L-グルコース資化菌由来 脱水素酵素を利用した電気化学的 LG計測法の開発

2025/04/26

○三浦 大明, 津川若子, 田畑美幸, 浅野竜太郎, 池袋 一典
（東京農工大学大学院　工学府生命工学専攻・生物システム応用科学府）

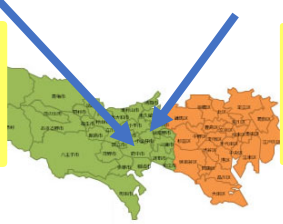
第 2 回 L-glucose 研究会
大阪公立大学 医学部 大講堂

TUAT 国立大学法人 東京農工大学
Tokyo University of Agriculture and Technology

東京農工大学
Tokyo University of Agriculture and Technology

FUCHU campus
Faculty of Agriculture

KOGANEI campus
Faculty of Engineering



農

工

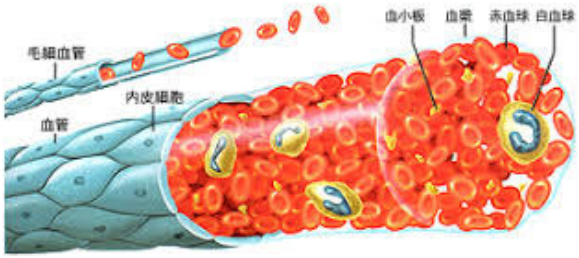
Biotechnology and Life Science,
生命工学専攻

バイオを使ったものづくり
→ バイオセンサの開発

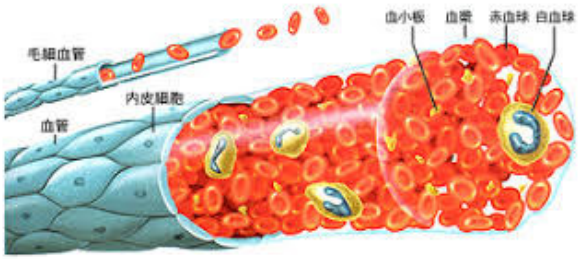
2

バイオセンサとは？

バイオセンサとは？



バイオセンサとは？



ChatGPTによるフェルミ推定：
一握の砂 = 10^9 (10億個)

