

令和 7 年 4 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2023～2024

課題番号：23K17767

研究課題名（和文）ポストPCR時代を見据えた宿主認識分子の検出に基づく病原体センサーの開発

研究課題名（英文）Development of pathogen sensors based on the detection of host recognition molecules for the post-PCR era

研究代表者

佐藤 久（Satoh, Hisashi）

北海道大学・工学研究院・教授

研究者番号：80326636

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：現在、水中の微生物分析法には、培養に基づく方法と、培養を介さない、顕微鏡を用いた直接計数法、免疫学的方法、バイオマーカーを検出する方法などがある。本研究ではDNAアプタマー（Apt）を用いた水中レジオネラ属菌純菌株（*Legionella pneumophila* (ATCC 33152)）の簡易検出技術を開発した。暗視野観察においてAu-Aptは*Legionella*属菌に結合したことがわかった。大腸菌には結合しなかったことから、Au-Aptは*Legionella*属菌に対して選択性があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、水中の微生物は、培養に基づく方法と、培養を介さない方法で検出されている。培養しない方法で最も有名な方法はPCR法である。しかしこの方法では核酸を抽出する、高額な酵素を必要とする、という課題がある。本研究により、核酸抽出や、高価な試薬を必要としない方法の開発に成功した。通常病原体は蛍光色素で顕微鏡下で検出される。しかし、蛍光色素は短時間で褪色するので観察が非常に難しい。本研究では蛍光色素に金ナノ粒子を用いることで、強い光で長時間サンプルを顕微鏡観察することに成功した。

研究成果の概要（英文）：Currently, microbial analysis methods for water include culture-based methods and non-culture-based methods such as direct microscopic counting, immunological methods, and biomarker detection. In this study, we developed a simple detection technique for *Legionella pneumophila* (ATCC 33152, referred to as Lp) in water using DNA aptamers (Apt). Dark-field microscopy observations revealed that Au-Apt bound to *Legionella* species. Since no binding was observed with *Escherichia coli*, it was confirmed that Au-Apt exhibits selectivity for *Legionella* species.

研究分野：水環境工学

キーワード：センサ アプタマー 簡易分析 病原体 水

1. 研究開始当初の背景

理系の大学を卒業した方なら誰しも細菌の測定をした事があるはずである。これが記憶に残るのは、シャーレを用いた細菌の測定では培地の準備、サンプルの希釈、24時間の培養、コロニーカウントなど、多大な労力を要するためであろう。PCR法はこの概念を根本から変えた。新型コロナウイルスの検出ですっかり有名になった方法ではあるが、①試薬や装置が高価、②酵素の冷凍保存、③有機物による阻害、④DNA濃度の調整、⑤不活性微生物の検出など、使ってみると意外に使い勝手が悪い技術である。この問題を解決するため、申請者は大きく発想を転換し、核酸(DNAやRNA)ではなく「病原体が宿主を認識している病原体表面に存在する分子」を検出する事で環境中の病原体を検出することとした。

2. 研究の目的

本研究ではPCR法によらない病原体センサーを開発する。対象病原体は水系感染症(下痢)を引き起こす病原体であるレジオネラ属菌とする。研究期間(2年間)ではレジオネラ属菌用DNAアプタマーの選抜、金ナノ粒子を用いたレジオネラ属菌の検出を行う。

3. 研究の方法

本研究では金ナノ粒子としてSigma-Aldrich社が作製し、販売する金ナノ粒子を用いた。直径は主に5nmを用い、クエン酸バッファー中に懸濁されたものを使用した(品番741949)。あらかじめ、ストック溶液として100mM酢酸バッファー(pH 5.2)と0.01M HCl溶液を作製した。100mM酢酸バッファー(pH 5.2)は、酢酸0.107mLと酢酸ナトリウム0.677gまたは酢酸ナトリウム三水和物1.124gを混合し、Milli-Q水で100mLにメスアップした。攪拌後、pHが5.2であることを確認する。0.1M HCl溶液は、濃塩酸(約12M)をMilli-Q水で120倍に希釈することで作製した。DNAアプタマーはEurofins Genomics社に作成を依頼した。DNAアプタマーは乾燥状態で納品され、それをMilli-Qで10μMに懸濁した。脱保護溶液として、終濃度がTCEP 1mM、酢酸バッファー90mMの溶液をストック溶液から作製した。これとDNAアプタマーを9:1で混合し、1時間静置することでDNAアプタマーの脱保護を行った。金ナノ粒子300μLと0.1M塩酸を3μLを混合したものに、脱保護を行ったDNAアプタマーを20μL加え、さらに1日冷暗所で静置することで金ナノ粒子とDNAアプタマーを結合させた。金ナノ粒子修飾DNAアプタマーをAu-Aptと称す。

Au-Apt)を95℃10分で加熱し変性する。以下の溶液をチューブ内で混合する。Au-Apt溶液5μL、洗浄済みの属菌培養液5μL。室温で1時間静置する。試料をスライドガラス上の中心に10μL添加する。カバーガラスを静かに乗せる。60℃、10分(またはサンプルが完全に乾くまで)乾燥させる。暗視野顕微鏡で観察する。

4. 研究成果

直径100nmの金ナノ粒子をLp5のDNAアプタマーに修飾させ、Legionella属菌と混合して暗視野顕微鏡で観察を行ったAu-Apt-Lp5は黄色やオレンジ色の丸い点状Legionella属菌は白い糸状で観察できることが確認できた。Au-Apt-Lp5とLegionella属菌が重なったとき、結合していると判断した。このとき、Legionella属菌とAu-Apt-Lp5の結合が確認できた。

