

<令和元年度助成>

## 酵素および装置フリーな 16S rRNA 検出法に基づく 「その場」食品細菌検査法の開発

大石 基

(筑波大学 数理物質系 物質工学域)

### 背景と目的

食中毒の発生は、細菌に汚染された食品類を喫食することが主な原因である。近年、食品類がどれだけ細菌に汚染されているかを検査し、安全性を確認する食品細菌検査の重要性が高まっている。しかし、現行の食品細菌検査では細菌培養法を用いているため、培養に時間（1～3日）が必要となり、検査結果の報告まで2～7日かかってしまう。したがって、この検査の間にも食中毒および食品汚染が広がるリスクが存在する。一方、酵素を用いたPCR (Polymerase Chain Reaction) 法を利用した16S リボソーム RNA (16S rRNA) の系統解析による食品細菌検査も行われている。この16S rRNAとは細菌のリボソームを構成するRNAの1つであり、すべての細菌が保有している。また、その塩基配列の一部は細菌ごとに異なっていることが知られている。したがって、PCR法により16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) を増幅・検出することにより、細菌を培養することなく比較的短い時間（6～8時間）で細菌を検出することができる。しかしながら、食品類にはPCRで用いる酵素（ポリメラーゼ）に対する阻害物質が含まれているため、PCR法では手間および時間のかかる前処理（16S rDNAの単離）が必要となる。また、16S rDNAは細菌1つあたり数コピーしか存在しないことから、PCR法では細菌数の少ない食品類（1gあたり $10^5$ 個以下の細菌）からの検出が困難であるため、たとえ細菌に汚染された食品類であっても陰性となる場合がある。さらに、PCR法では増幅・検出には特別な装置も必要となる。したがって、既存のPCR法は特別な装置が必要であり、検出感度

も十分ではなく（疑陰性を生じる）、時間（6～8時間：汚染の拡大）・手間（16S rDNAの単離）がかかるため、食品加工などの現場において実施するのは困難である。一方、食品加工現場において細菌を「その場」かつ「迅速」に高感度で検出できれば、細菌による食品汚染を未然に防げると同時に出荷の延滞（PCR法による検査時間待ち）による生産性低下も防げることからも、食品加工現場において細菌を簡便かつ迅速に検出できる食品細菌検査法の確立が求められている。

本研究ではヘアピン型DNAとポリエチレングリコール (PEG) を共固定化させたDNA/PEG化金ナノ粒子を調製し、ナノ粒子界面での足場介在型DNA鎖交換反応（酵素不要かつ室温での反応）を素反応としたDNAサーキットによりシグナルを増幅させることで、酵素および装置を一切用いず、かつ食品類の前処理（16S rRNA 遺伝子の単離）することなく標的16S rRNAを「その場」で検出することを目的としている。

### 結果と考察

本研究でのDNAサーキットにおいて鍵となるのは、足場介在型DNA鎖交換反応である（図1）。この足場介在型DNA鎖交換反応とは、二本鎖を形成しているDNA (A/B) から突き出ているDNA (A) の一本鎖の部分を足場として別の一本鎖DNA (C) が足場と塩基対を形成しDNA鎖 (B) と (C) が置き換わり新しい二本鎖DNA (A/C) を形成する反応である。この反応においてDNA (B) よりもDNA (C) の方が長い（塩基数が多い）ため、二本鎖DNAの

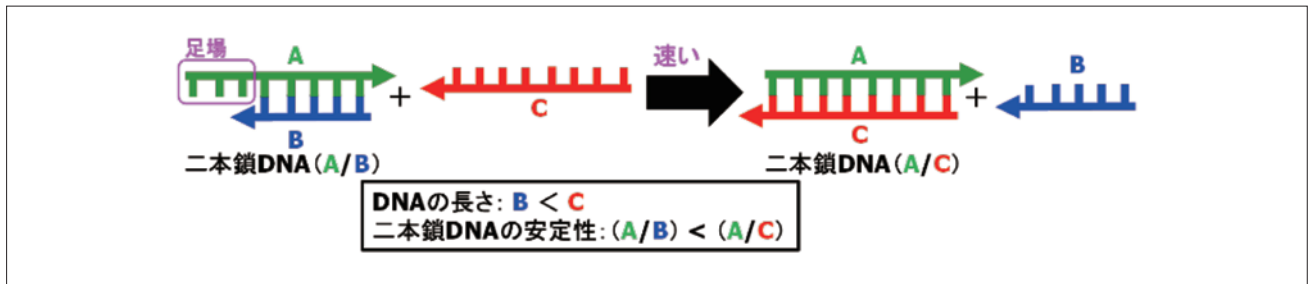


図1 足場介在型 DNA 鎖交換反応の概略

安定性は DNA (A/B) よりも DNA (A/C) の方が高いため反応が一方方向に進行する。また、この反応は、様々な生体物質が共存する環境下においても室温かつ酵素フリーで進行することが明らかになっている。

