

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19560046

研究課題名（和文）微生物1個体検出可能なATP超高感度検出システムの開発

研究課題名（英文）Development of ultra-sensitive detection of ATP for one microorganism's detection

研究代表者

飯沼 昌隆（IINUMA MASATAKA）

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教

研究者番号：00294521

研究成果の概要：

アデノシン三リン酸(ATP)は、すべての生命体が保有するエネルギー源となる分子であり、ATPの検出が公衆衛生現場での細菌の微量検出などに利用されている。ATP検出感度を微生物1個体検出が可能なレベル(10^{-19} mol)まで向上させるために、ATPの消費によって起こるルシフェリン分子の酸化反応で発生する光子を、単一光子検出可能な冷却型アバランシェフォトダイオードによって検出するシステムを構築した。今回のシステムでは 10^{-15} molの感度を達成し、 10^{-16} mol～ 10^{-17} molに到達可能であることも分かった。しかし反応がピークに達するまでの立ち上がり時間が一桁から二桁長くなる現象が見られた。その原因はいまだに不明である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎・応用物理学一般

キーワード：物理計測・バイオセンサー・単一光子検出・APD・SBP-ルシフェラーゼ・光ファイバー・ルシフェリンルシフェラーゼ反応・反応速度

1. 研究開始当初の背景

ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を利用したATP検出法は国内外を問わず広く利用され、通常の光電子増倍管に集光効率の高い集光系を組み合わせたATP検出システムは、数多く製品化されている。光電子増倍管は受光面が1cm程度と比較的大きい領域を持ち、

大きな発光領域を検出できるため、 10^{-17} mol- 10^{-16} mol程度の高感度をすでに達成している。一方、光検出器に固体デバイスを利用した例も数は少ないが存在し、早稲田大学のグループがすでにシリコン検出器の受光面に直接ルシフェラーゼを固定させてATPを検出するATP分子認識チップを開発している。しかしながらこれらのシステムは 10^{-19} molの検出感

度を有していない。その主たる原因は暗電流雑音の影響が大きいことにある。一般に暗電流雑音は、光電子増倍管で毎秒 10^4 カウント程度、固体光検出素子で毎秒 10^7 カウント程度である。ATP検出の目標感度 10^{-19} molは、ほぼ 10^4 個のATPの検出を意味するから、これらの光検出器をそのまま利用する限り、たとえ検出効率が100%に達したとしても、 10^{-19} molの検出感度は得られないことになる。

これらを解決するためには、暗電流雑音を抑えた冷却型光検出器を利用する方法が考えられる。しかし冷却型の光電子増倍管は、暗電流雑音を抑えることを優先するため、受光面が小さくなる、装置が大掛かりになる、扱いが面倒になる等のために、あまり利用されていない。一方、冷却型固体光検出器（冷却型アバランシェフォトダイオード）の場合は、小型、軽量、扱いが容易などのメリットがある反面、受光面が0.2mm程度と非常に小さい。そのため、これまでは感度向上の見込みがないとされ、高感度検出には利用されてこなかった。

2. 研究の目的

この研究は、冷却型アバランシェフォトダイオード（冷却型 APD）を積極的に利用し、最終的に 10^{-19} mol の感度を目指すものである。そのためにこの研究では、以下の1)と2)の二つを目的とした。しかしながら研究遂行中に、固定したルシフェラーゼの反応速度が二桁程度遅くなる現象が見られた。そこで今回の研究期間では、1)と3)の実施を優先させた。

- 1) ルシフェラーゼを先端に固定した光ファイバーと冷却型 APD 結合検出システムによる感度向上
- 2) 四重極トラップによる ATP の収集と閉じ込めの可能性の追求
- 3) 固定したルシフェラーゼの立ち上がり速度が二桁程度遅くなる原因

1) について

ルシフェラーゼを先端に固定した光ファイバーと冷却型 APD との結合による検出システムを構築し、到達可能な最大感度を調べる。感度を決定する要因は、①ATP による発光量に寄与する固定したルシフェラーゼの個数、②光ファイバーと冷却 APD との結合効率、③冷却型 APD の暗電流雑音の三つであるが、このうち①と②はトレードオフの関係にある。そこで最大の感度が得られる①と②の条件を見出し、最終的な到達感度を調べることに主目的となる。