全血 1 mL中

イオン, 低分子 (グルコースなど)： **2.5×10^{19} 個**

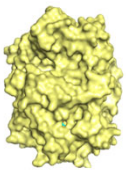
血球成分： **5.3×10^{9} 個**

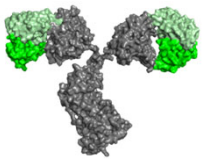
がん関連分子 (ex. 1 nM)： **5.3×10^{11} 個**

一握の砂に存在する10粒の砂粒子を探すようなもの…
それを可能にするのが「バイオセンサ」

バイオセンサにおける分子認識素子

相手を捕まえるためのアイテム

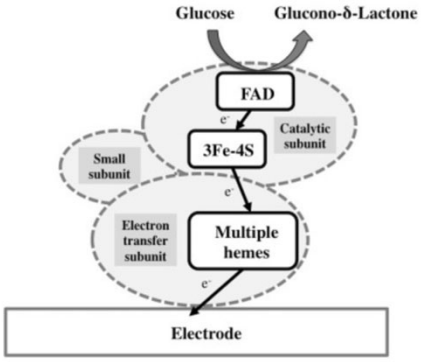




	核酸アプタマー	酵素	抗体
親和性	μM～nM	mM～μM	μM～pM
標的分子	低分子 ～タンパク質	低分子	低分子 ～タンパク質
シグナル変換	難	易	難

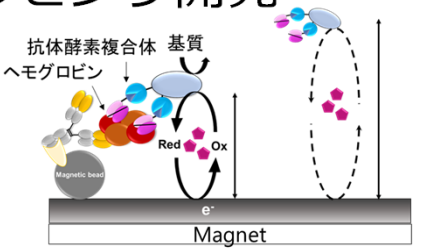
“DG×酵素”を用いたこれまでのセンサ開発

血糖センサを志向した
グルコースセンシング

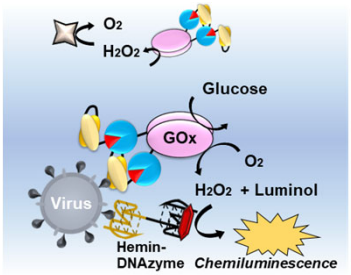


I. Lee *et al.*, *Bioelectrochem.*, **121**, 1-6, (2018)

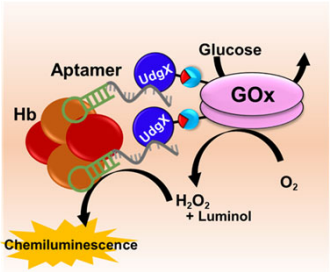
グルコースを燃料
= シグナル変換の起点
とした疾患関連分子
センシング



Miura *et al.*, *Talanta.*, **234**, 122638, (2021)



Miura *et al.*, *Adv. Sci.*, **11**, 2403871, (2024)

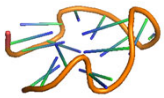


Komiya *et al.*, *JACS*, **146**, 4087-4097, (2024)

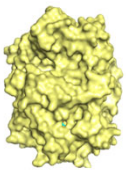
迅速簡便評価系 (すぐに誰でも簡単に) の構築

バイオセンサにおける分子認識素子

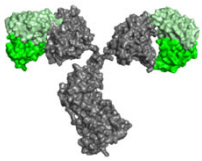
相手を捕まえるためのアイテム



核酸アプタマー



酵素



抗体

	核酸アプタマー	酵素	抗体
シグナル変換	難	易	難
異性体識別	報告なし	多数報告	報告なし

LG迅速簡便評価系を構築するには、
酵素を分子認識素子とすることが最適である！

LGセンサー

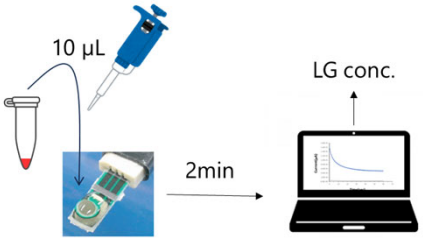
最終目標

環境中のLG、資化菌やがん細胞培養液中のLG濃度を簡便に計測できるバイオセンサーを構築する。

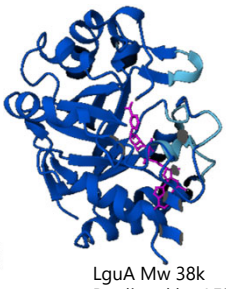
→ **LGの追跡＝代謝・体内動態の解析 (血液・尿・涙・汗など)も可能になる**と考えられる

今回の目的

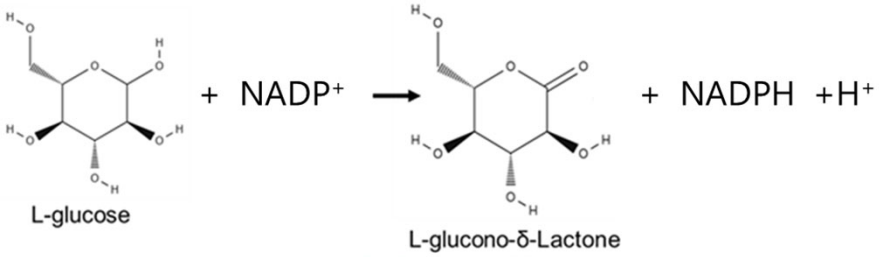
・最も簡単な計測例として、mMオーダーのLGの計測
・DGとLGを区別できるか
・細胞培養用培地および
バクテリア用最少培地中でのLG計測



L-galactose dehydrogenase (LguA)



- ***Luteolibacter* sp. LG18由来の酵素**
- **L-ガラクトースを基質とするが、LGとも反応する**
  - Yachida M, Nakamura A. *Microbiol Resour Announc*. 2024 12;13(3)



10

Preparation of LguA

発現ベクターは筑波大 中村先生
よりご供与いただきました。

BL21 (DE3)

↓ Transformation with pET28a-lguA

Pre-culture/LB (50 μg/mL Kanamycin)

↓

Culture
Autoinduction medium
25 ℃, 150 rpm, 20 h

↓

Harvesting
Wet cells (14 g / L-culture)

