

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：23303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14905

研究課題名(和文) 家庭用プリンタでプリントアウトして作成する酵素法によるポリアミンセンサーの開発

研究課題名(英文) Development of Polyamine Sensor by Enzymatic Method Creating by Printout with Home Printer

研究代表者

栗原 新 (Kurihara, Shin)

石川県立大学・生物資源環境学部・寄附講座准教授

研究者番号：20630966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ポリアミン摂取が動物の健康寿命延伸に著効を示すことが報告されており、腸管内腔の腸内細菌由来のポリアミン濃度を適正に保つことは健康増進に重要であると考えられる。本研究では糞便中のポリアミン濃度を簡便に測定することを目的とした酵素法を用いた使い捨てセンサーの開発を目指して研究を行った。

Rhodococcus erythropolisのプトレッシンオキシダーゼのプトレッシン酸化が直接電子移動型であることを発見し、この特性を利用してメディエーターを用いないアンペロメトリックバイオセンサーを作成した。また、プトレッシンオキシダーゼを用いたポリアミンお96穴プレート上での比色迅速定量系を開発した。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that administration of polyamines is effective for the promotion of the healthy life of animals. Therefore, it is considered that appropriate maintenance of the concentration of polyamine derived from intestinal microbiota in the intestinal lumen is important for health promotion. In this study, we aimed to develop disposable sensor using enzyme method for simple measurement of polyamine concentration in feces. A mediator-less amperometric biosensor for putrescine detection was developed to obtain a (pseudo) steady-state catalytic current. We also developed a colorimetric rapid quantification system for putrescine on 96-well plate using putrescine oxidase.

研究分野：応用微生物学

キーワード：ポリアミン バイオセンサー プトレッシンオキシダーゼ 簡易定量法 プトレッシン

1. 研究開始当初の背景

ポリアミンは1分子中にアミノ基を二つ以上含む脂肪族化合物であり、ほぼ全ての生物に見出される生理活性アミンである(図1)。

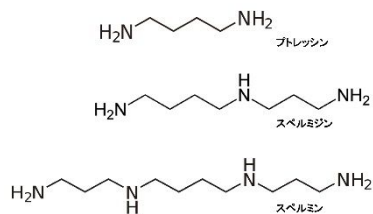


図1 ポリアミンの構造

近年、ポリアミンを摂取することで、オートファジーの誘導、ヒストンのアセチル化の促進、血管および腸管における炎症抑制が起こり、これらの作用を通じて、動物の認知力が向上することや寿命が伸長することが報告された。腸管内腔には腸内細菌由来のポリアミンが著量存在し、これは宿主のポリアミン摂取源の主要なものであることから、この濃度を適正に保つことが健康増進に重要であると考えられる。

細菌はポリアミンを自ら生産し、特定の生育条件でこれを細胞外へと放出する。尿路感染症菌 *Proteus mirabilis* は、細胞外に放出したポリアミンを細菌細胞間におけるコミュニケーションツールとして用い、集団で病原性遺伝子を発現することが報告されている (Sturgill et al., Mol Microbiol, 2004, 51: 437-46)。

現状、ポリアミンの定量は主に HPLC で行われており、操作が煩雑であるうえに測定に長時間を要する。また、腸管内腔のポリアミン濃度を知るためには糞便中のポリアミン濃度を測定することが最も簡便であるが、HPLC による糞便中のポリアミン濃度の定量には衛生上の問題が存在する。したがって、糞便中のポリアミンを常時モニターすること及び、多数の検体のポリアミン濃度を簡便に定量することへの技術的な問題は大きい。

2. 研究の目的

本研究では糞便中のポリアミン濃度を簡便・衛生的に測定することを目的として、プトレッシンオキシダーゼを用いた酵素法による使い捨てセンサーの開発を目指して研究を行った。また、新たなポリアミンの簡便定量系として、プトレッシンオキシダーゼと発色試薬を組み合わせた 96 穴プレートを用いた比色定量法の開発を行った。

3. 研究の方法

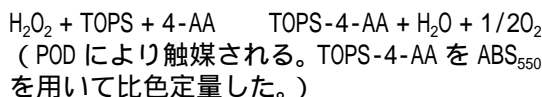
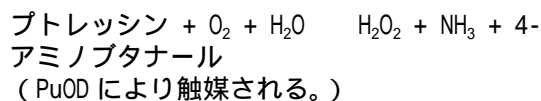
プトレッシンの酵素法を用いたバイオセ

