

平成 21 年 3 月 31 日 現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18550069
 研究課題名(和文) DNAをプローブとする微生物計測システムの開発と環境評価への適用
 研究課題名(英文) Development of Microorganisms-Measuring System Using DNA as a Probe and Its Application to Evaluation of Environments
 研究代表者
 下村 雅人 (SHIMOMURA MASATO)
 長岡技術科学大学・工学部・教授
 研究者番号：20251853

研究成果の概要：特定の微生物に由来するターゲット DNA と水晶振動子表面上に固定化したプローブ DNA (ターゲット DNA と相補的な塩基配列を持つ) との 2 本鎖形成を認識し、複合微生物群中の特定微生物を定量する新規な分子生物学的システムを開発した。このシステムを河川に存在する特定微生物の定量に応用し、迅速な環境評価技術としての有用性を確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,000,000	0	2,000,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	540,000	4,340,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生物学的分析

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らは、生物関連物質の定量を目的として、生物関連物質および生化学反応を利用した各種のバイオセンサーの研究と開発に取り組んできた。

(2) 水晶振動子は 10^{-9} gレベルの微小質量変化の追跡に有用であり、液中での安定な水晶共振も実現できたことから、バイオセンシングへの応用が期待された。

(3) 研究代表者らは、環境ホルモンの影響を評価するためのバイオマーカーとなるタンパク質(ピテロジェニン)の検出を目的として、抗体(抗ピテロジェニン)を固定化した水晶振動子を検出素子とする免疫センサーを開発し、水晶振動子の有用性を確認した。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、DNA の 2 本鎖形成を利用して特定の微生物由来の DNA 検出に基づく微生物計測システムを構築し、環境評価への適用を図ることを目的としたものである。

(2) 微生物由来のターゲット DNA と水晶振動子に固定化したプローブ DNA が 2 本鎖を形成する際の微小質量変化を共振周波数の変化として観測することにより、複雑な微生物群の分離操作を省いて、特定微生物の迅速な分析・計測を実現する。

(3) さらに、この微生物計測システムを河川等に存在する微生物分析に適用し、環境評価技術としての実用性を検証することを目的として、本研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) 実験装置

本研究では、基本発振周波数 21 MHz の水晶振動子（接液側電極面積 $5.3 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ ）、温度制御された水晶発振器 OCXO (Oven Controlled Crystal Oscillator)、攪拌機構を備えた恒温ガラスセル、周波数カウンタおよびパーソナルコンピュータで構成した水晶振動子微量秤量 (QCM) 装置を用いて DNA の検出実験を実施した。QCM 装置の概略を図 1 に示す。

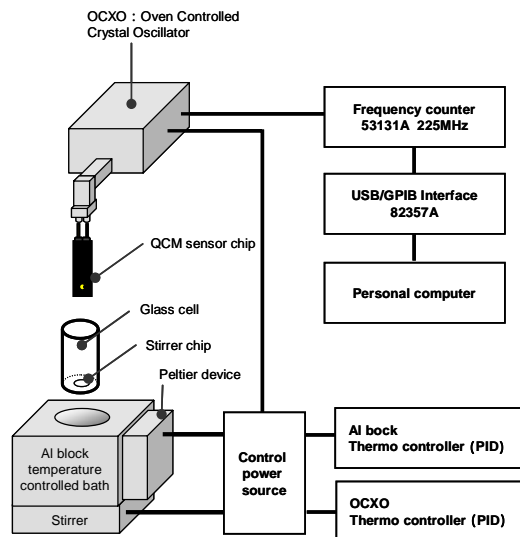


図 1 QCM 装置の概略

(2) 合成 DNA による 2 本鎖形成の追跡

互いに相補的な塩基配列を有する 1 本鎖の合成 DNA をプローブおよびターゲットとして 2 本鎖形成の追跡を行い、計測のための諸条件を検討した。また、プローブ DNA と非相補的な塩基配列を有する DNA ターゲットとした実験も併せて実施し、非選択的な相互作用の有無を確認した。実験に用いた 1 本鎖 DNA の塩基配列は次のとおりである。

(プローブ DNA)