↓

Disruption by French press

↓

Centrifugation
Ultracentrifugation

↓

Crude LguA

↓

Purification
Ni^{2+} affinity chromatography

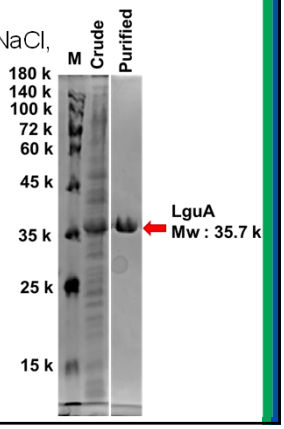
↓

Dialysis
20 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl,
10 % Glycerol pH 7.5

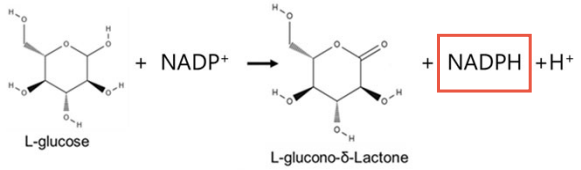
↓

Purified LguA
(~50 mg/Lculture)

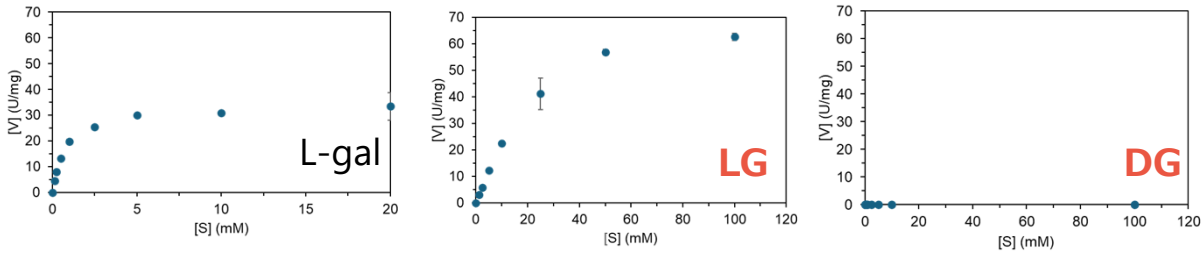
Auto-induction medium
0.5 % glycerol, 0.05 % glucose,
0.2 % lactose, 50 mM $(NH_4)_2SO_4$,
50 mM KH_2PO_4, 50 mM Na_2HPO_4,
1 mM $MgSO_4$, 500 μM $FeCl_3$



Enzymatic activity of LguA



Condition
Buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8.5)+1mM NADP
Wavelength: 340 nm (NADPH)
30 sec kinetics



