

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月18日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22656115

研究課題名（和文） 蛍光分子とウイルス吸着タンパク質を用いた革新的水中病原ウイルスセンサの開発

研究課題名（英文） Development of a sensor for detection of pathogenic virus in water based on fluorescent molecule and virus binding protein

研究代表者

佐藤 久 (SATO HISASHI)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80326636

研究成果の概要（和文）：本研究の最終目的は水中に存在する病原ウイルスを検出するセンサを開発することである。本研究期間内において、センサ開発に必須のウイルス吸着タンパク質（VBP）と蛍光分子（fluorophore）を作製した。VBP を合成するように遺伝子組み換えされた大腸菌を用いて VBP を生産した。SDS-PAGE により生成したタンパク質の分子量が VBP の分子量である 60kDa と一致することを確認した。既往の研究に従い、本研究室において fluorophore（4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene、通称 BODIPY）を生産する方法を確立した。

研究成果の概要（英文）：The final goal of this study is to develop a sensor for detection of pathogenic virus in water. In this study, we synthesized virus-binding proteins (VBP) and fluorophore. VBP were produced by genetically-modified E. coli. The SDS-PAGE profile showed the extracted soluble proteins from E. coli cells were VBP of which the estimated molecular weight is 57 kDa. We could also synthesize fluorophore (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) in our laboratory.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1700000	0	1700000
2011年度	1500000	450000	1950000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
2014年度	0	0	0
総計	3200000	450000	3650000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：ウイルス、センサ、ウイルス吸着タンパク質、蛍光分子、光導波路、エバネッセント波、マイクロ流路

1. 研究開始当初の背景

ウイルスによる水系感染症が世界中で発生している。特に開発途上国においては多くの若い命が奪われており、効果的な対策は待ったなしの状況である。水系感染症の症例としては下痢を伴う胃腸炎、まひ、髄膜炎、等が

挙げられる。世界保健機関(WHO)は下痢により世界中で年間180万人が亡くなっていると報告している。ウイルスによる水系感染症を予防するには、水道水源や発生源のウイルス量を正確に定量しなければならない。ウイルスの検出はRNA量の定量により行われているが、RNA転写、増幅時にミスマッチが生じ定量

性に欠ける、等の問題がある。

研究代表者は10年以上にわたりマイクロセンサを開発してきた。マイクロセンサは、先端の高分子膜内に組み込まれた分子が、サンプル水中から特定のイオンを選択的にセンサ内に運ぶ際に、イオン濃度に比例して電流が発生する原理を利用している。ウイルスと選択的に結合する物質があればウイルスセンサが開発できるはずである。研究分担者の佐野はウイルス吸着タンパク質 (Virus-Binding Protein: VBP) に関する研究の第一人者であり、VBP の回収、精製技術に精通している。佐野との議論の中で VBP は高分子 (10~60kDa) 有機物でありセンサ先端の膜内を移動させることは極めて難しいことが明らかとなった。現在研究代表者は蛍光分子 (fluorophore) を用いた重金属センサを開発している。fluorophore は、特定のイオンと結合した時に蛍光波長がシフトする蛍光分子である。ウイルスは電荷を持つので、蛍光分子を VBP と隣接させればウイルスを検出できる可能性があると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子内電荷移動により蛍光波長がシフトする fluorophore を合成する、ノロウイルスに特異的な VBP (NoVBP) を生産する、事である。

3. 研究の方法

Imai らの方法に準拠し、NoVBP を生産した。培地ビンに Yeast extract 5g, Tryptose 10g, NaCl 1g をそれぞれはかり取り、Milli-Q 水 500mL を加え溶解させた。これをオートクレーブにかけた。LB 培地 10mL を 50mL チューブに取り、そこへ 50mg/L アンピシリン溶液を 10 μ L 加えた。大腸菌を含む培養液を、マイクロピペットチップの先端が液面に軽く触れるようにして取り、LB 培地に接種した。これを 37°C で一晩培養した。翌日、2本の 50mL チューブにそれぞれ LB 培地 40mL、アンピシリン溶液 40 μ L、培養した大腸菌培地 1mL を加え、37°C で8時間再度培養した。なお、培養液への大腸菌の接種は、コンタミネーションを防ぐため、ビンおよびチューブのふちを栓の開閉時にガスバーナーで軽くあぶりながら行った。

