

## 深海水における Caged ATP を用いた ATP 定量法の改良

○佐野優貴（横浜市立大学）、福場辰洋・三輪哲也（海洋研究開発機構）

微生物バイオマスの測定に用いられる ATP 計測は迅速で操作が簡便であるなどの理由から、ルシフェリン-ルシフェラーゼ反応(L-L 反応)を用いており、食品工場や医療現場の衛生管理の指標として利用されている。L-L 反応は ATP のエネルギーを光へと変換する生物発光であり、発光強度は ATP 濃度と相関が高い。深海のバイオマス測定は海洋生態系の把握に重要であり、海底調査などによる環境影響の評価や熱水噴出孔探索時の指標にもなり得ると考えられてきた。

我々が使用している ATP 定量法は、これまで外部標準法と内部標準法の 2 つの手法があった。外部標準法は、既知濃度の ATP 標準液を測定し、発光量と ATP 濃度の関係から検量線を作成することで、検量線からサンプルの発光量を ATP 濃度に変換してきた。だが、L-L 反応は酵素反応であるため、サンプルの塩分や pH などの要因により、発光強度の変動が確認されてきた。一方で内部標準法は、熱水噴出孔付近などの阻害要因を含むと予想される海水に対し、正確に測定を行うために提案された手法であった。紫外線を照射することで活性化する Caged ATP を内部標準として用いて、活性化した Caged ATP の発光強度と ATP 濃度の比から、サンプルの ATP 濃度の算出を行ってきた。

今までの実験から内部標準法は外部標準法よりも、要因に影響を受けずに値を計測できることが確認されたが(前田ら、2017)、外部標準法の測定時間は 10 秒であったのに対し、内部標準法は 31 秒(計測 10 秒・紫外線照射 1 秒・計測 20 秒)かかった。これは Caged ATP を活性化させるための紫外線が微弱光計測装置(マクロテックニチオン株式会社: NU-2600)内部とポリスチレン製試験管(greiner bio-one: 112101)を発光させ、その発光(阻害光)が UV 停止後にも継続することにより、紫外線照射から数秒間、発光強度が上昇すると考えられる。阻害光の継続を Fig. 1 に示す。そのため、照射から数秒間の値は濃度計算に使用することができず、測定時間が外部標準法よりも長くなっていた。L-L 反応による発光は時間と共に減少していくので、計測時間の短縮は正確な測定を実現するために必要であった。本研究では、阻害光による発光強度上昇による誤差の増大の問題を解決するために、UV 照射中の PMT 保護用シャッターと PMT の間に光学フィルタを設置し、改良することで解決を試みた(Fig. 2)。

阻害光が微弱で波長の特長が困難であった。そこで複数の光学フィルタを組み合わせるなどして評価した結果、約 380~610nm に阻害光を確認した。これまでに最も阻害光を遮断した 550nm 以下をカットする光学フィルタ(朝日分光株式会社: LVX550)を用いて、試験管のみを測定した結果を Fig. 3 に示す。改良した装置を用いて、既知濃度の ATP 試料(通常試料)、同じ ATP 濃度で塩濃度を 4 倍にした試料(高塩濃度試料)をそれぞれ外部標準法と内部標準法(装置改良前・改良後)の 3 つの手法で測定し、実用性を検証した。結果を Fig. 4 に示す。

計測結果より、通常試料において、内部標準法と外部標準法は、ほぼ同レベルの ATP 濃度が算出された。高塩濃度試料を外部標準法で測定した場合、ATP 濃度が内部標準法と比べて低くなった。これは塩分が L-L 反応を阻害していると考えられる。内部標準法では、Caged ATP を内部標準とすることで、塩分による影響を抑えて測定することができる。これにより、高塩濃度を含むサンプルにおいては、内部標準法の方が有利な手法であると示唆された。また、内部標準法は外部標準法と誤差を比較する