*V*max : 35 U/mg, *K*m : 0.85 mM

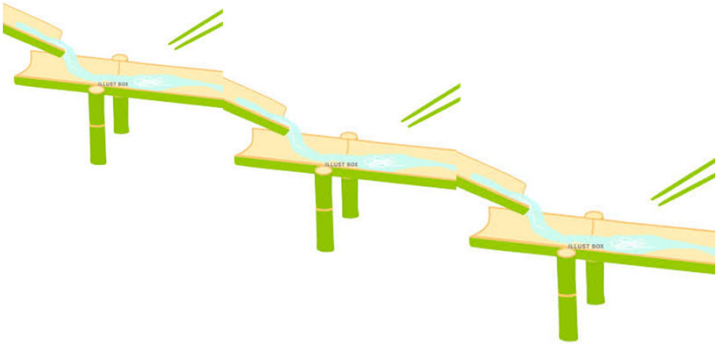
*V*max : 77 U/mg, *K*m : 21.5 mM

LGに高い活性を示し、DGにはほとんど反応しなかった

12

LG電気化学センサの構築
～検出原理～

流しそうめん：位置エネルギーの低い方へ

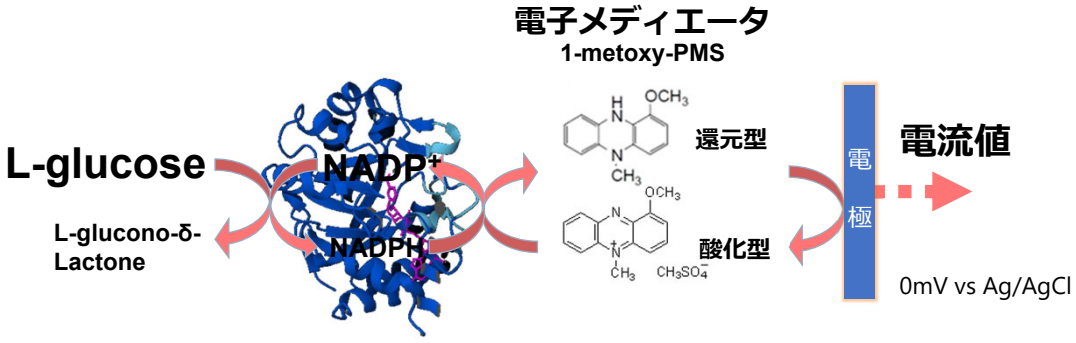


酵素反応＝酸化還元反応＝電子の授受

電気的エネルギーの低い方へ電子が渡されていく

13

LG電気化学センサの構築
～検出原理～



LGの酸化によって生じた電子が、最終的に電流値として測定できる

14

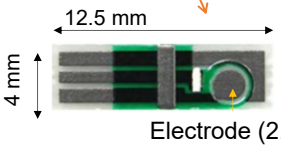
Protocol

酵素反応溶液:
50 mM 電子メディエータ
0-10 mM 基質
1 mM $NADP^+$
1.5 U LguA
20 µl in total/100 mM P.P.B. (pH 7.0)

1分間反応

10 µLを微小電極に滴下

1分間断続的に
電流値を測定

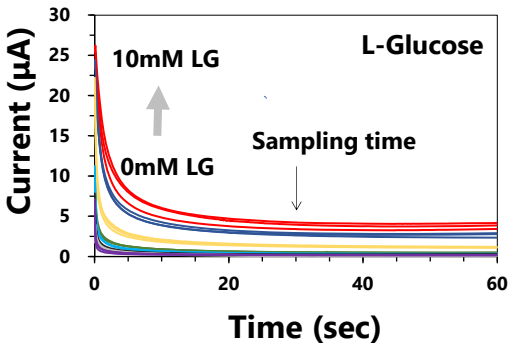


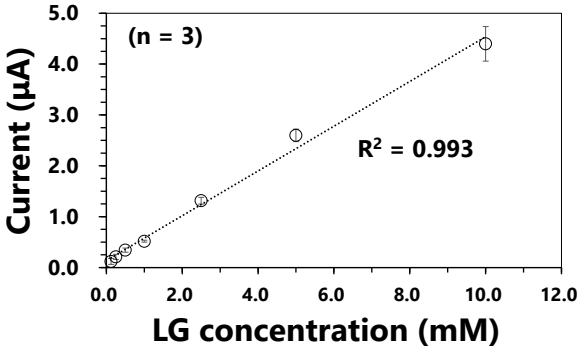
Electrode (2.64 mm^2)

potentiostat

15

リン酸緩衝液中のLGの電気化学検出

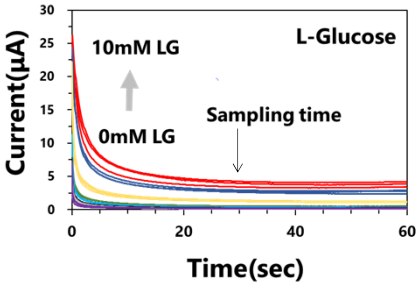


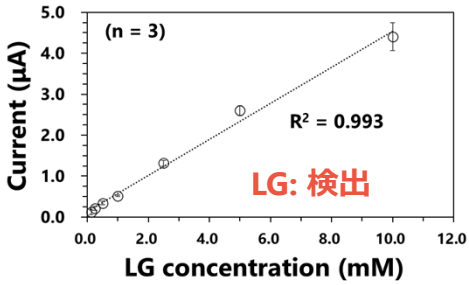


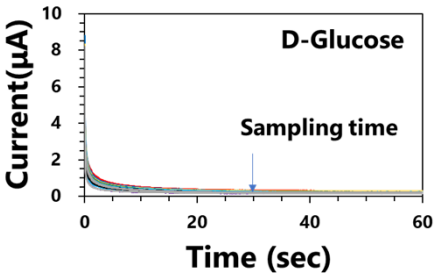
LG濃度依存的な電流値変化が観察され、0.125-10 mMで高い直線性が確認された。

