

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：53401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410157

研究課題名(和文)有機リン加水分解酵素表層発現酵母を用いる高感度有機リンセンサーの構築

研究課題名(英文) Construction of detection system using the surface displayed OPH yeast cells for organophosphorus compounds

研究代表者

高山 勝己 (Takayama, Katsumi)

福井工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号：70226934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：OPH表層発現酵母とNIR酵素を触媒として組み合わせて、電気化学的にp-ニトロフェノール骨格をもつ有機リン農薬(代表例：パラチオンやスミチオン)を特異的に検出する(検出限界：0.5 μ M程度)バイオセンシングシステムの構築が実現できたといえる。電極は市販のGC(6 mm i.d.)電極を使用した。これを楕形電極に置換すればさらなる検出感度の向上(サイクリング反応による応答増幅効果による)が見込める。分析の全工程に必要な所要時間は30-40分程度である。

NIR酵素も表層発現体に置換する事が最終目標であるが、NIR表層発現酵母の活性が低いために実現できない状態にある。

研究成果の概要(英文)：Organophosphorus hydrolase was displayed on the surface of yeast cell MT8-1 by using a glycosylphatidylinositol(GPI) anchore. This yeast cell(MT8-1(OPH)) was used as a biocatalyst for the detection of harmful organophosphorus compounds such as parathion and sumithion. Parathion was hydrolyzed to p-nitrophenol with MT8-1(OPH). The p-nitrophenol was reduced to p-aminophenol with nitroreductase(NIR), and electrochemically detected. In this method, NIR was trapped on the commercially available Glassy Carbon electrode surface.

The calibration curve linearity was obtained for paration concentrations between 1 μ M(0.29 ppm) to 7 μ M(2ppm) with a detection limit of 0.5 μ M(0.14 ppm). The current response decreased with the repeated using of NIR electrode. The similar results for sumithion were obtained. This detection system is sensitive and specific for organophosphorus compounds with p-nitrophenol structure.

研究分野：分析化学

キーワード：バイオセンサー 有機リン農薬 細胞表層発現 酵母 有機リン加水分解酵素 ニトロレダクターゼ

1. 研究開始当初の背景

有機リン化合物は、アセチルコリンエステラーゼを強く阻害し、神経伝達を攪乱する物質として知られている。パラチオン、メチルパラチオンは1950年代初めに開発されたが、ヒトに対しても高い毒性があるために国内での生産・使用は中止された。しかしながら開発途上国においては、使用が継続されており農産物汚染や土壌汚染が危惧されている。

一方、日本国内では、その後開発されたスミチオン等が普及し、ホームセンター等で容易に入手でき大量に畑に散布されている。ヒトに対する毒性が低くなったとはいえ、国内外における有機リン農薬による環境汚染、農産物汚染は依然深刻なままである。カリフォルニア大学リバーサイド校の Ashok らは、有機リン農薬の微生物分解や検出法の開発研究に1999年以來取り組んでおり、申請者も過去10年間にわたって共同でこの課題に取り組んできた。

申請者は、2006年に酵母細胞表層上に、 α -グルチニンアンカー(C-末端結合型 GPI アンカー)を用いて、*Flavobacterium* 由来の有機リン加水分解酵素(OPH)を発現させることで、有機リン化合物(OPs)に極めて高い選択性を持つバイオアッセイシステム用の生体触媒(野性型 OPH 表層発現酵母)をはじめて創製した[1]。

特に p -ニトロフェノール骨格を構造に有する OPs が OPH の加水分解作用を受けると、415nm に吸収極大を持つ p -ニトロフェノール(黄色)を生成するので、これを小型可視吸光度計と組み合わせることで簡易的なバイオセンサーを構築できる。ところが、可溶化状態の OPH 酵素と比べるとその活性が低かったため、反応速度が遅く、許容に耐える時間内で有機リンを検知するシステムが構築できなかった。そこで、N-末端型アンカーの一つであるレクチン様細胞壁タンパク質(FL01p)アンカーを用いることで、その活性を10倍程度まで増大させることに成功し、実用レベルに到達できた[2]。