5 CAT GTG TTA GGC CTG CCG CCA GCG T 3

(ターゲット DNA)

3 GTA CAC AAT CCG GAC GGC GGT CGC A 5

(非ターゲット DNA)

3 TGC GAC CGC CGT CCG GAT TGT GTA C 5

なお、プローブ DNA については、5'末端に水晶振動子の金電極表面への固定化反応に必要な -S-S-S- 結合を介してジメトキシトリチル基が結合しているものを用いており、図 2 に示す反応によって、Au-S-結合を形成させることでプローブ DNA を金電極に共有結合させた。

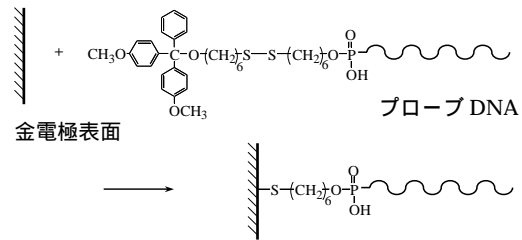


図 2 プローブ DNA の固定化

(3) 微生物由来の DNA 検出

大腸菌 (*Escherichia coli*) の純粋菌株から抽出した 16S rDNA の先端 5 番目から 531 番目までの 527 塩基対を PCR (Polymerase Chain Reaction) 法よりに増幅した。得られた PCR 生成物を 100 において 5 分間の熱処理し、1 本鎖に変性させた。この DNA 鎖には前節 (2) に示したプローブ DNA と相補的な塩基配列の存在することが知られているので、(2) と同じプローブ DNA を電極表面に固定化させた水晶振動子を用いて大腸菌由来の DNA 検出を行った。

一方、河川 (信濃川、長岡市蔵王町) にて採取した水中の微生物群から抽出した DNA 試料について大腸菌の 16S rDNA (527 塩基) の計測を行い、当該採取水の大腸菌数の定量を試みた。

4. 研究成果

(1) 計測条件の適性化

DNA の 2 本鎖を形成させるためには、予め、1 本鎖 DNA の分子内水素結合を除いておく必要がある。このため、ある程度的高温条件が求められるが、高温になるほど 2 本鎖間の塩基対形成が不安定となる問題がある。一般に、DNA の融解温度 (本研究で用いた合成 DNA の場合は 26) よりも若干高い温度が 2 本鎖形成に適しているため、計測温度を 40 として DNA 検出に用いる緩衝液およびその pH について検討した。

DNA を構成する塩基では、紫外部 (260 nm 付近) に吸収の極大が見られ、2 本鎖では 1 本鎖よりも吸光度が低下する。このことを利用して、プローブおよびターゲットとして用いる合成 DNA の 2 本鎖形成を 0.01 M の HEPES 緩衝液、TE 緩衝液およびリン酸緩衝液 (PBS) の中で行い、260 nm の吸光度を追跡した。

図 3 に示すように、PBS および TE 緩衝液を用いた場合には 2 本鎖形成に伴う吸光度の変化に乏しかったが、HEPES 緩衝液を用いた場合には 1 時間程度で著しい吸光度の低下が見られた。このことから、DNA 検出に用いる緩衝液として HEPES 緩衝液が有用であると判断した。また、pH の異なる HEPES 緩衝液を用いて 2 本鎖形成に伴う吸光度の

変化を追跡した結果, 図 4 に示すように, pH 7.5 の緩衝液を用いた場合に吸光度減少率が最大となった。このことから, QCM 法による DNA 検出には pH 7.5 の HEPES 緩衝液を用いることとした。

