

放射線を測定するための FRET を利用した微生物センサーの開発

Development of a FRET based microbial biosensor for radiation measurements

仲嶋紗那

指導教員 秋元卓央

東京工科大学 応用生物学部 応用生物学科 バイオセンサー研究室

キーワード： 放射線, バイオセンサー, 大腸菌

【背景・目的】

現在の放射線測定は、現地へ赴き検体を回収したり、測定を行う方法が主であるが、線量が多い地では測定を行うだけで被曝する可能性がある。放射線を浴びると DNA が切断されるなど遺伝子に損傷が起こる。そこでこのような危険を回避するため、放射線により蛍光色が大腸菌に変化する大腸菌を散布し、蛍光観察を行うだけで放射線の強弱を測定できる方法の開発を目的とした。

具体的には、大腸菌内で放射線に反応して Tobacco Etch Virus (TEV) プロテアーゼを発現させるために、RecA プロモーターの下流に TEV プロテアーゼ遺伝子を導入した。また、これとは別に TEV 認識配列を含んだリンカーで GFP と RFP を連結した遺伝子を導入する。すると放射線が無い場合には TEV 認識配列の切断が起きず FRET (Fluorescence energy transfer) により赤色の蛍光を発し、有る場合には TEV 認識配列の切断が起きて緑色の蛍光を発することが可能になる (図 1)。

FRET とは 2 色の蛍光タンパク質間の距離が近いことで起きるエネルギー転移による蛍光色変化である。GFP は青色の光を当てると緑色の蛍光を示す蛍光タンパク質であり、RFP は緑色の光を当てると赤色の蛍光を示す蛍光タンパク質である。そのため、この 2 つを繋いで青色の光を当てると GFP のエネルギーを受けて RFP が蛍光するため大腸菌は赤色に光る。一方 GFP-RFP 間の TEV 認

識配列を含むリンカーが切断されると、GFP と RFP の距離が大きく開くため青色の光を当てても RFP は GFP のエネルギーを受け取ることができず、GFP の蛍光のみが見られるため大腸菌は緑色に蛍光する。

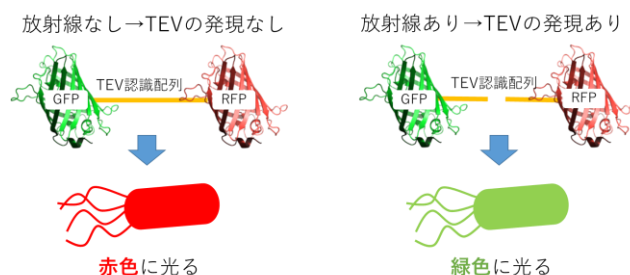


図 1 FRET による蛍光色変化

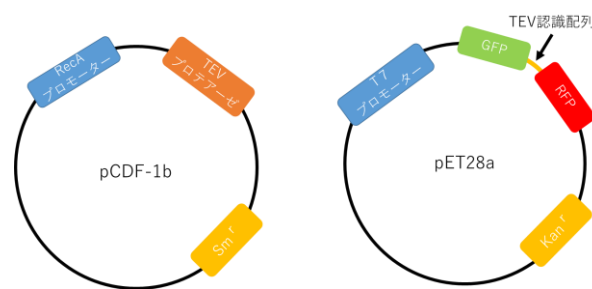


図 2 導入したプラスミド

【実験方法】

pCDF-1b プラスミドベクターに RecA プロモーターを導入し、その下流に TEV プロテアーゼ遺伝子を挿入した。また、pET-28a プラスミドベクターには T7 プロモーターの下流に GFP 遺伝子、TEV 認識配列、RFP 遺伝子の順で導入した (図 2)。次に、これら 2 つのプラスミドを BL21 株に形質

転換し、共発現させた。

遺伝子を導入した大腸菌にタンパク質誘導を行い、SDS-PAGE、蛍光スペクトル測定、蛍光観察を行い、タンパク質の発現と蛍光を確認した。遺伝子を損傷させる物質として放射線の代わりにマイトマイシン C(MMC)を用い GFP-RFP の発現の誘導には IPTG を用いた。誘導は IPTG 濃度 100 μ M 添加し 2 時間後に MMC 濃度 0~0.1 μ g/ml を添加する方法で行った。

