

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 12 日現在

機関番号：82826

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23655076

研究課題名（和文） 新規な菌類検査方法の基礎研究

研究課題名（英文） Fundamental study for a novel method for bacteria inspection

研究代表者

松田直樹 (NAOKI MATSUDA)

産業技術総合研究所生産計測技術研究センター、上級主任研究員

研究者番号：10344219

研究成果の概要（和文）：我々は細菌類検査方法前処理として電解コンデンサ、リレー、定電圧電源を組み合わせた装置を用い、細菌類を含む溶液中の電極間に低電圧パルス（low voltage application：LVP）を印加する方法を開発した。LVP 印加後に遠心分離操作を行い溶液層と沈殿物とに分離した大腸菌を含む試料のそれぞれに発色する基質である X-gluc を加えその吸収スペクトル変化を観察したところ、溶液層の方が沈殿物に比べ吸光度増加は 3 倍程度大きかった。このことから LVP 印加により大腸菌の細胞膜から酵素である β -D-glucuronidase を抽出できたことが分かった。

研究成果の概要（英文）：We invented low voltage pulse (LVP) method as a pretreatment for bacterial inspection. The instrument is composed of electrolytic capacitor of 3,000 μ F, relay, and DC voltage power supply, which can generate 1-10 V, 5 Hz LVP between a needle and planar electrode. Comparing visible absorption spectral change at peak position of X-gluc in two samples, one is solution and the other is precipitation phase by centrifugation process of fungi sample solution after LVP treatment, the absorbance from solution phase was about 3 times higher than that from precipitated phase. It was clearly shown that LVP application successfully extracted enzyme, β -D-glucuronidase, from cell membrane of Escherichia coli.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

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：低電圧パルス放電、細菌、大腸菌、酵素、発色酵素基質法、吸収スペクトル、細胞膜破壊

1. 研究開始当初の背景

衛生管理、医療等の要請から菌類や細胞の検査は病院等で頻繁に行われており、多くの検査方法が知られ種々の簡易キットも販売されている。基本的な原理は共通で菌類や細胞に内包されている酵素やミトコンドリアが特定の基質から化学反応によって別な化合物（代謝物質）生成する事を利用する。例

えば MTT 法に代表されるように基質の色の変化を観察する。

しかし細胞膜だけを破壊して酵素をその機能を損なわずに取り出すことは非常に困難である。超音波照射に代表される物理的な方法では高圧や高温に曝され内容物が損なわれる可能性が高い。薬品で細胞膜を破壊する化学的な方法では酵素まで破壊してしま

う。そのため通常は短時間超音波を照射して酵素を菌類の外に取り出しているが、細胞膜の破壊が十分ではなく酵素を取り出す効率は低く、基質の反応に時間がかかってしまう。

菌類に含まれる酵素等を簡便な方法で効率よく取り出し、迅速に検査する方法の開発が求められている。また持続可能な社会実現のため、なるべく試薬・薬品の使用量は減少させることが望まれている。

2. 研究の目的

近年我々が開発した低電圧パルス (Low Voltage Pulse:LVP) を用いて菌類の細胞膜を破壊する方法では菌類や細胞内に含まれる酵素やミトコンドリア等の内容物をそれらの機能を損なわずに高効率に細胞外に取り出すことが可能である。

通常、エレクトロポレーション (電気穿孔:EP) 法は高電圧、短時間パルス (長時間高電圧を保つのは困難) 印加を行い電位差でイオンを動かしている。低電圧に設定できる装置もあるが電圧を印加する事で細胞膜のイオンチャンネルや細胞膜を開口させ、DNAを細胞や細菌内に導入し形質転換する事が大きな目的である。またスキンケアや美容に用いられている。我々の装置は低電圧であり、電流でイオンを動かしているのが特徴である。

菌類から取り出した酵素の化学反応によって基質から生成した代謝物質をスラブ光導波路表面に濃縮し高感度かつ迅速に検出できる。既にこの発想に沿って可能性を確認した「新規な菌類検査方法」を開発するため、