ンサーの開発

試料中のプトレッシン濃度を電気化学的に定量する目的で、ペルオキシダーゼ (POD) 反応の直接電子移動 (DET) 型酵素触媒電極反応をプトレッシンオキシダーゼ (PuOD) 反応と組み合わせることでメディエーターを用いないアンペロメトリックバイオセンサーを構築した。ホースラディッシュ由来 POD と *Rhodococcus erythropolis* 由来 PuOD をグルタルアルデヒドとケチエンブラック (KB) ベースのメソポーラス電極上に共固定化し、標準試料中のプトレッシン濃度を定量した。

プトレッシンの比色定量法の開発

細菌の培養上清および糞便抽出液中のプトレッシン濃度を比色定量する目的で、精製した *R. erythropolis* 由来 PuOD とホースラディッシュ由来 POD、発色試薬である TOPS と 4-アミノアンチピリン (4-AA) を組み合わせることで反応を行い、プトレッシン濃度依存的に起こる吸光度変化を測定する簡易定量系を開発した。反応式を下に示した。



開発した簡易定量系の有効性を示す目的で、プトレッシンを細胞外に放出することが知られている *P. mirabilis* の培養上清、ヒト糞便の抽出液、ポリアミンを含むことが知られている食品について、プトレッシン濃度の定量を簡易定量系を用いて行い、HPLC を用いて定量した値と比較した。

4. 研究成果

プトレッシンの酵素法を用いたバイオセンサーの開発

PuOD/POD を固定化した KB 修飾グラッシェー電極を回転電極として用いた場合、PuOD 反応により生成した H₂O₂ の POD 触媒直接電子移動型還元波が、0.60 V (vs. Ag|AgCl) に観測された。PuOD/POD 固定化および KB 修飾マイクロディスク電極では、静止条件下で、プトレッシンの球状拡散による (擬) 定常触媒電流を観測できることを明らかにした。このバイオメソポーラス微小電極は、プトレッシンに対して、感度 0.33 ± 0.01 mA mM⁻¹ cm²、検出限界 5 μM (S/N > 3) で、17 μM から 500 μM の範囲で直線的電流応答した。

現在、得られた成果を発展させ、使い捨てプトレッシンセンサーを開発する目的で、共同研究を続行中である。

プトレッシンの比色定量法の開発

本簡易法を用いて *P. mirabilis* の培養上

清中 (図 2) 及び糞便抽出液中 (図 3) のブトレッシン濃度を定量したところ、HPLC による定量値と同様の傾向の値を得ることができた。

本簡易法の基質特異性を調べたところ、ブトレッシンに対する反応速度を 100 とした時に、カダベリンに対しては 11.1、スペルミジンに対しては 2.2、アグマチンに対しては 2.1 の反応速度であることが明らかとなった。

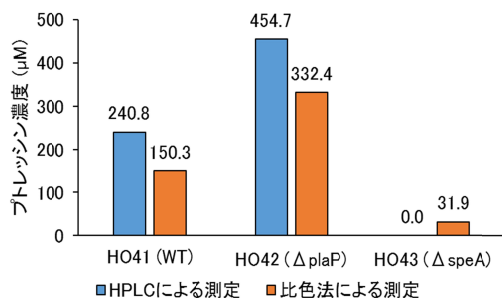


図 2 *P. mirabilis* の培養上清のブトレッシン濃度定量における比色簡易定量と HPLC 定量との比較

P. mirabilis の野生株 (HO41)、ブトレッシンの取り込み能を失った $\Delta plaP$ 株 (HO42)、ブトレッシン生成能を失った $\Delta speA$ 株 (HO43) のそれぞれの培養上清のブトレッシン濃度を本研究で開発した簡易定量法で定量し、HPLC による定量値と比較した。

