

## 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 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656529

研究課題名（和文）ピコリットル空間での ATP 増幅反応と微生物計測への応用

研究課題名（英文）ATP amplification reaction in pico-liter chamber and its application to bacteria detection.

## 研究代表者

黒田 章夫 (KURODA AKIO)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：50205241

## 研究成果の概要（和文）：

微生物の個体数を迅速に計測するため、我々はキャピラリーアレイ（微細管を二次元に規則正しく整列させたガラスプレート）を用いることにした。十分希釈した微生物溶液を ATP 抽出液と生物発光試薬を含むキャピラリーアレイに展開した後、発光するチャンバーの数を数えれば、直ちに微生物の数が計測できる。本研究では、微生物モデルとして約 2.8 ミクロン直径のマイクロビーズにルシフェラーゼを固定化したものを作成した。そのビーズを用いることで、顕微鏡下で発光を検出するための ATP 濃度を決定した。結論的には、現状の ATP 増幅技術を向上させ、また高輝度ルシフェラーゼを利用すれば、迅速微生物計測が可能となることが分かった。

## 研究成果の概要（英文）：

To rapidly measure the number of microorganisms in solution, we attempted to use a capillary array, a circular glass plate with fine pore regularly arranged in two-dimensional array. After applying a given amount of sufficiently diluted solution to the capillary array containing both ATP-extracting and bioluminescence reagents, the number of microorganisms can be easily estimated from the proportion of luminescent pores. In this research, we immobilized luciferase on micro-beads (approximately 2.8  $\mu\text{m}$  in diameter) that could serve as a model of microorganisms in solution. Using the micro-beads, we determined the concentration of ATP needed to generate detectable level of luminescence. We concluded that the rapid measurement of microorganisms would require further improvement of ATP amplification technology and the use of high luminescence luciferase.

## 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	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：ルシフェラーゼ、迅速計測、微生物、ATP



pET21b-Luc-AviTag で形質転換した大腸菌 BL21 (DE3) pBirAcm を LB 培地で 37°C 一晚培養し、200ml の TYH 培地 [20g/l トリプトン、10g/l 酵母エキス、11g/l HEPES、5g/l NaCl、1g/l 硫酸マグネシウム、0.5% グルコース、水酸化カリウムで pH7.2-7.4 に調整] に 1% 植菌した。OD600 が 0.7 になるまで 37°C で培養後、IPTG (終濃度 0.5mM) と D-biotin (終濃度 100 μM) を添加後、さらに 28°C で 4 時間培養を行なった。培養液を遠心分離することで集菌し菌体ペレットを 80°C で保存した。タンパク質の精製の方法は、HisTag を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製を行なった。-80°C で保存しておいた菌体ペレットに、10ml の緩衝液 [0.05M Tris-HCl (pH8.3)、0.05M NaCl、10% glycerol] を加えて懸濁し、超音波により破碎した。得られた細胞破碎液を HisTrap FF カラム (GE Healthcare Bioscience 社) に供し、C 末端にヒスチジンを有するビオチン化ルシフェラーゼを当該カラムに吸着させ、緩衝液 [0.05M Tris-HCl (pH8.3)、0.05M NaCl、10% glycerol、0.5M イミダゾール] で溶出させた。精製したタンパク質についてポリアクリルアミド電気泳動により精製度を確認したところ 95% 以上であった (図 3)。

### 3-2 ルシフェラーゼ固定化ビーズの顕微鏡観察

まず、ストレプトアビジンが固定化されている直径 2.8 μm のビーズに、ビオチン化したルシフェラーゼを混合して、ルシフェラーゼ固定化ビーズを作製した。具体的には、10 μl のストレプトアビジン修飾磁気ビーズ (MagnaLink Streptavidin Magnetic Beads、ビーズ濃度  $5.0 \times 10^7$  beads/ml、Solulink) と 67 μl のビオチン化ルシフェラーゼ (22.4 μM) を 20 μl の 5×TMAT buffer (250mM Tricine (pH8.0)、5mM 酢酸マグネシウム、25% トレハロース) と 13 μl の水で混合して室温で 30 分反応させた。1×TMAT buffer で 2 回洗浄した後、100 μl の 1×TMAT buffer で再懸濁し、ルシフェラーゼ固定化ビーズ溶液を調製した。次に、ルシフェラーゼ固定化ビーズの顕微鏡観察を行なった。5cm×5cm のカバーガラスを、顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000) の試料台にセットし、カバーガラスに 5 μl のルシフェラーゼ固定化ビーズ溶液を滴下した。このビーズを顕微鏡で観察し、まずネガティブコントロールとして 1 分露光して写真を撮影した。その次に、5 μl の 8.25mM ATP と 10mM ルシフェリン (最終濃度 4.13mM ATP と 5mM ルシフェリン) を添加し、顕微鏡で一分間露光した画像を取得し補正を行なった。