2) について

今回の検出システムでは、発光領域が光ファイバー断面積とほぼ同程度となるため、ATP がサンプル溶液全体にわたって拡散している状態では 10^{-19} mol の感度に到達できない。そのため2)が必要となる。ATP を収集し、ルシフェラーゼが固定された光ファイバー端面周辺に ATP 高濃度領域を作り出すことができれば、1)の検出システムで大幅な検出感度向上が見込める。1)と2)の結果を組み合わせることで、 10^{-19} mol の感度到達が可能となる。しかしながら今回の研究では当初の方針を変えて、この2)より次の3)の実施を優先させた。

3) について

1)の研究の進行中、固定したルシフェラーゼのピークまでの立ち上がり時間が固定しない場合と比べて二桁程度遅くなる傾向が見られた。固定化のために反応速度が遅くなり、その結果立ち上がり速度が遅くなるのであれば、検出時間としては数分程度必要となるため、実用にならない。この原因の追究と改善の可能性について調べる必要がある。

3. 研究の方法

1) について

広島大学大学院先端物質科学研究科生物工学研究グループの黒田らが開発した石英ガラスに吸着するシリカ結合たんぱく質 (SBP) とルシフェラーゼとの融合たんぱく質 (SBP-ルシフェラーゼ) を用いて光ファイバー端面に固定し、単一光子検出可能な冷却型 APD で ATP の検出を試みる。

図1にATP検出システム全体のセットアップを示す。APDは、単一光子検出が可能な冷却型タイプで、米国パーキンエルマー製フォトカウンティングモジュール、SPCM-AQR-14（波長550[nm]での量子効率55%、暗電流カウント $100[\text{sec}^{-1}]$ ）を用いた。

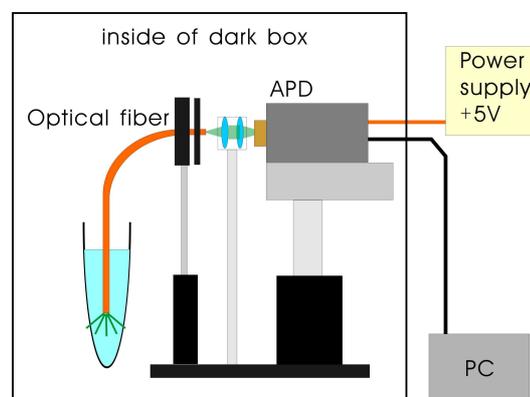


図1：システム全体のセットアップ

ATP の検出は、ATP とルシフェリンが入った試料溶液にルシフェラーゼが固定化され

た光ファイバー先端を浸すことで行う。発光はルシフェリンを取り込んだルシフェラーゼで起こるため、発光領域は光ファイバー先端部に限定される。光ファイバーに入った光は図2に示す光学結合系を介してAPDの光検出面に誘導され、検出される。1光子がAPDで検出されると1つの電圧パルスが出力され、その個数をPCで計測する。なお外部からの光の進入を遮断するため、装置全体を暗箱の中に設置した。

この実験のポイントは、以下の4点である。

- a) 光ファイバー先端に固定されたルシフェラーゼの数を増やすための固定化条件を見出す。
- b) 光ファイバーと冷却 APD との結合効率を最適化するため、結合光学系と光ファイバーに関するパラメータの決定、光学系の構築。
- c) a)と b)について条件を最適化した下でのATP 検出実験を行う。反応速度との関連や検出光子数の積算値を見るために、検出光子数の時間依存性と ATP の濃度依存性を測定する。
- d) さらなる感度向上の可能性の検討。

3) について

SBP-ルシフェラーゼを固定した場合、固定しない場合と比較して立ち上がり時間が二桁遅くなった。この原因追求について、以下の方法を実施した。

- a) SBP-ルシフェラーゼの作成具合によるサンプル依存性も調べるため、新たなSBP-ルシフェラーゼを作成する。
- b) 固定化したルシフェラーゼの立ち上がり時間の密度依存性の測定。光ファイバー断面積一定の下で、固定するルシフェラーゼの個数を変えて測定する。

4. 研究成果

1) について

- a) ルシフェラーゼ固定化条件

ルシフェラーゼは、光ファイバー切断面をエタノール、Tris バッファ溶液 (0.25mM の Tris-HCl と 0.15M の NaCl の混合溶液) で洗浄した後、3°C~6°Cの温度を保ちながら、SBP-ルシフェラーゼ溶液に先端部を浸すことで固定化する。このとき光ファイバー切断方法として、凹凸が少ない滑らかな切断面が得られるクリーピング法と、かなりの凹凸が発生するカッターで単純に切断する方法と両方を比較した。その結果、カッターで切断

