

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03328

研究課題名(和文) IoT技術の基盤となるDNAアプタマーを用いた網羅的水質センサの開発

研究課題名(英文) Development of comprehensive water quality sensor using DNA aptamers for foundation of IoT technology

研究代表者

佐藤 久 (Sato, 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) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、三価のヒ素、ノロウイルス、カドミウムイオンのDNAアプタマーを用いて、これら水質汚濁物質の簡易センサーを開発した。検出限界値は、ヒ素センサーで10.2 µg/L、ノロウイルスセンサーで $10^5$ 個/mL、カドミウムセンサーで2 µMであった。このように、本研究では、IoT技術の基盤となるDNAアプタマーを用いた網羅的水質センサを開発する、という所期の目的を達成できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、水質を一斉分析できるマルチセンサを開発することができるようになる。このマルチセンサは、井戸や上水道施設でオンサイトで水質を分析することを可能にする。さらには、IoT技術を用いて水道事業者が水質を遠隔監視できる技術の開発に道筋を付けられる。現在、遠隔監視可能な水質は濁度、色度、水温、遊離塩素程度に限られており、このようなマルチセンサが開発されれば、多種類の水道水質項目を高頻度、広範囲、低コストで遠隔監視できるようになり、水道水の安全性を高い信頼性で確実に担保できるようになる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a simple measurement tools for water pollutants, arsenate, norovirus and cadmium ion, using DNA aptamers specific to these targets. The detection limits were 10.2 µg/L for the arsenate,  $10^5$  cells/mL for norovirus, and 2 µM for cadmium, respectively. Thus, in this study, the intended purpose of developing a comprehensive water quality sensor using DNA aptamers, which becomes the foundation of IoT technology, was achieved.

研究分野：水環境工学

キーワード：センサ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国の水道水質基準項目は主に、生物学的安全性指標、金属類、有機塩素化合物、性状に関する項目からなる。生物学的安全性は大腸菌と一般細菌の数を制御することで担保されている。水質検査の公定法は、大腸菌は特定酵素基質培地法、一般細菌は寒天培地法である。これらの方法には、寒天培地の準備に労力を要する、測定に24時間を要する、多くの大腸菌や一般細菌は病原体ではない、これらの指標細菌を制御しても病原性ウイルスや塩素耐性微生物は制御できない場合がある、といった問題がある。このような背景から、抗体を用いた大腸菌センサの開発が国内外で活発である。しかしながら、抗体には作製に生物体が必要であり倫理的に問題がある、作製の再現性が低く精製に労力を要する、化学的に不安定である、

改変(蛍光色素や固定化部位の修飾が)しにくい、分子量が大きい、免疫原性がある、などの欠点がある。また、生物学的安全性の担保には残留塩素濃度を常に目標値以上に保つ事が不可欠である。金属類は原子吸光度計、誘導結合プラズマ(ICP)発光分光分析装置、ICP質量分析装置で分析されている。これらの方法は分析精度が高く定量下限値も低い、装置が高額である、装置が大きくオンサイト分析には適さない、ランニングコストが高い、などの欠点がある。現状では、水道水質基準項目の測定値はほとんどの項目で基準値を大幅に下回っていることから、分析精度は低くとも測定値が基準値以下であることを簡易に判別できる分析法の普及が望まれており、多数の簡易分析法が普及している。簡易分析法は、分析に手間や専門的知識を要しない、装置や分析のコストが低い、オンサイト分析が可能であり結果を迅速に得られるので、事業者は水質を経済的かつ効率的に評価し自主管理できるようになる、といった公定法には無い利点を有している。簡易金属分析技術の代表例は「デジタルバックテスト」である。しかしながらこの方法には、1サンプル当たりの分析コストが高い、選択性が低いため妨害物質の数が多い、測定できない水質基準項目がある(例えば水銀やカドミウム)などの欠点がある。