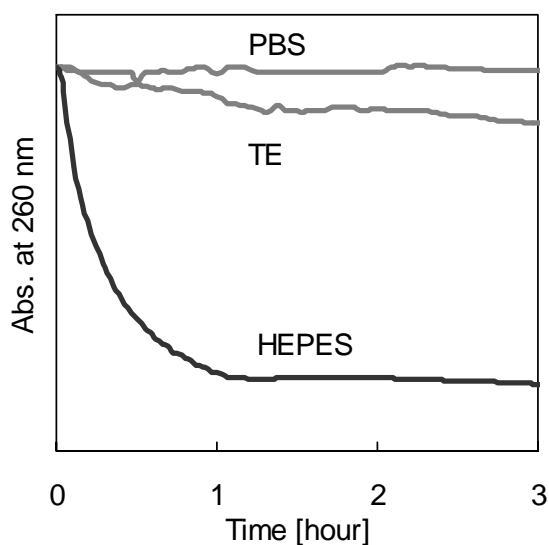


図 3 各種緩衝液中での 2 本鎖形成

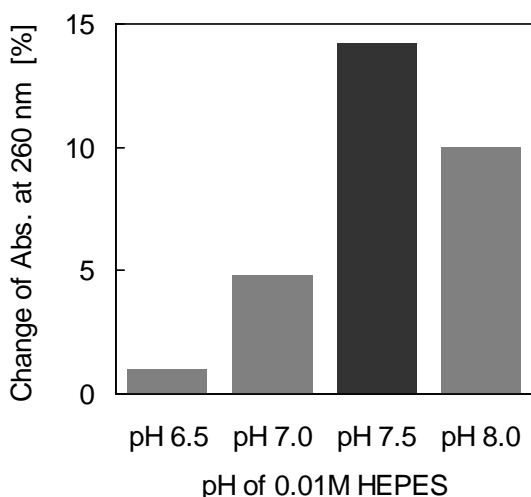


図 4 2 本鎖形成に及ぼす pH の影響

(2) QCM 法による合成 DNA の検出

QCM 装置のガラスセル内で, 図 2 の反応によって水晶振動子の金電極表面にプローブ DNA を固定化し, 蒸留水および pH 7.5 の HEPES 緩衝液 (0.01 M) で洗浄したのち, 同じ緩衝液とターゲット DNA (0.5 μ M) をガラスセルに入れ, プローブ DNA の固定化およびターゲット DNA との 2 本鎖形成に伴う発振周波数の変化を経時的に追跡した。なお, 一連の操作はガラスセルを 40 に保って行った。

その結果, 図 5 に示すように, 水晶振動子の金電極表面へのプローブ DNA の固定化に

よる発振周波数の低下が観測され, 次いで, ターゲット DNA との 2 本鎖形成に起因する周波数低下が確認できた。

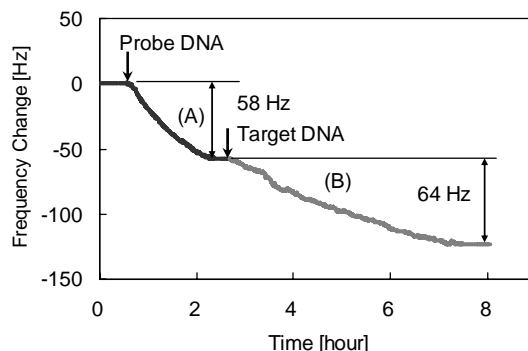


図 5 プローブ DNA の固定化およびターゲット DNA との 2 本鎖形成

本研究に用いた水晶振動子では, 1 Hz の発振周波数低下が 53 pg の質量増加に相当するので, 同様の実験を繰り返し, 発振周波数の低下量 ΔF からプローブ DNA の固定化量と 2 本鎖形成によるターゲット DNA の結合量を求めて, 表 1 にまとめた。

表 1 プローブ DNA の固定化量およびターゲット DNA の結合量

	ΔF (Hz)	物質量 (pmol)
プローブ固定	58 ~ 97	0.39 ~ 0.66
ターゲット結合	64 ~ 86	0.40 ~ 0.59

水晶振動子ごとにプローブ DNA の固定化量にかなりの差があり, これ伴ってターゲット DNA の結合量にもばらつきが見られるものの, ハイブリダイゼーション効率 (プローブ DNA 量に対するターゲット DNA 結合量の割合) は 91 ~ 102 % と良好な値であった。

(3) 再現性の向上

水晶振動子ごとにプローブ DNA の固定化量に差があるという問題は計測の信頼性を確保するうえで大きな障害となる。この障害を回避するために, プローブ DNA の固定化反応を水晶振動子の発振周波数低下が 50 Hz になったところで停止させ, 固定化量を一定とすることを試みた。