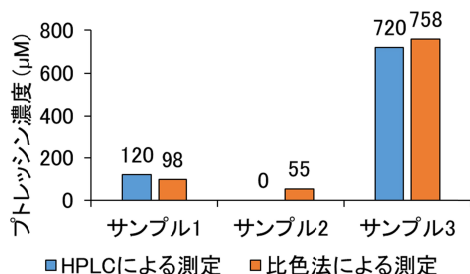


図 3 糞便抽出液のブトレッシン濃度定量における比色簡易定量と HPLC 定量との比較

異なる 3 人の被験者の糞便を PBS で懸濁し、その上清中のブトレッシン濃度を本研究で開発した簡易定量法で定量し、HPLC による定量値と比較した。

また、複数の食品からポリアミンを抽出し、本簡易法を用いてブトレッシン濃度を定量したところ、ピーマン、赤パプリカ、牛肉、ナス、キャベツ、ナンブラー 2 種については HPLC による定量値と同様の値を得ることができたが、しめじ、シイタケ、納豆、ブロッコリースプラウトについては HPLC による定量値と乖離する値が得られた (図 4)。

これらの結果から、本簡易法は培養上清や糞便抽出液、複数の食品抽出液中のブトレッシン濃度を定量することができ、HPLC に代わる簡便な定量法であることが示された。

シンの濃度を定量することができ、HPLC に代わる簡便な定量法であることが示された。

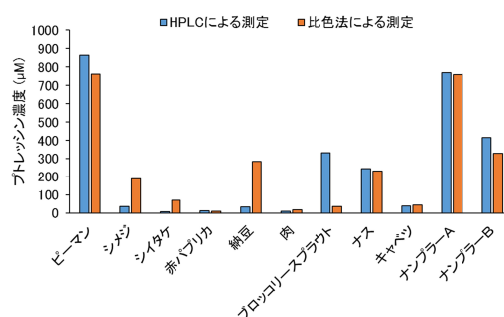


図 4 食品中のブトレッシン濃度定量における比色簡易定量と HPLC 定量との比較

様々な食品を粉砕して PBS 中に懸濁し、その上清中のブトレッシン濃度を本研究で開発した簡易定量法で定量し、HPLC による定量値と比較した。

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 1 件)

Hong-qi Xia, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Hirokazu Ohta, Shin Kurihara, Kenji Kano (Corresponding author). (2017). Putrescine oxidase/peroxidase-co-immobilized and mediator-less mesoporous microelectrode for diffusion-controlled steady-state amperometric detection of putrescine. *J. Electroanal. Chem.* 804:128-132.
doi: org/10.1016/j.jelechem.2017.09.056

〔学会発表〕(計 4 件)

○太田宏一、杉山友太、栗原新。ブトレッシンオキシダーゼと発色試薬を用いたブトレッシンの新規簡易定量法の開発。Development of a novel method for quantification of putrescine using putrescine oxidase and chromogenic reagents. 日本農芸化学会 2018 年度大会。2018 年 3 月 17 日。名古屋市。

○太田宏一、杉山友太、栗原新。ブトレッシンオキシダーゼを用いたブトレッシンの新規簡易定量法の構築と新規ブトレッシンエクスポーターのスクリーニングへの応用。第 10 回北陸合同バイオシンポジウム。2017 年 11 月 10 日。富山市。

○太田宏一、杉山友太、栗原新。ブトレッシンの新規簡易定量法の開発とこれを用いた尿路感染症菌 *Proteus mirabilis* の新規ブトレッシンエクスポーターの探索。東京慈恵会医学大学 学外共同研究助成 ポリアミンと核酸の共進化 第 16 回 合同シンポジウム

△. 2017年9月9日. 東京都港区.

○Hirokazu Ohta, Yuta Sugiyama, and Shin Kurihara. Development of a novel simple method for the determination of putrescine concentration in biological samples. Gordon Research Conference 2018 “Polyamine Metabolism in Disease and Polyamine-Targeted Therapies.” 2017年6月27日. 米国ニューハンプシャー州ウォータービルバレー.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)
なし

取得状況(計0件)
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 新 (KURIHARA, Shin)
石川県立大学・生物資源環境学部・寄附講座准教授
研究者番号：20630966

(2) 研究分担者

加納 健司 (KANO, Kenji)
研究者番号：10152828

(3) 連携研究者

川原 圭博 (KAWAHARA, Yoshihiro)
研究者番号：80401248

(4) 研究協力者

太田 宏一 (OHTA, Hirokazu)