【実験結果】

GFP-RFP と TEV プロテアーゼを誘導したのちに、大腸菌からタンパク質抽出を行い、可溶性画分と不溶性画分を得た。それを SDS-PAGE によってタンパク質の発現を調べた結果が図 3 である。GFP-RFP は 78kDa、TEV は 27kDa である。それぞれの不溶性画分から 75kDa 付近、25kDa 付近にバンドが確認できる。このため GFP-RFP と TEV プロテアーゼが発現していることが確認できた。また、MMC 濃度が上がるにつれて、TEV のバンドが濃くなっていることも確認できる。

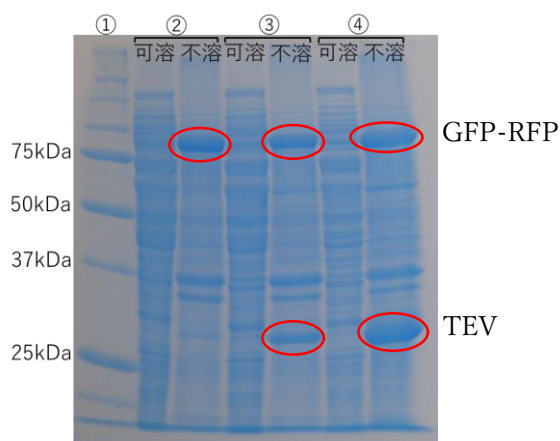


図 3 SDS-PAGE の結果

①分子量マーカー ②MMC 濃度 0 μ g/ml ③MMC 濃度 0.01 μ g/ml ④MMC 濃度 0.1 μ g/ml

大腸菌の蛍光スペクトル測定を行った結果が図 4 である。図 4 より、どのサンプルにも 510 nm 付近に GFP 蛍光ピークが見られた。MMC 濃度 0 μ g

/ml のサンプルには FRET による 570 nm 付近の RFP 蛍光ピークも見られた。一方 MMC 濃度 0.1 μ g/ml のサンプルではリンカーの切断により RFP のピークは消滅した。

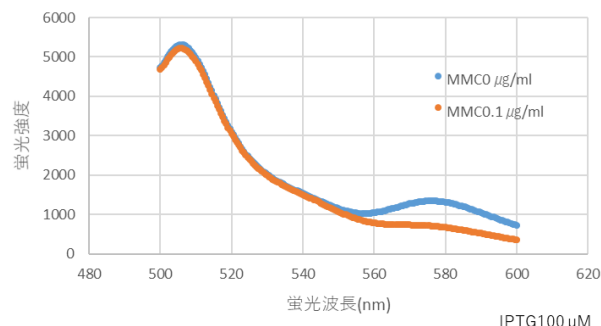


図 4 蛍光スペクトル測定の結果

これらの大腸菌に 488nm の光を当て蛍光色を観察したものが図 5 である。MMC 濃度 0 μ g/ml と 0.1 μ g/ml を比較すると大きく色が異なることが分かる。MMC 濃度 0 μ g/ml のサンプルでは FRET が起き RFP が蛍光しているため、緑色と赤色の蛍光が混ざり黄色く見えている。MMC 濃度 0.1 μ g/ml のサンプルでは FRET が起きておらず、緑色の蛍光が見えている。

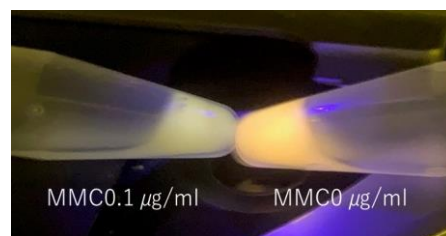


図 5 蛍光観察

【結論と考察】

遺伝子導入した大腸菌は MMC の添加により蛍光色変化を示すことが分かった。これは MMC により、TEV が発現し、TEV 認識配列を切断することで FRET が起きなくなっていると考えられる。

しかし、RFP の発色のむらなどによってもこのような結果になることが考えられるため、今後は GFP-RFP 間が切断されたことによる蛍光色変化であるかを確認し、実際に変異原物質の添加により FRET の有無が起きているのか検討したい。