この方法で水晶振動子の金電極表面に固定化するプローブ DNA の量を一定にし, ターゲット DNA との 2 本鎖形成を追跡した結果, 表 2 に示すように, ターゲット DNA の結合量のばらつきが少なく抑えられることが確認された。ハイブリダイゼーション効率は 98 ~ 102 % でなり, 水晶振動子に固定化したプローブ DNA のほぼ 100 % がターゲット

DNA と 2 本鎖を形成したことになる。

表 2 プローブ DNA の固定化量および
ターゲット DNA の結合量
(プローブ固定化量を一定とした場合)

	ΔF (Hz)	物質質量 (pmol)
プローブ固定	50	0.34
ターゲット結合	48 ~ 50	0.33 ~ 0.35

このように、再現性の向上を図ることができたので、計測に供するターゲット DNA の濃度を変えて水晶振動子の発振周波数変化を追跡して、ターゲット DNA 濃度とハイブリダイゼーション効率との関係を調べた。その結果、図 6 に示すように、50 pM 程度から 1 nM の範囲でハイブリダイゼーション効率の濃度依存性が認められ、この濃度範囲でターゲット DNA の定量が可能であることが明らかとなった。

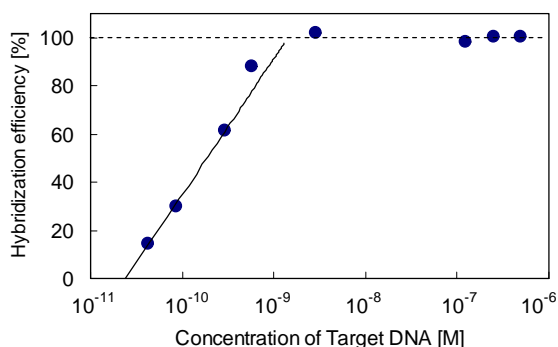


図 6 ターゲット DNA 濃度とハイブリダイゼーション効率との関係

(4) 非ターゲット DNA の影響

ターゲット DNA の代わりに非ターゲット DNA を用いて QCM 法による周波数測定を実施し、DNA 検出・定量の選択性を検討した。図 7 に示すように、ターゲット DNA を測定試料とした場合には顕著な発振周波数の低下が観測されるのに対して、非ターゲット DNA を試料とした場合には周波数低下がほとんど見られなかった。

この結果からターゲット DNA および非ターゲット DNA におけるハイブリダイゼーション効率を求めて、表 3 にまとめた。ターゲット DNA の場合にはほぼ 100% のハイブリダイゼーション効率となるのに対して、非ターゲット DNA の結合は無視できることが確認された。

このように、プローブ DNA と相補的な塩基配列を有するターゲット DNA のみが選択的に検出されることは、QCM 法を用いて

様々な塩基配列の DNA 混合物中から特定の DNA を検出・定量するための必須条件であり、この手法を特定微生物の定量に適用する可能性を示唆する。

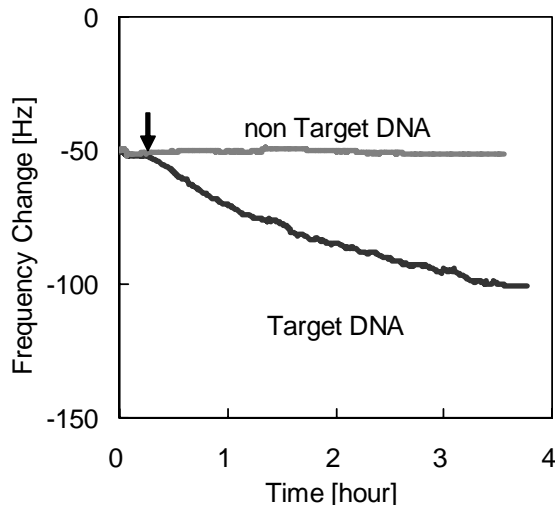


図 7 ターゲット DNA と非ターゲット DNA (濃度はいずれも 0.5 μ M) の QCM 測定結果

表 3 プローブ DNA の固定化量および
ターゲット DNA の結合量

	ΔF (Hz)	ハイブリダイゼーション効率 (%)
ターゲット	48	98
非ターゲット	1	2

(5) 大腸菌に由来する DNA の検出

大腸菌の純粋菌株から抽出した 16S rDNA の断片 (527 塩基) を試料として QCM 法による周波数測定をこれまでの実験と同様に実施した。その結果を図 8 に示す。