2本の培養チューブの質量差が 0.05g 以内になるように Milli-Q 水を加え調整した後、12,000rpm で10分間遠心分離した。遠心上清を捨て、各チューブに 3mL の BugBuster を加え沈殿物が完全に溶解するまでピペッティングし、数秒間 VORTEX にかけた。これを10分間室温で静置した。各チューブの質量差を Milli-Q 水で調整した後、再び遠心分離した。

この上清を抽出タンパク質とした。精製作業は3回行い、1回目はシリンジ操作型カラム、2、3回目は自然落下型カラムを用いた。

カラム内に気泡が入らないよう、カラムの注入部位を Milli-Q 水で満たしてからシリンジを固定し、できるだけゆっくりと以下の各液体を注入した。はじめに、カラム内を 5mL の Milli-Q 水で置換し、つづいて 5mL の洗浄バッファーで置換した。次に洗浄バッファーで10倍に希釈した抽出タンパク質サンプル溶液を 10mL カラムに添加し、再度洗浄 5mL のバッファーを注入し、カラムにトラップされなかったタンパク質を洗い流した。最後に溶出バッファーを 5mL 注入し、溶出液を回収した。

はじめにカラム内の充填液を排出し、洗浄バッファーを 10mL 通した。次に洗浄バッファーで10倍希釈した抽出タンパク質サンプル溶液を 10mL 通し、続いてトラップされなかったタンパク質を 10mL の洗浄バッファーで洗い流した。次に、イミダゾール濃度が異なる溶出バッファーを低濃度のものから順にそれぞれ 10mL 通し、それぞれの溶出液を回収した。

上述の各精製ステップにおける洗浄バッファーおよび溶出バッファーはリン酸バッファーにイミダゾールを添加したものである。

参考文献: Imai et al. 2011 BMC Biotechnology, 11:123.

精製したタンパク質の分子量を、SDS-PAGE で測定した。本実験では NuPAGE 電気泳動専用試薬および泳動ゲル (インビトロジェン社) を用いた。SDS-PAGE は全ての精製タンパク質に対して行った。MOPS SDS ランニングバッファー (20 \times) 40mL を Milli-Q 水 760mL で希釈し陽極用ランニングバッファーとした。このうち 200mL をビーカーに取り、NuPAGE アンチオキシダント 0.5mL を加えて攪拌し、陰極用ランニングバッファーとした。10% Bis-Tris ゲルカセットを袋から取り出し Milli-Q 水で洗った。カセットのテープをはがしコームを抜き取り、ゲルカセットのウェルを陰極用ランニングバッファーでピペッティング洗浄した。ゲルカセットを向きに注意して泳動層セルに差し込みセットした。

ゲルの12個のウェルのうち、両端に Novex-sharp を 10 μ L、残りのウェルにはサンプルを 20 μ L、気泡が入らないように注意して専用のチップを用いてマイクロピペットで添加した。陰極バッファー槽に少量の陰極用ランニングバッファーを注いで漏れないことを確認した後、ウェルが十分浸る高さまで注いだ。つづいて陽極バッファー槽に陽極用ランニングバッファーを注いだ。泳動層を電源装置に接続し、200V の定電圧で50分間電気泳動を行った。

泳動が終了したゲルカセットを泳動層から取り出し、洗ビンを用いて Milli-Q 水で洗浄した。カセットをナイフで開き、中のゲルを取り出し、染色容器に移した。容器に Milli-Q 水を注ぎ約 5 分後水を捨てる、といった洗浄作業を 3 回行った。洗浄が済んだら、ゲルが十分浸るよう容器に SimplyBlue 染色液を注ぎ、一晚緩やかに振とうさせた。

翌日、染色液を Milli-Q 水に交換し、1 時間振とうすることで洗浄した。その後、ゲルを容器から取り出し、ゲル両端の分子量マーカーと位置を比較することで各サンプルの分子量を測定した。

Hafuka らの方法に準拠し、BODIPY を生産した。参考文献：Hafuka et al. *Analytica Chimica Acta*, submitted.