静置時間が1時間と長いため、短縮するために5分、10分、15分、30分、60分と時間を変え実験を行った。静置時間5分から60分の間では、インキュベーション時間が長いほど結合が多くみられると感じた。そのため、実験条件の最適化を行う上で、静置時間は60分が適しているという結果となった。

金ナノ粒子は、Bufferの塩が高濃度であると凝集することが知られている。そのため、この特性を生かして、塩濃度を10倍にすることで水中のAu-Aptを凝集させ、Legionella属菌に結合しなかったAu-Aptのスポットを少なくできると考えた。BufferのKClを10倍にし、同様の条件で実験を行った。Legionella属菌のサンプルでは、水中のAu-Aptの凝集は見られず、あまり変化が見られないという結果になった。大腸菌のサンプルでは、大腸菌同士が凝集して列のようになってしまい、うまく観察することができなかった。

上記の結果を受け、KCl濃度を戻した。また、Au-Aptはリン酸-Bufferであったが、細菌の洗浄で用いているTris-Bufferで統一した方が良いと考え、細菌と混合する前にAu-Aptを遠心分離し、上澄み液をTris-Bufferと置き換えた。Au-Aptの遠心分離を行ったことによって、画像中のAu-Aptの総数が減ってしまい、細菌との結合が分かりづらくなってしまった。

上記の結果を受け、Au-Aptを洗浄するのではなく、Au-AptのBufferの検討を行い、クエン酸、PBSの二種類で試みた。Legionella属菌のサンプルでは、クエン酸Bufferで少しAu-Aptが凝集して総数が少なくなっていることが確認できた。しかし、そのほとんどが

Legionella 属菌に結合していたと感じた。また、大腸菌サンプルでは、**PBS-Buffer** では少し大腸菌と **Au-Apt** の結合は見られる一方で、クエン酸 **Buffer** では結合はほぼ見られなかった。したがって、クエン酸 **Buffer** の方が、**Legionella** 属菌に選択性を示したといえる。これまでの実験で、**DNA** アプタマーの結合が **Legionella** 属菌に選択的に行われていることがある程度確認できたため、**Legionella** 属菌と大腸菌を混合し簡素的に環境サンプルを模して、**Legionella** 属菌の濃度の違いによる **Au-Apt** の結合の違いをみた。**Legionella** 属菌、大腸菌の **OD** をどちらも **1.0** になるよう調整し、その混合割合を **1:2**、**2:1**、**1:1** にして顕微鏡観察を行った。**Legionella** 属菌の濃度が高くなるにつれて結合した **Au-Apt** の個数も多くなっているように感じた。この個数を定量的に表すため、カウントする手法を確立した。

これらの画像を解析し、ピクセル数や **RGB**、明るさなどで、水中の **Au-Apt** + 大腸菌、すべての **Au-Apt** + 大腸菌を認識した。この個数の差し引きにより、**Legionella** 属菌に結合した **Au-Apt** の個数をカウントすることが可能となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松永光司, 西山 佳孝, 佐藤久, 半田友衣子, 齋藤伸吾
2. 発表標題 高分子増強-キャピラリー過渡的等速電気泳動法による生体粒子結合型新規DNAアプタマーの探索
3. 学会等名 第58回日本水環境学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松永光司, 佐藤久, 半田友衣子, 齋藤伸吾
2. 発表標題 高分子増強-キャピラリー過渡的等速電気泳動法による生体粒子結合型DNAアプタマーの探索
3. 学会等名 第6回生体膜デザインコンファレンス
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松永光司, 佐藤久, 半田友衣子, 齋藤伸吾
2. 発表標題 高分子増強-キャピラリー過渡的等速電気泳動法を用いる生体粒子に対するDNAアプタマー選抜
3. 学会等名 第43回キャピラリー電気泳動シンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松永光司, 佐藤久, 半田友衣子, 齋藤伸吾
2. 発表標題 新規Legionella pneumophila結合型DNAアプタマー-金ナノ粒子コンジュゲートを用いる簡易細菌分析法
3. 学会等名 令和5年度東日本分析化学若手交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松永光司, 佐藤久, 半田友衣子, 齋藤伸吾
2. 発表標題 新規Legionella pneumophila結合型DNAアプタマー-金ナノ粒子コンジュゲートを用いる簡易細菌分析法
3. 学会等名 第83回日本分析化学討論会 2023年5月20日
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤久、中尾菜之、高井麻帆、松永光司、齋藤伸吾、中屋佑紀
2. 発表標題 DNA アプタマーを用いた水中レジオネラ属菌の簡易検出
3. 学会等名 第59回日本水環境学会年会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 中尾菜之、松永光司、齋藤伸吾、中屋佑紀、佐藤久
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた環境水中レジオネラ属菌検出を目指した簡易分析法の開発
3. 学会等名 第59回日本水環境学会年会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 中尾菜之、松永光司、齋藤伸吾、中屋佑紀、佐藤久
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いたLegionella pneumophilaの検出
3. 学会等名 第61回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高井麻帆、中尾菜之、松永光司、齋藤伸吾、中屋佑紀、佐藤久
2. 発表標題 Legionella pneumophilaに特異的なDNAアプタマーの開発
3. 学会等名 第61回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北大 佐藤久研究グループ https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSato/index-HisashiSato.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 伸吾 (Saito Shingo) (60343018)	埼玉大学・理工学研究科・教授 (12401)	
研究分担者	中屋 佑紀 (Nakaya Yuki) (60868735)	北海道大学・工学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------