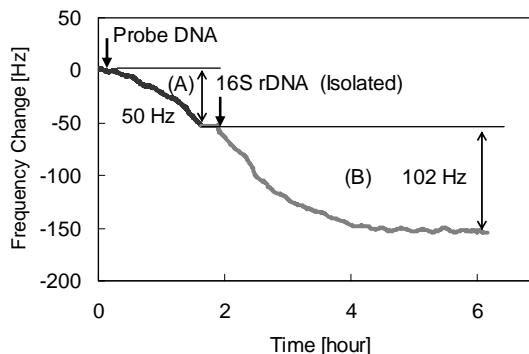


図 8 大腸菌に由来する DNA の QCM 測定結果

プローブ DNA の固定化反応を水晶振動子の発振周波数低下が 50 Hz になったところで停止させ (A), 次いで, 大腸菌から抽出した 16S rDNA 断片との 2 本鎖形成を追跡し (B), 102 Hz の周波数低下を観測した。この結果から求めたプローブ DNA の固定化量と大腸菌由来のターゲット DNA (16S rDNA 断片) の結合量を表 4 に示す。

表 4 プローブ DNA の固定化量および 16S rDNA 断片の結合量

	ΔF (Hz)	物質質量 (pmol)
プローブ固定	50	0.34
16S rDNA 結合	102	0.03

大腸菌から抽出した 16S rDNA 断片ではハイブリダイゼーション効率が 9 % にとどまったが, これは, 試料として用いた DNA の分子鎖が 527 塩基からなる大きなものであるため, 水晶振動子の金電極表面において立体障害が生じたことに起因するものと考えた。これに関連して, 図 8 の 16S rDNA 断片との 2 本鎖形成による周波数変化 (B) を観測したのち, 25 塩基からなる合成ターゲット DNA を測定セルに加えてみたが, 周波数の低下は認められず, 水晶振動子表面で 2 本鎖を形成している 16S rDNA 断片の立体障害はかなり大きいものと推定した。

このように, 数百塩基からなる DNA をターゲットとする場合にはハイブリダイゼーション効率が著しく低下するものの, 発振周波数の大きな変化が見られるため, 十分に計測可能であることが明らかとなった。

(6) 河川中の微生物定量

河川にて採取した水中の微生物群から抽出した DNA について, 大腸菌の 16S rDNA の断片 (527 塩基) をターゲットとして QCM 測定を実施した結果を図 9 に示す。

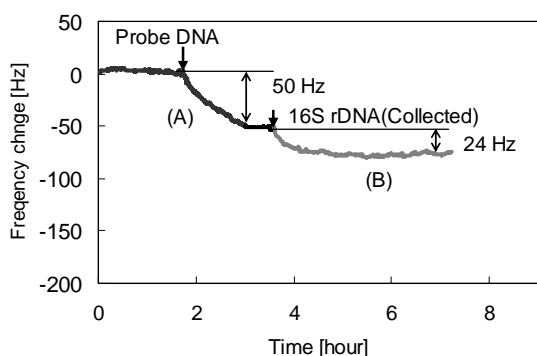


図 9 河川中の微生物群から抽出した DNA の QCM 測定結果

これまでと同様に, プローブ DNA の固定化を水晶振動子の発振周波数低下が 50 Hz になったところで停止させ (A), 次いで, 河川の微生物群から抽出した DNA 試料に存在する大腸菌由来の 16S rDNA 断片との 2 本鎖形成を追跡し (B), 24 Hz の周波数低下を観測した。この結果から求めたプローブ DNA の固定化量と大腸菌由来のターゲット DNA (16S rDNA 断片) の結合量を表 5 に示す。

表 5 プローブ DNA の固定化量および 16S rDNA 断片の結合量 (河川中の微生物群から抽出した DNA)

