

## 内部標準法を用いた海洋サンプルの ATP 定量法の開発

○前田京香（横浜市立大学大学院），福場辰洋・山本啓之・三輪哲也（海洋研究開発機構）

ATP はすべての微生物細胞内に存在し、その量からバイオマスを推定できることから、生物もしくは生命活動の痕跡を示す指標となる。ATP 計測は医療現場での洗浄度検査や海洋における微生物バイオマスの計測に、広く一般的に用いられている。深海をはじめとした海洋における微生物バイオマスの把握に向けて、我々はこれまで ATP 計測法の改良を行ってきた。

ATP 計測には、ルシフェリン-ルシフェラーゼ（Luciferin-Luciferase: L-L）反応（以下、L-L 反応）を利用する。L-L 反応は酸化反応によって ATP の化学エネルギーを発光へと変換し、その発光量は ATP 量と比例する。本研究では、海洋サンプルに市販の細胞溶解液と L-L 発光試薬（ルシフェール HS プラス：キッコーマンバイオケミファ株式会社）を加え、発光量を高感度微弱発光計測装置（ルミカウンター NU2600：株式会社マイクロテック・ニチオン）で計測することで、サンプル中の細胞内 ATP と細胞外 ATP を区別せずに全 ATP 濃度を算出する方法をとった。

従来の ATP 定量法（以下、従来法）では、まず既知濃度の ATP 溶液を標準液とした計測を行い、発光量と ATP 濃度の関係から検量線を得る。従来法ではこの検量線を用いて、海洋サンプルから得られる発光量を ATP 濃度に変換している。一方、L-L 反応は海水の塩濃度や海水環境中のその他阻害物質によって影響を受ける可能性がある酵素反応である。深海をはじめとした海洋サンプルを対象とした計測ではこの点を考慮して、標準液と条件の異なる現場海水を用いた校正計測を行わなければならない。そこで本研究では、内部標準法を用いた ATP 定量法（以下、内部標準法）を海洋サンプルに対する ATP 定量法として提案し、従来法との比較や現場海水を用いた実験計測を行ってきた。

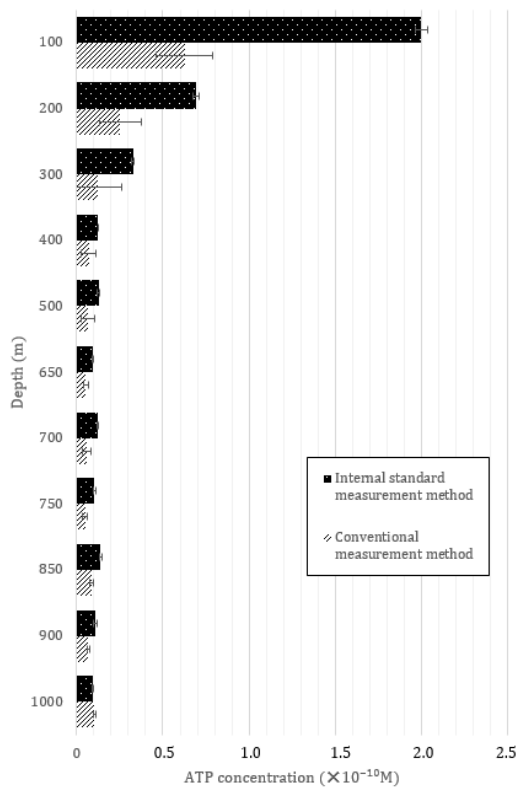
Caged ATP は ATP を不活性化した光分解化合物で、近紫外線の照射によって瞬時に活性化でき、かつ活性化される量は光照射量に比例するため、光照射によって自在に濃度を調整できる内部標準として用いることができる。本研究では、内部標準として最終濃度  $2.0 \times 10^{-7}$  M の Caged ATP（同仁化学研究所）を予め L-L 試薬に混合し、紫外光照射前後の発光量を計測した。紫外光照射によって活性化される ATP 濃度と発光量の比をもとにして、海洋サンプルの ATP 濃度を求めた。

KR16-15 航海では中部沖縄トラフ；伊平屋北・野甫サイトを中心に、深海調査研究船「かいらい」、CTD-RMS および無人探査機「かいこう Mk-IV」（JAMSTEC）を用いて、ニスキン採水とシリンジ採水を行った。様々な環境の海水を採水後ただちに船内にて ATP 計測を行い、従来法と内部標準法の ATP 濃度計算値の比較を行った。また、採水した各海水サンプルの一部を孔径 0.22 $\mu$ m メンブレンフィルタで濾過し、その濾液をサンプルとして計測することで細胞外 ATP の計測も行い、全 ATP 量に占める割合も算出した。

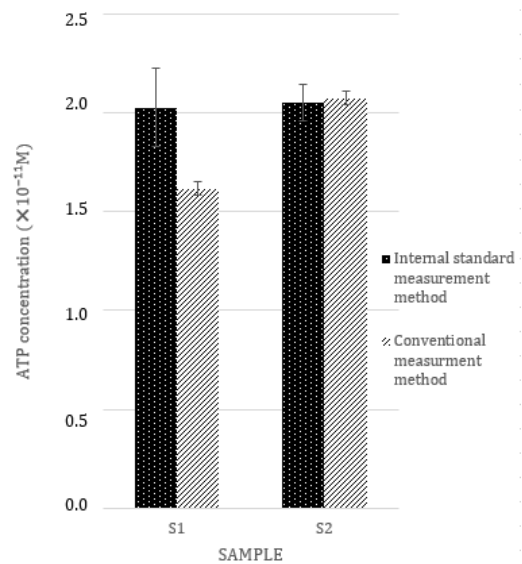
伊平屋北サイトでの CTD 採水による鉛直方向の水深別サンプルの ATP 計測結果を見ると、両定量法を用いた計測結果も表層では高い ATP 濃度を示しているが、水深が深くなるにつれて ATP 濃度は急激に減少している。また従来法と内部標準法を比較すると、一様に内部標準法の方が高い ATP 濃度を示した（図 1）。

特に表層付近のサンプルについて内部標準法を用いた ATP 濃度計算値は、従来法の値と比較すると非常に高い ATP 濃度を示している。内部標準法の特徴として、紫外光照射によって活性化する ATP 濃度が計測対象濃度と比較して極端に低い場合に、ATP 濃度が過大評価されてしまうことがある。今回の計測では、 $n \times 10^{-11} \sim 10^{-12}$  レベルの低濃度 ATP の計測を行う深海環境での計測を想定して試薬調製した。表層と比較して海底付近の計測値に大きな差がみられないことから、計測対象としていないレンジの ATP 濃度の海水を計測したために起きた計測結果と推察される。

また、別日にかいこうを用いて伊平屋北サイトで採水した深海底海水サンプルの計測結果を（図 2）に示す。目視できるほどの熱水活動の盛んな深海底（S1）と、熱水生物は存在するが比較的穏やかな環境の深海底（S2）で得た深海サンプルでは、採水環境ごとにそれぞれ異なる計測結果を得た。環境によっては何らかの L-L 反応阻害物質が存在し、従来法の計測では ATP 濃度計測が正確にできていない可能性が示唆された。



(図 1) 伊平屋北水深別 ATP 計測結果



(図 2) 伊平屋北（かいこう #712）全 ATP 計測結果