本研究における DNA サーキットの原理を図2に示す。具体的には、金ナノ粒子（平均粒径：40 nm）表面に末端に正電荷アミノ基（ $-NH_3^+$ ： $\oplus$ ）を有する PEG と末端に蛍光色素（ $\text{F}$ ：FAM）を有するヘアピン型 DNA（H1）を共固定した H1-DNA/PEG 化

金ナノ粒子を調製する。この際、H1-DNA はヘアピン構造を形成しているため、蛍光色素である FAM は金ナノ粒子近傍に存在する。この近接している状態では、FAM から金ナノ粒子への蛍光共鳴エネルギー移動（FRET：Förster Resonance Energy Transfer）が起こるため、FMA が発光することはできない。また、この H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の溶液に別のヘアピン型 DNA（H2：燃料）を加える。一方、混合した際にヘアピン構造を有する H1 と H2 の間で足場介在型 DNA 鎖交換反応を起こすことはない。次

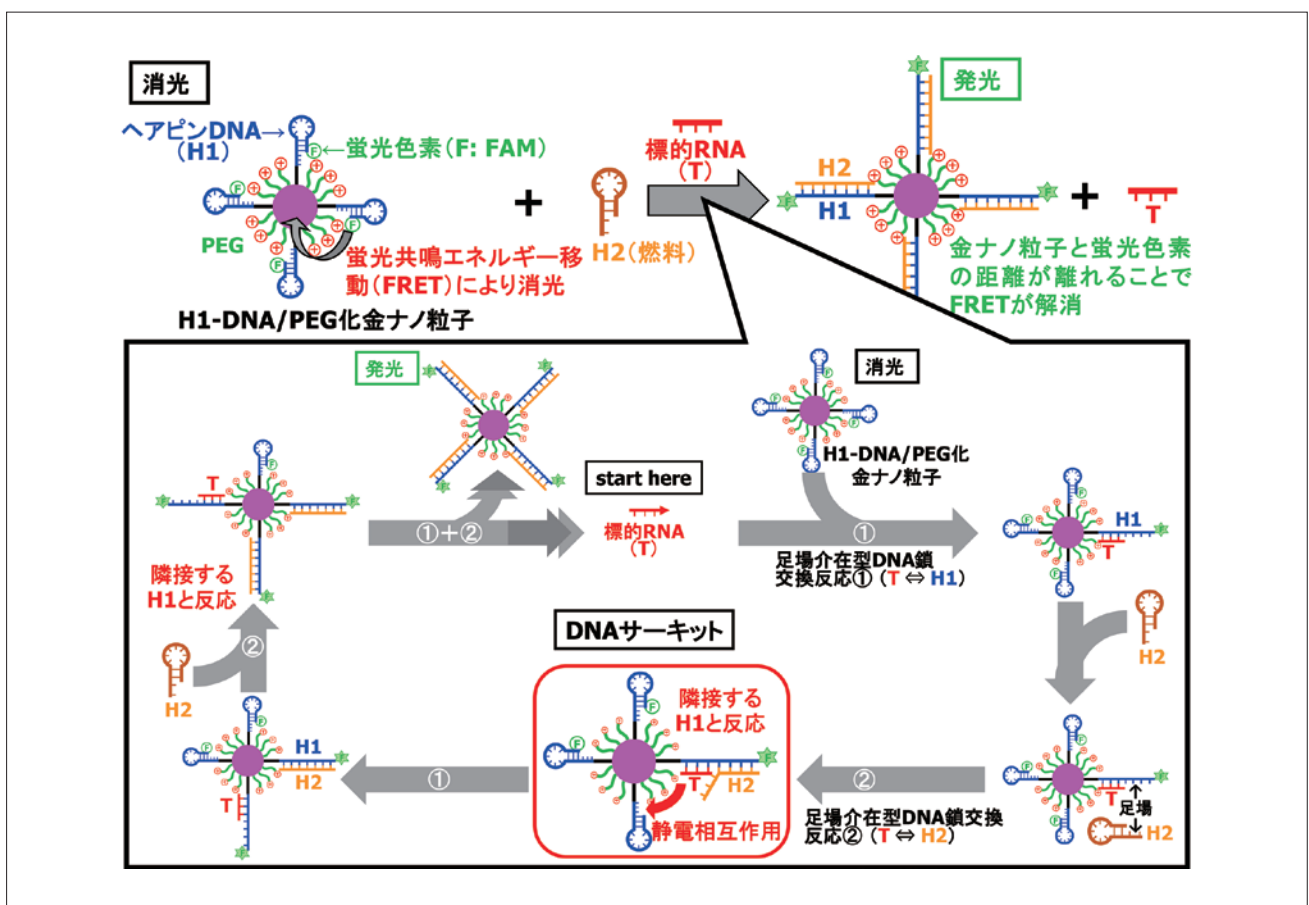


図2 金ナノ粒子界面における DNA サーキットによる標的 RNA の「その場」検出の原理

いで、標的 RNA (T) を含む検体を加えると、粒子表面の H1 の足場を介して T との足場介在型 DNA 鎖交換反応①が起こり、ヘアピン構造が直鎖構造に変化（開環）する。さらに、粒子表面の H1/T は、足場を介して H2 と足場介在型 DNA 鎖交換反応②を起こし、同時に T がリリースされる。このリリースされた T は、PEG 末端の正電荷 (⊕) と T (核酸) 自身の負電荷 (⊖) との静電相互作用により同じ粒子表面に隣接する H1 と足場介在型 DNA 鎖交換反応①を起こす。すなわち、再生した T は、同一粒子上で足場介在型 DNA 鎖交換反応①および②の触媒として働くことになる。最終的には、金ナノ粒子と蛍光色素である FAM との距離が離れることで FRET が解消され FMA が発光できるようになる。したがって、理論上 1 分子の標的 RNA (T) が存在しさえすれば、検体を前処理することなく、かつ装置および酵素を一切用いず迅速に発光させることが可能となり、「食品加工現場」において細菌を簡便かつ迅速に検出できることになる。