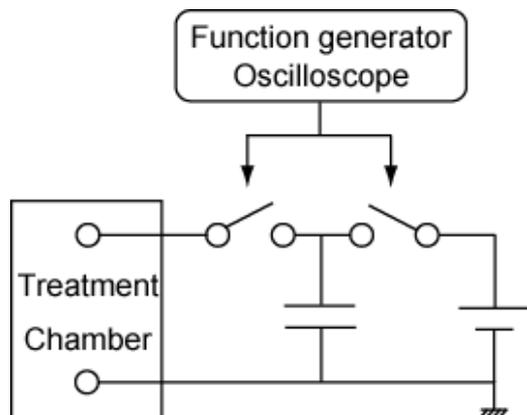


図1 低電圧パルス印加装置の概略図
直流電源の電流をコンデンサに充電し、リレーで切り替えて放電電極間に放電する。

本提案では多くの基礎的検討や実験を行い、疑問点や技術課題を解決したい。

3. 研究の方法

大腸菌 (TOYOBO, Escherichia coli: DH5 α) を用い、LB 液体培地 (Difco, Tryptone : 10g/L, Yeast extract : 5g/L, NaCl : 10g/L) 中で 37°C、12 時間以上振とう培養した。培養後、遠心分離 (2,000rpm, 15min) を行い、新たな LB 液体培地に交換し、培養液用比色計により 620nm での O.D. を 0.4 に調整し試料溶液とした (約 10^8 cfu/mL)。この大腸菌試料溶液の 1 mL を分取してセル中に入れ、一定電圧で充電した低電圧パルスを印可した。

電解コンデンサ (3,000 μ F) とリレー回路を組み合わせて 1 秒間に数十回の充放電が可能な装置を組み立てた。装置の概略図を図 1 に示す。アノードは 6mm ϕ のタングステン平板 (6mm ϕ , 厚み 0.1mm, 99.95%)、カソードは 0.6mm ϕ のタングステン針 (99.99%) を用い、電極間は 2 mm に固定した。

用いた低電圧パルスの繰り返し周波数とパルス電圧はそれぞれ 5Hz (0.1 秒毎に充電と放電を交互に繰り返す) と 1.0、5.0、10 V である。所定の回数繰り返したら試料溶液の 1 mL をサンプル管に入れ、1 mL の DMSO と 9 mL の液体培地で溶解させた X-gluc 溶液の 1 mL を加え、恒温振とう培養器に入れ 37°C で反応させた。17 時間後に取り出し、吸光度計で吸収スペクトルを測定し 620nm の

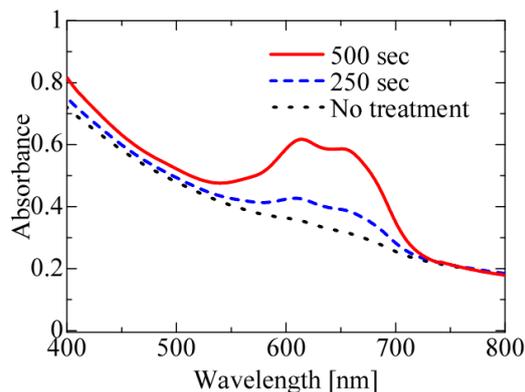


図2 低電圧パルス印加に伴う X-gluc の吸収スペクトル変化
(a)遠心処理有りパルス処理無し、(b)遠心処理無しパルス処理無し、(c)遠心処理有りパルス処理有り。遠心処理はパルス印加前に 2,000rpm15 分間行った。パルス印加条件は 5V、5Hz 1,000 回である。パルス印加後、37°C に 20 時間放置後測定を行った。

吸光度から X-g l u c の発色度合いを観察した。このピーク強度が大きいほど反応しているため、よりよい実験条件と言える。

4. 研究成果

細菌類検査キットでは酵素機能を損なわずに細胞から取り出すため、超音波照射や界面活性剤等の薬品で細胞膜を破壊する化学的方法等が用いられるが、効率が低く機能喪失の可能性がある。我々は LVP を用いて細菌類に含まれる酵素を機能を損なわずに高効率に細胞外に取り出す方法を開発した。

平成 23 年度は基礎検討として大腸菌に含まれる酵素である β -D-グルコナーゼの活性を利用し 5-ブromo-4-クロ-3-インドリル- β -D-グルコト (X-g luc) の発色に伴う吸光度変化から本方法の有効性を検討した。結果を図 2 に示す。(a), (b) は LVP 印加を行っていない結果で、それぞれ大腸菌試料溶液を調整したあと遠心分離を行い培養液を入れ替えた場合と、遠心分離を行わず培養液を入れ替えない場合である。(b) の培養液を入れ替えない場合は LVP 印加を行っていないにもかかわらず 17 時間後に X-g luc の 620nm 付近の吸収バンドが観察され、 β -D-グルコナーゼの酵素反応が進んだ事が分かる。一方、(a) の培養液を入れ替えない場合は X-g luc の 620nm 付近の吸収バンドはほとんど観察されず酵素反応が進まなかった。培養中に細胞分裂が生じ大腸