申請者は2011年に、FL01p型アンカーを用いた OPH 表層発現酵母を用いた簡易型の OPs センサーを市販のファイバー型可視分光光度計デバイスと組み合わせて構築し、分析条件の最適化を行い実用化への可能性を検討した[3]。その結果、触媒の長期安定性や応答時間はほぼ満足のいくものとなったが、パラオキソンに対する検出限界は5ppm程度であり、さらなる高感度化をいかに達成するかが問題として残したままであった。

2. 研究の目的

有機リン(パラチオン)が *Flavobacterium* 由来の有機リン加水分解酵素(OPH)の作用を受けると、 p -ニトロフェノールが生成する。よって、生成した p -ニトロフェノール(405nm に吸収極大を持つ黄色の化合物)の吸光度測定により有機リンの検出が可能となるが、OPH 表層発現酵母を触媒とする場合には、測定溶液系が懸濁状態となるため、高感度化の妨げになった。そこで、電気化学的測定法の適用を考案したが p -ニトロフェノールの酸化還元電位は0.8V (Ag/AgCl sat. KCl) にあり共存する酸化還元物質(例:ビタミンC等)の影響が大きくなることが予想されるため高感度化の妨げとなる。そこで、大腸菌由来ニトロレダクターゼ酵素(NIR)により p -ニトロフェノールを p -アミノフェノールに変換すれば、より低電位側0.2V (Ag/AgCl sat. KCl) で検出できるようになるため、新たに大腸菌由来の NIR 遺伝子を酵母表層発現ベクターに組み込み NIR 表層発現酵母触媒を創製し、図1のメカニズムで有機リンを検出するバイオアッセイ系を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

NIR 表層発現酵母の創製

3つの異なるアンカーを用いて NIR を酵母表層に発現させその酵素活性を、 p -ニトロフェノールを基質として2時間後に生成する p -アミノフェノール濃度によって比較した。 p -アミノフェノールの生成量はインドフェノール法によって測定した。

GC 電極上に10 unit 相当の NIR 含有液を滴下し、室温にて風乾後、透析膜で表面を被覆した。この NIR 固定 GC 電極を pH7.0 トリス緩衝液(NIR の補酵素として10 mM NADH と $OD_{600} = 1.0$ になるように OPH 表層発現酵母を含有)に浸漬した。ポテンショスタットを用いて電極に0.2V (Ag/AgCl sat. KCl) の電位を印加後、溶液を攪拌しながら所定濃度になるようにパラチオンを加えた時の電極応答(電流応答)をみた。

4. 研究成果

NIR を表層発現していない酵母(MT8-1)をコントロールとして用いるアンカーによる表層 NIR 活性比較を行った結果を図2に示した。GPI アンカーにより表層発現したタイプ(pMW NfsA)が他に比べ活性が3倍程度高いことが分かった。しかし、実用的な触媒としては、さらに10倍程度の向上が必要であると判断した。

MT8-1 (OPH) と NIR 酵素固定電極を用いて、パラチオンの電気化学的検出を行った。図 3 に 7 μM パラチオンに対する電流 - 時間応答 (赤色) を示した。正味で 600 nA 程度の電流応答が確認された。検量線を図 4 に示した。0.5 ~ 10 μM の範囲で直線性 ($R^2 = 0.9945$) が得られ、検出限界は 0.5 μM であった。応答選択性であるが *p*-ニトロフェノール骨格を有するスミチオンもパラチオンと同等の応答を示したが、*p*-ニトロフェノール骨格を持たないマラソンには応答しなかった。

本研究において、電極は市販の GC (BAS 製: 6 mm i.d.) 電極を使用した。これを楕形電極に置換すれば、さらなる検出感度の向上 (サイクリング反応による応答増幅効果) が見込める。触媒である NIR 酵素を NIR 表層発現酵母に置換することが最終目標であるが NIR 表層発現酵母の NIR 活性が低いために実用に見合う感度を持った測定系の構築が実現できないという課題を残している。