## 4. 研究成果

本研究では、キャピラリープレート上の多

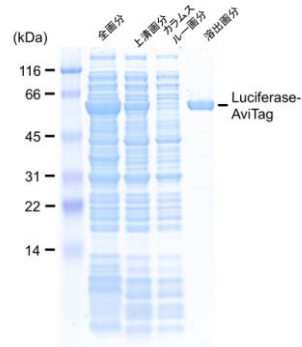


図 3. ビオチン化ルシフェラーゼ (Luciferase-AviTag) の SDS-PAGE 解析結果

数分割されたピコリットル空間に最大 1 個体ずつ微生物を分配し、ATP 増幅後に発光した空間の数を数えることによって、個体数を迅速に計測することを目指した。まずは ATP を増幅しない条件下で、ピコリットル空間において発光検出するにはどの程度の ATP 濃度が必要なのか検討を行なった。キャピラリープレートのピコリットル空間 (直径 10 μm) 中の ATP を検出するには、ルシフェラーゼをその空間内に固定化しておく必要がある。しかし、キャピラリーのピコリットル空間は、直径 10 μm と短い、高さは 400 μm と非常に長い、顕微鏡で観察する際にどこに焦点を合わせるかが難しい。そこで、空間内にルシフェラーゼを固定化するかわりに、ビーズにルシフェラーゼを固定化することで、ATP に応答するビーズを作製することにした。これにより、顕微鏡の焦点をビーズに合わせればよいので、焦点が合わせやすくなり、さらに、ルシフェラーゼが局所的に密集しているので発光強度の増加が期待できる。具体的には、ピコリットル空間に分配できるサイズのビーズ (直径 2.8 μm) に、ビオチン化したルシフェラーゼをビオチン-ストレプトアビジン結合を利用することでビーズに固定化

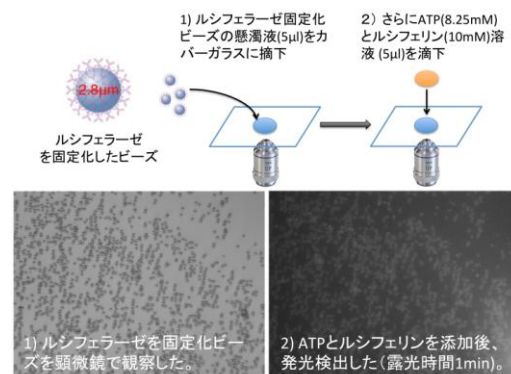


図 4. ルシフェラーゼ固定化ビーズの顕微鏡観察結果

し、ルシフェラーゼ固定化ビーズを作製した。次に、実際にそのビーズが ATP により発光する様子を顕微鏡 (KEYENCE BZ-9000) で観察した。その結果、ルシフェラーゼ固定化ビーズに対して、4.13mM ATP と 5mM ルシフェリンを添加し、顕微鏡で一分間露光した画像を取得し補正を行なったところ、ビーズが発光している様子が観察された (図 4)。

次に、ピコリットル空間に大腸菌 1 個体が分配されたと仮定し、その空間内の ATP 濃度を計算し、ATP 増幅技術を用いれば発光検出が可能であるか検討した。大腸菌 1 細胞あたりの ATP 量は 2amol と見積もられており、キャピラリープレート (31.4pL) のピコリットル空間 (直径 10 $\mu$ m、高さ 400 $\mu$ m) の中で破碎されて ATP が均一に拡散した場合、理論上の ATP 濃度は 63.7nM となる。今回の実験で発光検出には 4.13mM の ATP 濃度が必要であるとわかったので、それを考慮すると約 6 万倍の ATP 増幅が必要となる。現状の ATP 増幅技術は 1 万倍程度可能であるが、しかしそれだけでは十分ではない。さらにルシフェラーゼを 15 倍高感度である高輝度ルシフェラーゼ (バイオエネック社製) に変えれば、ATP 増幅技術と合わせてシグナルを 15 万倍に増幅できるため、理論上 63.7nM の ATP を発光で検出することは可能となる。現状では、ATP を発光検出するには高濃度の ATP が必要のため難しい課題ではあるが、ATP 増幅技術及び高感度ルシフェラーゼを組み合わせれば、ピコリットル空間に分配された微生物 1 個体を発光で検出することは可能であることが分かった。

ATP は生きた細胞にのみ含まれているため、ATP による微生物検出は増殖の可能性を有する微生物の存在を示す。しかし、1 個体中の ATP 存在量は細菌の種類によって違う。また同じ細菌でも細胞の状態によって変化する。従って、ATP 量からは、細菌の数を計測することは不可能であり、このことが ATP を指標とする衛生検査の限界と指摘されていた。しかし、本提案のように、ピコリットル空間に細菌を分配し、発光する空間の数を CCD で数えることによって、菌数を数えることが原理的に可能である。それにより数値としての細菌数を提示することが可能となり、超清浄環境のモニタリングシステムへの適用、あるいは抗体を利用することで特定の有害微生物を超高感度に定量検出する技術の開発につながる。また、滅菌の正否判定を極めて有効に行うことができることから、医薬分野での抗生物質の開発などにも利用できる。

## 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 1 件)

1、黒田章夫、廣田隆一、リン酸の無機化学とバイオテクノロジー、生物工学会誌、90、473-476 (2012) 査読なし

〔学会発表〕 (計 3 件)

1、黒田章夫、高輝度ルシフェラーゼの開発と医療診断応用への可能性、医工連携説明会・情報交換会 (東京)、2013 年 1 月 16 日

2、黒田章夫、リンのバイオテクノロジー、生物工学会賀詞交換会 (東京)、2012 年 1 月 27 日

3、黒田章夫、廣田隆一、還元型リン酸のバイオ利用のための新たな挑戦、生物工学会 2011 年度大会 (東京農工大学)、2011 年 9 月 27 日

〔その他〕

ホームページ (微量 ATP の増幅技術)

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/akbio/Research/luc.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 章夫 (KURODA AKIO)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授  
研究者番号：50205241

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：