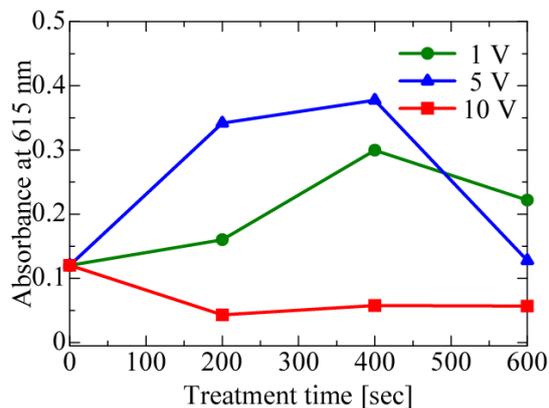


図 3 低電圧パルス印加に伴う X-g luc の吸収スペクトル変化の電位依存性
大腸菌試料溶液調整後に遠心分離処理 (2,000rpm、15 分間) を行い培養液を新鮮なものに取り換えた後にパルス処理を行った。パルス電圧は 1、5、10V で、その他のパルス印加条件は 5Hz、1,000 回である。パルス印加後、37°C に 20 時間放置後測定を行った。

菌の濃度が大きく増加するのに伴って大腸菌の細胞膜から β -D-グルコナーゼが放出されその濃度が徐々に増加したためにこのような結果になったと考えられる。(c) に示したように腸菌試料溶液を調整したあと遠心分離を行い培養液を入れ替えた場合でも、LVP 処理を行うことで大きな吸光度増加が認められ β -D-グルコナーゼが細胞膜から機能を保ったまま取り出されている事が分かった。LVP 処理を行っていない試料に比べて大きな吸光度の増加が観察され、本方法の有効性が示された。

LVP の電圧と印加時間を変化させた場合の 620nm に観察される X-g luc の吸収バンド増加を観察し LVP 効果の電位と時間への依存性を観察した。

5V の場合は 200 秒と 400 秒ではそれぞれ 620nm における吸光度が 0.4 程度増加したが 600 秒では 0.1 程度まで減少した。1V の場合、620nm における吸光度が 200 秒で 0.15、400 秒では 0.3 と増加したが、600 秒では 0.2 程度まで減少した。このことから LVP 印加を繰り返すと酵素活性を失活させることが分かった。また 1V の LVP でも効果がある事が分かった。一方、10V を印加した場合は 200 秒の印加であったも呈色反応が認められなかったため、LVP 処理により酵素活性が失活させられていると考えられた。

LVP 印加により酵素が大腸菌の細胞膜から取り出している事を証明するため、平成 24 年度は更に LVP 印加後に試料溶液を遠心操作で固形分と溶液成分に分離しそれぞれに X-g luc を添加し吸収スペクトル変化を観察した。その結果、①溶液成分と固形分の吸光度増加はほぼ遠心分離を行っていない試料のそれとほぼ等しい事、②溶液成分の方が固形分より 3 倍程度大きい事、が分かり酵素が大腸菌から取り出している事が分かった。また我々の実験条件では 10V、5Hz の LVP を印加すると 10 分で試料溶液が 45°C 程度まで温度上昇する事も分かりこれが酵素機能消失の原因と考えられることも分かった。

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 3 件)

- ① “低電圧パルス印加による大腸菌からの酵素抽出方法の開発”、松田直樹、

BACTERIAL ADHERENCE & BIOFILM,
Vol.26, 93-97 (2012)

- ② ② “Low voltage pulse application to biological cells”, Hidenori Otsuka, Saya Okimura, Masako Nagamura, Daisuke Matsukuma, Kouichi Kutsuzawa, Naoki Matsuda, Hirotaka Okabe, *IEICE TRANSACTIONS ON ELECTRONICS*, **E96-C**, 348-352 (2012).
- ③ ③ “Effect of Low Voltage Pulse on Cell Elimination”, Hidenori Otsuka, Saya Okimura, Masako Nagamura, Daisuke Matsukuma, Naoki Matsuda, Hirotaka Okabe, Tatsuro Nakashima, *Chem. Lett.*, **Vol. 41**, 1636-1638 (2012).

〔学会発表〕（計 3件）

- ① ” Low voltage pulse application for enzyme extraction from Escherichia Coli”, Naoki Matsuda, Hirotaka Okabe, Tatsuro Nakashima, Hideki Ooba, Mingfeng Xie, *Biofilms* 5, 2012年12月11日, Espace Saint-Martin, Paris (ポスター発表)
- ② ” 低電圧パルス放電を用いた大腸菌からの酵素抽出方法の開発”, 松田直樹、岡部 浩隆、中島 達朗、2012年日本化学会西日本大会、2012年11月11日、佐賀大学 (ポスター発表)
- ③ “低電圧パルス印加による大腸菌検査における前処理方法の開発”, 松田 直樹、岡部 浩隆、中島 達朗、金 英輝、第26回Bacterial Adherence & Biofilm学術集会、2012年06月13日、大阪ガーデンパレス (口頭発表)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田直樹 (NAOKI MATSUDA)
産業技術総合研究所生産計測技術研究センター、上級主任研究員
研究者番号：10344219

(2) 研究分担者

大庭英樹 (HIDEKI OOBA)
産業技術総合研究所生産計測技術研究センター、上級主任研究員
研究者番号：60356657