

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：83201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18435

研究課題名(和文) マイクロチップ分析型キャピラリー電気泳動装置を用いた病原性大腸菌の検出

研究課題名(英文) Development of capillary electrophoresis system for the pathogenic E. coli and its use in the mobile type CE system.

研究代表者

安川 和志 (Yasukawa, Kazuyuki)

富山県衛生研究所・化学部・主任研究員

研究者番号：00737835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：食中毒発生現場等で腸管出血性大腸菌等の測定が可能な、キャピラリー電気泳動法を基盤としたポータブル型分析機器の開発を目的に、現在ボトルネックとされている微生物同属種の株の分離とより高感度な微生物の検出法について検討した。本研究により、大腸菌外膜の化学的な誘導体化をすることで、不可能とされていた微生物同属種の株をキャピラリー電気泳動上で分離できる可能性が見えてきた。また、本手法は従来の微生物のDNAを対象にした蛍光染色法よりも高感度であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キャピラリー電気泳動法による微生物の分離分析は、多くなされているが、似通った微生物同士は凝集し分離が困難とされてきた。本研究では、大腸菌を化学的に誘導体化することが可能であり、従来のDNAを対象とした蛍光染色法より高感度であることを示した。本技術は、従来不可能とされていた、キャピラリー電気泳動法による微生物同属種の株を分離できる可能性が示唆された。このことにより、食中毒発生現場等でのキャピラリー電気泳動法を基盤とした安価なポータブル型分析機器の開発に貢献する。

研究成果の概要(英文)：The technique of directly detecting pathogenic bacteria using capillary electrophoresis (CE) has been attractive attention from field of health research. However, there is no report concerning the separation of bacteria strain such as Escherichia coli strain K-12 and B which have similar particle size and polarity. The aim of this study is to develop CE separation techniques for bacteria strain and are applicable to the mobile CE system. In this study, we showed method of chemical modification for bacteria outer membrane based on the o-phthalaldehyde reaction. Using this method, we obtained data proposing possibility of separation of bacteria strain by CE. Moreover, the method was showed higher fluorescence intensity than the fluorescence staining method for bacteria cell such as DAPI and Hoechst 33258.

研究分野：分析化学

キーワード：キャピラリー電気泳動 大腸菌 微生物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌(EHEC)による食中毒問題は、日本のみならず世界が直面する問題である。近年、迅速な EHEC の検出法として EHEC 特異的な遺伝子配列を利用した遺伝子増幅法やハイブリダイゼーション法を基盤としたマイクロチップデバイスが開発されている。しかしながら、前述した方法では、EHEC の血清型に関する情報は得ることが難しい。一方で、マイクロチップ分析装置に応用が容易なキャピラリー電気泳動(CE)法を基盤とする理化学的な微生物の分離分析法の開発も注目されている。しかしながら、本手法は微生物の表面電荷と細胞の大きさに依存しており細胞構造が似通った同属種の株を分離同定することは、困難であるとされ報告例はほとんど無い¹⁾。わずかな例として、黄色ブドウ球菌の薬剤耐性株と感受性株の違いを CE で分離同定されているが、分離がどのような原理に基づくのかは、未だ解明されていない²⁾。

以上の背景から、既存の微生物の CE 分離概念である表面電荷と細胞の大きさに加え、新たに大腸菌表面の糖鎖構造(タンパク質等)の違いに着目することで、微生物株の分離が可能であると推測した。

2. 研究の目的

応募者は、食中毒発生現場等で腸管出血性大腸菌等の測定が可能な、キャピラリー電気泳動法を基盤としたポータブル型分析機器の開発をするため、モデル微生物として大腸菌 K-12 株と B 株を選択し、現在 CE 法のボトルネックとされている微生物同属種の株の分離とより高感度な微生物の検出法を開発することを目的にした。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌株の電気泳動移動度の測定

大腸菌株は、LB 培地で 37℃、24 時間培養した。その後、集菌と洗菌を行い、濁度計を用いてホウ酸緩衝液(pH8.5)中で濁度 1 に調整した。電気泳動移動度の測定は、濁度 1 の調整菌液 10 μL を pH4~7.5 の各緩衝液(終濃度 10 mM)で 1 mL に調整し、ボルテックスを用い攪拌した。その後、ゼータ電位計(Zetasizer nano ZSP, Malvern Instruments, UK)を用いて、電気泳動移動度と粒子径を測定した。

(2) キャピラリー電気泳動条件の検討

キャピラリー電気泳動(CE)は、以下の条件で実施した。

装置：PA 800 Plus (AB SCIEX)

キャピラリーカラム：Untreated fused silica (有効長：30 cm, 100 μm i.d.)