4. 研究成果

LB 培地を用いて遺伝子組み換え大腸菌を培養した。BugBuster を用いて大腸菌を処理した。遠心分離により固形物を回収した。カラムを用いてヒスチジンタグの付いた VBP を回収した。SDS-PAGE により、回収したタンパク質が NoVBP であることを確認した。分離膜を用いて NoVBP を透析した。最後に、NoVBP を遠心濃縮した。

NoVBP はアミンカップリング法によってセンサチップに固定化した。まず、センサチップとして使用する金薄膜が蒸着したガラス板を、0.01M の 3-メルカプトプロピオン酸、又は 0.01M の 11-メルカプトウンデカン酸の水溶液に約 20 時間浸し、金薄膜上にメルカプトカルボン酸の自己集合膜を形成させた。自己集合膜を用いることにより、NoVBP をその表面に並列させて固定化することができ、またすべての操作を流れ系によって簡便に行うことができる。次に、金膜と結合した硫黄の反対側の末端基として存在するカルボキシル基を、1 エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)を使って N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)のエステルとする。このようにして活性化されたカルボキシル基に、リン酸緩衝液で希釈した NoVBP を固定化する。EDC と NHS の混合溶液は 0.4M EDC 水溶液と 0.1M NHS 水溶液で調整した。この混合液に前処理したセンサチップを 7 分間浸し、NHS を末端に結合させた。最後に末端基としてアミノ基を持つ NoVBP の水溶液にセンサチップを捜すと、置換反応によって NoVBP がペプチド結合する。

4-Methyl-1,5-dihydro-pyrrol-2-one から 4-(2-butyl-octyloxy)-1,5-dihydro-pyrrol-2-one を、3,5-dimethyl-1H-pyrrole-2-carbaldehyde と

4-(2-butyl-octyloxy)-1,5-dihydro-pyrrol-2-one から 4-(2-butyl-octyloxy)-5-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene)-1,5-dihydro-pyrrol-2-one を、4-(2-butyl-octyloxy)-5-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene)-1,5-dihydro-pyrrol-2-one から fluorophore (Trifluoromethanesulfonic acid 4-(2-butyl-octyloxy)-5-(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-ylmethylene)-5H-pyrrol-2-yl ester) を合成した。これが BODIPY であることを ¹H NMR スペクトル、¹³C NMR スペクトル、マスマスペクトルによって確認した。

BODIPY の光特性を、金属イオンとの反応により明らかにした。吸収極大波長は 516 nm であった。Na⁺、K⁺ をそれぞれ加えても吸収スペクトルに変化はなかった。Mg²⁺、Ca²⁺、Cr³⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺、Hg²⁺ ならびに Pb²⁺ をそれぞれ加えたところ、吸収スペクトルが長波長側に移動した。Fe²⁺ を加えた場合には他のイオンと異なり吸収極大域が 2 領域現れた。また Fe³⁺ の場合には吸収極大波長での吸光度が著しく低かった。

蛍光極大波長は 539 nm であった。Mg²⁺、Ca²⁺、Zn²⁺ ならびに Cd²⁺ をそれぞれ加えた場合、蛍光スペクトルが長波長側に移動した。また、蛍光極大波長もイオンの種類によって異なった。Cr³⁺、Mn²⁺、Fe²⁺、Fe³⁺ ならびに Cu²⁺ は蛍光消光を引き起こした。Hg²⁺ および Pb²⁺ は Zn²⁺ よりもさらに長波長側に弱い蛍光を発した。

モル吸光係数は 50000~60000 と高い値であったが、Fe²⁺ および Fe³⁺ を加えた場合においては低下した。BODIPY の蛍光量子収率は 0.81 であり、高い値を示した。金属イオンを加えると蛍光量子収率が著しく低下してしまう蛍光色素が存在するが、BODIPY は Zn²⁺ の場合でも 0.30 という比較的高い値を示した。なお、Hg²⁺ および Pb²⁺ 存在下では蛍光量子収率は低い値となった。

このように、本研究により、センサ開発に必須のウイルス吸着タンパク質 (VBP) と蛍光分子 (fluorophore) を作製した。これらを用いてウイルスセンサが作製できれば、瞬時にウイルスを検出できる技術となる。今後は、さらに簡便にセンサを開発するため、表面プラズモン共鳴を用いたウイルスおよび病原菌センサの開発を行う。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕（計 0 件）

〔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

<http://www.eng.hokudai.ac.jp/lab/aqua/contents/HisashiSatoh/index-HisashiSatoh.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 久 (SATO HISASHI)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80326636

(2) 研究分担者

佐野 大輔 (SANO DAISUKE)

北海道大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80550368