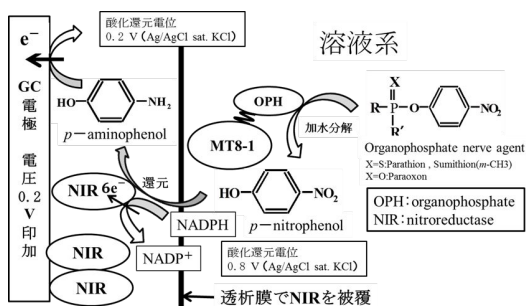


図 1 有機リン農薬の検出メカニズム

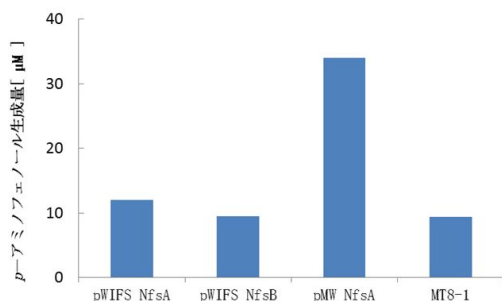


図 2 各種表層発現 NIR の活性比較

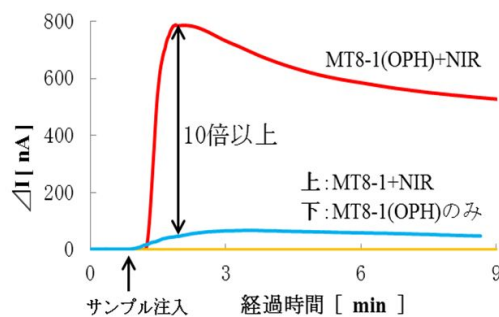


図 3 パラチオンに対する電流 - 時間応答曲線

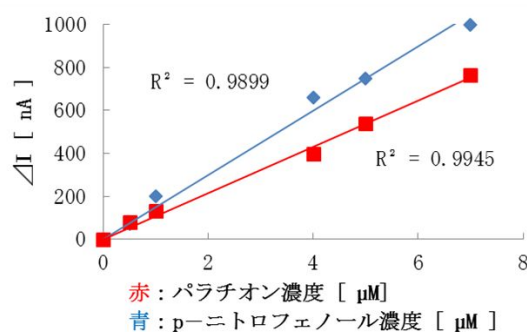


図 4 パラチオンに対する検量線

< 引用文献 >

Takayama et al., *Biotechnol., Prog.*, 22, 939-943(2006)
 Fukuda T., Tsuchiyama K., Makishima H., Takayama K., Mulchandani A., Kuroda K., Ueda M., Suye S., Improvement in organophosphorus hydrolase activity of cell surface-engineered yeast strain using Flo1p anchor system, *Biotechnology Letters*, 32, 655-659(2010).
 Takayama K., Suye S., Tanaka, Y., Mulchandani, A., Kuroda K., and Ueda M. Estimation of enzyme kinetic parameters of cell surface-displayed organophosphorus hydrolase and construction of biosensing system for organophosphorus compounds. *Analytical Sciences*, 27, 823-826 (2011).

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 3件)

高山勝己、酵母表層発現酵母を用いた有機リン農薬検出法の構築、第 21 回高専シ

ンポジウム in 香川、2016 年 1 月 23 日、
丸亀市民会館

高山勝己、酵素表層発現酵母を用いた有機リン農薬検出法の構築、日本化学会近畿支部 北陸地区講演会と研究発表会、
2015 年、11 月、金沢大学

高山勝己、ニトロレダクターゼ酵母表層発現、第 19 回高専シンポジウム in 久留米、2014 年 1 月 25 日、久留米工業高等専門学校

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ce.fukui-nct.ac.jp/staff/takayama/kenkyu.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高山 勝己 (TAKAYAMA Katsumi)

福井工業高等専門学校・物質工学科・教授

研究者番号：70226934