

機関番号：24302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20510117

研究課題名（和文）局在プラズモン増強励起と蛍光蛋白発現菌体を
組み合わせた重金属分析マイクロデバイス研究課題名（英文）development of a biosensor for heavy metal ions based on
mercury-responsive transcription factor (MerR) and local plasmon enhanced excitation

研究代表者

石田 昭人 (ISHIDA AKITO)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：20184525

研究成果の概要（和文）：

蛍光蛋白や生物発光酵素を予め2つに分割して機能を消失させておき、これらを水銀イオン耐性大腸菌がもつ水銀制御蛋白によって再結合させる系を大腸菌の遺伝子組み換えにより構築した。これらの大腸菌や菌体から単離した蛋白をガラス表面に固定化して水銀イオンセンサ機能を実証したが、感度が低いことが判明した。感度向上のために優れた光アンテナ機能をもつ素材としてバラ花形の金・銀合金ナノコロイドを再現性よく大量合成することに成功し、これらを組み合わせてセンサを構築した。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to develop a protein-based heavy metal sensor for field analysis. Gene constructs consisting of mercury-responsive transcription factor (MerR) and split yellow fluorescent protein or luciferase were prepared. The resulting E-coli and the isolated proteins showed properties of mercury ion sensor, while the sensitivities were not sufficient for practical use. Plasmonic materials such as gold and silver colloids have been employed to enhance the excitation and emission efficiency. Novel protocol for effective preparation and immobilization of flower-like gold-silver hybrid colloids on a glass substrate was established and the plasmonic substrate showed remarkable fluorescence enhancement by visible light excitation. The resulting E coli or isolated protein was immobilized on the plasmonic substrate using a PDMS microfluidics system and tested for a mercury sensor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,800,000	540,000	2,340,000
21年度	700,000	210,000	910,000
22年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：総合・新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ化学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：局在プラズモン，マイクロ流体デバイス，プラズモン増強蛍光，重金属耐性遺伝子，水銀耐性大腸菌，スプリット蛍光蛋白，ナノコーンアレイ

1. 研究開始当初の背景

近年、開発途上国では水銀などの重金属による飲料水汚染が重大な問題となっている。重金属の分析には誘導結合プラズマ発光分析装置 (ICP) や原子吸光 (AA) といった非常に大型で高価な装置が必要である。しかし、途上国の場合は交通機関が未発達なことが多く、広大な国土に点在する膨大な数の水源から試料を収集して分析することは困難なことが多い。住民の健康被害を防ぐためには小規模な村落で使われている井戸や川などの水源が安全であるかどうかをその場で確認できることが望ましい。すなわち、試料水に含まれる微量な重金属濃度をその場で簡便に検査できる安価なマイクロチップセンサの開発が急務となっている。重金属イオンの分析方法には多々あるが、 pM – μM オーダといった希薄な濃度で試料水中に含まれる重金属イオンを高感度で分析するためには蛍光や発光を用いることが考えられる。しかも、単なるキレート試薬のようなものではなく、酵素反応のように増幅過程をもつ系を適用することが望ましいと考えられる。

重金属を含む培地で継代培養された細菌はその金属の毒性に対抗するため、これを排出する機構を持つようになる。そのような機構発現の要になるのが金属応答転写制御因子 MTF である。ここでは対象を水銀イオンに絞り込むこととし、水銀耐性菌 *Pseudomonas K-62* にコードされている水銀耐性遺伝子 (*mer* オペロン) の発現を制御する制御遺伝子 *merR* に着目し、これによって転写・翻訳される蛋白質である MerR の水銀結合ドメイン MBD (Metal Binding Domain) が水銀イオンと結合する際に起きる構造変化を利用することにした。一方、蛍光や発光の母体としては黄色蛍光蛋白とルシフェラーゼを用いることにした。これらはあらかじめサブユニットに分割しておいて再結合させることで機能を回復させることができる。すなわち、水銀イオンが MerR の MBD に結合することによる構造変化を駆動力として蛍光蛋白やルシフェラーゼのサブユニットを再結合させ、蛍光や生物発光の機能を誘導させることができると期待される。