### 2. 研究の目的

上記の現状を鑑み、本研究では、水系感染症を引き起こすウイルス(ヒトノロウイルス(HNoV GII.4型))、金属類(ヒ素、水銀、カドミウム)を一斉分析できるセンサを開発する。各物質を選択的に認識するセンサ素子にはDNAアプタマーを用いる。

### 3. 研究の方法

#### 簡易As(III)分析法

33  $\mu\text{L}$  の 10 mM MOPS バッファー中に Ars-3 (濃度 100 nM) を 5  $\mu\text{L}$  添加し、これにサンプルを 20  $\mu\text{L}$  添加した。15分静置後、AuNPs 溶液(平均粒径 10 nm)を 40  $\mu\text{L}$  添加し、40分静置した。その後、3 M NaCl 溶液を 2  $\mu\text{L}$  添加した。NaCl 添加から 20分後に吸収スペクトルを測定した。

#### 簡易ノロウイルス(NoV)分析法

ELISAにおける抗体をDNAアプタマーに置換した新たなNoVのオンサイト分析可能な検出法、酵素結合アプタマー吸着(Enzyme-linked Aptamer Sorbent Assay: ELASA)の開発を試みた。

本研究ではカルボキシル基がウェルの底面に固定化されたELISA用カルボプレート(住友ベークライト株式会社)を使用した。これにアミノ基が修飾されたAG3(一次アプタマー)を添加し共有結合させることでプレートへの一次アプタマーの固定化を行った。一次アプタマーの添加のみでは固定化は起こらないため、カルボキシル基とアミノ基を結合させるために、1-[3-(ジメチルアミノ)プロピル]-3-エチルカルボジイミド(EDC)とN-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)の架橋反応を利用した。また、一次アプタマー結合効率の観点から二段階反応(EDC、NHS架橋反応後にpHを変化させてアミノ基と反応させる方法)を選択した。

EDCがカルボン酸基と反応すると、反応混合物中の第一級アミノ基の求核攻撃によって変位しやすい有効なO-アシルイソ尿素中間体が形成される。第一級アミンは、元のカルボキシル基とのアミド結合を形成し、副産物であるEDCが水溶性尿素誘導体として放出される。一般にNHSまたはその水溶性類似体(スルホ-NHS)をEDC結合プロトコルへ組み込むことによって効率性を向上させたり、乾燥安定性(アミン反応性)中間体を作製する。EDCによりNHSをカルボキシルへ結合させると、O-アシルイソ尿素中間体より極めて安定性の高いNHSエステルが形成され、同時に生理学的pHで第一級アミンへの結合も可能になる。EDCとNHSの架橋反応はpH 4.5~7.2で高効率である。しかしながら、NHSの半減期はpH 7で4~5時間、pH 8.6で10分であり、pHが高くなると分解されやすくなる性質を持つ培養時間が長いほど蛍光強度が高いことから、より多くのAG3がウェルに固定化されたことがわかる。しかしながら、1~9時間までの培養時間当たりの蛍光強度の増加量と比較すると、9~24時間ではほとんど蛍光強度は上がっておらず固定化されるAG3量は変わらないことが示唆された。したがって、 $\text{NH}_2$ -AG3-FAMとNHSエステルの反応は7~9時間で平衡に達することが明らかとなった。また、24時間固定化しても蛍光強度の減少は観察されなかったことから、 $\text{NH}_2$ -AG3-FAMがアルカリ性溶液を用いて行った今回の固定化条件で分解されることはないと考えられた。