と、値が高くなった。阻害光による発光強度の上昇が、紫外線照射後の測定結果に影響を与えていると考えられる。しかし、改良後は改良前より測定誤差が小さくなっており、光学フィルタの挿入による対策が効果的であると分かった。今後は、阻害光をさらに削減することで、測定誤差を減少させ、測定精度の向上が期待できる。

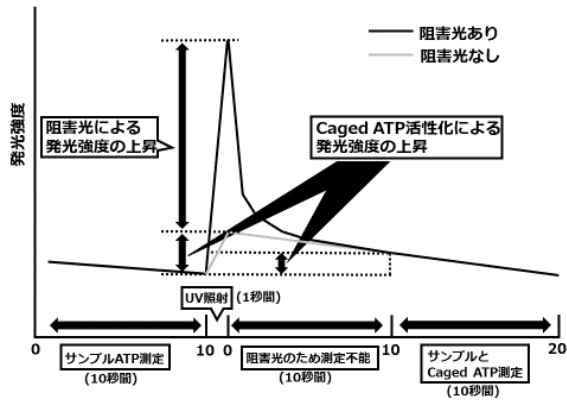


Fig. 1 内部標準法における阻害光の影響

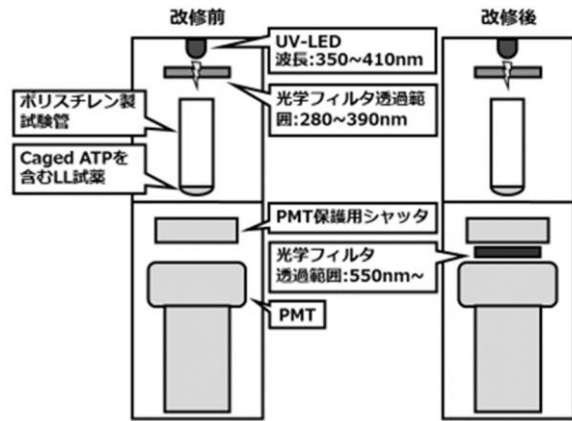


Fig. 2 微弱光計測装置(左:改良前、右:改良後)

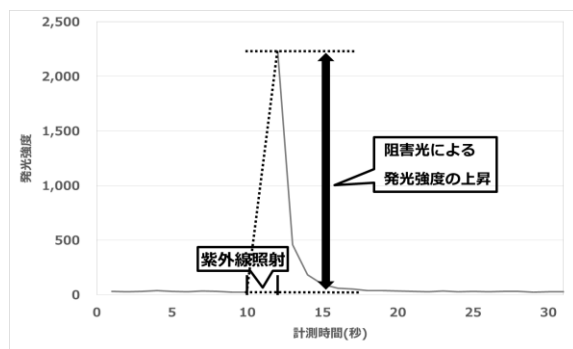


Fig. 3 光学フィルタ使用時のバックグラウンド光計測の測定結果

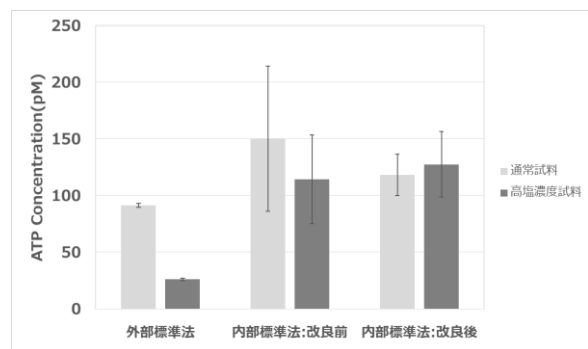


Fig. 4 外部標準法・内部標準法(改良前・改良後)による測定結果

## 引用文献

前田 京香、福場 辰洋、山本 啓之、三輪 哲也「内部標準を用いた海洋サンプルのATP定量法の開発」ブルーアース '17 (東京, 2017. 3. 3)、要旨集 p. 166-167, BE17-P72, 2017