する方法は、クリーピング法に比べて発光量一桁が増えて感度が向上することが分かった。ただし切断面の微妙な変化によって発光量が大幅に変動するため、現時点では制御ができていない。発光量が一桁増大した理由は、固定したルシフェラーゼの個数が一桁増大したことが原因であるが、凹凸の分の面積の増大だけでは、一桁の増大の説明がつかない。原因は不明であるが、感度向上の観点からカッターで切断する方法を採用した。ただし実験によってルシフェラーゼの個数を制御したい場合、クリーピング法を用いた。

- b) 結合光学系とパラメータの決定

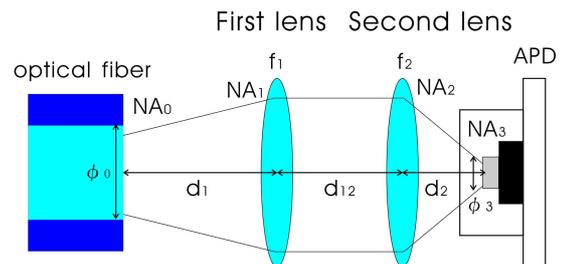


図2：光ファイバーとAPDとの結合光学系

図2で示すような結合光学系を考え、各パラメータを決定した。フィギュアオブメリット(FOM)を以下のように定義して、FOMが最大になるように最適化した。ただしレンズや光ファイバー入手の都合から、値に制限を課した。

$$FOM = \phi_0^2 \cdot \eta(NA_0) \cdot \varepsilon(\phi_0, NA_0)$$

ここで、 ϕ_0 は光ファイバーの直径、 NA_0 は光ファイバーの開口数、 η は光ファイバー先端での集光効率、 ε は光ファイバーとAPDとの結合効率である。APDの受光面の直径、 ϕ_3 は0.175[mm]、APDの開口数 NA_3 は0.78であり、レンズの幾何学的構造から $d_{12}=5$ [mm]とした。この条件下で $d_1=f_1$ 、 $d_2=f_2$ としてFOMを最大とする条件を探した結果、 $\phi_0=0.6$ [mm]、 $NA_0=0.37$ と決定した。さらに ϕ_0 と NA_0 を固定してFOMが最大となる d_1 、 d_2 を探したところ、 $d_1=11.6$ [mm]、 $d_2=2.7$ [mm]のとき最大値 $\varepsilon=33.33\%$ が得られた。このとき $\eta=1.95\%$ であった。

- c) 時間依存性と濃度依存性

ルシフェラーゼを固定した光ファイバー先端を試料溶液(ATPとルシフェリンをバッファ溶液に混合したもの)に浸した時間を時刻ゼロとして検出した光子数の時間依存性を測定した。ATPの濃度が 1.65×10^{-7} [M]のときの計測結果を図3に示す。なお試料溶液の

体積は、このとき 100[μ l]であった。

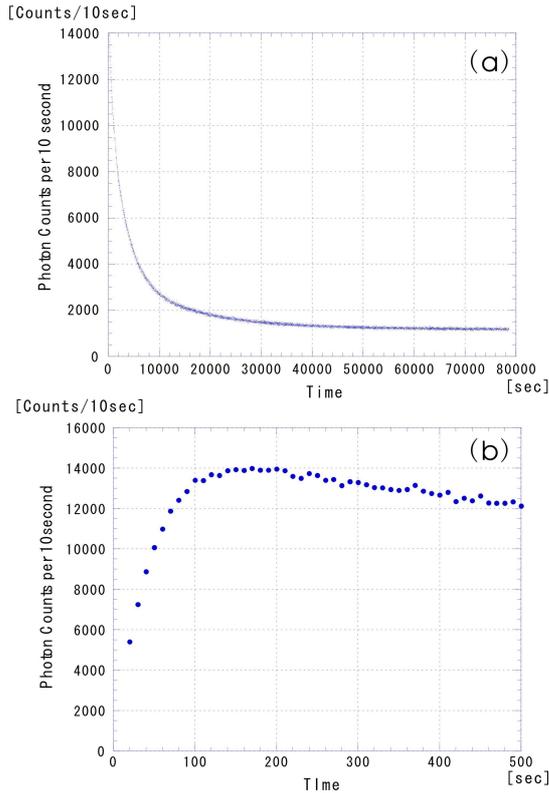


図 3 : 検出光子数の時間依存性

図 3 (a)は長時間測定を示し、図 3 (b)は同じ結果で立ち上がりのみ拡大したグラフを示す。両者から分かるように、試料溶液を光ファイバーに浸してから 150[sec]程度でピークに達し、その後徐々に減衰し、長時間経過後にはバックグラウンドレベルにまで到達している様子が見て取れる。この結果から最高感度を得るには、約 300[sec]程度、計測を続ける必要があることが分かった。しかし、通常のリシフェリン・リシフェラーゼ反応での立ち上がりは 1~2 秒程度であり、このような遅い立ち上がりは通常は見られない。

