

表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を用いたかび臭バイオセンサーにおける DNA-CamR タンパク質会合の反応速度論的解析

○東北学院大学大学院
前澤工業 (株)
東北学院大学工学部

学生員 渡部 英
正会員 及川 栄作
正会員 石橋 良信

1) はじめに

上水道においてかび臭は毎年全国で 1000 万人以上の人々に異臭味被害を与えており、おいしい水供給の観点から解決に急を要する大きな課題になっている。その原因の 1 つであるかび臭物質は主に、ある種の藍藻類 (Cyanobacteria) が富栄養化したダム湖などで異常増殖した際の二次代謝産物であることが知られている。現在、かび臭物質としてモノテルペンである 2-メチルイソボルネオール(2-MIB)とセスキテルペンのジェオスミンが同定されている。

高度処理におけるかび臭除去分解は、かび臭の発生状況を監視して発生量に応じた低コストで効率のよい処理が望まれている。このような処理にはかび臭物質を高感度で迅速に監視するシステムが必要であると考えられる。

そこで、生体分子間の会合や解離をリアルタイムに測定する事ができる技術である表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を適用したかび臭バイオセンサーの開発をおこなった (以下 SPR 型かび臭バイオセンサー)。本センサーは従来の発光型かび臭バイオセンサーの生体内反応をセンサーチップ上で再現したものであり、オペレーター DNA と CamR タンパク質、かび臭物質の 3 つの物質の相互作用を分析するものである。SPR 型かび臭バイオセンサーの特徴として、感度はヒトの鼻よりも高く、ガスクロマトグラフ質量分析計と同等以上であり、最小 5 分間程度での測定が可能であることが挙げられる¹⁾。また、環境水においても阻害物質などの影響がなく測定できることが示された²⁾。本研究では、SPR 型かび臭バイオセンサーに使用している CamR タンパク質の精製を行なうと共にオペレーター DNA との分子同士の相互作用を SPR 法を用いて反応速度論的解析により結合定数 K_A および解離定数 K_D として算出し、その基本的な挙動を把握する事を目的とした。

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、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、今回の測定で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 CamR 量に依存し共鳴角度の変化量が増加する。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、CamR はかび臭物質に優先的に結合するため CamR の DNA への結合量がかび臭物質量に応じて異なる。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

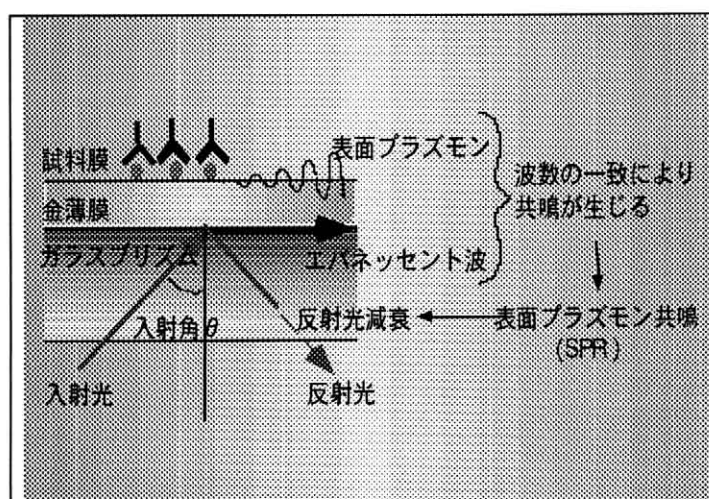


図-1 表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーの物質測定原理

キーワード：表面プラズモン共鳴、バイオセンサー、かび臭、解離定数、ピアコア 2000

連絡先：〒985-8537 宮城県多賀城市中央一丁目 13-1 ・ TEL022-368-7418 ・ FAX022-368-7070

(共鳴角度)を測定しておけば、未知量のかび臭物質を換算することができる。原理を図-1に示す。

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 タンパク質の生産には大腸菌発現用のプラスミドベクターを用い、目的とする CamR タンパク質の精製は、アミロースレジンカラムおよび Ni-NTA カラムクロマトグラフィーによって分離精製を行った。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 装置はピアコア (株) の BIACORE2000 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通りである。ピオチン化 DNA の SA センサーチップへの固定化→CamR と試料との混合液の添加→2M $MgCl_2$ 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。