しかしながら、いかに蛍光や生物発光が高感度な分析法であるといっても、マイクロチップベースの分析においては試料の体積が非常に小さいため、極希薄な試料で十分な光信号を得ることに大きな困難が伴う。そこで励起光を効率よく試料に伝達し、また、試料からの発光を効率よく吸い上げて検出器に導入するための方法論が必要となる。すなわち、光アンテナ機能が必要となるが、それには本研究代表者が開拓してきたプラズモン増強励起を用い、その媒体としては局在プ

ラズモン媒体である金や銀のコロイドを固定化したガラス基板を用いることにした。これにシリコンゴム製のマイクロ流路を接着することにより、そのままマイクロ流体デバイスとして用いることが可能である。

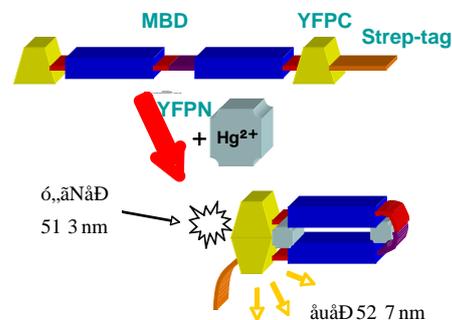
以上のように、本研究の開始時においては、水銀イオンに応答する蛋白質と光アンテナ機能をもつ局在プラズモン媒体の2つの最新要素技術がともに開発されつつあり、これらをもとにして新たな重金属イオン分析用マイクロ流体デバイスが構想できるという背景があった。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3課題の実現を目的として研究を行った。

1) 水銀イオンに効率よく応答して機能を発現するスプリット黄色蛍光蛋白およびルシフェラーゼ系の開発

2つの MerR に二分割した黄色蛍光蛋白 (YFP) もしくはルシフェラーゼ (Luc) のサブユニットをそれぞれ連結しておき、2つの MerR が1つの水銀イオンをサンドイッチ型に配位することを利用して、それぞれに結合されているサブユニットを接近・再結合させることで蛍光もしくは生物発光機能を発現させることによりセンサとして応用する技術を開発する。



2) 形質転換菌体や機能性蛋白を安定にガラス基板上に固定化する技術の開発

設計した遺伝子を大腸菌に組み込んで大量発現させ、産生された機能性蛋白質を単離・精製してマイクロ流体デバイスの基板表面にできるだけ大量にしかも安定に固定化する技術を開発する。また、単離した蛋白質の機能発現が芳しくない場合に備え、遺伝子を組み込んで機能性蛋白質を発現させた形質転換大腸菌の菌体そのものもセンサとして応用できるように、ガラス基板上への生菌体の長時間安定な固定化技術についても開発する。

3) 高い電場局在機能をもつ局在プラズモン媒体の開発とそのガラス基板上への固定化
プラズモン増強電場の局在による光アンテナ

ナ機能を持つと期待される金、銀、および金銀合金のコロイドについて、電場の局在に適した先鋭状の微細構造を持つことで強い蛍光増強特性を発現すると期待される新たな異方性形態のコロイドを作製するとともに、これらをガラス基板上に固定化して、蛍光性あるいは発光性の蛋白質を効率よく増強励起あるいは増強発光を誘起する技術を開発する。

3. 研究の方法

1) 遺伝子コンストラクトの設計と形質転換体の作成

YFP^N-MBD1-MBD2-YFP^Cの作成

TT-PCR法を用いてYFP^N-YFP^Cを作成し、次にこれをpASK-IBA3plus vectorに組み込んだ。これを大腸菌に組み込んで培養し、プラスミドを回収した。MBD1-MBD2フラグメントを作成し、これをさらに組み込んでYFP^N-MBD1-MBD2-YFP^Cをもつ目的のプラスミドを得た。精製のために必要に応じてStreptag, GSTtagまたはMBPtagを導入した。各段階でシーケンスを解析して確認した。これを大腸菌に組み込み、発現誘導して蛋白質の発現をSDS-PAGEで確認した。発現誘導した大腸菌を集菌して抽出し、アフィニティークラムで精製した。精製した蛋白質は紫外可視分光光度計およびパルス励起蛍光スペクトロメータで光特性を評価した。