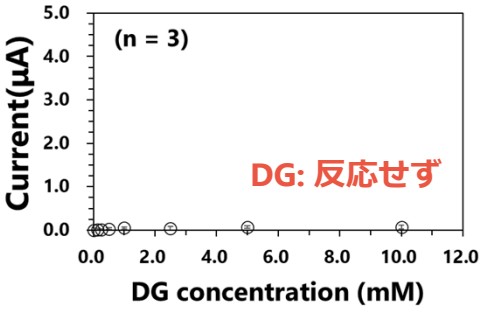
16

リン酸緩衝液中での特異性評価









17

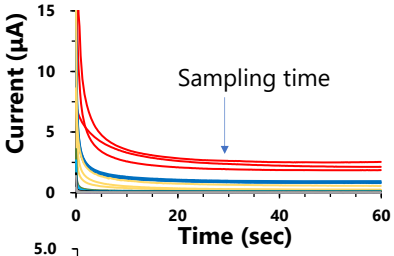
夾雑物存在下でのLG検出：大腸菌最少培地

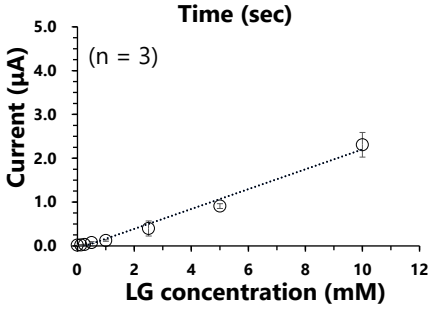
Table 2-2-1. L-glucose minimal medium

		10 mM
NH_4Cl	0.54 g	7 mM
KCl	0.52 g	2 mM
$MgSO_4 \cdot 7H2O$	0.52 g	4 mM
KH_2PO_4	0.53 g	6 mM
K_2HPO_4	1.06 g	13 mM
L-glucose	2.5 g	
*Hutner's trace element solution	2 ml	
	1 L (pH 7.0)	

Hutner's trace element solution		液中濃度	培地中濃度
		7.65 mM	15μM
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.2 g	0.02 mM	0.04
H_3BO_3	1.1 g	2.53 mM	5.0
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.5 g	1.79 mM	3.6
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 g	0.67 mM	1.24
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.16 g	0.64 mM	1.28
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.16 g	0.09 mM	0.18
$(NH_4)Mo7O_2 \cdot 4H_2O$	0.11 g		
	1 L		

Shimizu T, Takaya N, and Nakamura A. J. BIOL. CHEM.OL. 287, NO. 48, pp. 40448–40456, 2012





リン酸緩衝液中と同様にLG濃度依存的な電流値変化が観察された。(0.125-10 mM)

18

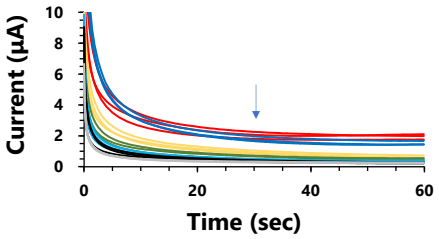
夾雑物存在下でのLG検出：動物細胞培養培地

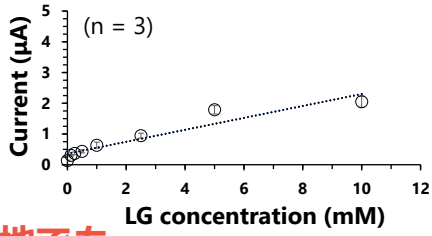
D-MEM (高グルコース) (L-グルタミン, フェノールレッド, ピルビン酸ナトリウム、ウシ胎児血清含有)

Code No.	043-30085 041-30081
D-Glucose	High
L-Glutamine	●
Phenol Red	●
Sodium Pyruvate	●
HEPES	-
Components	**(mg/L)**
Inorganic components:	
$CaCl_2$ (anhyd.)	200.00
KCl	400.00
$MgSO_4$ (anhyd.)	97.67
$MgSO_4$ $7H_2O$	-
NaCl	6,400.00
$NaHCO_3$	3,700.00
NaH_2PO_4 (anhyd.)	108.70
NaH_2PO_4 H_2O	-
Trace elements:	
$Fe(NO_3)_3$ $9H_2O$	0.10
Amino acids:	