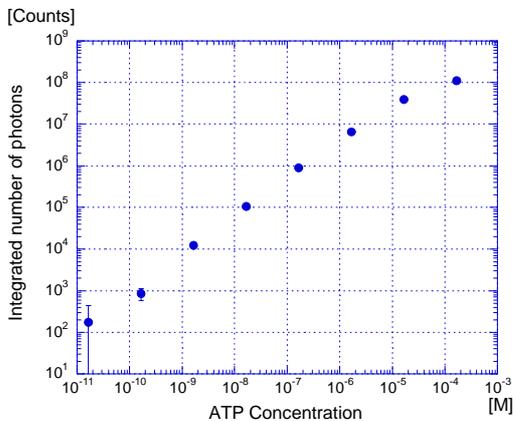


図 4 : 濃度依存性

同じような測定を ATP の濃度別に行って、光子数と ATP 濃度との関係をプロットしたのが、図 4 である。この図の縦軸は、測定開始時間から 300[sec]までの発光光子数の積算値を示している。この図から ATP の検出感度は 1.65×10^{-10} [M]であることが分かる。このときの試料溶液の体積は 100[μ l]であったが、10[μ l]でも 10^{-10} [M]の濃度の検出を確認できた。このことは、現時点では 10^{-15} [mol]の感度まで達していることを意味する。

光子計測率の最大値の濃度依存性を見るために、光子計測数が最大となる時刻での 60 秒間の平均光子計測率を濃度別に求め、プロットした。図 5 の丸印で示す。図 5 の四角で示すプロットは、化学反応速度だけを考慮し、ミカエリス・メンテンの式を用いて求めた光子計測率の予想値である。ミカエリス定数を 2×10^{-6} [M]、リシフェラーゼ一個あたりの反応速度を 0.125 [sec $^{-1}$] (B. R. Branchini, et. al. “The Role of Lysine 529, a Conserved Residue of the Acyl-Adenylate-Forming Enzyme Superfamily, in Firefly luciferase”, Biochem, Vol39, No. 18, 5433-5440 (2000) 文献 (1))、固定したリシフェラーゼの面密度 9.03×10^{10} [mm $^{-2}$] (K. Taniguchi, et. al. The Si-tag for immobilizing proteins on a silica surface, Biotechnol. Bioeng, Vol. 96, No. 6, pp. 1023-1029 (2007) 文献 (2))とした。実験値と比較してみると、二桁程度の隔りがある。

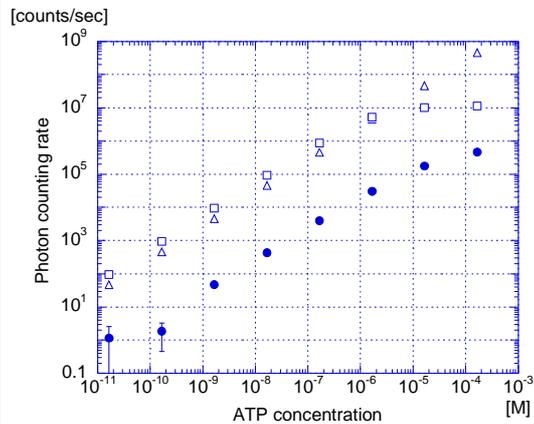


図 5 : 光子計測率の濃度依存性

光子計測率が ATP の拡散速度に達している可能性を見るために、化学反応速度が極端に速いと仮定し、簡単な 1 次元の拡散モデルだけを用いて反応イベント数を計算した。結果を三角で示す。この計算では、ATP の拡散係数を $D=0.5 \times 10^{-5}$ [cm 2 /sec]、濃度勾配は一定で拡散層を 0.1[mm]とした。実験データと比較すると、ATP の拡散による反応レートの上限値が二桁程度高いことが見て取れる。また ATP の拡散の影響をもう少し正確に見るため