H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の調製は、市販の金ナノ粒子（平均粒径：40 nm）表面に末端にチオール (SH) 基を有する PEG（分子量：5000）と末端にチオール (SH) 基と蛍光色素 (Ⓣ：FAM) およびスペーサ部分に T20（チミンの 20 量体）を有するヘア

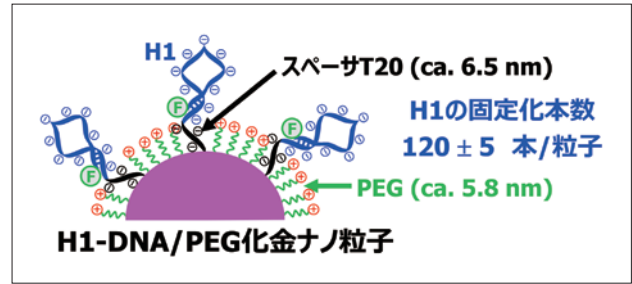


図3 H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の構造

ピン型 DNA (H1) を共固定することで行った (図3)。また、1 粒子あたりの H1 の本数は、 $120 \pm 5$  本/粒子であった。さらに、市販の金ナノ粒子、T20 化金ナノ粒子 (T20 のみを固定化) および PEG 化金ナノ粒子 (PEG のみを固定化) の粒径から、金ナノ粒子界面における T20 (スペーサ部分) および PEG の鎖長を計算した。その結果、鎖長は T20 (6.5 nm) > PEG (5.8 nm) の順となり、これらの値はこれまでの報告と近い値であった。すなわち、H1 の足場部分の DNA は PEG 層からは突き出た構造となっており (PEG 層に埋もれていない)、足場介在型 DNA 鎖交換反応がスムーズに進行することが期待される。

様々な標的 RNA 濃度 (0 M ~ 10 nM) における H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子および H2 を用いた DNA サーキットの時間に対する規格化した蛍光強度 (F) の変化を図 4a に示す。標的 RNA の非存在下 (0 M)