一方で、NHSエステルとアミノ基の反応はpH 7~8で高効率である。したがって、効果的にアミノ基を結合させるためには、pH 5~6のMESバッファー中でEDCとNHSを反応させた後、

pH を上げてアミノ基と反応させる二段階反応が適している。

具体的には、ウェルの底面にカルボキシル基が固定された ELISA 用カルボプレート（住友ベークライト株式会社）を用意した。始めにウェルに 50 mM NaCl と 2 M NaOH 混合溶液を 200  $\mu$ L 加え 10 分間静置し、ウェルの洗浄を行った。溶液を捨て MES 緩衝液（0.1 M、pH 6.0）でウェルを洗浄した後、MES で調製した 50 mM 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩（EDC）と、50 mM N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）の混合液を 97.5  $\mu$ L 加えて 20 分間室温で静置した。その後、5' 末端にアミノ基、3' 末端に蛍光色素の FAM を修飾した 50  $\mu$ M AG3 (NH<sub>2</sub>-AG3-FAM) を 2.5  $\mu$ L、5 M NaOH を 1.2  $\mu$ L 加えて pH を 8.0 に上昇させ 2 時間培養し、AG3 をウェルに共有結合によって固定化した。溶液を捨て、TBS（10 mM、pH 7.5）でウェルを 3 回洗浄し未結合の AG3 を取り除いた。PBS（pH 7.4）を 200  $\mu$ L 加えた後にマイクロプレートリーダーにより蛍光強度（Em：485 nm、Ex：535 nm）を測定し、ウェルに残存した AG3 の量を調べた。

ネガティブコントロールとしてアミノ基が修飾されていない 3' 末端 FAM 修飾 AG3 (AG3-FAM)、ブランクとして MES を加えて培養し、蛍光強度の比較を行うことでアミノ基による共有結合の確認を行った。全ての条件で各サンプル数は 4 ウェル（n = 4）で実験を行った。

#### 4. 研究成果

##### 簡易 As(III)分析法

まず NaCl 最終濃度と MOPS バッファの pH を検討した。NaCl 最終濃度が 30 mM から 90 mM の間で As(III)の有無（100  $\mu$ M および 0  $\mu$ M）における吸光度比の差が大きくなった。また、バッファの pH が 6.5 から 7.3 に増加するにつれて検量線の傾きが増大したが、pH 7.3 以上では検量線の傾きが低下した。以上の結果より、NaCl 最終濃度を 60 mM、バッファの pH を 7.3 と決定した。以上の条件で検量線を作成した。As(III)濃度が 0  $\mu$ M から 0.5  $\mu$ M に増加するに従い 600nm の吸光度と 520nm の吸光度比（A600/A520）の値は増加し、As(III)濃度が 0.5  $\mu$ M より高濃度になると、A600/A520 の値はほとんど変化しなかった。また、As(III)濃度が 0.1  $\mu$ M では、サンプルごとの吸収スペクトルがばらつき、標準偏差が大きくなった。この検量線から検出限界値は 0.14  $\mu$ M（10.2  $\mu$ g/L）と算出された。本法で地下水中の As(III)濃度を測定した。本法で求めた As(III)濃度は添加した As(III)濃度と概ね一致することが明らかとなり、地下水中の As(III)分析に本手法が適用できることが明らかとなった。

##### 簡易ノロウイルス（NoV）分析法

アミノ基の有無に関わらず蛍光強度がブランクよりも高い値を示したことから、AG3 を加えると何らかの形で必ずウェルに残存することがわかった。残存の仕方として、AG3-FAM は物理的吸着、NH<sub>2</sub>-AG3-FAM は物理的吸着と共有結合を介したウェルへの固定化の両方が考えられる。アミノ基の有無による蛍光強度を比較すると、アミノ基を持つ AG3 のほうが蛍光強度は高くなった。ここでウェルに残存した AG3 の結合力に着目する。ウェルに物理的に吸着した AG3 は共有結合した AG3 よりもウェルへの結合力は小さく、洗浄プロセスによってウェルから容易に脱離される。したがって、蛍光強度の差は洗浄プロセスによる残存 AG3 の除去率、つまり AG3 の結合力の差によるものであり、NH<sub>2</sub>-AG3-FAM の方が結合力が強い場合より多くの AG3 が残存したと考えられる。したがって、NH<sub>2</sub>-AG3-FAM は物理的脱着だけでなく共有結合によってウェルに固定化されたことが示唆された。しかしながら、これだけでは共有結合していることを完全には証明できないため、後にウイルス添加条件による発光量変化の違いについての実験を行った。