に、酵素反応における拡散・反応微分方程式を数値的に解いて、時間依存性と濃度依存性を計算した。濃度 1.65×10^{-7} [M] のときの拡散がある場合とない場合の時間依存性の計算結果を図6に示す。ただしこれらの計算では、阻害因子の効果は入っていない。

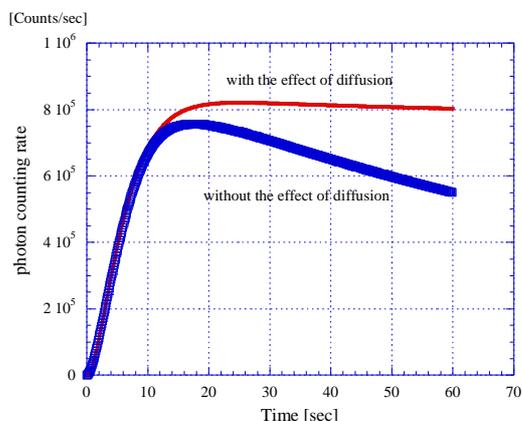


図6：時間依存性（計算値）

図6の結果は、実験結果を再現していないことを示すと同時に、この立ち上がり時間では拡散の影響を受けていないことを示す。この時間依存性のピークでの計算値を濃度別にプロットしたのが図7である。この図では参考のために実験値も載せてある。この結果は、図5の結果のダブルチェックとなっており、実験値が計算値の二桁低い結果を再現している。これらの結果より、現在の光子計測数が予想値より二桁程度低いこと、さらに光子計測数がATPの拡散速度に達している可能性も少ないことがわかった。

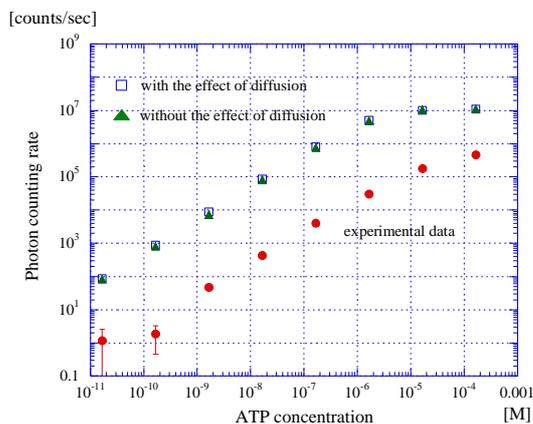


図7：濃度依存性（計算値）

d) 感度向上の可能性の検討

このとき使用した冷却型APDは、最も低い暗電流雑音のタイプと比較して、5倍程度大きいものである。暗電流カウントの最も低いAPDを用いれば、ATPの濃度 1.65×10^{-11} [M] を超えることができる。 10^{-16} [mol] の感度に対応する。

一方、実験結果と予想値との二桁の違いから、さらに二桁程度感度が向上する可能性があることが分かる。この予想値との違いの原因として考えられるのは、次の三点である。

- ・ ルシフェラーゼ一個あたりの化学反応速度そのものの低下。
- ・ 活性を保った固定ルシフェラーゼの個数が予想より少ない。
- ・ 生成物が阻害因子として働いている。

XPS(X-ray Photoemission Spectroscopy)の原子分析によって、固定ルシフェラーゼの実際の個数を見積もった。シリコン原子の個数を較正に用いたため、ルシフェラーゼの密度が少ないクリーニング切断をしたものを測定した。

光ファイバーの直径 0.6 [mm]、クリーニングによる切断でのルシフェラーゼの個数は、

$$n = 6.67 \times 10^9 \text{ 個}$$

となった。一方、黒田らの値（文献（2））を用いると、

$$n = 2.55 \times 10^{10} \text{ 個}$$

となった。実際はカッターで切断したファイバーを使っているため、この値の10倍程度であると推定できる。したがって実際の数が予想と一桁以上ずれている可能性は低い。

もし固定化したルシフェラーゼの個数が予想とほぼ同じとすると、ルシフェラーゼの反応速度そのものの低下と阻害因子の影響の可能性が高い。反応速度が遅くなれば、光子計測数の立ち上がりが遅くなる理由も説明がつく。しかしながら、全く同じSBP-ルシフェラーゼを固定化しないまま時間依存性を測定すると、ピークに達するまでの立ち上がる様子が観測できなかった。つまり固定化しないSBP-ルシフェラーゼは、通常のルシフェラーゼと同程度の反応速度を有していると思われる。今後の課題として、遅い立ち上がりの原因と反応速度との関連の追究、阻害因子の影響が挙げられる。