	ΔF (Hz)	物質質量 (pmol)
プローブ固定	50	0.34
16S rDNA 結合	24	0.01

水晶振動子表面上のプローブ DNA と大腸菌由来の 16S rDNA 断片との 2 本鎖形成についてのハイブリダイゼーション効率は 2 % であった。(5) で述べたとおり, 大腸菌から抽出した 16S rDNA 断片の 2 本鎖形成による ΔF の飽和値は 100 Hz 程度であることから, 河川の微生物群から抽出した DNA 試料の場合の 24 Hz の周波数低下は当該試料中の 16S rDNA 断片の濃度を反映しているものと考えられる。この点を検証するために, 図 9 の 16S rDNA 断片との 2 本鎖形成による周波数変化 (B) を観測したのちに, (5) の大腸菌から抽出した 16S rDNA 断片の入ったガラスセル中で計測を続けたところ, さらに発振周波数の低下することが確認された。

純粋菌株を用いた実験から, 大腸菌の個数と抽出される 16S rDNA の断片の量との関係がわかっているため, QCM 測定の結果から求めた 16S rDNA 断片の量を PCR 前の量に換算すれば, その値から大腸菌濃度を推算できる。このようにして河川から採取した水中の大腸菌濃度を算出し, 220 個 / ml という値を得た。

(7) 環境評価技術としての実用見通し

現在のところ, 多様な微生物群から大腸菌のみを定量する公定分析法はなく, 大腸菌群として計量が行われている (昭和 46 年環告 59 号最確数)。今回の河川から採取した試料について, 大腸菌群の計量を (社) 新潟県環境衛生中央研究所に別途依頼し, 3,300 個 / ml という結果が得られている。

このように, QCM 測定の結果は大腸菌群 3,300 個中に 220 個の大腸菌が存在していたことを示している。微生物群中の特定微生物の単定量を行う他の方法がない現状では, この値の妥当性を検証することは容易では

ないが、QCM法をDNA検出に応用し、特定微生物の定量について見通しが得られたことは大きな成果であるといえる。さらに、16S rDNAは菌種に特徴的な塩基配列を有しているため、この手法を様々な微生物の定量に応用することが可能であり、迅速な環境評価技術としての有用性も極めて大きい。

今後の課題は、PCR効率の精度向上を図ること、また、16S rDNA断片について、ハイブリダイゼーション効率の濃度依存性を精密に把握することにより、定量値の信頼性を向上させることである。一方で、本研究の手法によって得た定量値の妥当性検証に参照しうる特定微生物計測法の開発も望まれる。(謝辞)

本研究の遂行に協力を賜った(社)新潟県環境衛生中央研究所に厚くお礼申し上げます。

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)

齋藤英一, 笠原 仁, 串宮範彦, 下村雅人, 水晶振動子型バイオセンサーによる生体分子間相互作用の研究, 新潟工科大学研究紀要, No. 13, pp. 19 - 24 (2008), 査読無し

K. Kon, N. Tsukahara, M. Shimomura, DNA Sensing with a Quartz Crystal Device for Determination of Microorganisms, Sensors and Actuators B, Vol. 123, pp. 647 - 650 (2007), 査読有り

[学会発表](計3件)

山本卓磨, 近藤みずき, 桑原敬司, 下村雅人, 水晶振動子によるDNAハイブリダイゼーションの検出, 日本化学会近畿支部 高分子学会北陸支部 合同福井大会 講演要旨集, p. 244 (2008)

K. Kon, M. Shimomura, K. Kaneko, DNA Sensing with a Quartz Crystal Microbalance for Determination of *Esherichia coli*, Program & Abstracts, 4th International Symposium on Advanced Material in Asia-Pacific Rim, p. 87 (2007)

塚原直明, 昆 吉郎, 下村雅人, 宮内信之助, 水晶振動子マイクロバランスによるDNAハイブリダイゼーションの検出, 第55回高分子学会北陸支部研究発表講演会 講演要旨集, p. 129 (2006)

[その他]

下村雅人, バイオセンシングテクノロジーにおける最近の進歩, 新潟工科大学・産学交流会 基調講演 (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下村 雅人 (SHIMOMURA MASATO)
長岡技術科学大学・工学部・教授
研究者番号: 20251853

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し