培養時間が長いほど蛍光強度が高いことから、より多くの AG3 がウェルに固定化されたことがわかった。しかしながら、1~9 時間までの培養時間当たりの蛍光強度の増加量と比較すると、9~24 時間ではほとんど蛍光強度は上がっておらず固定化される AG3 量は変わらないことが示唆された。したがって、NH<sub>2</sub>-AG3-FAM と NHS エステルの反応は 7~9 時間で平衡に達することが明らかとなった。また、24 時間固定化しても蛍光強度の減少は観察されなかったことから、NH<sub>2</sub>-AG3-FAM がアルカリ性溶液を用いて行った今回の固定化条件で分解されることはないと考えられた。

マウスノロウイルス（MNV）検出のための ELISA を確立することができた。検量線を作成したところ、MNV 濃度と発光量に指数関数的な関係が見られた。分析条件の最適化の結果、ELISA よりも高感度に（10<sup>3</sup> PFU/mL = 10<sup>5</sup> 個/mL）MNV を検出することができた。また、本法は BSA、MNVS7 に対して選択性があることが明らかになった。基質添加前の洗浄回数を増やすことで西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）の非特異的吸着のみならず非特異的に吸着した二次アプタマーと HRP の結合体も取り除くことができることも明らかとなった。

しかしながら、環境水中の MNV の検出では競合物質の影響を受けるためにバックグラウンドが高くなることが課題として残された。従って、MNV の定量および環境水中の MNV の検出ためにはさらなる感度の向上が求められる。現在の問題点の一つとして、ウェルのブロッキングが適切でないために二次アプタマーが非特異的吸着し、ブランクの発光量が高くなっていると考えられる。今後はブロッキングバッファやブロッキングの時間などの検討による感度向上を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koji Matsunaga, Yu Okuyama, Reiko Hirano, Satoshi Okabe, Masahiro Takahashi, Hisashi Satoh	4. 巻 224
2. 論文標題 Development of a simple analytical method to determine arsenite using a DNA aptamer and gold nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chemosphere	6. 最初と最後の頁 538-543
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemosphere.2019.02.182	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件（うち招待講演 1件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 松永 光司・奥山 優・平野 麗子（セルスペクト）・岡部 聡・高橋 正宏・佐藤 久
2. 発表標題 DNAとナノ粒子を用いた簡易ヒ素検出法の開発
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松永 光司・奥山 優・岡部 聡・高橋 正宏・佐藤 久
2. 発表標題 三価と五価のヒ素を分別定量可能な新規光学的簡易バイオセンサーの開発
3. 学会等名 第55回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松永 光司・奥山 優・岡部 聡・高橋 正宏・佐藤 久
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易ヒ素( )分析手法の開発
3. 学会等名 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 C. Meegoda, H. Satoh
2 . 発表標題 Development Of An Optical Sensor For Norovirus Detection
3 . 学会等名 IWA-World Water Congress & Exhibition 2018 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 K. Matsunaga, H. Satoh
2 . 発表標題 Development Of A Simple Analytical Method For Determination Of Arsenite Using A DNA Aptamer And Gold Nanoparticles
3 . 学会等名 IWA-World Water Congress & Exhibition 2018 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 C. Meegoda, Reiko HIRANO, Masaaki KITAJIMA, Masahiro TAKAHASHI , Satoshi OKABE , H. Satoh
2 . 発表標題 Development of Enzyme-Linked Oligonucleotide Assay (ELONA) for Pathogenic Microorganism Detection in Aquatic Samples
3 . 学会等名 Water and Environment Technology Conference ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Koji MATSUNAGA, Yu OKUYAMA, Masahiro TAKAHASHI, Satoshi OKABE, H. Satoh
2 . 発表標題 Development of a Simple Analytical Method for Determination of Arsenite Using a DNA Aptamer and Gold Nanoparticles
3 . 学会等名 Water and Environment Technology Conference ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤久
2. 発表標題 Determination of Heavy Metals Concentrations in Aquatic Samples using DNA Aptamers
