確立することも、その解決に役立つと考えられる。

このような観点から、組換えDNA技術によってかび臭物質受容遺伝子と発光遺伝子を導入した大腸菌を作製し、発光強度でかび臭物質 2-メチルイソボルネオール (2-MIB) を定量することのできるかび臭バイオセンサーを開発した（以下発光型かび臭バイオセンサー）。しかし、開発したセンサーは感度がヒトの鼻の1/100のレベルであることから感度の向上の課題、大腸菌の培養に時間を要することから測定時間の短縮化の課題、組換え微生物を用いているためからバイオハザードの課題があげられた。

この課題を解決するために、第一の改良法として野生型の遺伝子に変異を与え、目的の機能を発現する変異型を得るための技術である進化分子工学的手法を適用してセンサーの改良を試みた。その結果、ある程度の感度の向上や指向性の改変に成功したが、実用化するためにはさらなる検討が必要となった。

そこで、本研究では第二の改良法として、生体内の分子と分子の結合度や解離度をリアルタイムに測定する方法である表面プラズモン共鳴 (SPR) 法の適用を試みた。SPR法は当初の発光センサーと比較して高感度が期待されること、測定時間を短縮することができること、組換え微生物を用いないことからバイオハザードの心配がないことなどの利点が上げられる。しかしながら、SPR法を応用したバイオセンサーの開発は緒に付いたばかりであり、臭気センサーの開発例は少なく、類似のオペロン遺伝子を用いたセンサーの開発の報告もない。そのため、研究の始めは発光センサーの原理をSPRセンサーに適用した、検出原理を考案し、この原理に基づいて実験を行った。

その結果、臭気物質をヒトの鼻と同等以上に検知することができるバイオセンサーの基礎的な系の構築に成功した。以下にその実験方法および結果を示す。

2. センサーの原理

SPR法を応用したかび臭バイオセンサーの原理を簡単に示す。センサーに使用しているCamRは*cam operon*におけるリプレッサータンパク質であり、またかび臭物質受容体タンパク質である。SPR反応は共鳴角度の変化量によって示され、この場合センサーチップに固定化したオペレーターDNAに結合するCamR量が多ければ、多いほど共鳴角度の変化量が大きくなる。CamRはかび臭物質がない場合はセンサーチップに固定化したオペレーターDNAに結合するが、かび臭物質がある場合はかび臭物質に優先的に結合する。CamR量が一定である時、CamRはかび臭物質量に応じてDNAに結合する量が異なる。従って、予め既知の濃度のかび臭物質を用いてCamRのDNA結合量（共鳴角度）を測定しておけば、未知量のかび臭物質量を換算することができる。

3. 実験方法

3-1 かび臭物質受容体タンパク質の生産および精製

SPRに供するためのCamRタンパク質の生産は大腸菌発現用のプラスミドベクターを用いて行った。そのプラスミドは目的のタンパク質とマルトース結合タンパク質(MalE)を融合タンパク質として発現させ、発現

キーワード：かび臭バイオセンサー、表面プラズモン共鳴 (SPR)、かび臭受容体タンパク質

連絡先：住所 宮城県多賀城市中央一丁目13-1・TEL 022-368-1115 内線513・FAX 022-368-7070

させた融合タンパク質はアミロースレジンカラムによってアフィニティー精製することができるpMal-c2 (New England Biolabs, Inc.)を用いた。また、プラスミドの構築はSPR 反応が分子量の大きいものほど高い反応を示すことが知られていることや、臭気物質の結合箇所を増やした方が反応が高まると考えたことから、MalEにCamRを1つ融合させたもの(1xCamR), 2つ融合させたもの(2xCamR), 3つ融合させたもの(3xCamR)をそれぞれ発現するように構築した。さらに、MalE-CamR融合タンパク質からCamRのみを容易に分離精製するために、CamRのアミノ末端に6 残基のヒスチジントグ(His-tagged CamR)をPCRによって付加したプラスミドの構築も行った。

発現後の精製は融合タンパク質をプロテアーゼによって切断し、その後CamRの分離精製はイオン交換クロマトグラフィーによる精製、また、ヒスチジントグを付加したCamRの精製においてはNi-NTAカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製したタンパク質はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によって、その純度を分析した。

3-2 SPR装置の操作

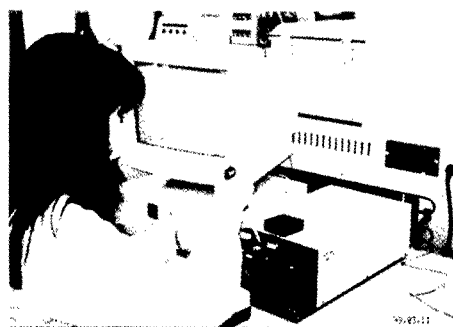
SPR装置は日本レーザー電子(株)のSPR670-Eを使用した。本センサーのかび臭物質を測定するまでの操作手順は以下のとおりである。DNAのセンサーチップへの固定化→牛血清アルブミン(BSA)による空きサイトのブロッキング→glycine HCl (pH1.0) によるフリーのBSAの洗浄→CamR binding bufferによる平衡化→CamRと試料の混合液の添加→glycine HCl (pH1.0)による洗浄とセンサーチップの再生であり、以上の操作を繰り返し行った。

4. 実験結果

1) SPRセンサーに使用するための材料である、CamRタンパク質を生産するためのプラスミドの構築を行い、構築したプラスミドを導入した大腸菌を用いてマルトース結合タンパク質との融合(MalE-CamR)タンパク質として大量生産することができた。

2) MalE-CamR融合タンパクはアミロースレジンアフィニティークロマトグラフィーによって容易に精製できた。また、His-tagged CamR タンパク質はNi-NTAカラムクロマトグラフィーによって高い回収率で単一のCamRタンパク質を精製することができ、SPRに供するためのCamRタンパク質の精製法を確立することができた。

3) SPR法を応用して新規のかび臭物質を検出するためのバイオセンサーを基礎的な系を構築することができた。SPR装置を用いてかび臭物質の測定を行っている状況写真を左に示す。



4) SPRを用いたセンサーはDNAの固定から試料の測定まで約 20 分で測定することができ、従来の発光センサーより大幅に測定時間を短縮することができた。

5) 各種精製したCamRタンパク質のDNA結合性はアミノ末端にヒスチジントグを付加して精製したHis-tagged CamRが最も高いDNA 結合性を示した。ついで、2xCamRが高く、MalE-CamR融合タンパク質は分子量が大きいにもかかわらず、低いDNA結合性が示された。そのため、以後の実験にはHis-tagged CamRタンパク質を用いた。

6) 精製したHis-tagged CamRを用いてかび臭物質2-MIBの定量を試みたところ、1 ng/L~10 mg/Lの範囲で定量検出することができた。この感度は従来の発光センサーより1,000 倍感度が高く、ヒトの鼻の数十倍であり、ガスクロマトグラフ質量分析法と同等以上の感度である。

5. おわりに

本バイオセンサーは以前の発光型バイオセンサーの感度、測定時間およびバイオハザードの課題をすべてクリアーした。現在は環境試料の測定を試みており、この結果についても報告する予定である。