Amino acids:	
L-Arginine HCl	84.00
L-Cystine	48.34
L-Cystine 2HCl	-
L-Glutamine	584.00
Glycine	30.00
L-Histidine HCl H_2O	42.00
L-Isoleucine	105.00
L-Leucine	105.00
L-Lysine HCl	146.00
L-Methionine	30.00
L-Phenylalanine	66.00
L-Serine	42.00
L-Threonine	95.00
L-Tryptophan	16.00
L-Tyrosine	71.59
L-Tyrosine 2Na $2H_2O$	-
L-Valine	94.00
Vitamins:	
D-1/2Ca Pantothenate	4.00
Choline Chloride	4.00
Folic Acid	4.00
i-Inositol	7.20
Niacinamide	4.00
Pyridoxine HCl	4.00
Riboflavin	0.40
Thiamine HCl	4.00
Other components:	
D-Glucose	4,500.00
Phenol Red	15.00
Phenol Red Na	-
Sodium Pyruvate	110.00
HEPES	-

25mM DG

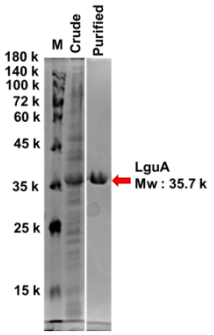




より夾雑物の多い動物細胞培養培地でも
LG濃度依存的な電流値変化が観察された。(0.125-10 mM)

19

本発表のまとめ

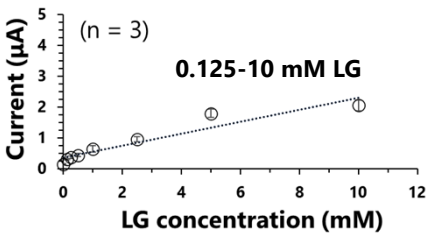


<u>○LG資化菌由来LguAの組換え生産および評価</u>

- 大腸菌を宿主とした組換え生産および精製を実施
- ~50 mg/L cultureの生産性で高純度
- DGには反応しなく、異性体を識別できた

<u>○LG簡便計測用電気化学センサの作製</u>

- LG依存的な電流値変化を観測し、0.125-10 mMで直線性を確認
- 夾雑物存在下の微生物培養用最小培地および動物細胞培養用培地でも、バッファー中と同等の直線性を確認



今後の予定

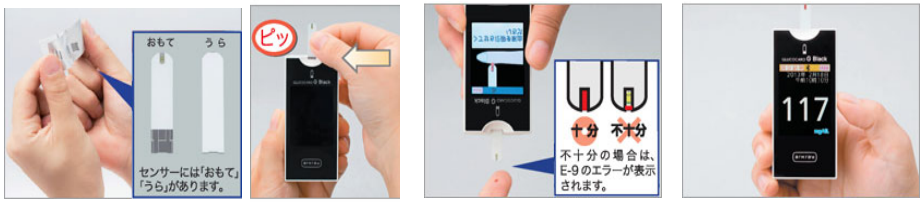
<u>培養液実試料中LGの計測</u>

・LG資化菌　*Paracoccus laeviglucosivorans*/最少培地
・LGとりこみ能のあるがん細胞/DMEM,FBS

<u>センサの作りこみ</u>

市販の血糖センサのように、試料をセンサに接触させるだけで計測が開始できる、ドライセンサの構築

センサをメーターに差し込む　　試料をセンサに吸わせる　　濃度がわかる



アークレイ血糖自己測定器関連情報サイトより

21

計測ニーズを是非教えて下さい

1. どのような場でどの程度の濃度、解像度でLGを計測できたらよいでしょうか？
2. 試料の量はどの程度でしょうか？
3. LG以外の夾雑物は何でしょう？

22

謝辞

- 筑波大学　中村顕 先生
- 東京農大　矢嶋俊介 先生

- 弘前大学　山田勝也 先生
- 北海道大学　奥山正幸 先生

- 東京農工大学　薛厚丞さん
  小﨑千成実さん

23