FNluc-MBD1-MBD2-FClucの作成

LucとしてFirefly luciferase (Fluc) およびRenilla luciferase (Rluc)を用いた。作成法は両者とも同様である。精製のために必要に応じてStreptag, GSTtagまたはMBPtagを導入した。TT-PCR法を用いてFNluc-FClucを作成し、次にこれをpASK-IBA3plus vectorに組み込んだ。これを大腸菌に組み込んで培養し、プラスミドを回収した。MBD1-MBD2フラグメントを作成し、これをさらに組み込んでFNluc-MBD1-MBD2-FClucをもつ目的のプラスミドを得た。各段階でシーケンスを解析して確認した。これを大腸菌に組み込み、発現誘導して蛋白質の発現をSDS-PAGEで確認した。それぞれ発現誘導した大腸菌を集菌して抽出し、アフィニティークラムで精製した。精製した蛋白質の水銀イオン応答性の評価はマイクロチューブ内で蛋白質に一連の濃度の水銀イオンを添加し、発光基質であるルシフェリンを混合して、発光強度の時間変化をゲーティッドホトンカウンタまたはルミノメータで測定した。

2) ガラス基板の表面修飾と菌体および蛍光蛋白質の表面固定化

ポリLリシン(PLL)、アミノプロピルトリメトキシシラン(APS)、マツナミ親水性コート(MAS)、およびポリエチレンイミントリメト

キシシラン(PEI)によるガラス表面コーティングを比較検討した。前3者は市販品を利用し、PEIのみは独自に各種条件において表面処理を行った。これらの表面にYFPおよびYFP発現大腸菌を修飾固定化し、固定化率と菌の生存特性を評価した。菌体の生存特性については死菌をトリパンブルーで、全菌をサフランINでそれぞれ選択染色して一定面積の吸光度または画像解析により、一定面積内の菌体数を計数して評価した。

3) 高い電場増強機能をもつ新規局在プラズモン媒体の作製とガラス基板上への固定化

クエン酸、アスコルビン酸など各種の還元試薬および一連の分子量のポリピロリドンなどの安定剤を用い、金、銀、および金-銀合金コロイドを作製した。生成するコロイドの形態は金および銀イオン、還元剤、安定剤の濃度および混合順序、反応温度、攪拌法によって大きく異なり、ある形態のコロイドを特異的に生成する条件の探索と最適化を行った。元素分析は溶液状態でICPにより行い、粒径分布は動的レーザ散乱(DLS)により行った。コロイドの成長過程に関する情報を得るために、反応中に超遠心処理を行い、成長途中のコロイドを単離することも試みた。

作成した異方性コロイドをMASまたはPEIコートガラス表面に固定化し、FE-SEMによる形態の観察とEPMAによる元素分布分析を行うとともに、透過吸収スペクトルでプラズモンバンドおよびギャップモード吸収を測定した。さらに、その表面にクロロフィル誘導體、YFP発現大腸菌などを修飾し、蛍光増強特性を評価した。

4. 研究成果

1) 形質転換体の作成および蛋白質の単離精製と水銀イオン応答機能の検証

YFP^N-MBD1-MBD2-YFP^C

コンストラクトの作成と形質転換体の作成については成功した。しかし、水銀イオン無添加においても菌体自体がすでに弱い黄色蛍光を発しており、さらに、アフィニティークラムで精製途中、カラム内で蛍光強度が徐々に高まっていくことが目視で観測された。カラムから溶出した蛋白質は室内光で明らかに黄色蛍光を示していた。このことは水銀イオン無しでサブユニット間の結合が起きてしまったことを意味する。そこで、分子の熱振動を抑えるために冷暗所で分離精製を試みたが同様の結果であった。これらのことから、本コンストラクトで作成されたスプリットYFPはサブユニットの間隔が狭いかあるいはヒンジ部分の剛直性が低いために、サブユニット同士が容易に再結合してしまい、一旦再結合すると再び離れることがないものと判断され、残念ながら水銀イオンセンサとしては利用できないことが明らかになっ

た。コンストラクトの設計からやり直すことも考えたがより高感度が期待される split luciferase 系への移行を優先することにした。

FNluc-MBD1-MBD2-FC1uc の作成

Strep tag の場合、コンストラクト作成については sequence 解析により確認できた。また、SDS-PAGE で約 70 kDa の目的蛋白質が発現していることも明らかになった。しかし、アフィニティーカラムによる精製と溶出を数回試みたが単離は不可能であった。そこで、大腸菌宿主株を rozettagami2 に変更して再度試みたが単離することはできなかった。