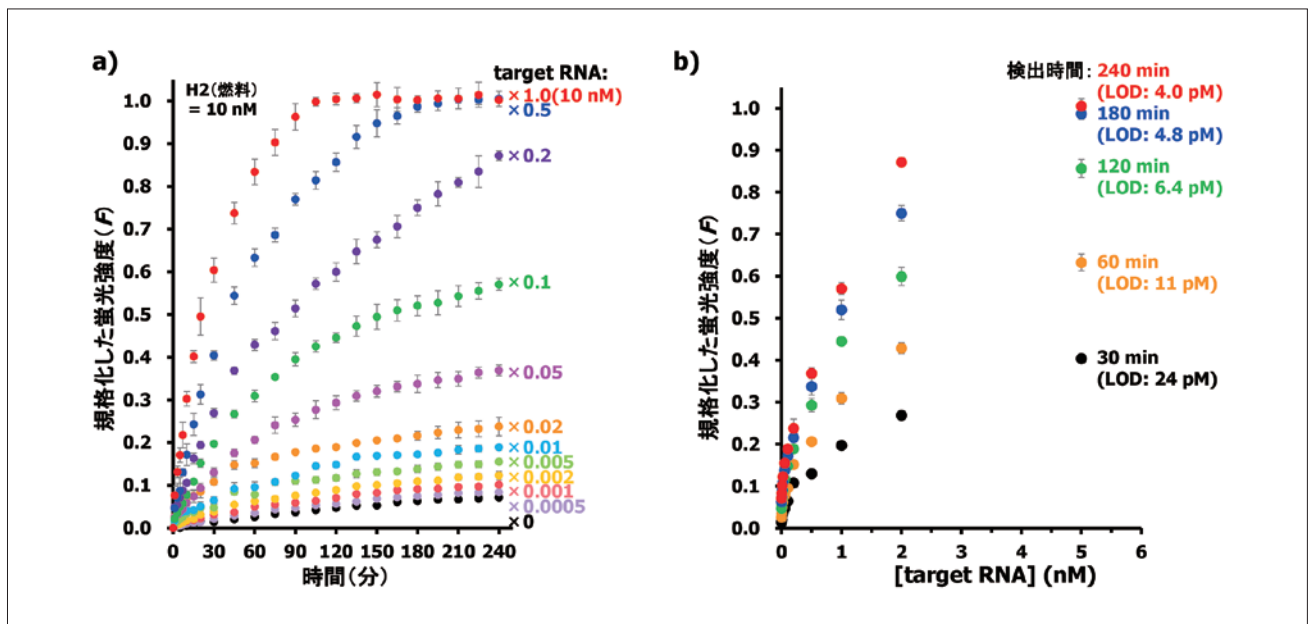


図4 a) 様々な標的 RNA 濃度における H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子および H2 を用いた DNA サーキットの時間に対する規格化した蛍光強度 (F) の変化。b) 様々な標的 RNA 濃度における各検出時間と規格化した蛍光強度 (F) の関係。

においては、蛍光強度の変化はほとんど認められなかった。一方、標的 RNA の存在下においては、標的 RNA 濃度および時間に依存して蛍光強度が増加していることが確認された。これらのことから、標的 RNA を触媒とした DNA サーキット（蛍光シグナルの増幅）が金ナノ粒子界面においても成立していることが明らかとなった。また、様々な標的 RNA 濃度における、各検出時間（30, 60, 120, 180, 240 分）と蛍光強度（normalized  $F$ ）の関係を図 4b に示す。全ての検出時間において、標的 RNA 濃度の蛍光強度の関係は良い直線性が認められた。これら標的 RNA 濃度と蛍光強度の直線性は、標的 RNA 濃度に対して pM レベル～ nM レベルの範囲で確認できることから、3 桁ほどの広い定量範囲を有していることが明らかとなった。さらに、検出限界濃度（LOD：Limit of Detection）は、検出時間が長くなるにつれて低くなることが確認された。すなわち、検出時間 30 分において LOD = 24 pM（pM： $10^{-12}$  M）および検出時間 240 分において LOD = 4.0 pM をそれぞれ達成することができた。

## 結 論

本研究では足場介在型 DNA 鎖交換反応（酵素不要の反応）を素反応とした蛍光シグナル増幅機能を有する DNA サーキットを金ナノ粒子界面において構築することに成功した。この DNA サーキットシステムは、蛍光シグナルを容易に増幅可能であるため、高感度（LOD = 4.0 pM）で標的 RNA を検出することが可能であった。また、この DNA サーキットは、室温かつ酵素および特別な装置を一切使用しないため、食品類を前処理（16S rRNA の単離）することなく、標的細菌由来の 16S rRNA の「その場」検出が可能と思われる。今後、実際に食品サンプルおよび菌体を用いて標的細菌由来の 16S rRNA の検出を行っていく予定である。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご援助を賜りました公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

## **Development of an “in situ” Food Bacteria Testing Method Based on an Enzyme- and Instrument-free Detection System for 16S rRNA**

**Motoi OISHI**

*Division of Materials Science, Faculty of Pure and Applied Sciences,  
University of Tsukuba*

In this study, I designed and prepared an “in situ” bacteria testing method based on an enzyme- and instrument-free detection system for 16S rRNA, which relies on the creation of a simple diffusion limited nano-interface on gold nanoparticles (DNA/PEG-GNP) co-modified with fluorescence-labeled hairpin DNA and poly (ethylene glycol) (PEG) containing a positively charged amino group at one end. The proposed testing method is driven by an enzyme-free DNA circuit mechanism through cascading toehold mediated DNA displacement reactions, using fuel hairpin DNAs in response to a target RNA. The proposed testing method was able to detect the target RNA with high sensitivity (limit of detection = 4.0 pM) because the fluorescent signals could be easily amplified. In addition, since the proposed testing method is performed at room temperature and without any enzymes or special equipment, it appears to be possible to detect 16S rRNA from target bacteria “in situ” without pretreatment of food products.