

「平成 20 年度工学部予算重点配分研究テーマに係る研究 報告書」
バイオセンシングデバイスのプラットフォームとして光導波路を用いた
チップ型オプトバイオセンサー

末 信一郎（福井大学工学研究科生物応用化学専攻・准教授）
勝山 俊夫（福井大学工学研究科ファイバ・アモニティ工学専攻・教授）
中根 幸治（福井大学工学研究科材料開発工学専攻・助教）
榎波 康文（広島大学ナノデバイス・バイオ融合科学研究所・特任教授）
高山 勝巳（福井工業高等専門学校・准教授）

背景 及 び 目 的

生体内機能分子の働きをきた細胞内で観測する手段として、蛍光タンパク質を利用した蛍光共鳴エネルギー移動をはじめ種々の蛍光測定技術が開発されている。しかし蛍光シグナルによる細胞内の動態も現状ではシングルセルからではなく、細胞群からの情報として捉えられているに過ぎない。本研究では、ゾルゲルガラスをコアとしてハイブリッド型ポリマー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、単一細胞での酵母や大腸菌を用いた蛍光観測を模索する。さらにEGFPと有機リン分解酵素を細胞表面に発現した酵母を導波路内のゾルゲルコアに配置し、食品等に含まれる有機リンを高感度で検知することのできるバイオセンシングシステムの構築を行う。

研 究 成 果 の 概 要

OPH-EGFP共発現のためのプラスミドの構築

従来より酵母細胞表層への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きた。この際OPHは凝集機能領域と標的タンパク質の間にスペーサー領域を持たせた長いアンカーを、EGFPはスペーサー領域を省いた短いアンカーを用いて細胞表層上に提示した。今回はOPHとEGFPのナノレベルでの反応場の距離を近くすることでよりEGFPの消光反応が効率的になると考え、EGFPも同様にスペーサー領域を有するよう

プラスミド (pWIFL-EGFP) の構築を試みた。プラスミド構築するために、ベクターとしてpWIFLをBglIIIにて制限酵素処理を行い、またインサートとしてEGFPをコードするpIEG1をPCRにて増幅した。増幅産物をBglIIIにて制限酵素処理を行い、この2つの断片を連結して新規プラスミドを構築した。構築したプラスミドを酵母MT8-1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ためpWIFL-EGFPの構築に成功したことがわかった。現在OPHとEGFPの両者が細胞表層に共に発現された酵母についてのOPH活性を検討している。

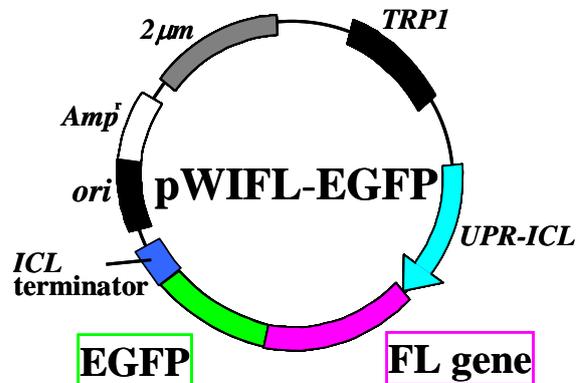


Fig. 1 構築した GFP 表層発現のためのプラスミド

GFP・ゾルゲル光導波路の作製

光導波路のゾルゲルコア中でのEGFPの蛍光を確認する目的でスライドガラスにOPHとEGFPの共発現酵母を含むゾルゲル溶液をドープし、スピコーターによって展張した後、UVを照射し硬化させた。このゾルゲルガラス中に封入された共発現酵母について蛍光顕微鏡観察を行いゾルゲルガラス内部での共発現酵母の蛍光を確認した。ゾルゲル内部でのGFP寿命は肉眼レベルであるが現時点で約1ヶ月しても蛍光の低下は見られずゾルゲルガラス中でGFPが安定に存在することがわかった。ゾルゲルガラス表面にパラオキシソンを滴下しガラス内にパラオキシソンを浸透させたところ、パラオキシソン分解に伴うEGFPの消光が確認できた。またゾルゲルガラスの硬化条件によって消光の有無があり、硬化条件によるゾルゲル内部の構造によるポーラス構造が基質の浸透に影響しているものと考えられた。

結言および今後の予定

今後は、光導波路をデバイスとした有機リン高感度検出システムの構築を目指して、ゾルゲルガラスの硬化条件の詳細な検討を行う。また、反応の効率化と活性の増大を目的としてOPHとGFPを融合タンパクとした酵母細胞表層上に発現するようなプラスミドを構築する。

配分額及び経費の支出額内訳

経費の支出内訳

	配分額		
消耗品 試薬、部品等		輸送費	
備品 スピコーター		合計	

その他特記事項

研究成果

1. H. Makiasima, T. Fukuda, K. Kuroda, A. Mulchandani, K. Takayama, M. Ueda, and S. Suye
Organophosphorus compounds sensing system using organophosphorus hydrolase and EGFP displayed arming yeast. Biosensor 2008, Shanghai, China, 2008.5.13
 2. 榎波康文、末 信一郎光導波路デバイスと蛍光分析装置並びにそれを用いた化学物質の検出方法特願 2008-31117
 3. S. Suye; Combinatorial mutation of cellulolytic enzymes for green chemistry. 4th International Symposium of Environmental Biotechnology, Tainan, Taiwan 2008.8.13 Key note lecture
 4. H. Makishima, T. Fukuda, K. Kuroda, A. Mulchandani, K. Takayama, M. Ueda, S. Suye, Organophosphorus hydrolase and EGFP displayed arming yeast for organophosphorus compounds sensing system. 4th International Symposium of Environmental Biotechnology, Tainan, Taiwan, 2008.8.13
 5. S. Suye, Combinatorial mutation of cellulolytic enzymes for green chemistry. The 1st national Graduate Student Forum on Fiber Materials and Textile Technology, Tianjin, China, 2008.9.27 Invited Lecture
- その他国内外学会発表等 3件
特記事項 修士論文研究として本研究に取り組んだ牧島央和君が 4th International Environmental Biotechnology Symposium での講演発表（研究成果 No. 4）に対して Award of Excellent Student Presentation を受賞した。