3-3 SPR 法を用いた野生株 CamR タンパク質とオペレーター DNA との結合反応からの解析

分子同士が相互作用する時には、両者には何らかの Affinity があることを意味する。Affinity は、結合の強さを表す尺度として一般的に使用されており、結合定数 (K_A 、単位 M^{-1}) あるいは解離定数 (K_D 、単位 M) として表される。本研究では、各濃度 Wild CamR タンパク質とセンサーチップに固定化した DNA の SPR による結合を測定し、BIAevaluation ソフトウェア (ピアコア (株)) を使用し定数の算出を行った。

4.実験結果と考察

CamR タンパク質の分離精製を行ない、野生株 CamR タンパク質とオペレーター DNA との結合データを基に、ピアコア 2000 を用いて反応速度定数の解析を行った結果、結合定数 K_A は $10^7 \sim 10^8$ 程度であり、解離定数 K_D は $10^{-8} \sim 10^{-9}$ 程度であるという解析結果が得られた。この結果から両者の Affinity は比較的強く、抗原抗体反応の解析の際に多く見られる値であることが分かった。その結果を図-2に示す。

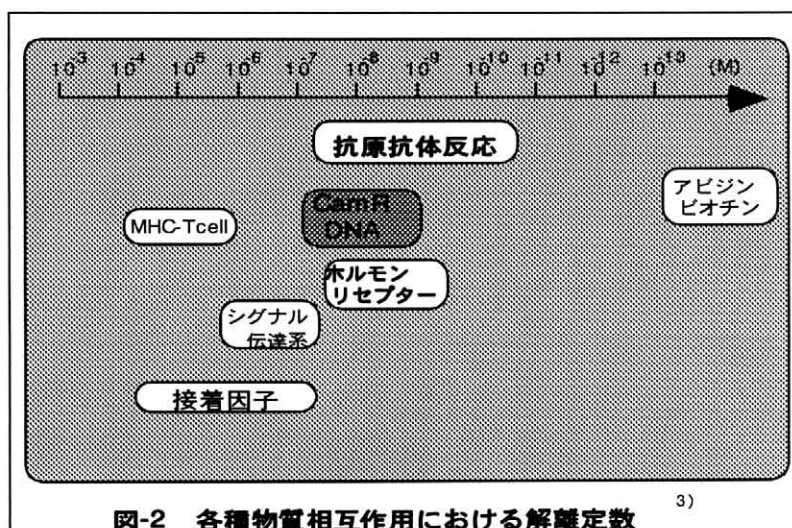


図-2 各種物質相互作用における解離定数

5.おわりに

Camphor および 2-MIB に強く反応する野生株 CamR とオペレーター DNA との結合データから両者の結合強さの解析を行なう事ができた。今後は、他のにおい物質にも反応することが知られている変異株 CamR とオペレーター DNA の結合についての解析も行っていく予定である。

<参考文献>

- 1) 及川栄作、木村憲司、加藤竜司、西野徳三、阿部隆弘、渡部英、国包章一、石橋良信：表面プラズモン共鳴 (SPR) 法を応用した新規バイオセンサーによるかび臭物質の検出、第33回日本水環境学会年会 (1999)
- 2) 及川栄作、木村憲司、加藤竜司、西野徳三、阿部隆弘、渡部英、国包章一、石橋良信：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、土木学会第54回年次学術講演会概要集、Vol.7, pp.130~131, 1999
- 3) BIAforum 1999 (ピアコア株式会社)