3. 学会等名 BIT's 4th Annual World Congress of Smart Materials-2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松永光司、奥山 優、岡部 聡、高橋正宏、佐藤 久
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易ヒ素分析法の開発
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉原光、北島正章、岡部聡、高橋正宏、佐藤久、佐野大輔
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易ノロウイルス検出法の開発
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林ひかり, 吉原光、岡部聡、高橋正宏、佐藤久
2. 発表標題 水銀イオンとDNAチミン塩基の塩基対形成能を利用した簡易水銀分析法の開発
3. 学会等名 第52回日本水環境学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松永光司、奥山 優、岡部 聡、高橋正宏、佐藤 久
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易ヒ素分析法の開発
3. 学会等名 第54回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉原光、北島正章、岡部聡、高橋正宏、佐藤久、佐野大輔
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易ノロウイルス検出法の開発
3. 学会等名 第54回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林ひかり, 吉原光、岡部聡、高橋正宏、佐藤久
2. 発表標題 水銀イオンとDNAチミン塩基の塩基対形成能を利用した簡易水銀分析法の開発
3. 学会等名 第54回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松永光司、奥山 優、岡部 聡、高橋正宏、佐藤 久
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易ヒ素分析法の開発
3. 学会等名 平成29年度水道研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉原光、北島正章、岡部聡、高橋正宏、佐藤久、佐野大輔
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易ノロウイルス検出法の開発
3. 学会等名 平成29年度水道研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松永光司、奥山 優、岡部 聡、高橋正宏、佐藤 久
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易ヒ素(III)分析手法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉原光、北島正章、岡部聡、高橋正宏、佐藤久、佐野大輔
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易ノロウイルス検出法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第66年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小野寺岳史郎、平野麗子、佐藤久
2. 発表標題 DNAアプタマーの立体構造変化を利用した蛍光ヒ素(III)センサの開発
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松永光司、平野麗子、岡部聡、佐藤久
2. 発表標題 蛍光色素修飾DNAと酸化セリウムナノ粒子を用いた簡易ヒ素(V)検出法の開発
3. 学会等名 日本分析化学会第68年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤久、小野寺岳史郎、松永光司、平野麗子、中原禎仁
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易蛍光ヒ素測定法の開発
3. 学会等名 地下水・土壌汚染とその防止対策に関する研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤久、小野寺岳史郎、中原禎仁
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた簡易蛍光ヒ素(III)分析法の開発
3. 学会等名 水道研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野寺岳史郎、平野麗子、佐藤久
2. 発表標題 DNAアプタマーの立体構造変化を利用した蛍光ヒ素(III)センサの開発
3. 学会等名 第56回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松永光司、平野麗子、佐藤久
2. 発表標題 DNAとナノ粒子を用いた簡易ヒ素(V)検出法の開発
3. 学会等名 化学系学協会北海道支部2020年冬季研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松永光司、平野麗子、佐藤久
2. 発表標題 酸化セリウムナノ粒子を用いた簡易ヒ素(V)検出法の開発
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野寺岳史郎、平野麗子、佐藤久
2. 発表標題 ヒ素(III)用アプタマーを用いた簡易蛍光ヒ素分析法の開発
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

佐藤久研究グループWebsite <a href="http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSatoh/index-HisashiSatoh.html">http://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSatoh/index-HisashiSatoh.html</a>
---

## 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	羽深 昭  (Hafuka Akira)  (30735353)	北海道大学・工学研究院・助教       (10101)	