GST tag の場合は SDS-PAGE で本来出るのは 91 kDa のバンドが見られず、フラグメントしか観測できなかったため、目的蛋白質が菌体内で分解されていることが示唆された。

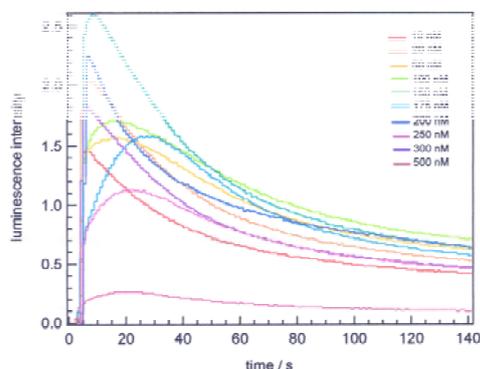
MBP tag の場合はフラグメントの生成も確認できなかった。

このように、延べ1年半以上にわたって多大な労力を費やして Fluc 系のコンストラクト作成と蛋白分離を次々に試みたが、残念ながらいずれも目的が達成できなかったため、目的蛋白質と外部との相互作用を減らすべく luciferase ユニットの Fluc からよりコンパクトな Rluc に変更することにした。

RNluc-MBD1-MBD2-RC1uc の作成と機能評価

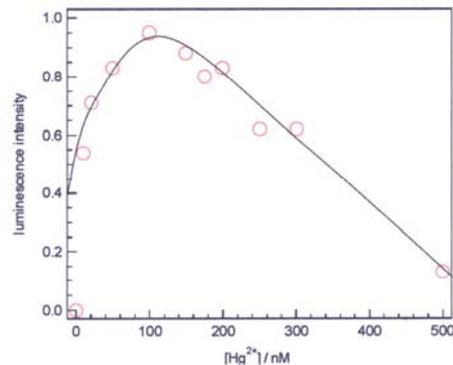
C 末端側に Strep tag をもつコンストラクト RNluc-MBD1-MBD2-RC1uc-Strep tag を作成して形質転換させ、誘導をかけたところ、53 kDa の目的蛋白質の合成が SDS-PAGE で確認された。さらに、アフィニティーカラムによる精製単離にも成功した。そこで、この蛋白質の水銀イオンに対する応答を検討した。

塩化水銀(II)水溶液を緩衝溶液で希釈して希釈系列を作成した。PCR チューブに蛋白質濃度 10 mM の溶液を入れ、発光基質である ViviRen substrate を 60 μ M になるよう添加した後、ゲーティッドホトンカウンタまたはルミノメータで発光強度を観測しながら水銀イオン溶液を濃度 0~500 nM になるよう添加して発光強度の時間変化を観測した。



上図のように発光強度は水銀イオン濃度依存的に変化していたが、立ち上がりの速度

が異なるなど挙動が複雑であった。そこで、発光強度が減衰してほぼ一定となる 85 秒後の強度を水銀イオン濃度に対してプロットしたところ、下図のような関係が得られた。



100 nM 以下の希薄領域では水銀イオン濃度とともに発光強度が増大しているが、高濃度領域では逆に濃度依存的に低下している。

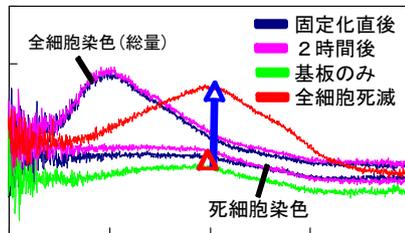
以上の結果から、水銀イオン濃度が極めて低い希薄領域では当初の設計通り、水銀イオンが蛋白質の MBD に捉えられ、それによって 2 分割された luciferase のサブユニットを引き寄せて再結合させ基質の分解による発光機能を復活させることができたものと判断される。しかし、100 nM 以上の高濃度領域になると希薄領域と同様に luciferase ユニットの再結合によって発光機能を獲得するものの、過剰な水銀イオンによって発光機能そのものを阻害されるのではないかとと思われる。このことから考えて、本研究で提案したコンストラクトは希薄条件においてのみ有効であると思われる。これは発光性あるいは蛍光性のスプリット蛋白を用いる重金属のセンシングという概念における共通した限界であろう。

