

## 内部標準を用いた海洋サンプルの ATP 定量法

○前田京香（横浜市立大学）、三輪哲也・福場辰洋（海洋研究開発機構）

深海をはじめとした海洋環境における微生物のバイオマスの把握に向けて、海水サンプルの ATP 定量法をこれまで検証してきた。ATP 計測には、ルシフェリン-ルシフェラーゼ（Luciferin-Luciferase: L-L）生物発光検査方法（以下、L-L 法）を用いた。サンプルに ATP 溶解液と L-L 発光試薬を加え、ATP 濃度に比例して変化する発光量（Relative Light Unit: RLU）を PMT で計測する方法である。

L-L 法は、海水に含まれる塩分などの反応阻害物質によって発光量が大幅に落ちてしまう。そこで、Caged ATP を内部標準に用いた計測方法（以下、内部標準法）を検証した。Caged ATP は ATP を不活性化した光分解化合物で、近紫外光の照射で瞬時に活性化できる。内部標準法では、内部標準として Caged ATP を L-L 発光試薬に予め混合し、紫外光照射前後の RLU 値を計測する。紫外光照射によって活性化される ATP 濃度と RLU 値の比をもとにして、海洋サンプルの ATP 濃度を求めた。

前回 2014 年に、深海調査研究船「かいれい」および、無人探査機「かいこう 7000 II」（JAMSTEC）において、熱水活動域である沖縄トラフの伊是名海穴での深海水サンプルを用いた計測を行った。計測にはルミカウンター NU-2600（マイクロテックニチオン株式会社）を用いた。この装置には紫外光照射機能がないため、紫外光照射を別装置で行った後、ルミカウンターを用いて RLU 計測を行った。装置間の移動があるため、サンプルごとに 1) 紫外光照射・RLU 計測間のタイムラグの発生、2) 実験室内照明による Caged ATP の活性化が起き、計測条件が不揃いだったと考えられる。

そこで、紫外光照射と RLU 値計測を装置内で完結できるように、試験管ホルダー蓋部分に UV-LED を取り付け装置の改良を行った（図 1）。これにより、計測条件を揃えると同時に計測作業の効率化を図った。改良した計測装置を用いて、2015 年の同船の航海において、標準計測と内部標準法を用いた計測を行った。シリンジ採水器で深度毎に採水した、熱水海域の深海水サンプルを計測した結果を（図 2）に示す。標準計測と比較して、内部標準法では誤差範囲が縮まった。海底から上昇するに連れて、ATP 濃度が低くなっていることもわかった。

環境サンプルでは真値がわからないため、既知濃度の ATP を用いて両方法での計算値濃度の比較も行った（図 3）。内部標準法の方が、より真値に近い値を示したことがわかる。本計測手法を、深海で使用できる現場型 ATP 定量分析装置に導入することで、深海環境の ATP 定量が現場でより正確に行えると期待される。また、阻害の大きなサンプルへの対応も検討している。

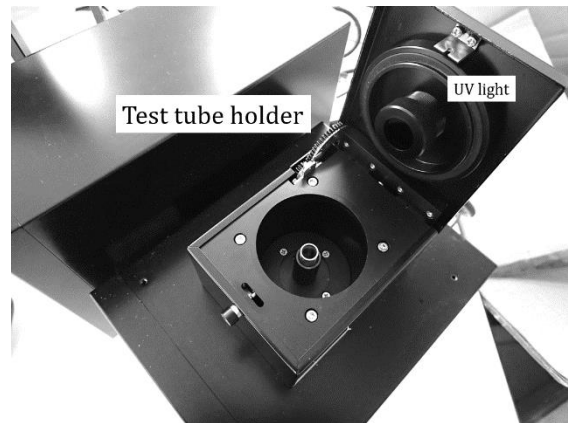
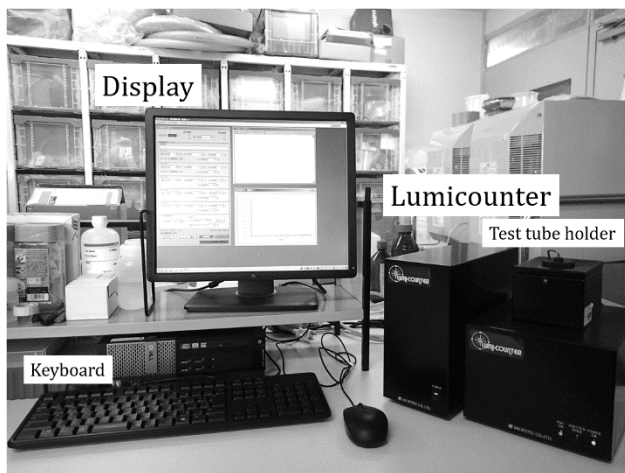


図1 計測装置（改良後）（左：装置外観、右：試験管ホルダー内）

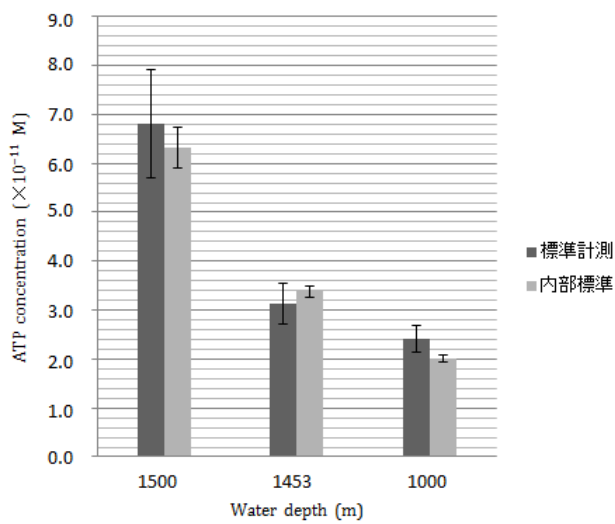


図2 深海水サンプルの計測結果  
（エラーバーは、 $3\sigma$ を示す）

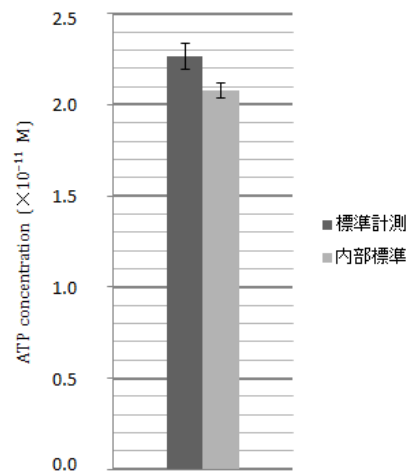


図3 既知濃度サンプル ( $2.0 \times 10^{-11}$  M) に対する  
標準計測と内部標準法による計算値濃度の比較  
（エラーバーは、 $3\sigma$ を示す）