3) について

新たにSBP-ルシフェラーゼを作成して、サンプルの違いを見るとともに、固定したルシフェラーゼの密度の評価と立ち上がり速度の密度依存性を測定した。

a) 新しいSBP-ルシフェラーゼの作成

黒田らの助言の下、新しいSBP-ルシフェラーゼを作成することができた。

b) 立ち上がり速度の固定化したルシフェラーゼの密度依存性の測定

新しく作成した SBP-ルシフェラーゼを用いて、光ファイバー断面に固定する密度を変えて、時間依存性の測定を行った。そのためには、密度を変える方法の確立と、そのときのルシフェラーゼの数の見積もりを行う必要がある。そこで、

- 光ファイバー断面を浸すSBP-ルシフェラーゼ溶液のSBP-ルシフェラーゼの濃度を変えた溶液、 4.25×10^{-6} [M]、 4.25×10^{-7} [M]、 4.25×10^{-8} [M]の三種類用意して、ルシフェラーゼの密度を変えたファイバーを3つ用意した。
- 個数を変えたファイバー断面をXPSで原子分析することで、実際の個数を測定した。

ファイバーは直径 1.5[mm]、NA=0.37 を用いて、浸す時間を 15 分とした。それぞれのルシフェラーゼの密度は、表のとおりとなった。

	(1)	(2)	(3)
ルシフェラーゼ溶液の濃度 [M]	4.25×10^{-6}	4.25×10^{-7}	4.25×10^{-8}
XPS から求めた個数	3.13×10^9	1.68×10^9	2.31×10^9
観測した円領域の直径 [mm]	$0.4 \times \sqrt{2}$	$0.4 \times \sqrt{2}$	$0.8 \times \sqrt{2}$
面密度 [mm^{-2}]	1.25×10^{10}	0.668×10^{10}	0.230×10^{10}

それぞれの場合について、ATP 検出の時間依存性を測定した。ATP 濃度は、 10^{-4} [M]で、光検出器は冷却型光電子増倍管を用いた。

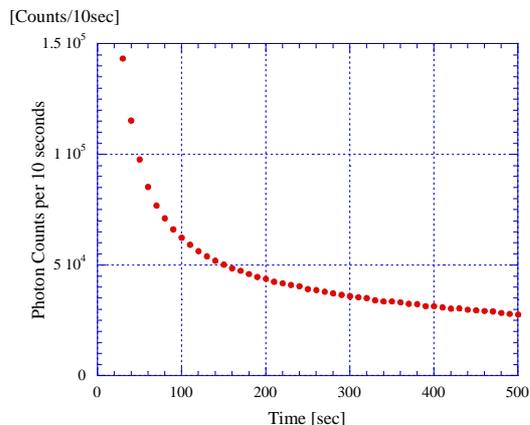


図 8：密度 (1) の場合の時間依存性

(1)の密度の場合のみ図 8 に示す。この結果から、これまで見られていた遅い立ち上がり

りを見ることが出来なかった。測定は光ファイバー断面を試料溶液に浸した時刻をゼロとして、20 秒または 25 秒後から測定を開始したが、一向に下がるだけで、しかも減衰が非常に大きかった。(3)はバックグラウンドに埋もれて測定できなかったが、(2)も同様の傾向が見られた。この結果から立ち上がり速度は、少なくとも $1/25[\text{sec}^{-1}]$ 以上であることが言える。

一方、全く同じ SBP-ルシフェラーゼを固定化せずに、ATP 濃度を 10^{-4} [M]として時間依存性を測定したところ、この場合も同じ傾向を示し、遅い立ち上がりを観測できなかった。

サンプルの出来具合の違いも存在する可能性は否定できないが、少なくとも固定化そのものが立ち上がり速度を遅くする原因にはなっていないと考えられる。また図 6 の結果を考慮すると、今回の測定では、反応速度が固定化前に比べて変化していない可能性が高い。固定する個数を確実に大きく変える手法を確立した上で、サンプル酵素をいくつか用意して、立ち上がり速度の密度依存性を測定する必要がある。

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 飯沼昌隆、牛尾恭幸、黒田章夫、角屋豊、光ファイバー先端での生物発光を利用した高感度 ATP 検出、電機学会論文誌 C、査読有、127、2007、1498-1503

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯沼 昌隆 (IINUMA MASATAKA)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教
研究者番号：00294521

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者