2) ガラス基板の表面修飾と菌体および蛍光蛋白質の表面固定化

蛍光性および発光性蛋白質を固定化したセンサを作製するために、一連の修飾試薬でガラス表面を修飾し、菌体および蛍光蛋白を固定化してその固定化率と安定性を評価した。菌体試料としては YFP を過剰発現させた大腸菌を用いた。

生物試料の固定化にしばしば用いられる PLL と APS コートガラス基板は菌体の固定化率が非常に低く、実用性に乏しいことが明らかになった。これらは表面の疎水性が高いことが知られている。これらに対して、MAS コートおよび PEI コートガラス基板では菌体の吸着が非常に良好であった。さらに、吸着された菌体の生存率を死菌と生菌のトリパンブルーとサフラニンによる選別染色で評価したところ、PLL コートや APS コートで吸着された菌体は半数が死滅したのに対し、MAS コートおよび PEI コートは 90% 以上の生存率

を示した。PEI コートにおける代表的な吸収スペクトルによる菌体固定化評価の結果を下図に示す。500 nm のピークが全菌、600 nm のピークが死菌の吸収を示す。エタノールにより全菌体を死滅させた後のスペクトルとの比較から、表面に固定化された菌体が2時間後にもほぼ完全に生存していることがわかる。

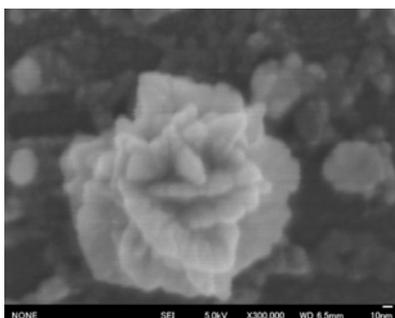


大腸菌の菌体表面は負電荷を帯びており、アミノ基を持つ表面修飾分子に静電的相互作用によって吸着されると期待される。表記の修飾試薬を選んだのはそれゆえであるが、この結果からアミノ化ガラス基板への生菌の安定な吸着固定化のためには、表面の正電荷よりも親水性が一層重要であることが明らかになった。

3) 高い電場増強機能をもつ新規局在プラズモン媒体の作製とガラス基板上への固定化

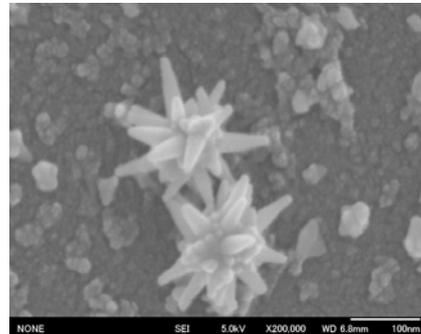
ポリビニルピロリドン (PVP) 存在下、アスコルビン酸 (AA) によって還元反応を行うことにより、平板、スパイク形、および花形などの特異な形態をもつ銀、金、および金銀合金の異方性ナノコロイドを容易かつ再現性よく作製する技術を確立することができた。さらに、成長途中のナノコロイドを超遠心分離することにより、成長過程の観測と成長機構の解明にも成功した。

花形ナノコロイドの代表的な作製法を示す。0.6 μM 10 ml 塩化金酸をプラスチックボトルに入れ、マグネチックスターラで攪拌しながら 50 μM 硝酸銀を 5 μM になるように加えた。これに 1 mM の PVP 水溶液 1 ml, 0.1 mM の AA 水溶液 0.1 ml を順に加えてすぐに攪拌をやめ、惰性で攪拌させた。



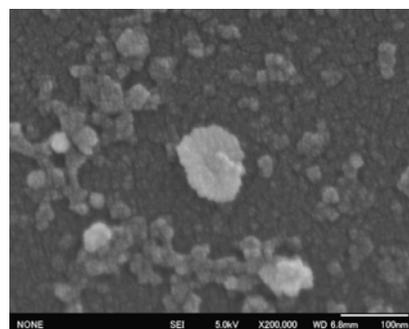
溶液は1分ほどで薄い黄色から青色に変化し、それを 10000 rpm 3 分で沈殿させ、2 度水で洗った。得られた微粒子は SEM から花形であることが明らかになった。

形成機構を明らかにするために一連の実験を行った。まず、PVP 無添加で AA による還元反応を行うと花形ではなくスパイク型の突起構造をもつナノコロイドが形成された。