温度：25

電圧：20 kV

検出波長：230 nm

注入量：10 psi, 10 秒

測定開始毎に、100 mM NaOH 溶液, 1 分, 蒸留水, 1 分, 電気泳動緩衝液, 1 分を 60 psi で注入した。

(3) 大腸菌の誘導体化法の探索

大腸菌の外膜に存在するアミノ基をターゲットに、温和な条件下で化学的に誘導体化が可能な試薬をスクリーニングした。誘導体化のモデル株として大腸菌 K-12 株と B 株を用いた。誘導体化した大腸菌は洗菌により未反応の誘導体化試薬を除去し、CE による分析を行った。

(4) *o*-フタルアルデヒドと 3-メルカプトプロピオン酸メチルを用いた大腸菌の誘導体化の検討

o-フタルアルデヒド(OPA)と 3-メルカプトプロピオン酸メチル(3-MPAM)を用いた誘導体化法の最適条件を検討した。また、誘導体化した大腸菌は、ゼータ電位計による電気泳動移動度の測定と蛍光顕微鏡による観察を実施した。

4. 研究成果

(1) 大腸菌株の電気泳動移動度の測定

大腸菌 K-12 株と B 株の電気泳動移動度と pH の関係について検討した。結果、pH5 を境界に電気泳動移動度は大きく正に増大する結果が得られた。また、大腸菌 K-12 株と B 株は、いずれの pH においても、それぞれ異なる電気泳動移動度を示した。以上の結果は、Hamadi 等が報告する大腸菌 H101 株, 382 株, AL52 株の 3 株について検討した、pH の変化における電気泳動移動度の変化に関する報告と一致する³⁾。

(2) キャピラリー電気泳動条件の検討

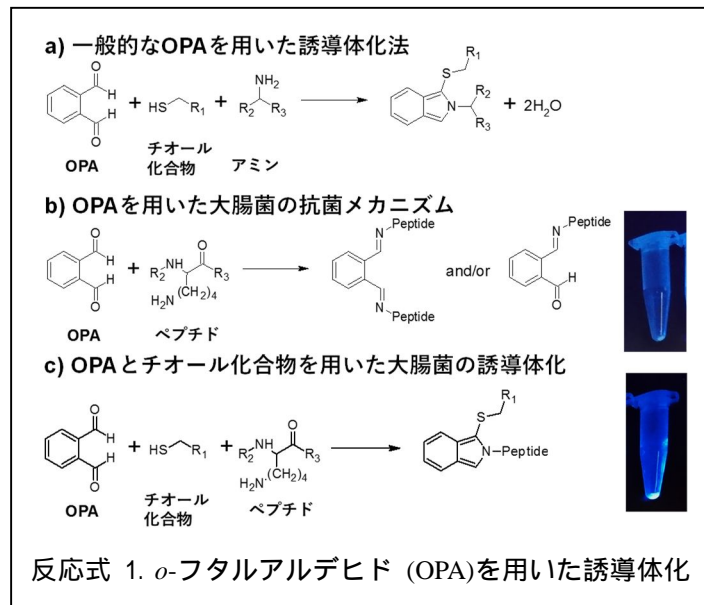
大腸菌 K-12 株と B 株の電気泳動移動度が異なることは、CE 分析の結果から得られた電気泳動移動度からも明らかであった。しかしながら、2 つの大腸菌株を混合した試料液では、明らかに凝集した 1 つのピークとして検出された。そこで、電気泳動用緩衝液の pH(5~10) および疑似カラムとしての種々ポリマー(総数 20 種)の検討を行ったが、CE 分析における大腸菌株同士が凝集する問題を大きく解決する手段とはならなかった。

(3) 大腸菌の誘導体化法の探索

大腸菌同士の凝集を防ぐために、大腸菌の外膜に存在するアミノ基をターゲットに化学的誘導体化を行った。まず着目したのは、*o*-フタルアルデヒド(OPA)が微生物の外膜タンパク質に作用することで抗菌活性を示すことである⁴⁾(反応式1)。さらに、OPAとチオール化合物を用いたタンパク質の蛍光定量法も一般的に知られている。このことから、OPAとチオール化合物を用いて、微生物の外膜に存在するアミノ基をターゲットに誘導体化が可能であると考えた。結果、OPAと2-メルカプトエタノール(2-ME)を用いて誘導体化した大腸菌は、360 nmの励起光により460 nmの蛍光を検出した(反応式1)。

OPAと2-MEを用いて誘導体化した大腸菌 K-12 株と B 株について、CE 装置で分離を行った結果、複数の望まないピークが確認されるものの、わずかながら分離が確認された。そこで、CE 上での大腸菌の凝集の改善とより蛍光強度が高くなる組合せを探索するため、OPA とカップリングさせるチオール化合物についてスクリーニングを実施した。結果、OPA と 2-フェニルエタノール(2-PE)の組み合わせが最も高い蛍光強度を示し、次いで 3-メルカプトプロピオン酸メチル(3-MPAM)との組み合わせが高い蛍光強度を示した。しかし、大腸菌 K-12 株と B 株の CE による分離は、達成できなかった。

さらに、誘導体化試薬として 9-フルオロレニルメチルクロロホルメート(FMOC-Cl)、NBD-F、FITC、Alexa Fluor 350 NHS Ester を検討した結果、蛍光の観察は確認できたが、CE 上での大腸菌 K-12 株と B 株の分離は確認できなかった。



(4) *o*-フタルアルデヒドと3-メルカプトプロピオン酸メチルを用いた大腸菌の誘導体化の検討

取り扱いが容易でかつ、高い蛍光強度を示した OPA と 3-MPAM について詳細を検討した。OPA と 3-MPAM を用いた大腸菌の誘導体化法について、より最適な反応条件を検討した結果、10 mM ホウ酸緩衝液(pH10)中で 2 mM OPA と 2 mM 3-MPAM を用い、室温で 15 分反応させることにした。最適化した条件を用いて、一般的に微生物の蛍光染色法に用いられる DNA をターゲットにした試薬(DAPI, Hoechst 33258)と蛍光強度の比較を蛍光マイクロプレートリーダーを用いて検討したところ、OPA と 3-MPAM による誘導体化法は約 3 倍程度高い蛍光強度を示した。また、大腸菌濃度 $1.2 \times 10^6 \sim 2.4 \times 10^7$ cfu/mL の範囲で蛍光強度と高い相関($R^2=0.996$)を示した。

OPA とチオール化合物を用いた大腸菌の誘導体化の結果、大腸菌のゼータ電位は負に増大する傾向が観察された。このことは、誘導体化により大腸菌外膜のアミノ基(正電荷)が減少することに起因していると考えられる。また、誘導体化した大腸菌の粒子径は、疎水度の高いチオール化合物(2-PE, 3-MPAM)で顕著に縮小した。この結果は、誘導体化により大腸菌の外膜が疎水的になったことが関係していると考えられる。

また、誘導体化した大腸菌を蛍光顕微鏡で観察した結果、すべての細胞から蛍光が観察された。さらに、細胞膜に損傷を受けた細胞を選択的に染色する PI で二重染色すると、OPA 濃度の増大に依存して染色される細胞が増加した。この結果から、CE を用いた分析で、複数の目的外ピークが確認された要因の一つは、細胞膜へのダメージが不均一に生じているためであると考えている。

(5) まとめと今後の展望

微生物の外膜に存在するアミノ基をターゲットにした、微生物の化学的誘導体化法は、従来の DNA をターゲットにした蛍光染色法より高い感度を示し、定量性も確認できた。しかしながら、本方法を利用した CE 法による大腸菌 K-12 株と B 株の分離は、目的外のピークが多く存在した。誘導体化した大腸菌の蛍光顕微鏡による観察結果から、誘導体化による微生物の外膜への影響が均一でないことが CE 分析における目的外ピークの出現の原因の一つではないかと考えられた。今後は、微生物の化学的誘導体化を均一に実施できる手法を検討する必要がある。

<引用文献>

- 1) J. Petr, V. Maier, Analysis of microorganisms by capillary electrophoresis, Trends in Analytical

Chemistry, 31, 2012, 9-22.

- 2) M. Horká, M. Tesařová, P. Karásek, F. Růžička, V. Holá, M. Sittová, M. Roth, Determination of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteria in blood by capillary zone electrophoresis, *Analytica Chimica Acta*, 868, 2015, 67-72.
- 3) F. Hamadi, H. Latrache, A. Elghari, H. Zahira, M. Maabrouki, A.E. Elbouadili Determination of *Escherichia coli* Negative Charge Concentration From XPS Data and Its Variation with pH, *Journal of Surface Analysis*, 12 (3) 2005, 293-302.
- 4) C. Simons, S.E Walsh, J.-Y. Maillard, A.D. Russell, Ortho-Phtalaldehyde: proposed mechanism of action of a new antimicrobial agent, *Letters in Applied Microbiology*, 31, 2000, 299-302.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安川和志、山下智富
2. 発表標題 大腸菌の化学修飾とキャピラリー電気泳動法への応用
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安川和志、山下智富
2. 発表標題 o-フタルアルデヒド法による微生物の誘導体化
3. 学会等名 日本化学会 第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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