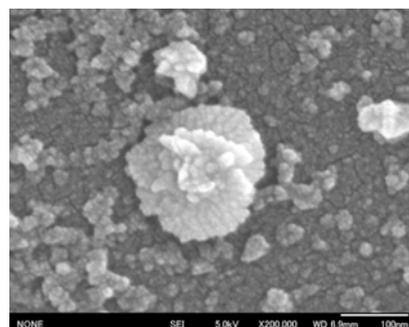


一方、金イオンのみを PVP 存在下 AA により還元すると花卉構造を持たない平板状のナノコロイドが形成された。PVP は Au(111) および Ag(100) 結晶面にそれぞれ特異的に吸着されると言われており、その吸着特性の差が花卉型構造の成長を促していると考えられる。そこで、成長途中のナノコロイドを分離することを試みた。

反応開始直後に超遠心分離を開始したところ、ナノプレートの中心から花卉が成長しかけた構造を捉えることができた。



さらに、30 秒後に超遠心分離を開始して得られたナノコロイドでは花卉構造がかなり成長している様子が鮮明に観測されていた。



溶液の透過吸収スペクトルの時間分解測定により、反応開始直後には金コロイドに特有のプラズモン吸収がみられ、それが消失するとともに長波長領域にブロードな吸収を示し、花形ナノコロイドは青色に着色していることが明らかになった。EPMAによる元素マッピングでは分解能の制限から花弁の元素マッピングを行うことができなかったが、全体では金銀合金であることが明らかになり、これはICPによる分析と一致した。

金と銀の還元電位から考えて、AAによる還元は金のほうが銀よりもはるかに速く、初期には金の還元が優先されて金の球形ナノコロイドが生成すると考えられる。PVPによって保護されるため、その周縁部が選択的に成長してナノプレートを形成する。この際、金と銀が同時に析出する、あるいは一旦銀が析出してその一部が金によって交換する、といった過程が関与すると思われる。花弁構造は中止部から成長していくので、恐らく金と銀の合金化による欠陥部分から成長するものと考えられる。

得られた異方性のナノコロイドは600～800 nm領域にブロードな吸収を持ち、MASコート基板上で長期間安定であるため、生体分子用の近赤外蛍光増強媒体やラマン増強媒体として期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

石田昭人, バイオセンシングとプラズモニクス, 表面技術, 2011, 62, 1-6.

Akito Ishida and Keisuke Kumagai, Fluorescence Enhancement Due to Gap Mode of Gold Colloids Immobilized on a Hydrophilic Amino-terminated Glass Substrate, Chem. Lett., 2009, 144-145.

[学会発表] (計7件)

1) 熊谷圭祐, 石田昭人, AuAg 二元合金花形ナノ粒子によるクロロフィル誘導体のプラズモン蛍光増強, 日本化学会第91春季年会, 2011年3月, 横浜.

2) 石田昭人, 特異な形態をもつ銀マイクロプレートの蛍光増強特性, 第19回ナノオプティクス研究討論会, 2010年7月, 東京.

3) 石田昭人, 親水性アミノ化ガラス表面におけるプラズモン増強蛍光分光, 2009年固体光化学討論会, 2009年11月, 京都.

4) 石田昭人, プラズモン蛍光増強媒体としての金属コートナノインプリントレプリカと金コロイド吸着基板, 第17回ナノオプティクス研究討論会, 2008年7月, つくば.

5) 石田昭人, プラズモン蛍光増強媒体としての金属コートナノインプリントレプリカ

と金コロイド吸着基板, 日本化学会第88春季年会, 2008年3月, 東京.

6) 石田昭人, プラズモン増強電場のバイオフォトニクスへの応用, 応用物理学会応用電子物性分科会, 2007年9月東京.

7) 石田昭人, ナノ構造化金属表面におけるプラズモン増強蛍光分析, レーザー学会東京支部第18回若手技術者と学生のためのレーザー応用セミナー, 2007年7月, 東京.

[図書] (計2件)

石田昭人, 生体分子反応計測への応用, 第5章計測・センシング技術, 第1節, 山田淳監修, プラズモンナノ材料の最新技術, 2009, pp157-175, シーエムシー出版.

石田昭人, インタラクティブ研究に応えるSPR センサの最新展開, プラズモン基礎理解の徹底と応用展開 第4章第5節, 2011, pp98-106, 情報機構.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 昭人 (ISHIDA AKITO)

研究者番号: 20184525

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし