



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	核酸を用いた環境水中のヒ素およびレジオネラ属細菌の検出に関する研究
Author(s)	松永, 光司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15191号
Issue Date	2022-09-26
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15191">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15191</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/87260">https://hdl.handle.net/2115/87260</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Koji_Matsunaga.pdf



核酸を用いた環境水中のヒ素およびレジオネラ属菌の検出  
に関する研究

**Study in detection of arsenic and *Legionella* spp. in the  
environmental water using nucleic acids**

2022年9月

北海道大学 大学院工学院 環境創生工学専攻

松永 光司

## 目次

<b>第1章 序論</b> .....	1
1.1 水質汚染の現状.....	1
1.2 現行の分析法.....	1
1.3 核酸を用いた簡易水質分析法.....	6
1.3.1 DNA アプタマーベースのバイオセンサーの検出原理.....	7
1.3.2 これまでに開発された DNA アプタマーベースのバイオセンサー.....	8
1.3.2.1 金属.....	8
1.3.2.2 微生物.....	10
1.4 本研究の目的.....	11
1.5 本論文の構成.....	12
参考文献.....	14
<b>第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発</b> .....	19
2.1 背景.....	19
2.2 実験方法.....	22
2.2.1 本研究で使用した試薬.....	22
2.2.2 Ars-3 を用いた As(III)の定量.....	22
2.2.3 本実験で使用した測定装置.....	24
2.3 結果と考察.....	25
2.3.1 AuNPs の粒径分布と吸収スペクトルの解析による検出メカニズムの解明.....	25
2.3.2 NaCl 最終濃度が与える影響.....	29
2.3.3 NaCl 添加後の反応時間.....	31
2.3.4 緩衝溶液の pH が与える影響.....	32
2.3.5 本手法の検量線.....	33
2.3.6 本手法の選択性.....	35
2.3.7 地下水中の As(III)測定.....	36
2.3.8 As(III)・As(V)混合サンプル中における As(III)濃度測定.....	40
2.4 結論.....	43
参考文献.....	44

<b>第 3 章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発</b> .....	47
3.1 背景.....	47
3.2 実験方法.....	49
3.2.1 本研究で使用した試薬.....	49
3.2.2 CeO <sub>2</sub> NPs と FAM 修飾 ssDNA を用いた As(V)の定量試験.....	49
3.2.3 実験装置とソフトウェア.....	51
3.3 結果と考察.....	52
3.3.1 蛍光強度に及ぼす CeO <sub>2</sub> NP と FAM 修飾 DNA の濃度の影響.....	52
3.3.2 FAM 修飾 ssDNA の塩基長が蛍光強度に及ぼす影響.....	56
3.3.3 試料添加後のインキュベーション時間が蛍光強度に及ぼす影響.....	57
3.3.4 本手法の検量線.....	58
3.3.5 本手法の選択性.....	59
3.3.6 地下水サンプルの分析.....	63
3.3.7 As(III), As(V)混合サンプル中における As(V)濃度測定.....	67
3.4 結論.....	70
参考文献.....	71
<b>第 4 章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索</b> .....	74
4.1 背景.....	74
4.2 実験方法.....	77
4.2.1 本研究で実施した PectI 選抜法, 及びアプタマー配列の決定法.....	77
4.2.2 遠心分離導入型 PectI 選抜法の検討.....	80
4.2.3 本研究で用いた試薬.....	81
4.2.4 PectI 選抜法による Lp(SG1)結合型 DNA アプタマー選抜の流れ.....	82
4.2.5 NGS データから DNA アプタマー配列の抽出.....	83
4.2.6 Lp(SG1)結合型 DNA アプタマー候補配列の評価.....	84
4.2.7 実験装置.....	85
4.3 結果と考察.....	86
4.3.1 PectI 選抜法による Lp(SG1)結合型アプタマーの選抜.....	86
4.3.2 CL 解析と DL 解析による DNA アプタマー候補配列の決定.....	89
4.3.3 DNA アプタマー候補配列の結合試験と配列の同定.....	92

4.4 結論 .....	96
参考文献 .....	97
<b>第5章 総括 .....</b>	<b>99</b>
5.1 本研究で得られた知見 .....	99
5.2 今後の展望 .....	100
謝辞 .....	101

### 第1章 序論

#### 1.1 水質汚染の現状

持続可能な開発目標(SDGs)の第6のゴールが「安全な水とトイレを世界中に」であるように、水質汚染の問題を解決することは依然として世界全体の課題である。WHOの飲料水水質ガイドラインでは汚染原因物質は大きく化学物質、微生物、放射性核種の3つに区分されている。さらに化学物質は有機物、無機物、金属、その他のイオン、農薬の5つに、微生物は病原性細菌、病原ウイルス、原虫、病原性蠕虫、有毒シアノバクテリア、指標生物6つの中区分に分類され、これらの分類の中で各化学物質、微生物の特徴やこれによって引き起こされる問題が論じられている[1]。

この中で金属は過剰に、もしくは低濃度でも長期的に摂取した場合は急性毒性、あるいは慢性毒性を示す[2]。特に重金属は人や水生生物に対して深刻な被害を引き起こす。重金属の発生源は自然由来のものと人為由来のもの2種類に分けられる。自然由来の場合は、鉱床地帯や地層中から溶出した重金属が地下水や河川に混入することがある。

また病原性微生物は水系感染症を引き起こす[1]。病原性細菌の暴露経路としては水道水、飲料水、灌漑用水、畜産業、漁業、レクリエーション活動、冷却水などの循環水の利用がある[1, 3, 4]。病原性微生物の発生源は主に温血動物の腸内である。よって、野生動物、家畜、ペットの糞便、生活排水、下水処理水、合流式下水道のオーバーフロー、浄化槽処理水などが主要な発生源となり得る[5, 6]。

#### 1.2 現行の分析法

水質分析には公定法と簡易分析法がある。公定法とは、成分の定性分析および定量分析を行う際、国際機関、国家もしくはそれに準ずる公定試験機関、研究所において指定された方法をいう。分析化学、微生物培養においてある物質の定性、若しくは定量分析を行おうとする場合、その方法は何通りも存在するが多い。しかしながら、全ての方法が同一の結果を導き出すとは限らないため、結果の同一性を期するため、上述の機関が当該物質の分析法を法律等で指定する場合がある。これら指定された方法が公定法である。その精度の確保確認のため分析技術や手順は様々な機関で厳密に繰り返し吟味された後に決定される。

一方、公定法の多くは、高い精度が求められるゆえに必然的に分析機器は高額となる。前処理も含めて分析技術については専門的な知識が必要で、これらの分析機器の日常的な保守管理を含めると分析作業に要する業務の負担は大きい。しかしながら実際には水道水、下水処理水、工場排水の水質に関する情報をおおよそ把握したいというニーズがある。各事業所でいつでも水質

## 第1章 序論

測定を行うことができ、結果を迅速に把握することが優先される場合には、誰もが簡単に現場で水質を分析できることが必要となる。簡易分析法は、公定法で求められる煩雑な操作を省略することにより安価で、誰でも簡単に短時間に測定できるのが特徴である。よって多検体の分析が可能になり、事業所の日常管理や時間毎の管理などの負担軽減につながる。工程の想定外の事態や排水処理装置の故障やトラブルなどが生じれば、規制値を超えてしまう可能性がある。月や週に1度の公定法による排水の測定に加え、簡易分析法による日常的な排水管理を実施すれば、迅速に得られる概略値により日常的に水質をチェックすることで、異常の早期発見や、対処が可能となる。水質汚濁防止法や下水道法により罰則規定のある水質項目については、事業者にとって行政などの取締り側と常時同じ分析方法を行っていけば問題は発生していないと判断できる。簡易分析は法律の遵守だけに留まらず、周辺住民とのコミュニケーション、資源の有効利用、自然環境の保全につながる。このような背景から様々な水質の簡易分析法が様々な化学薬品メーカーから多数発売されている。当然のことながら簡易分析法の分析精度や感度は後述のように公定法と比べ劣る。

各水質汚染物質の種類とそれを分析する公定法および簡易分析法を Table 1-1 にまとめた。

Table 1-1 水質汚染物質の種類、公定法、簡易分析法[7]

汚染物質	公定法	簡易分析法
有機物	BOD, COD, TOC, 吸光光度法等	COD 簡易分析キット
無機物	イオンクロマトグラフィー, フローインジェクション解析等	プローブ-標的錯体の分析(比色法)
重金属	原子吸光法, ICP, 蛍光 X 線法, アノードストリッピングボルタメトリー等	プローブ-標的錯体の分析(比色法)
農薬	GC-MS, LC-MS	
微生物	プレートカウント法, qPCR 等	イムノクロマト法

本研究では重金属、及び微生物(細菌)に対して着目した。現在用いられている重金属分析法は原子吸光分析法、原子蛍光分光法、誘導結合プラズマ発光分光分析法、誘導結合プラズマ質量分析法、ボルタンメトリー法、蛍光 X 線法である。これらの分析法の長所としては、選択性が高いため定性分析が正確である、高感度である、などが挙げられる。そのため、これらの装置は公定法として広く利用されている。短所としては装置が高額である、前処理が煩雑であることが挙げられる。

簡易分析法としては吸光光度法や蛍光分光光度法、サイクリック・ボルタンメトリーがある。光学

## 第1章 序論

的分析法は金属と選択的に結合する分子(プローブ)をサンプルに添加し、プローブが測定対象金属と配位結合した結果変化する光学的特性(吸光スペクトルや蛍光スペクトル)を分析することで金属濃度を測定する。しかしながらプローブが完全にターゲットの金属とのみ結合することではなく、他の金属とも結合してしまう。このような分析の邪魔をする物質は妨害物質と呼ばれる。妨害物質の影響は選択性で評価される。市販されている比色法による金属イオンを標的とした簡易分析法における標的物質とその呈色反応、及び阻害物質の一覧を Table 1-2 に示す。

## 第 1 章 序論

Table 1-2 市販の比色法による金属イオンを標的とした簡易分析法の標的物質と呈色反応で使用する試薬, 阻害物質[8, 9]

標的	呈色反応で使用する試薬	阻害物質 ( $\geq 50$ mg/L)
Mg(II)	Titanium elongation	Cu(II), Fe(II), Fe(III), Zn(II), Mn(II), Cl <sup>-</sup> , Cr(III), Cr(VI), Cu(II), F <sup>-</sup> , Fe(II), Fe(III),
Al(III)	Eriochrom cyanine R	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Sn(II), Mo(VI), Zn(II), Mg(II), Ni(II), Pb(II), As(III)
総 Cr	Diphenylcarbazide	Mn(II), Phenol, Cl <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Cr(VI)	Diphenylcarbazide	Fe(III), V(V), Cl <sup>-</sup> , Cu(II), Mo(VI), NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
Mn(II)-Mn(VII)	Potassium permanganate	Co(II), Cr(III), I <sup>-</sup> , CN <sup>-</sup> , Cr(VI), Fe(II), Fe(III), Phenol, Cu(II)
総 Fe	<i>O</i> -Phenanthroline, 低濃度用; Basophenanthroline	Co(II), Cu(II), Ni(II), Zn(II), Ag(I), CN <sup>-</sup> , Cr(VI)
Fe(II)	<i>O</i> -Phenanthroline	低濃度用; Al(III), Cu(II),  CN <sup>-</sup> , Co(II), Cl <sup>-</sup> , Cr(III), PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Zn(II), Cr(VI), Mo(VI), Ni(II)
Fe(III)	Sulfosalicylic acid Basokuproin	CN <sup>-</sup> , Cr(VI), Cl <sup>-</sup> , Co(II), Cu(II), Fe(III), Zn(II)
Cu(I)-Cu(II)	In drainage; Sodium N,N-Diethyldithiocarbamate Trihydrate	CN <sup>-</sup> , Cr(VI), F <sup>-</sup>
Zn(II)	1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol, 低濃度用; 2-(5-Bromo-2-pyridylazo)-5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl) amino] phenol Disodium Salt Dihydrate	Co(II), CN <sup>-</sup> , Ag(I), Cr(VI), Fe(II), Fe(III), Ni(II)
Cd(II)	5-[N-n-propyl-N-(3-sulfopropyl) amino] phenol	Mn(II), Cu(II), Co(II), Fe(II), Ag(I), Pb(II), Zn(II), V(V), Cr(VI), Ni(II), Cd(II), Cr(III)
Pb(II)	4-(2-Pyridylazo) resorcinol	低濃度用; Co(II), Fe(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II), Al(III), Cr(VI), CN <sup>-</sup> , Cu(II), Ag(I), Cr(III)
		S <sup>2-</sup> , Zn(II), Co(II), Cr(VI), Pb(II), Ag(I), Ni(II), NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Fe(II)
		Bi(III), Ba(II)

## 第1章 序論

例えば株式会社共立理化学研究所は様々な金属の簡易分析キットであるパックテスト®を販売している[8]. ここでヒ素はモリブデンブルー法により分析される[10]. しかしながら一般にモリブデンブルー法はリン酸の呈色反応に使用される方法である. リン酸とヒ素の化学的特性が似ていることからヒ素の分析にもこの方法が用いられた訳であるが, 当然のことながらヒ素が妨害物質となる. この方法では全ての操作が約 10 分で完了し, 水質汚濁に係る環境基準(10 µg/L 以下)から一律排水基準(100 µg/L 以下)レベルの総 As, As(III)をオンサイトで測定できる. しかし, リン酸以外にも Co(II), Mo(VI), Ni(II), Cu(II)が存在していた場合もこれらが分析を妨害し As 濃度を過大評価する. また, 重金属類や酸化剤が多量に共存した場合は, As 濃度を過小評価することがある.

現在用いられている細菌分析法は培養に基づく方法, 分子生物学的手法に基づく方法, 顕微鏡にて直接観察する方法である[7]. 培養に基づく方法は培養に少なくとも一日以上かかる, インキュベータ等の大型な機器を用いなければならない, 前処理が煩雑である, Viable but non culturable (VBNC) 状態にある細菌は検出できないといった欠点がある. これに対し分子生物学的手法に基づく方法は培養法に比べて数時間でターゲットを検出できる, 理論的にはサンプル中に 1 個でもターゲットがあれば検出できるほど高感度である, VBNC 状態にある細菌も検出できるなどの利点を持つが, 細菌から DNA を抽出するプロセスが必要である, 高価なリアルタイム PCR 装置, 及び高価な PCR 試薬を用意する必要がある, 生菌と死菌を区別できないなどの欠点がある. 顕微鏡にて直接観察する方法は顕微鏡が必要, 染色が必要な場合がある, ごく少量のサンプルしか分析できずサンプルの代表性を担保できないといった問題がある.

培養を必要としない簡易分析法としては抗原抗体法がある. 例えば本研究で対象とした Lp にも抗原抗体法がある. 抗原抗体法の一つであるイムノクロマト法を原理とした Lp 血清群 1 型 (*Legionella pneumophila* (Serogroup1); Lp(SG1)) 簡易検出キットが市販化されている. この方法はサンプルに試験紙を浸すと, サンプルが毛細管現象により移動し試験紙中の抗 Lp(SG1)群抗体結合 AuNPs を溶解させ, 試料中に Lp(SG1)が存在すれば免疫複合体を形成して移動する. 次に免疫複合体が移動して抗 Lp(SG1)抗体塗布部分で捕捉されて赤紫色ライン(判定ライン)を出現させる. さらに残った抗 Lp(SG1)抗体結合型 AuNPs が移動して, 抗マウス IgG 抗体塗布部分に捕捉されて赤紫色ライン(コントロールライン)を出現させる. もしサンプル中に Lp(SG1)が存在しなければ, 判定ラインでは色に変化せず, コントロールラインで色に変化する. しかし, この方法は, LD を発症した患者のような, 体内で Lp が高濃度に増殖した場合には容易であるが, 公衆浴場の水や冷却塔の水などの循環水をターゲットとした場合, イムノクロマト法の検出限界値(50 cfu/100 mL)未満であることが多いため, 循環水を濃縮させる必要がある. この時に濃縮させるサンプル量は約 20 L と多量であることと, 濃縮操作が煩雑であるといった問題点が挙げられる. また, イムノクロマト法

## 第1章 序論

自体は30-40分で済むが、この濃縮操作を前段で実施すると、総分析時間が約3時間となるため、qPCR法などと同等の時間が必要になる。

Lp以外の細菌を標的とした簡易分析法でもこれまでに紹介した比色法や蛍光分光法を原理とした簡易分析法が開発されている[5, 6, 11]。この場合、主に細菌表面のタンパク質や細菌の細胞壁、細菌内部の生体分子を標的とした試薬を用いる。例えば、ウェスタンブロッティングやELISAでは、特定タンパク質や分子の存在や量を測定する際に標的特異的プローブを主に活用し、抗体を用いる[12]。特定抗原に対するプローブ中の抗体の結合アフィニティーにより、複合サンプル中の標的の発見と検出が可能になる。しかし、抗体自体がタンパク質であるため、分析系で抗体を特異的に検出するには、可視化タグ付きの抗体を用いるか、もしくはタグ付き分子・酵素で二次プローブを添加する必要がある。二次プローブ中に用いられる検出試薬は、主に西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)や生物発光酵素ルシフェラーゼの変異体などの酵素タグを使用することが多い。

### 1.3 核酸を用いた簡易水質分析法

上述のように重金属や細菌の簡易分析法には多くの解決すべき課題がある。そこで本研究では核酸をプローブとして用いた簡易分析法を開発することとした。DNAはアデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T、RNAはウラシル(U))の4種類の塩基が鎖状につながった生体分子である。AはTと、GはCと特異的に結合することから、DNAプローブは核酸の検出に広く使われている。この原理を利用した分析方法にポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction, PCR)、サザン、ノーザン、ドットブロットハイブリダイゼーション、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)、DNAマイクロアレイなどがある。

ハイブリダイゼーションのみならず、核酸にはターゲットと特異的に結合する性質がある。DNAアプタマーとは、細菌細胞や動物細胞、タンパク質、エクソソームなどの生体物質や有機分子、金属、小分子などと多点的相互作用(水素結合、静電相互作用、疎水性相互作用)を基に強固に結合する一本鎖のデオキシリボ核酸のことである[13]。アプタマーという呼名はラテン語の「適合」を意味する *aptus* と、ギリシャ語の接尾辞“-mer”を組み合わせたものに由来する[14, 15]。DNAアプタマーはpHや温度に耐性があり、タンパク質で構成されるバイオレセプターが失活するような条件でも使用可能である[16]。さらに、DNAアプタマーは核酸塩基が構成成分であるので、陽電荷や正に分極した分子領域をはじめとしたルイス酸と相互作用でき、塩基が $\pi$ - $\pi$ 相互作用によって他の分子と相互作用することも、水素結合によって結合することもできる[16, 17]。DNAアプタマーは、アプタマー自身の分子内水素結合から形成される固有の高次構造(ステム、ループ、G<sub>4</sub>等の四重らせん、シュードノット、バルジ、ヘアピン等)が大きく寄与しており、高い選択性での分子認識が可能となっ

## 第1章 序論

ている[15]. 例えば, テオフィリン結合型アプタマーは, テオフィリンとはメチル基のみ構造が異なるカフェインよりも 10,000 倍の結合能力を示したという報告がある[18]. この高い認識能から, 抗体に代わる物質として注目されており, 標的物質に対するアプタマーの解離平衡定数  $K_d$  は,  $10^{-7}$  M ~  $10^{-10}$  M のものが多く報告されている[19] (抗体の一般的な解離平衡定数:  $10^{-10}$  M ~  $10^{-13}$  M [20]). これらのアプタマーは, 医療分野において, 治療薬, ドラッグデリバリーシステム, 臨床診断試薬などとして利用されるほか, アプタセンサーにも数多く応用されている[15].

### 1.3.1 DNA アプタマーベースのバイオセンサーの検出原理

DNA アプタマーベースのバイオセンサーは概ね次のような原理で作られている. (1) 蛍光色素・酵素・酸化還元ラベルとの競合・置換・サンドイッチアッセイ, (2) 電気化学的プローブ, (3) ラベルやマーカー同士の距離の変化, (4) 標的物質の結合に伴う結合サイトの変化を, 電位差計, FET, 導電率計, インピーダンス分光法などを用いてラベルなしで評価, である. アプタマーを用いたセンサーには次の特徴がある. (1) 分子ビーコンと呼ばれるアプタマーにターゲットが結合すると, 急激な構造変化が起こり, 大きなシグナルが発生する. (2) 標的物質と結合物質の複合体の交換速度は, 抗体よりもはるかに高い交換速度が得られる. これらにより, センサーの再生やオンサイト測定も可能となる.

また, DNA アプタマーはオリゴヌクレオチドの性質を持ち, 多様な結合メカニズムを持っているため, 新しい検出戦略が可能となる.

(1) ターゲット誘導型構造転換 (TISS): TISS は induced fit binding メカニズムに基づいている. ここでは, 標的が結合する際の構造変化を利用してシグナルを生成する.

(2) ターゲット誘起解離 (TID): アプタマーはオリゴヌクレオチドであるため, 相補的なオリゴヌクレオチドを設計することができ, 標的物質が存在しない状態でアプタマーとハイブリダイズする. 標的物質の存在下では, 相補的な配列はアプタマーから解離し, 標的物質に置き換えられる.

(3) TIR (Target-induced reassembling of aptamer fragments): 標的物質が存在しない状態では, アプタマーは相互作用しない 2 つの断片に切り分けられる. 標的物質の存在下では, アプタマー断片は再集合し, 標的物質との 3 分子複合体を形成する.

DNA アプタマーを簡易分析法へ応用する場合, 大抵の場合は DNA アプタマーとは別のシグナル検出試薬を用いることが多い. 代表的なものとして, 金ナノ粒子 (AuNPs), 量子ドット (QD) が挙げられる. 100 nm 以下の AuNPs は, 構造的, 電子的, 光学的, 触媒的特性など, バイオセンシングに適したユニークな特性を持っている. 局所的な表面プラズモン共鳴 (LSPR) や強力な光散乱などの特徴があり, さらに光退色がないことから, 堅牢で高感度な検出のためのプラットフォーム

## 第1章 序論

として利用されている[14]. AuNPs への DNA の固定化は, AuNPs を化学的に合成後, チオール化した DNA とのリガンド交換によって AuNPs を DNA で修飾するという2段階のプロセスが採用されている. この方法は DNA アプタマーにも応用されている. さらに最近では, 液体環境下での金のレーザーアブレーションによっても AuNPs が生成できること, また, レーザーアブレーションによる AuNPs 生成の際に, ワンステップで AuNPs にアプタマーを修飾できることが示された[14]. 局所的な LSPR が強く, 可視領域での消光係数が高いことから, AuNPs は特に比色分析に適している. また, アプタマー修飾 AuNPs は, その高い生体適合性から医療用途にも広く使用されている[21].

### 1.3.2 これまでに開発された DNA アプタマーベースのバイオセンサー

#### 1.3.2.1 金属

金属イオンについては, これまで, As(III)をはじめとしてカドミウム(Cd(II)) [22], 水銀(Hg(II)) [23, 24], 鉛(Pb(II)) [23, 25]等いくつかの金属イオン用の DNA アプタマーがスクリーニングされた. 2012年以降, ヒ素用アプタマーである Ars-3 を用いた簡易分析法, 及びセンサーの開発が数多く報告された. Wu らは Ars-3 をベースとした4種類の簡易 As(III)分析法を開発した[26–29]. Wu らは第一に, Hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB)と AuNPs を用いた方法を報告しており, AuNPs の凝集による色の変化を用いた比色法で As(III)濃度を測定した[26]. また, この報告内では, Ars-3 が As(III)と結合して DNA の構造が変化したことを円二色性スペクトル(CD スペクトル)によって確認した[26]. 第二の報告では, Poly(diallyldimethylammonium) (PDDA)を用いる手法を報告した[27]. この報告では, As(III)存在時, Ars-3 と As(III)が複合体を形成し, PDDA を添加すると AuNPs が凝集する. 一方で As(III)非存在下では, PDDA と Ars-3 が相補鎖を作るため, AuNPs は分散状態を保つ. 第三の報告では, crystal violet を Aptamer 内に内包させる手法である[28]. この時, レイリー散乱スペクトルを測定しており, これまでの報告よりも低い検出限界値(0.2 ppb, これまでの報告内では 0.6 ppb が最も低かった)を示した. 第四の報告では, Hemin を用いた方法である[29]. まず, Hemin と Ars-3 を混合させ複合体を形成させる. Hemin は Aptamer と結合している時は Hemin の触媒活性を阻害するため, 3,5,3'5'-tetra-methylbenzidine (TMB) がカチオンラジカルの青色生成物となる. 一方で, As(III)存在下では Ars-3 と As(III)が結合し, Hemin と Ars-3 は解離するため, Hemin の触媒活性が復活する. この時, TMB を添加すると Diimine という黄色生成物が出る. この溶液の吸収スペクトルを測定することで As(III)を定量する方法である.

Ars-3 が用いられているその他の As(III)簡易分析法について述べる. Tang らは AuNPs を用いた簡易 As(III)分析法を開発した[30]. As(III)存在下では Ars-3 が脱着する. 表面増強ラマン散乱を測定して As(III)を定量する. Zhan らは Ars-3 と AuNPs を用いて, AuNPs の凝集による色の変

## 第1章 序論

化, 即ち吸光度比を用いた方法を開発した[31]. この方法は上記の Wu らの方法とは異なり, 凝集剤として NaCl 溶液を添加しており, 従来の先行研究よりも測定原理が単純化された手法である. 2016年には Song らは Au@Ag shell-core nanoparticle を作製し, これと 4-mercaptobenzoic acid (4-MBA), Ars-3 を用いた方法を開発した[32]. まず, Au@Ag shell-core nanoparticle に 4-MBA と Ars-3 を添加すると, Au@Ag shell-core nanoparticle 表面に 4-MBA, Ars-3 の順で吸着する. その後, As(III)存在サンプルを添加することで Au@Ag shell-core nanoparticle 表面の Ars-3 が脱着する. その後, 表面増強ラマン散乱を測定して As(III)を定量する手法である. Ensafi らは CdTe/ZnS core/shell 量子ドット(QDs)を作成し, AuNPs を用いた測定法と同様に検出する手法を開発した[33]. この QDs は As(III)非存在下では Ars-3 を介して凝集し, 蛍光が消光するが, As(III)存在下では QD が分散状態となるので, 蛍光を発する. この時の Ex/Em = 450/510-550 を測定して As(III)を定量した. Lin らは G<sub>4</sub> 構造のアプタマーを基盤としたイリジウム(III)の複合体を生成後, チアゾールオレンジを添加して蛍光スペクトルを測定し, Ex/Em = 405 nm / 510-750 nm の面積を算出して As(III)濃度を定量した[34]. Oroval らは MCM-41 メソポーラスナノ粒子(作成)表面にローダミン B 内包アミノプロピル基を修飾, Ars-3 で被覆させた複合体を使用した測定法を開発した[35]. As(III)添加によって Ars-3 が脱着, ローダミン B を放出させ, このローダミン B 放出量を評価した. An らは As(III)検出用電界効果トランジスタ(field-effect transistor; FET)型アプタセンサーを開発した[36]. ヒ素結合アプタマーを結合させた CFMNS を液体イオンゲート FET システムに組み込んだところ, 1 秒以下で迅速な応答を示した. カルボキシルポリピロール(CPPy)被覆フラワー状 MoS<sub>2</sub> ナノスフィア(CFMNSs)を用いたアプタセンサーは, 他の多くの金属イオンの中から選択的に As(III)を認識し, 混合溶液中の As(III)を正確に検出した. また, この FET アプタセンサーは, 河川水の実試料中の目的成分を識別することができた. Zhang らは Fe(III)ベースの有機金属フレームワーク(Fe-MOF)とメソポーラス Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C ナノカプセルからなる新しいコアシェル型ナノ構造複合体を合成し, 水溶液中の微量重金属イオンを測定するためのプラットフォームとして開発した[37]. Yang らは Ars-3 とは別の, As(III)結合ペプチドリガンドのスクリーニングを Phage display technique によって実施, As(III)結合型ペプチドリガンドを開発し, その後, AuNPs による吸光度の変化によって As(III)を分析した[38]. Siddiqui らはスマートフォンベース光学的センサー(Ars-3 と AuNPs を用いたセンサー)を開発した[39]. 同時に少量の土壌サンプルから As を抽出するサンプル調整法を開発した[39]. Nguyen らは AuNPs 表面に Ars-3 を修飾, セチルトリメチルアンモニウムブロマイド(CTAB)の相乗的な分子集合体を利用し, 水試料中の As(III)イオンを選択的かつ高感度に比色認識した[40]. Pan らはエキソヌクレアーゼ III(Exo III)によるカスケード標的リサイクル増幅戦略によって As(III)センシングプラットフォームを開発, 検出素子には三十螺旋状の分子スイッチを用い,

## 第 1 章 序論

シグナルインジケータには 2-amino-5,6,7-trimethyl-1,8-naphthyridine を用いた[41]. Liang らは As(III)と Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>を用いて Au-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> ナノシートの ECL 発光を相乗的に消光し, 同時に Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>の ECL 信号を高強度で発生させることで, 超微量の As(III)を検出する新しいレシオメトリック電気化学発光(ECL)インジケータを開発した[42]. Baghbaderani らはキトサン-ナフィオン複合体を高導電性の表面プラットフォームとして利用し, さらにカーボンナノチューブを用いた新しい信号増幅法を用いて, As(III)を高感度に検出するための無液滴のインペディメトリー・アプタマーベースのセンサーを開発した[42]. Yuan らはメルカプトエチルアミンの自己組織化単分子膜を調製し, As(III)を水晶振動子マイクロバランスの表面に添加, その後, Ars-3-AuNPs 複合体を添加し, バイオセンサーの応答周波数を増幅させた As(III)検出型電圧アプタセンサーを開発した[43]. Banerjee らは地下水からの As(III)の除去と光プローブとしての機能を併せ持つ, 2 つの機能を持つナノコンポジットを開発した[44]. これはジチオスレイトール (DTT)を用いた適切なチオール化により, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au ナノコンポジット (DTT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au)を作製し, 水溶液中の As(III)を非常に低い検出限界で検出することができた[44]. このナノコンポジットは As(III)との親和性が高いため, As(III)の存在下で凝集し, 吸光度が大幅に低下し, 紫外可視分光法, 動的散乱法, 電子顕微鏡法により, As(III)と DTT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au ナノコンポジットとの間の詳細な相互作用が, 相互作用中のサイズダイナミクスと溶液挙動に関して明らかになり, ICP-MS の測定により DTT-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au による水溶液からの As(III)の除去率が約 70%であることが確認された[44].

### 1.3.2.2 微生物

微生物(ウイルスを含む)に関しては, 枯草菌[45], 酵母菌[45], 黄色ブドウ球菌[46, 47], サルモネラ菌[48], リステリア菌[49], カンピロバクター[50], 大腸菌[51], マウスノロウイルス[52], インフルエンザウイルス[53]を標的とした DNA アプタマーは数多く開発された. しかしながら本研究で標的としたレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーは, 本研究を開始した 2019 年時点では報告されていない. これらのスクリーニングされた DNA アプタマーを用いて細菌検出が可能なバイオセンサーの開発を実施, 現場で実際に測定して評価するまで一貫して実施された報告はない. また, 各細菌と結合する DNA アプタマーのスクリーニングには Cell-SELEX 法を用いるが, Cell-SELEX 法には第 2 章にて述べる致命的な欠点があり, 簡易分析法をはじめとしたバイオセンサーまで応用可能となるレベルの高性能な細菌結合型アプタマー, すなわち  $K_d$ が低く, かつ解離反応速度定数  $k_{off}$ が低い(DNA アプタマー-標的複合体の半減期が長い)はこれまでに開発されていない. そのため, 開発された DNA アプタマーを用いた細菌検出型バイオセンサーへの適用, 及び DNA アプタマーベースのバイオセンサーの普及・及び多様化のためには, 様々な細菌結合型 DNA アプ

## 第1章 序論

タマーの種類が増加とともに、従来の Cell-SELEX 法では開発できないような高性能な DNA アプタマーの開発を実施し、バイオセンサーへ適用・実用化を可能にする必要がある。実際に DNA アプタマー選抜の先行研究では、トロンピンや血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF) のような特定のタンパク質や黄色ブドウ球菌といった特定の細菌に対して改良した SELEX 法や Cell-SELEX 法を適用して DNA アプタマーをスクリーニングした報告が主であり、多種多様なタンパク質や細菌に対して結合する DNA アプタマーを選抜した報告は非常に少ない。さらに、DNA アプタマーの選抜、及び選抜された DNA アプタマーを用いたバイオセンサーを開発した論文でも、シグナル検出で用いた物質と標的との相互作用を評価しておらず、実用化・市販化まで達成できていないものが多い[54, 55]。

### 1.4 本研究の目的

上述のように現在のところ核酸をプローブとした水中の重金属分析方法は市販には至っておらず、水中の病原性細菌に至ってはプローブの開発段階の研究が主である。そこで本研究では誰でも手軽に安全な水へのアクセスを可能にするため、金属イオンと細菌を標的とした簡易分析法の開発と実用化を目的として実施した。本論文では、環境試料中の重金属の中でも As(III)と As(V)をターゲットとした新規簡易分析法の開発と、開発した簡易分析法を地下水中の As(III), As(V)の分析を通して、実用化への検討を実施した。また、細菌においては、レジオネラ細菌 (*Legionella pneumophila* (Serogroup 1); Lp(SG1))をターゲットとした簡易分析法の開発を目的とし、その第一段階として Lp(SG1)結合型 DNA アプタマーの選抜を試みた。

簡易 As(III)分析法の開発においては、As(III)結合型 DNA アプタマー「Ars-3」と金ナノ粒子 (AuNPs)を用いた簡易分析法の分析制度に影響を与える様々なパラメーターを最適化した。また、開発した本手法で地下水中の As(III)濃度を測定し、本手法の地下水への適用可能性を調査した。最後に 2019 年の報告で示された、Ars-3 と As(III)の結合性について、本研究でも確認した。

簡易 As(V)分析法の開発においては、As(V)を特異的に吸着する酸化セリウムナノ粒子 (CeO<sub>2</sub>NPs)と蛍光色素修飾 DNA (FAM-labeled DNA)を用いた簡易分析法を開発し、地下水中の As(V)を測定した。次いで、上記の簡易 As(III)分析法、簡易 As(V)分析法を組み合わせ、サンプル中の As(III)と As(V)について、分離分析が可能かどうか評価した。

Lp(SG1)結合型 DNA アプタマーの選抜では、従来の Lp(SG1)結合型 DNA アプタマーは 2020 年末に初めて Cell-SELEX 法で開発された[56]が、従来の Cell-SELEX 法で選抜された DNA アプタマーよりも高性能な DNA アプタマーを選抜する方法が発見・開発された[45]ため、簡易分析法へ適用できるような高い結合能を持った DNA アプタマーを開発した。

## 第 1 章 序論

### 1.5 本論文の構成

第 1 章では、研究背景、目的、これまでの先行研究についてまとめた。

第 2 章では、As(III)をターゲットとした簡易 As(III)分析法の開発を行った。簡易 As(III)検出法は、As(III)結合型 DNA アプタマー「Ars-3」と金ナノ粒子(AuNPs)を用いた手法を開発した。本手法の開発にあたり、各測定パラメーターの検討を実施した後に検出限界値(LOD)を算出したところ、 $2.1 \mu\text{M}$ の LOD が得られた。その後、本手法で地下水中の As(III)濃度を定量したところ、高濃度の As(V)や様々な金属カチオンを含む超純水、及び地下水中の As(III)濃度を選択的に測定することができた。また、2019 年に Zong らが指摘した、Ars-3 が As(III)と結合しておらず、AuNPs 表面に As(III)が吸着することで AuNPs の色に変化するという点に対して[55]、本研究でも検証した。その結果、Zong らが指摘したように Ars-3 が As(III)と特異的に結合していないことが示された。また、Ars-3 以外の塩基配列を持つ ssDNA を用いても As(III)を測定できた。このため、本章で開発した簡易 As(III)分析法は Ars-3 以外の塩基配列でも適用可能であることが示され、結果として本章で開発した簡易 As(III)分析法は、我々が予想していた反応とは異なる反応が生じて As(III)を定量できることが示された。

第 3 章では、As(V)をターゲットとした簡易 As(V) 分析法を開発、及び地下水への実用化を検討した。簡易 As(V)検出法では As(V)を特異的に吸着させる酸化セリウムナノ粒子( $\text{CeO}_2\text{NPs}$ )とフルオロセイン修飾一本鎖 DNA (FAM-labeled DNA)を用いた手法を開発した。第 2 章と同様に、各測定パラメーターの検討を実施した後に LOD を算出したところ、 $0.44 \mu\text{M}$ の LOD が得られた。その後、地下水中の As(V)を本手法で測定したところ、いくつかのサンプルは、本手法で測定した As(V)濃度と ICP-MS で測定した濃度がほぼ同じであることが示されたが、ほとんどの試料の As(V)濃度は本手法では過小評価された。この原因は前処理試料中に存在するイオン( $\text{Na(I)}$ )によるもの、及び測定誤差によるものだと考えられる。また、第 2 章で開発した簡易 As(III)分析法と組み合わせ、地下水中の As を化学種毎に測定した結果、サンプルの As(III)と As(V)をそれぞれ定量できた。

第 4 章では、DNA アプタマーを用いたレジオネラ細菌(Lp(SG1))の簡易分析法の開発にあたり、Lp(SG1)結合型 DNA アプタマーを開発した。従来の方法では、DNA アプタマーは SELEX 法と呼ばれる手法で開発されるが、本研究では SELEX 法よりも高分離かつ短時間で選抜可能な PectI 選抜法によって Lp(SG1)結合型 DNA アプタマーを選抜した。この PectI 選抜法で獲得できた DNA アプタマーの配列は、先行研究における、従来の Cell-SELEX で選抜された DNA アプタマーと比較して低い  $K_d$ ,  $k_{\text{off}}$ を持っており、平衡論的、反応速度論的に Lp(SG1)と高い結合能を持った DNA アプタマーを獲得できた。従って、先行研究で選抜された DNA アプタマーよりも

## 第1章 序論

Lp(SG1)と特異的に結合し、安定した複合体を形成するアプタマーであると考えられ、我々が目標としているバイオセンサーの開発に適したDNAアプタマーを選抜できたことが示された。

第5章では、結論であり、第2章から第4章で得られた知見についてまとめ、課題点及び今後の展望について述べた。

## 第 1 章 序論

### 参考文献

1. WHO (2011) Guidelines for Drinking-Water Quality - Fourth Edition
2. Jomova K, Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283:65–87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001>
3. WHO (2006) Guidelines for safe recreational water environments: Volume 2: Swimming pools and similar environments
4. WHO (2003) Guidelines for safe recreational water environments Volume 1: Coastal and Fresh Waters. World Health Organization
5. Satoh H, Katayose Y, Hirano R (2021) Simple enumeration of *Escherichia coli* concentrations in river water samples by measuring  $\beta$ -D-glucuronidase activities in a microplate reader. *Water Sci Technol* 83:1399–1406. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.072>
6. Satoh H, Kikuchi K, Katayose Y, et al (2020) Simple and reliable enumeration of *Escherichia coli* concentrations in wastewater samples by measuring  $\beta$ -D-glucuronidase (GUS) activities via a microplate reader. *Sci Total Environ* 715:136928. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136928>
7. Association APH, Association AWW, Federation WE (2017) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington DC
8. 株式会社共立理化学研究所. <https://kyoritsu-lab.co.jp/>
9. Hach® EZ Series Online Analyzers. <https://www.hach.com/ez-series>
10. Nagul EA, McKelvie ID, Worsfold P, Kolev SD (2015) The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: Opening the black box. *Anal Chim Acta* 890:60–82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.030>
11. Peng KP, Chiou JF, Chen YT, Liu TZ (2010) Is the Blood Donated by Habitual Nut Quid Chewers Suitable for Use in Transfusion? *J Formos Med Assoc* 109:106–112. [https://doi.org/10.1016/S0929-6646\(10\)60030-7](https://doi.org/10.1016/S0929-6646(10)60030-7)
12. Zeng X, Shen Z, Mernaugh R (2012) Recombinant antibodies and their use in biosensors. *Anal Bioanal Chem* 402:3027–3038. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5569-z>
13. Tuerk C, Gold L (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* (80- ) 249:505–510. <https://doi.org/10.1126/science.2200121>
14. Kim YS, Gu MB (2014) Biosensors Based on Aptamers and Enzymes. Springer

## 第 1 章 序論

15. Saito S (2021) SELEX-based DNA Aptamer Selection: A Perspective from the Advancement of Separation Techniques. *Anal Sci* 37:17–26. <https://doi.org/10.2116/analsci.20SAR18>
16. Ali MH, Elsherbiny ME, Emara M (2019) Updates on aptamer research. *Int J Mol Sci* 20:1–23. <https://doi.org/10.3390/ijms20102511>
17. Röthlisberger P, Hollenstein M (2018) Aptamer chemistry. *Adv Drug Deliv Rev* 134:3–21. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.007>
18. Jenison R, Gill S, Pardi A, Polisky B (1994) High-Resolution Molecular Discrimination by RNA. *Science* (80- ) 263:1425–1429. <https://doi.org/10.1126/science.7510417>
19. Kaur H (2018) Recent developments in cell-SELEX technology for aptamer selection. *BBA - Gen Subj* 1862:2323–2329. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.07.029>
20. Landry JP, Ke Y, Yu GL, Zhu XD (2015) Measuring affinity constants of 1450 monoclonal antibodies to peptide targets with a microarray-based label-free assay platform. *J Immunol Methods* 417:86–96. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2014.12.011>
21. Du Y, Li B, Wang E (2010) Analytical potential of gold nanoparticles in functional aptamer-based biosensors. *Bioanal Rev* 1:187–208. <https://doi.org/10.1007/s12566-010-0011-0>
22. Wu Y, Zhan S, Wang L, Zhou P (2014) Selection of a DNA aptamer for cadmium detection based on cationic polymer mediated aggregation of gold nanoparticles. *Analyst* 139:1550–1561. <https://doi.org/10.1039/c3an02117c>
23. Liu C, Huang C, Chang H (2009) Highly Selective DNA-Based Sensor for Lead ( II ) and Mercury ( II ) Ions. *Anal Chem* 81:6824–6828. <https://doi.org/10.1021/ac8022185>
24. Ono A, Miyake Y (2003) Highly selective binding of metal ions to thymine-thymine and cytosine-cytosine base pairs in DNA duplexes. *Nucleic Acids Res Suppl* 3:227–8. <https://doi.org/10.1093/nass/3.1.227>
25. Chen Y, Li H, Gao T, et al (2018) Selection of DNA aptamers for the development of light-up biosensor to detect Pb(II). *Sensors Actuators, B Chem* 254:214–221. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.068>
26. Wu Y, Liu L, Zhan S, et al (2012) Ultrasensitive aptamer biosensor for arsenic(iii) detection in aqueous solution based on surfactant-induced aggregation of gold nanoparticles. *Analyst* 137:4171–4178. <https://doi.org/10.1039/c2an35711a>
27. Wu Y, Zhan S, Wang F, et al (2012) Cationic polymers and aptamers mediated aggregation of gold nanoparticles for the colorimetric detection of arsenic(iii) in aqueous solution. *Chem*

## 第 1 章 序論

- Commun 48:4459–4461. <https://doi.org/10.1039/c2cc30384a>
28. Wu Y, Zhan S, Xing H, et al (2012) Nanoparticles assembled by aptamers and crystal violet for arsenic(iii) detection in aqueous solution based on a resonance Rayleigh scattering spectral assay. *Nanoscale* 4:6841. <https://doi.org/10.1039/c2nr31418e>
  29. Wu Y, Wang F, Zhan S, et al (2013) Regulation of hemin peroxidase catalytic activity by arsenic-binding aptamers for the colorimetric detection of arsenic(III). *RSC Adv* 3:25614–25619. <https://doi.org/10.1039/c3ra44346a>
  30. Tang M, Wen G, Liang A, Jiang Z (2014) A simple and sensitive resonance Rayleigh scattering method for determination of As(III) using aptamer-modified nanogold as a probe. *Luminescence* 29:603–608. <https://doi.org/10.1002/bio.2589>
  31. Zhan S, Yu CM, Lv CJ (2014) Colorimetric Detection of Trace Arsenic ( III ) in Aqueous Solution Using Arsenic Aptamer and Gold Nanoparticles. *Aust J Chem* 67:813–818. <https://doi.org/10.1071/CH13512>
  32. Song L, Mao K, Zhou X, Hu J (2016) A novel biosensor based on Au@Ag core-shell nanoparticles for SERS detection of arsenic (III). *Talanta* 146:285–290. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.052>
  33. Ensafi AA, Kazemifard N, Rezaei B (2016) A simple and sensitive fluorimetric aptasensor for the ultrasensitive detection of arsenic(III) based on cysteamine stabilized CdTe/ZnS quantum dots aggregation. *Biosens Bioelectron* 77:499–504. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.011>
  34. Lin S, Wang W, Hu C, et al (2017) The application of a G-quadruplex based assay with an iridium(iii) complex to arsenic ion detection and its utilization in a microfluidic chip. *J Mater Chem B* 5:479–484. <https://doi.org/10.1039/c6tb02656g>
  35. Oroval M, Coll C, Bernardos A, et al (2017) Selective Fluorogenic Sensing of As(III) Using Aptamer-Capped Nanomaterials. *ACS Appl Mater Interfaces* 9:11332–11336. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b15164>
  36. An JH, Jang J (2017) A highly sensitive FET-type aptasensor using flower-like MoS<sub>2</sub> nanospheres for real-time detection of arsenic(III). *Nanoscale* 9:7483–7492. <https://doi.org/10.1039/c7nr01661a>
  37. Zhang Z, Ji H, Song Y, et al (2017) Fe(III)-based metal–organic framework-derived core–shell nanostructure: Sensitive electrochemical platform for high trace determination of heavy metal ions. *Biosens Bioelectron* 94:358–364. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.03.014>

38. Vega-Figueroa K, Santillán J, Ortiz-Gómez V, et al (2018) Aptamer-Based Impedimetric Assay of Arsenite in Water: Interfacial Properties and Performance. *ACS Omega* 3:1437–1444. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01710>
39. Siddiqui MF, Kim S, Jeon H, et al (2018) Miniaturized sample preparation and rapid detection of arsenite in contaminated soil using a smartphone. *Sensors (Switzerland)* 18:6–10. <https://doi.org/10.3390/s18030777>
40. Thao Nguyen N Le, Park CY, Park JP, et al (2018) Synergistic molecular assembly of an aptamer and surfactant on gold nanoparticles for the colorimetric detection of trace levels of As<sup>3+</sup> ions in real samples. *New J Chem* 42:11530–11538. <https://doi.org/10.1039/c8nj01097h>
41. Pan J, Li Q, Zhou D, Chen J (2018) Ultrasensitive aptamer biosensor for arsenic (III) detection based on label-free triple-helix molecular switch and fluorescence sensing platform. *Talanta* 189:370–376. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.024>
42. Liang RP, Yu LD, Tong YJ, et al (2018) An ultratrace assay of arsenite based on the synergistic quenching effect of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> and arsenite on the electrochemiluminescence of Au-g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub> nanosheets. *Chem Commun* 54:14001–14004. <https://doi.org/10.1039/c8cc08353c>
43. Yuan M, Zhang Q, Song Z, et al (2019) Piezoelectric arsenite aptasensor based on the use of a self-assembled mercaptoethylamine monolayer and gold nanoparticles. *Microchim Acta* 186:. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3373-1>
44. Banerjee S, Kumar NP, Srinivas A, Roy S (2019) Core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanocomposite as dual-functional optical probe and potential removal system for arsenic (III) from Water. *J Hazard Mater* 375:216–223. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.04.085>
45. Saito S, Massie TL, Maeda T, et al (2012) On-column labeling of gram-positive bacteria with a boronic acid functionalized squarylium cyanine dye for analysis by polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis. *Anal Chem* 84:2452–2458. <https://doi.org/10.1021/ac2031145>
46. Cao X, Li S, Chen L, et al (2009) Combining use of a panel of ssDNA aptamers in the detection of *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* 37:4621–4628. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp489>
47. DeGrasse JA (2012) A single-stranded DNA aptamer that selectively binds to *staphylococcus aureus* enterotoxin B. *PLoS One* 7:. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033410>
48. Dwivedi HP, Smiley RD, Jaykus LA (2013) Selection of DNA aptamers for capture and

## 第 1 章 序論

- detection of Salmonella Typhimurium using a whole-cell SELEX approach in conjunction with cell sorting. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:3677–3686. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4766-4>
49. Suh SH, Dwivedi HP, Choi SJ, Jaykus LA (2014) Selection and characterization of DNA aptamers specific for *Listeria* species. *Anal Biochem* 459:39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.05.006>
  50. Dwivedi HP, Smiley RD, Jaykus LA (2010) Selection and characterization of DNA aptamers with binding selectivity to *Campylobacter jejuni* using whole-cell SELEX. *Appl Microbiol Biotechnol* 87:2323–2334. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2728-7>
  51. Kim YS, Song MY, Jurng J, Kim BC (2013) Isolation and characterization of DNA aptamers against *Escherichia coli* using a bacterial cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment approach. *Anal Biochem* 436:22–28. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.01.014>
  52. Giamberardino A, Labib M, Hassan EM, et al (2013) Ultrasensitive norovirus detection using DNA aptasensor technology. *PLoS One* 8:1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079087>
  53. Nguyen VT, Seo H Bin, Kim BC, et al (2016) Highly sensitive sandwich-type SPR based detection of whole H5Nx viruses using a pair of aptamers. *Biosens Bioelectron* 86:293–300. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.064>
  54. Liu X, He F, Zhang F, et al (2020) Dopamine and Melamine Binding to Gold Nanoparticles Dominates Their Aptamer-Based Label-Free Colorimetric Sensing. *Anal Chem* 92:9370–9378. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01773>
  55. Zong C, Liu J (2019) The Arsenic-Binding Aptamer Cannot Bind Arsenic: Critical Evaluation of Aptamer Selection and Binding. *Anal Chem* 91:10887–10893. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02789>
  56. Saad M, Chinerman D, Tabrizian M, Faucher SP (2020) Identification of two aptamers binding to *Legionella pneumophila* with high affinity and specificity. *Sci Rep* 10:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65973-3>

### 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

#### 2.1 背景

飲料水のヒ素(As)汚染は、公衆衛生にとって深刻な脅威となっている(Flora, 2015). As 中毒の症状には、循環器系の呼吸器疾患や、皮膚、肺、肝臓、腎臓のがんなどがある[1-4]. As の毒性は高いため、世界保健機関(WHO)と米国環境保護庁(USEPA)は、飲料水に含まれる総 As 基準値を 10  $\mu\text{g/L}$  と低く設定している[5, 6]. As の汚染源としては自然および人為的な物がある。As は飲料水の主要な供給源の一つである地下水を汚染する元素であるため、地下水の As 汚染は世界的な問題となっている[7]. 例えば、バングラディッシュでは、井戸水から採取した地下水サンプルのうちの 40%において As 濃度が 100  $\mu\text{g/L}$  を超えていた[8]. そのため、地下水の As 濃度を数 100  $\mu\text{g/L}$  のレベルで測定することが不可欠である。

As は、主に原子吸光分析法(AAS), 原子蛍光分析法, 誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MS)によって測定される。これらの技術は、優れた精度と感度を持っている[9]. しかし、これらの技術は、精巧で高価な大型の装置や、操作のための専門的な知識を必要とし、運用コストが高く、現場での分析には適していない[10, 11]. さらに、As 種(ヒ酸塩(As(V))や有機 As 化合物)の中でもより有害であることが知られている亜ヒ酸(As(III))を選択的に測定することができない[12, 13]. そのため、As(III)を分析するためのシンプルで低コストのオンサイト技術が必要とされている[11].

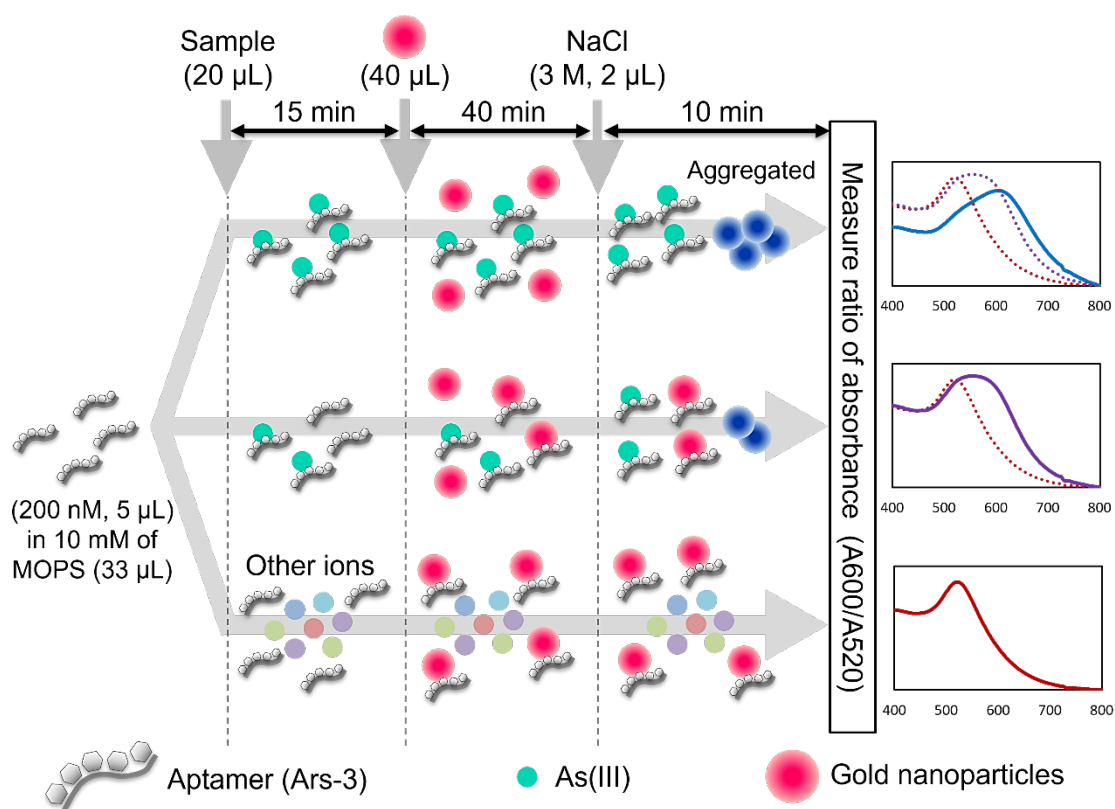
As を測定するためのバイオセンサーは、高感度、特異性、簡便性、低コスト、迅速な応答時間、使いやすさ、携帯性などの利点があり、いくつかの事例が報告されている[11]. 化学センサーとの違いは、酵素や抗体、DNA 等のバイオレセプターを用いる点であり、化学センサーよりも標的を選択的に識別可能で、分析前に必要な前処理の工程を少なくすることができる[14]. 遺伝子組換え細胞やオリゴヌクレオチド、タンパク質は、As 検出用バイオセンサーの認識要素として使用されている[11]. その中でも、Ars-3[15]と呼ばれる As(III)に特異的な DNA アプタマーは、As(III)に対する高い親和性と特異性を持つことから、多くの科学者の注目を集めている。Kaur らは、Ars-3 に含まれるアデニンとグアニンが、ヌクレオチド塩基との指向性不飽和水素結合と自己組織化による認識挙動を介して、Ars-3 の As(III)への特異的結合に寄与していることを示唆している[11]. これまでに、Ars-3 を用いた As(III)の比色バイオセンサーや電気化学的バイオセンサーが開発されている[10, 16-18]. しかし、これらの研究はいずれも地下水サンプルを測定していない。また、As の市販キットを用いて地下水の As を分析した事例では、他の金属イオンによる干渉によって偽陰性・偽陽性の結果が生じることが報告されている[19, 20]. そのため、Ars-3 を用いたバイオセンサーを地下水に適用し、その適用性を確認する必要がある。

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

本研究では、地下水中の As(III)濃度を測定するために、Ars-3 と金ナノ粒子(AuNPs)を用いた簡易分析法を開発した。Scheme 2-1 に本手法のセンシングメカニズムを示した。As(III)が存在しない場合、Ars-3 は DNA 塩基と金の相互作用によって AuNPs の表面に吸着されている。負電荷を帯びた Ars-3 アプタマーで覆われた AuNPs は、高濃度の NaCl でも溶液中に分散したままである。分散した AuNPs は赤い色をしており、この時の AuNPs の吸収スペクトルは 520 nm 付近にピークを持つ。一方、As(III)の存在下では、Ars-3 はアプタマー-As(III)複合体を形成する。溶液に添加された AuNPs は Ars-3 で覆われていないため、NaCl による凝集を受けることになる。この AuNPs の凝集により、AuNPs の色が赤から青に変化する。サンプル中に低濃度の As(III)が含まれていた場合、Ars-3 に覆われた AuNPs と AuNPs 単体の両方が存在しているため、NaCl を添加すると Ars-3 に覆われた AuNPs は分散状態のままであり、単体の AuNPs のみが凝集する。この時の AuNPs の吸収スペクトルは、AuNPs が分散状態の時の吸収スペクトルと比較して、520 nm 付近の吸光度が減少し、600 nm 付近の吸光度が増大する。サンプル中に高濃度の As(III)が含まれていた場合、全ての Ars-3 が As(III)と複合体を形成し、AuNPs は単体で存在する。この溶液に NaCl を添加すると溶液中の AuNPs が全て凝集する。この時の AuNPs の吸収スペクトルは低濃度 As(III)含有時と比較して、520 nm 付近の吸光度がより減少し、600 nm 付近の吸光度がより増大、かつ 600 nm 付近に吸収スペクトルのピークを持つ。したがって、赤と青の色に対応する吸光度の比(吸光度比)を測定することで、As(III)濃度の定量的な分析が可能となる。我々は測定条件を最適化するために、主なパラメーター(最終 NaCl 濃度、NaCl とのインキュベーション時間、緩衝液の pH)を調査した。最適化された条件で、実際の地下水サンプル中の As(III)濃度を測定した。

なお、我々の研究室では、これまでに環境中に存在する、ヒトに有害な重金属を標的とした簡易分析法を開発している。これまでに我々の研究室では As 以外にもカドミウム(Cd)、水銀(Hg)を標的とした簡易分析法を開発した。しかしながら、Cd、Hg を標的とした簡易分析法は実際に現場で使用することを想定した際に必要な検出限界値が得られず、地下水中の Cd、Hg を定量することが困難であった。

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発



Scheme 2-1 As(III)結合型 DNA アプタマー (Ars-3)と金ナノ粒子を用いた水溶液中の As(III)比色検出法の模式図, 及び各状態における金ナノ粒子が示す典型的な吸収スペクトル

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 2.2 実験方法

#### 2.2.1 本研究で使用した試薬

本研究にて使用した ssDNA (Ars-3, c-Ars-3, DNA-1, DNA-2) は, Eurofins Genomics 株式会社から購入した(各 DNA 配列は Table 2-1 に記す). 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) は, 同仁化学研究所株式会社から入手した. 各 ssDNA は, pH7.3 の 10-mM MOPS 緩衝液に溶解した. リン酸バッファーに溶解した AuNPs (10 nm) (カタログ番号 752584) は, Sigma-Aldrich Japan から入手した. As(III) (NaAsO<sub>2</sub>, カatalog番号 35000, Fluka) および NaCl は, 富士フィルム和光純薬株式会社から入手した. すべての溶液は, Milli-Q 水(メルクミリポア)で調製した. As(III) 標準溶液は, NaAsO<sub>2</sub>を Milli-Q 水で希釈して調製し, 6 時間以内に使用した.

Table 2-1 本研究で使用した DNA 塩基配列

DNA 名称	塩基配列
Ars-3	5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATTTTACA GAACAACCAACGTCGCTCCGGGTACTTCTTCATCGAGATAGTAAGTGC AATCT-3'
c-Ars-3	5'-AGATTGCACTTACTATCTCGATGAAGAAGTACCCGGAGCGACGTTG GTTGTTCTGTAAAATTGAATAAGCTGGTATCTCCCTATAGTGAGTCGTAT TACC-3'
DNA-1	5'-GGTTACCTTGAAGCAACCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NNNNNNNNNNNNNNNCTCGATTCTCCTAGACAC-3'
DNA-2	5'-AAGCCTGTATACGCGAATCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN NTTACGGTCACGGTCAAGTTC-3'

#### 2.2.2 Ars-3 を用いた As(III) の定量

マイクロチューブに入れた 10-mM MOPS 緩衝液 33 $\mu$ L に, Ars-3 溶液 (200 nM) を 5  $\mu$ L を加えてプローブ溶液を調製した. 20  $\mu$ L のサンプル液をプローブ液と混合した. この混合液を室温で 15 分間インキュベートした後, AuNPs 溶液 40 $\mu$ L を添加し, 室温で 40 分間インキュベートした. 最後に, 3 M の NaCl 溶液 2  $\mu$ L を添加し, 10 分間インキュベートした. その後, 100  $\mu$ L の混合液の吸収スペクトルを測定した. 混合溶液中の Ars-3 の最終濃度は 10 nM とした. 特に記載のない限り, この測定条件で実施した.

試験溶液中の NaCl 濃度, NaCl 添加後のインキュベーション時間, MOPS 緩衝液の pH が感度

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

に及ぼす影響を調べた。NaCl 濃度を最適化するために、試験溶液の最終 NaCl 濃度を 0~120 mM に変更した。NaCl の添加時間を最適化するため、As(III)が 0  $\mu$ M と 100  $\mu$ M の 2 種類の試験液を NaCl 添加後 30 分間インキュベートし、5 分ごとに吸光スペクトルを測定した。MOPS 緩衝液-溶液の pH を最適化するために、異なる pH で異なる As(III)濃度の試験溶液の吸光度スペクトルを測定し、As(III)の検量線を作成した。

上述のパラメーターを最適化した後、様々な As(III)濃度における本法の検量線を作成した。10 個のブランクサンプル(Milli-Q 水)と、個々の As(III)濃度における 3 つの As(III)標準溶液サンプルの吸光度スペクトルを測定した。520 nm と 600 nm の吸光度ピークの比(吸光度比)を As(III)濃度に対してプロットした。このプロットにロジスティック式を当てはめて検量線を得た。また、10  $\mu$ M 以下の As(III)濃度では、直線回帰を用いて検量線を得た。この結果に基づき、検出限界(LOD)値を  $3\sigma/s$  の式を用いて推定した。ここで  $\sigma$  は 10 個のブランクサンプルの標準偏差、s は直線回帰式の傾きである。

本手法の検量線を作成後、本手法の選択性を検討した。上記の測定条件で、ブランクサンプルと、各 6  $\mu$ M の NaAsO<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, ZnCl<sub>2</sub>, (CHCOO)<sub>2</sub>Pb·3H<sub>2</sub>O, NaCl, AgNO<sub>3</sub>をそれぞれ 6  $\mu$ M 添加した溶液の吸収スペクトルを測定し A<sub>600</sub>/A<sub>520</sub> を比較した。また、環境サンプルを測定するにあたり、As が含まれていない地下水(北海道大学で採水)を使用し、地下水による影響を確認した。

2016 年 11 月(Groundwater-1)と 2016 年 12 月(Groundwater-2)に当キャンパスで地下水を採取した。サンプルには As が含まれていなかったため、異なる濃度の As(III)をスパイクした。試料は、孔径 0.2  $\mu$ m の膜(アドバンテック株式会社)でろ過した後、陽イオン交換カラム(MetaSEP IC-ME, GL Sciences)に通すか、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を添加して陽イオン金属イオンを安定化させた。前処理後、本法を用いて As(III)濃度を測定し、既知の As(III)濃度にスパイクした試料と比較した。カチオン交換処理前後の地下水サンプル中の金属イオン濃度を Table 2-2 に示す。陽イオン交換処理における As(III)の回収率は 94%であった。

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

Table 2-2 地下水サンプル中の金属イオン濃度( $\mu\text{M}$ ). "Raw"は陽イオン交換処理前, "Eluent"は陽イオン交換処理後のサンプルをそれぞれ示す. 金属イオン濃度は ICP-MS で測定した.

イオン	Groundwater-1		Groundwater-2	
	Raw	Eluent	Raw	Eluent
Na	1,562	4,741	1,087	1,579
Mg	572	0.66	601	0
Al	134	1.78	5.23	0
K	188	4.94	143	0
Ca	272	0.27	103	1.38
Fe	5.35	1.02	7.93	0
Ni	1.35	0.002	0	0
Cu	0	0.06	0.16	0.008

### 2.2.3 本実験で使用した測定装置

吸収スペクトルは, 分光光度計 V-630 (日本分光株式会社) を用いて測定した. ZETASIZER NANO ZS90 (Malvern Panalytical Ltd) を用いて, 動的光散乱法 (DLS) により, 様々な測定条件での AuNP の粒径とその試験溶液中の分布を測定した. また, 金属イオン濃度は ICP-MS 8800 ICP-QQ (Agilent) で測定した.

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 2.3 結果と考察

#### 2.3.1 AuNPs の粒径分布と吸収スペクトルの解析による検出メカニズムの解明

As(III)の検出メカニズムを確認するための第一ステップとして、Ars-3 や NaCl の有無が AuNPs の粒径分布に及ぼす影響を検討した。DLS で測定した 10 mM MOPS 緩衝液中の AuNPs の粒径分布(縦軸:相対個数)を Figure 2-1 に示す。同様の粒径分布(縦軸:散乱光強度)を Figure 2-2 に示す。Figure 2-1 と Figure 2-2 の違いは各ピークの粒子径を考慮しているか否かであり、Figure 2-1 は粒子径を考慮していない結果であり、Figure 2-2 は直径の大きい粒子は直径の小さい粒子よりも多くの光を散乱させる、レイリー散乱(粒子の散乱強度は粒子直径の 6 乗に比例する)を考慮した結果である。公称粒径 10 nm の AuNPs のストークス径 ( $D_h$ )は 10.1 nm であった。AuNPs と Ars-3 を混合させた溶液の粒径分布は 10.1 nm に単一のピークが見られた。この結果から、As(III)は AuNPs の粒径に影響しなかったことが判明した。この溶液に NaCl を添加すると粒径分布のピークは 18.2 nm にシフトした。一方で、AuNPs に Ars-3 と As(III)を添加した溶液の粒径分布は 8.7 nm にピークが見られた。この溶液に NaCl を添加すると  $D_h$  は 164 nm にシフトした。これは Figure 2-2 のブラウン運動の散乱光強度を測定した場合でも同様の傾向が確認された。Ars-3 と As(III)の添加によって AuNPs の粒径分布の変化は見られなかったが、Ars-3 と As(III)が混合した溶液に NaCl を添加することによって AuNPs が凝集したことが判明した。

AuNPs は凝集することで吸収スペクトル上では赤色吸収領域へシフトするため、AuNPs の紫外可視(UV-Vis)吸収スペクトルは局所表面プラズモン共鳴や AuNPs の凝集状態によって、可視光領域(500-600 nm)にて強い吸収を示すことが知られている。Figure 2-3 に 10 mM-MOSP 緩衝液(pH: 7.3)中に分散した AuNPs の吸収スペクトルを示す。AuNPs と Ars-3 の混合溶液は AuNPs 溶液と同様に 520 nm に吸収スペクトルのピークが見られるため、Ars-3 は AuNPs の粒径に影響しないことが判明した。この溶液に NaCl を添加すると、520 nm の吸光度がわずかに減少したが、吸収スペクトルのピークのシフトは起こらなかった。AuNPs 添加前に As(III)を含むサンプルを混合させた溶液では、AuNPs 溶液の吸光スペクトルと変化が無かったため、As(III)によって AuNPs の吸収スペクトルに影響しないことが確認できた。この Ars-3, As(III), AuNPs を含む混合溶液に NaCl を添加すると 520 nm 付近にあった吸収スペクトルのピークが 600 nm 付近にシフトした。これにより、As(III)が存在すると AuNPs は NaCl 添加によって凝集したことが示された。この結果は DLS によって得られた結果と一致している。Figure 2-1, Figure 2-2, Figure 2-3 に示した結果から、Scheme 2-1 に示した測定原理は正しく、分散状態の AuNPs の吸収スペクトルのピークと凝集状態の AuNPs の吸収スペクトルのピークの比(吸光度比)が簡易 As(III)分析手法のシグナルとして使用可能であると判断した。

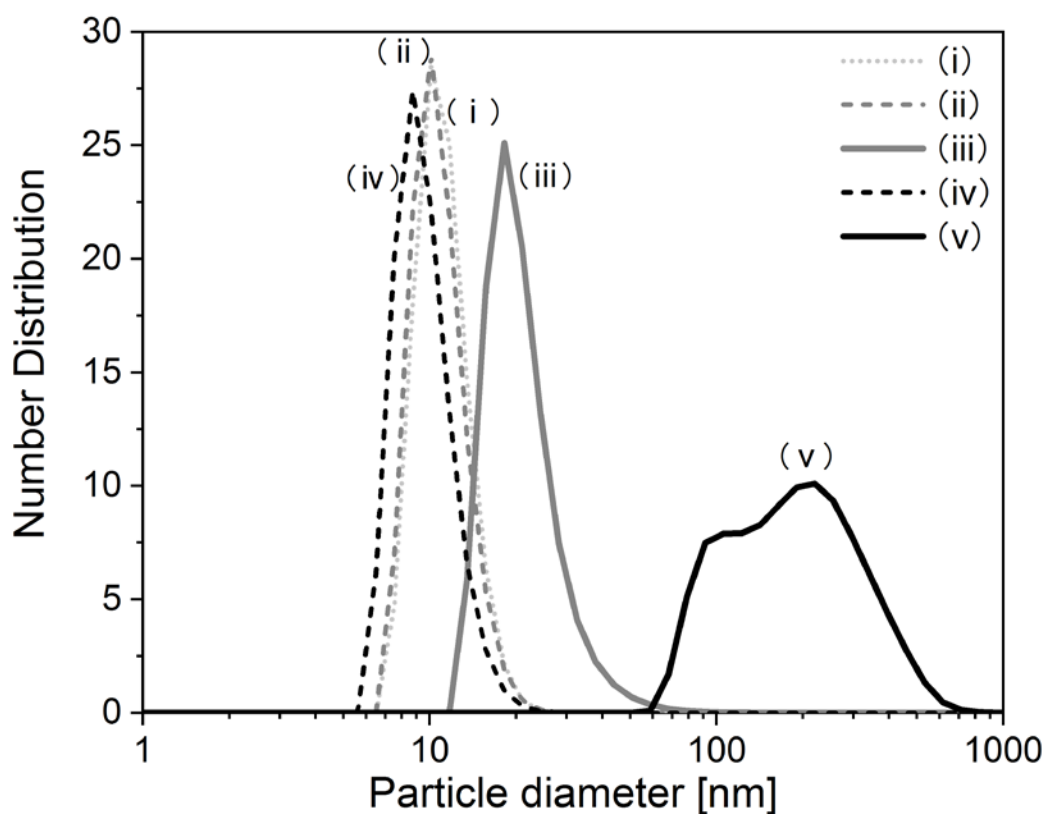


Figure 2-1 DLS で測定した 10 mM MOPS バッファー中の AuNPs の個数分布. (i) AuNPs, (ii) 10 nM Ars-3 とインキュベートした AuNPs, (iii) 10 nM Ars-3 と 60 mM NaCl 混合後の AuNPs, (iv) 10 nM Ars-3 と 100  $\mu$ M As (III) 混合液中の AuNPs, (v) 10 nM Ars-3, 100  $\mu$ M As (III), 60 mM NaCl とインキュベートした AuNPs

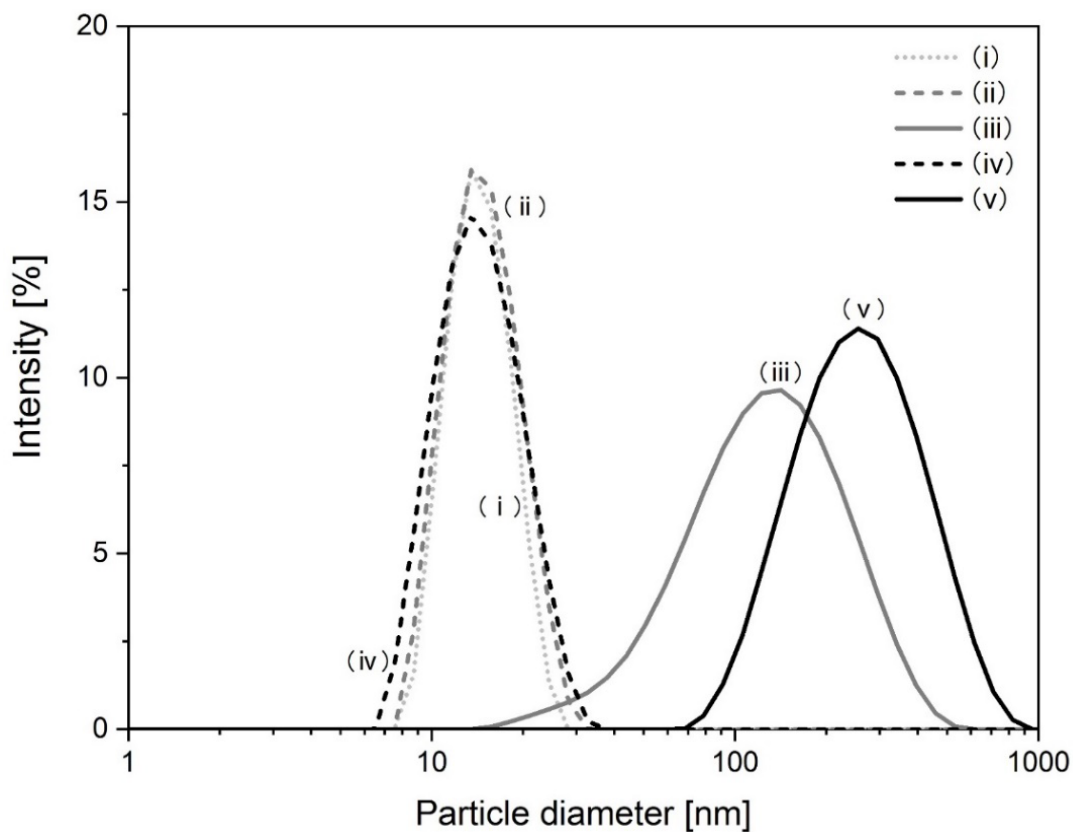


Figure 2-2 DLS で測定した 10 mM MOPS バッファー中の AuNPs の散乱光強度加重粒径分布.  
凡例((i)-(v))は Figure 2-1 のものと同じ.

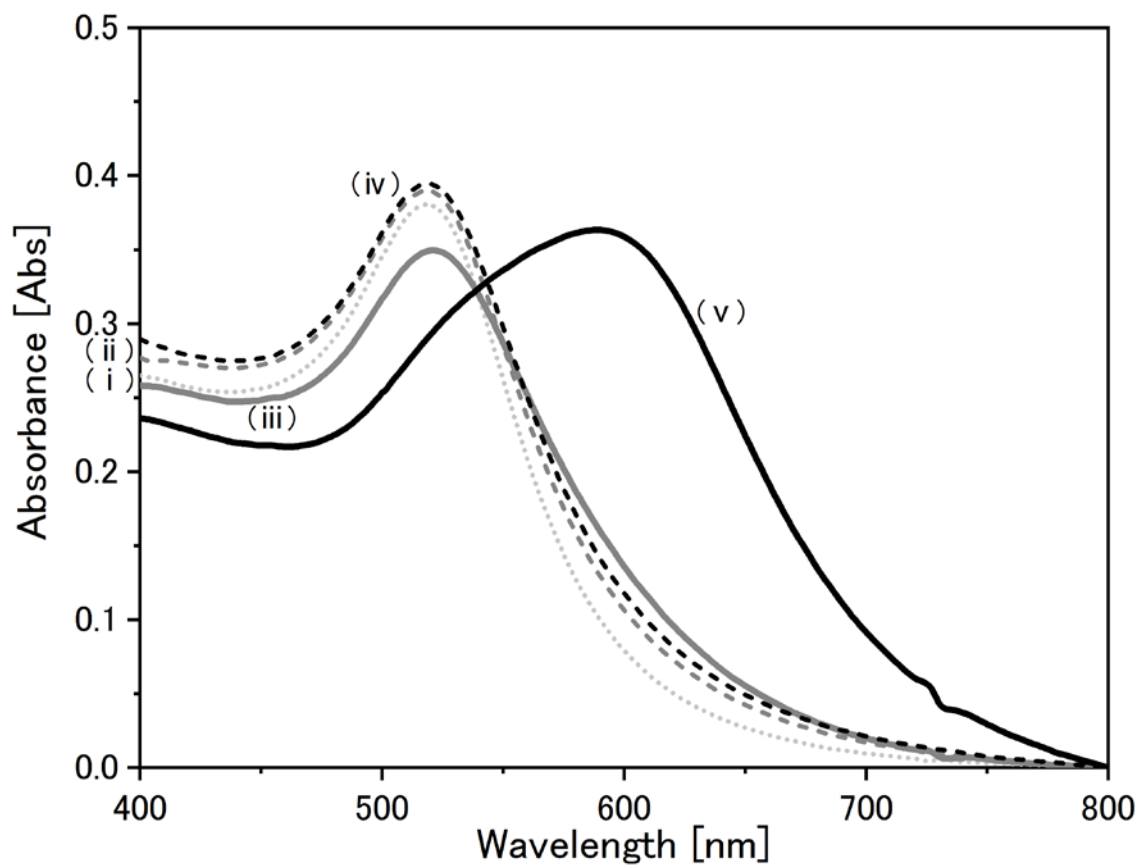


Figure 2-3 10 nM の Ars-3, 100 mM の As(III), 60 mM の NaCl 混合溶液における AuNP の吸収スペクトル. 凡例 (i)-(v) は Figure 2-1 のものと同じ.

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 2.3.2 NaCl 最終濃度が与える影響

本実験で使用する NaCl 濃度は Ars-3 や AuNPs 濃度よりも高く, AuNPs の凝集の程度を変化させるため, 吸収スペクトルに及ぼす最終 NaCl 濃度の影響を検討した. Figure 2-4 は As(III)を含むサンプルと含まないサンプルの吸光度比に対する NaCl 最終濃度の影響を示している. NaCl 無添加の場合, As(III)を含むサンプルと含まないサンプルの吸光度比は約 0.4 であった. 最終 NaCl 濃度が 30 mM 以上となるように NaCl を添加することで, 100  $\mu$ M As(III) サンプルの吸光度比は約 1.3と著しく増加した. 一方, As(III)を含まないサンプルの吸光度比は最終 NaCl 濃度を 120 mM まで高濃度にするとうわずかに上昇することが確認された. NaCl 濃度 = 120 mM では, NaCl による AuNPs の凝集する能力のほうが, AuNPs 表面に覆われた Ars-3 による分散維持させる能力よりも強いため, 一部の Ars-3-AuNPs 複合体が凝集したと考えられる. As(III)を添加した場合と添加しない場合の吸光度比の差は, NaCl 最終濃度が 30 mM, 60 mM, 90 mM のときにそれぞれ 0.80, 0.85, 0.77 であった. これは As(III)を含まない場合でも, NaCl 最終濃度が高いほど, AuNPs の凝集により試験溶液の吸光度比が増加するためである. As(III)の有無による吸光度比の差は本簡易 As(III)の感度を示すため, 試験溶液の NaCl 最終濃度を 60 mM とした. この濃度は, 先行研究で示された平均粒子径 15 nm の AuNPs を凝集させる NaCl 最終濃度の範囲 (50 mM-70 mM) に入るが[21], 直径 15 nm 未満の AuNPs を凝集させるのに最適な NaCl 最終濃度の 120 mM より低い [22]. このため, 最適な NaCl 最終濃度は, AuNPs のサイズ, 緩衝液の種類およびインキュベーション時間に依存すると考えられる.

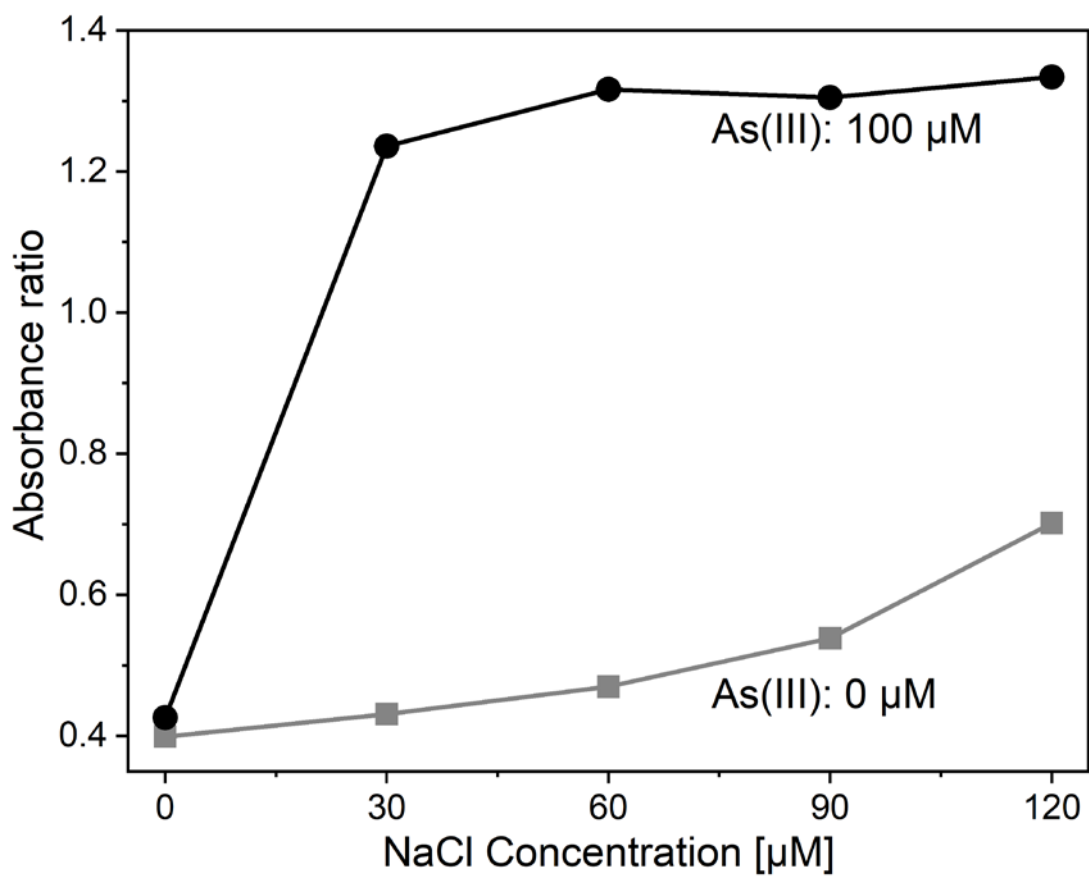


Figure 2-4 As(III)存在下および非存在下での吸光度比に対するサンプル溶液の最終 NaCl 濃度の影響.

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 2.3.3 NaCl 添加後の反応時間

Figure 2-5 は, As(III)を添加した場合と添加しない場合の, NaCl 添加後の試験溶液の吸光度比の経時変化を示したものである. As(III)を添加した試験液の吸光度比は, NaCl 添加直後に大きく上昇し, 10 分後には安定した. 一方, As(III)を含まない試験溶液の吸光度比は, NaCl 添加後も上昇しなかった. これらの結果から, NaCl 添加後のインキュベーション時間は 10 分と決定した.

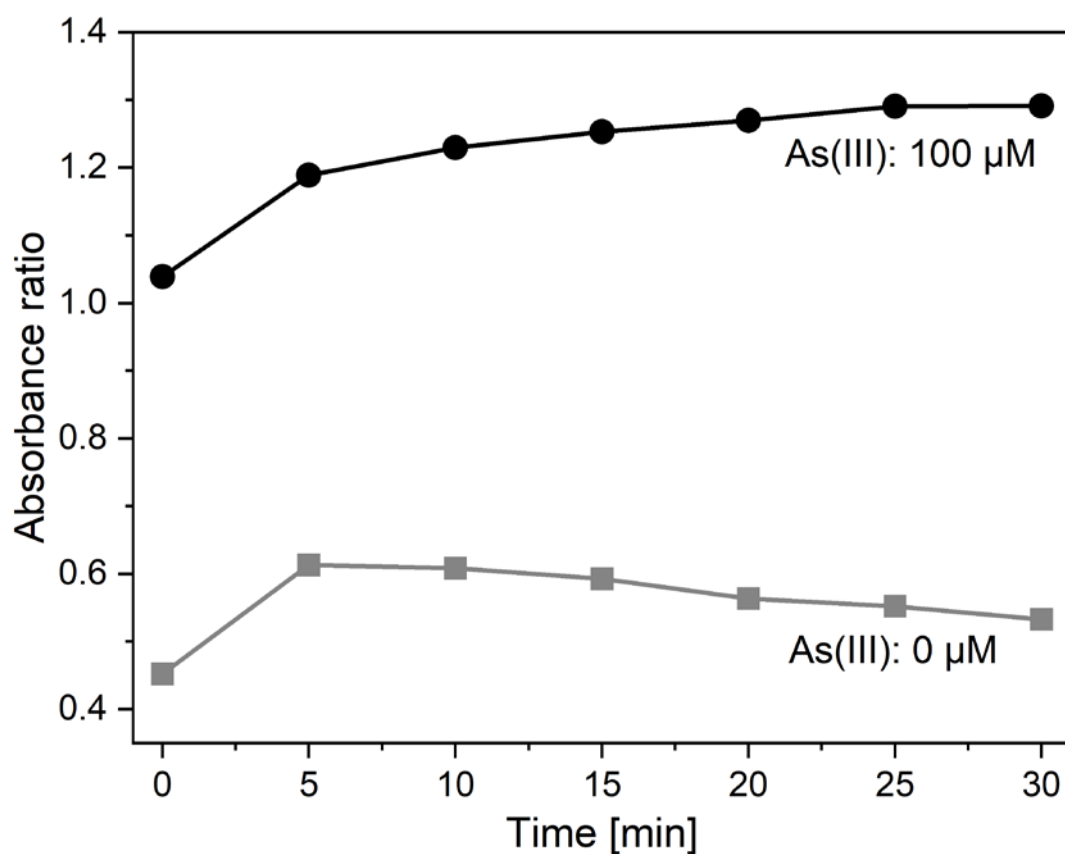


Figure 2-5 As(III)の存在下および非存在下での NaCl 添加後のサンプル溶液の吸光度比の経時変化

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 2.3.4 バッファー溶液の pH が与える影響

Figure 2-6 は MOPS バッファーの pH が検量線の傾き, すなわち本簡易 As(III)分析法の感度に及ぼす影響を示したものである. pH = 6.5 での検量線の傾きは  $2.5 \times 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$  であった. pH が 6.5 から 7.3 になるにつれて傾きが大きくなり, pH = 7.3 で最も高くなった ( $8.2 \times 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}$ ). さらに pH を上げていくと, 検量線の傾きが小さくなった. 本簡易 As(III)分析法は Ars-3-As(III)錯体の形成, 及び残存した単体の Ars-3 の AuNPs 表面への吸着が主な反応となる. 本結果によって, pH の変動によって Ars-3 の電荷に影響し, pH = 7.3 の時に Ars-3-As(III)錯体が最も多く形成され, 残存した単体の Ars-3 が少なくなったと考えられる. 本研究で検討した pH の範囲は As(III)の  $\text{AsO}_3^{3-}$  で変化しない. したがって, 最も高い感度を得られる MOPS バッファーの pH を 7.3 と設定した.

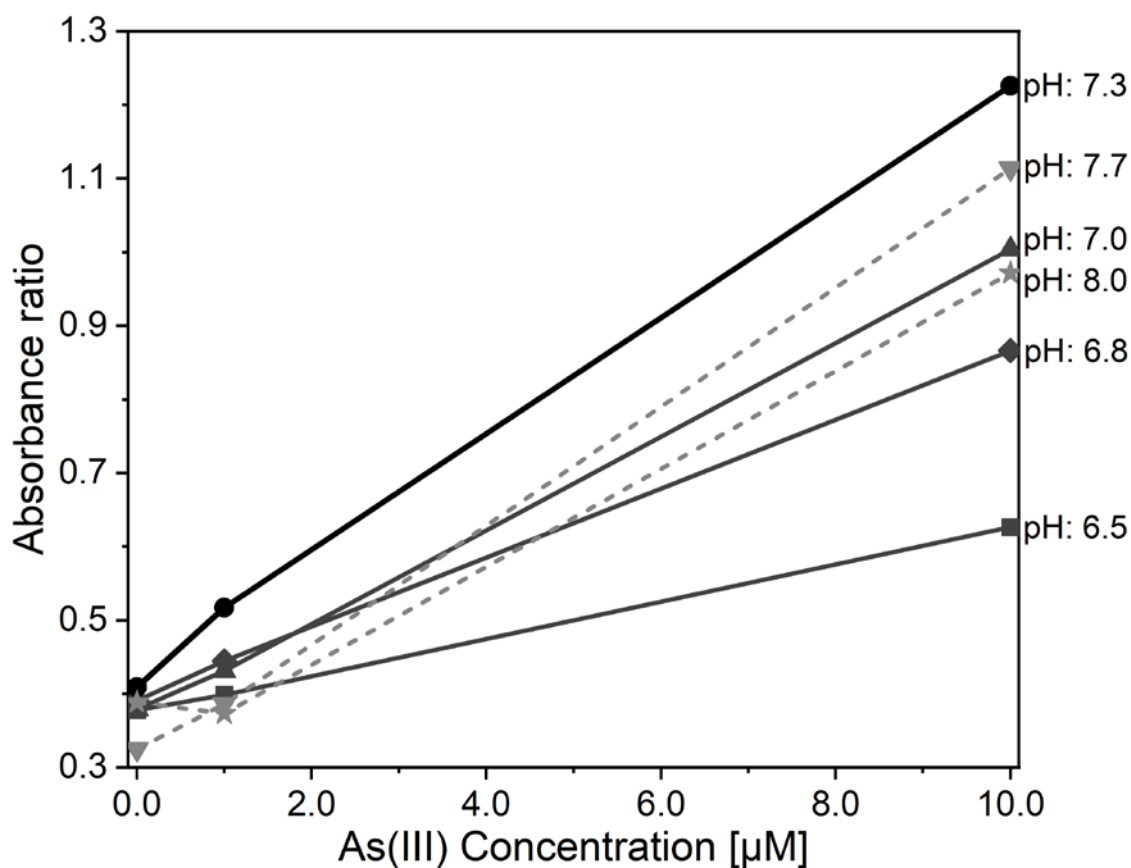


Figure 2-6 検量線における MOPS バッファー pH の影響. 試験実施前の初期の MOPS バッファーの pH を各行の右側に示された値に調整.

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 2.3.5 本手法の検量線

Figure 2-7 は本法における As(III) の検量線である。As(III) を含まない検液の吸光度比は 0.40 であった。吸光度比は 1  $\mu\text{M}$  の As(III) 以下では変化せず、1.0 ~ 10  $\mu\text{M}$  の As(III) 濃度では 0.41 ~ 1.0 まで直線的に増加した。As(III) 濃度が 10  $\mu\text{M}$  を超えると、吸光度比はさらに増加し、100  $\mu\text{M}$  の As(III) ではほとんど変化しなかった (Figure 2-8)。LOD は 2.1  $\mu\text{M}$  と算出された。

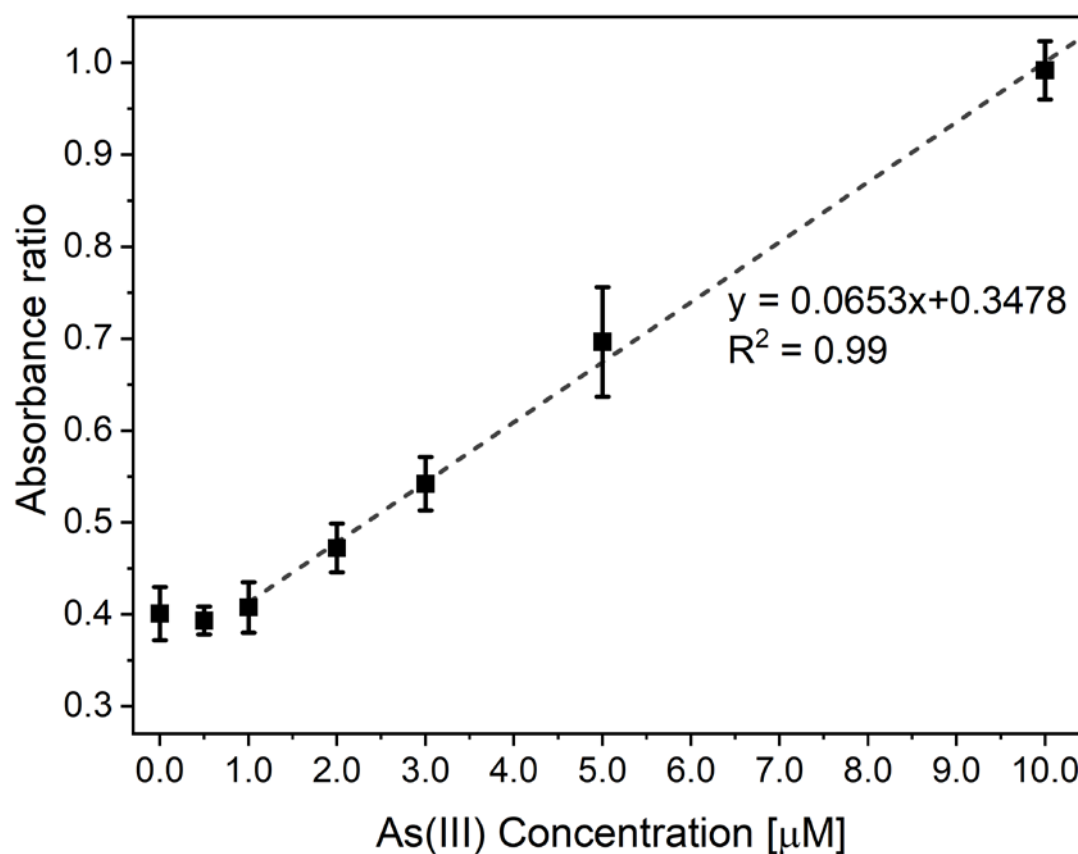


Figure 2-7 本手法による検量線。点線は近似直線。

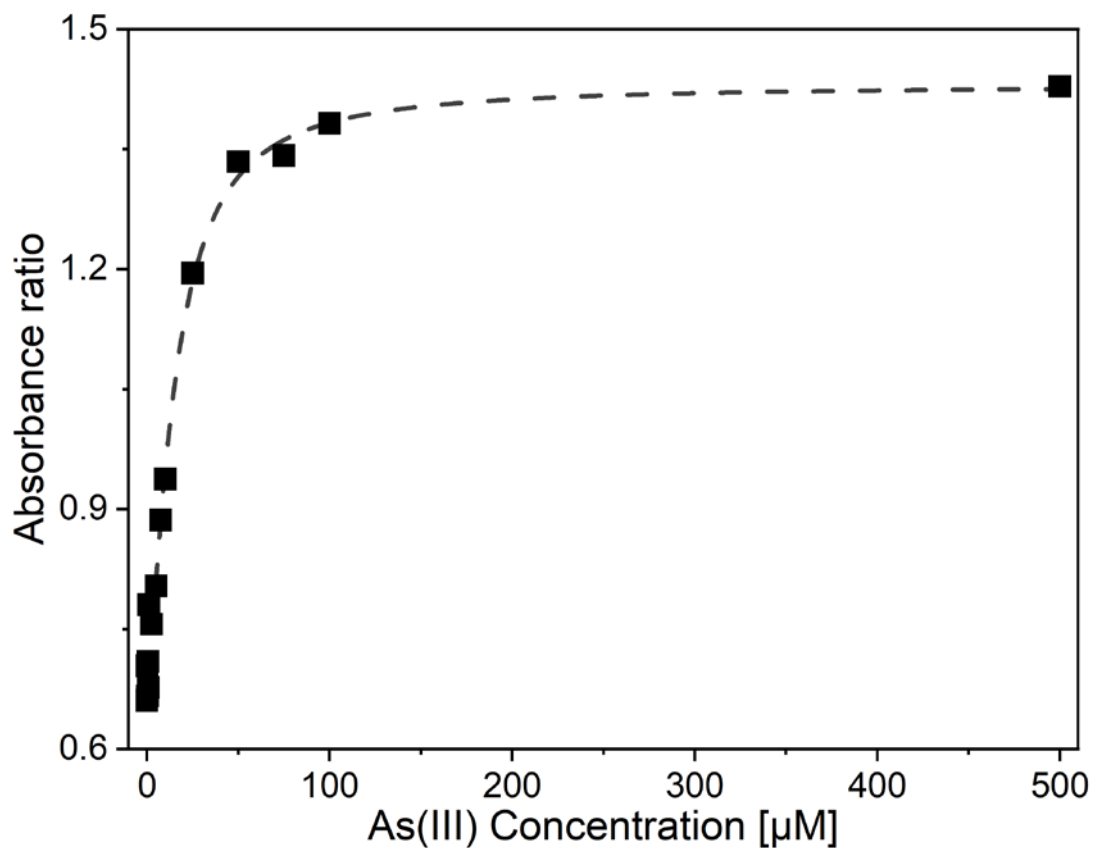


Figure 2-8 広範囲の As(III)濃度における本手法の典型的な検量線. 破線の検量線はシグモイド型で, データプロットはロジスティック回帰モデルで適合され, 決定係数は 0.99 であった. ロジスティック回帰式を以下に示す.

$$y = \frac{-0.74}{1 + \left(\frac{x}{15.4}\right)^{1.44}} + 1.43, \quad R^2=0.99$$

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 2.3.6 本手法の選択性

As(III)及び環境中に主に含まれる金属イオンを供した溶液の吸光度比を Figure 2-9 に示す。As(III)を添加した溶液の吸光度比は、ブランク試料の吸光度比よりも有意に高い値を示した。また、他の13種類の金属イオンを添加した溶液の吸光度比は、ブランクサンプルとほぼ同じであった。これらの結果は、本法が As(III)に対して高い選択性を持ち、さらに As(V)に対しても高い選択性を持つことを示している。

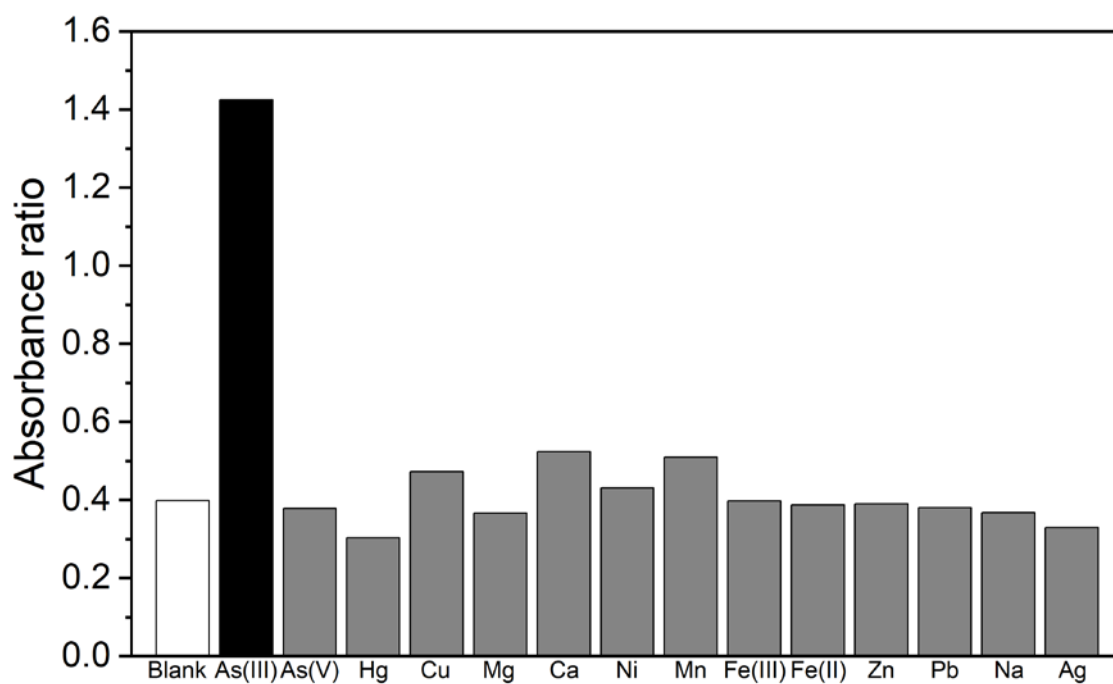


Figure 2-9 本手法の選択性. 各金属イオンの濃度 = 10  $\mu$ M.

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 2.3.7 地下水中の As(III)測定

As(III)を含まない地下水試料を本法に適用したところ、As(III)は存在しなかったにもかかわらず AuNPs は大きく凝集した (Figure 2-10). この凝集は、地下水中に高濃度で存在する金属カチオンが AuNPs を凝集させたためと考えられる (Table 2-1). そこで、地下水試料を孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のメンブレンフィルターと陽イオン交換樹脂で前処理した. 膜ろ過を行っても、地下水の干渉効果は避けられなかった (Figure 2-10). 一方、ろ過後に陽イオン交換を行った試料の吸収スペクトルは、プローブ溶液の吸収スペクトルと重なっていた (Figure 2-10). これは、ろ過後に陽イオン交換を行ったことで、干渉する金属陽イオンが除去され、非電荷または負電荷の As(III)が試料中に残ったことを示している. Table 2-2 に、陽イオン交換処理前後の地下水サンプルの金属イオン濃度を示す. 地下水サンプルには、2 価の陽イオン ( $\text{Mg}^{2+}$ と  $\text{Ca}^{2+}$ ) が前述の選択性試験で使用した  $\text{Mg}^{2+}$ や  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度よりも高濃度に含まれており、これが AuNPs の凝集につながったと考えられる. 陽イオン交換は地下水中の陽イオン金属 ( $\text{Mg}^{2+}$ や  $\text{Ca}^{2+}$ など) を除去し、AuNPs の凝集を抑えることができたが、陽イオン交換処理によって  $\text{Na}^+$ が増加した. これらの結果から、本研究で使用した陽イオン交換では、各金属イオンを  $\text{Na}^+$ に交換するものであり、本簡易 As(III)分析法はサンプル中の高濃度の  $\text{Na}^+$ による干渉を受けなかった.

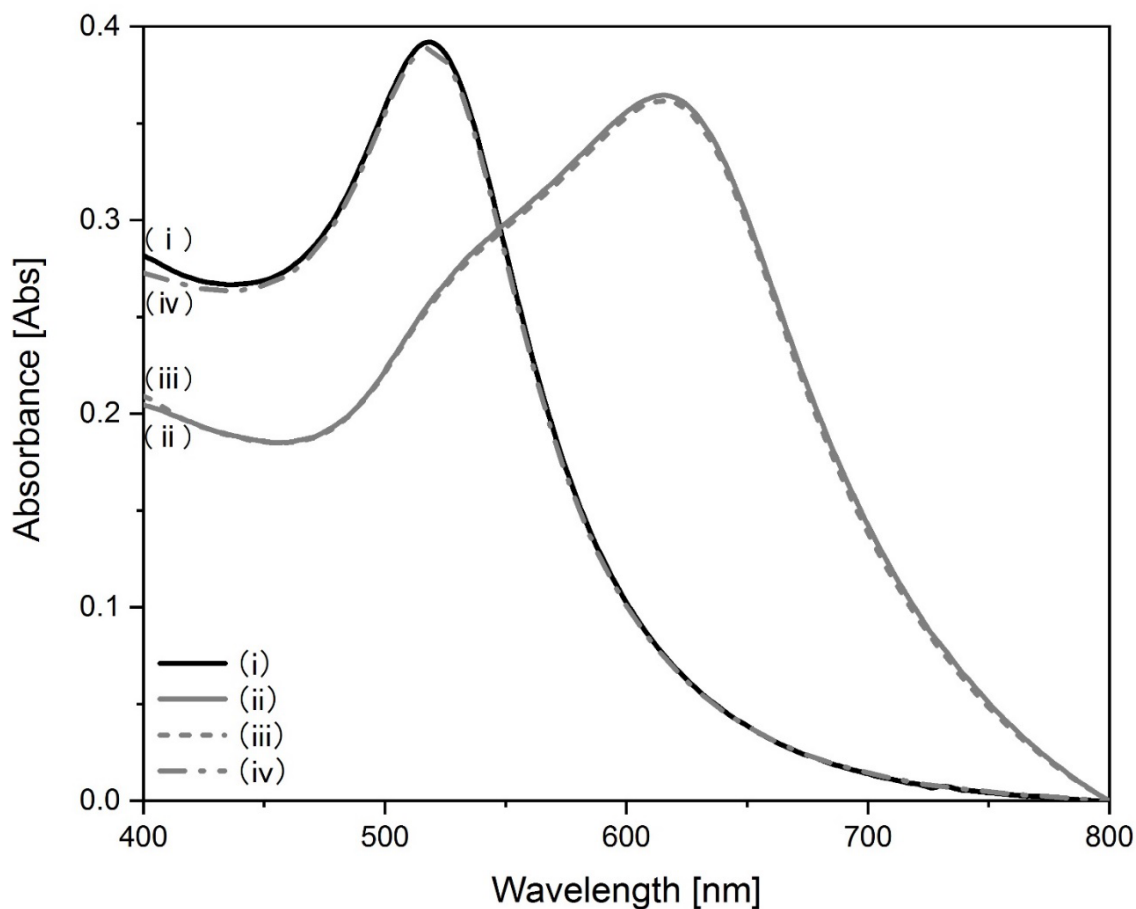


Figure 2-10 (i) Milli-Q, (ii) 地下水, (iii) 孔径 0.2- $\mu\text{m}$  メンブレンフィルターでろ過した地下水, (iv) 孔径 0.2- $\mu\text{m}$  メンブレンフィルターでろ過して陽イオン交換樹脂に通した地下水中の AuNPs 吸収スペクトル.

陽イオンをマスクするための前処理として, EDTA の添加を検討した. 実地下水サンプルに EDTA (10 nM) を添加すると, As(III) を含まない地下水でも As(III) を含む地下水でも AuNP の凝集が抑制された(データ非表示). したがって, EDTA はこの方法のマスキング剤としては不向きであった. これは EDTA によって AuNP の表面が保護されたためと考えられる.

Figure 2-11 は, As(III) を添加した地下水サンプルの濃度と, 本法で測定した濃度との関係を示している. 2 つの地下水サンプルに As(III) が含まれていなかったため, サンプルにはさまざまな濃度の As(III) を添加した. 2.0  $\mu\text{M}$  以上の As(III) を含む地下水試料では, 本法で測定した As(III) 濃度は, スパイクされた溶液とほぼ同じであったが, 1.0  $\mu\text{M}$  以下の As(III) 濃度は本法では過大評価されていた. このことから, 本法は 2.0  $\mu\text{M}$  以上の地下水試料中の As(III) 濃度の簡易測定に適用できると結論付けた.

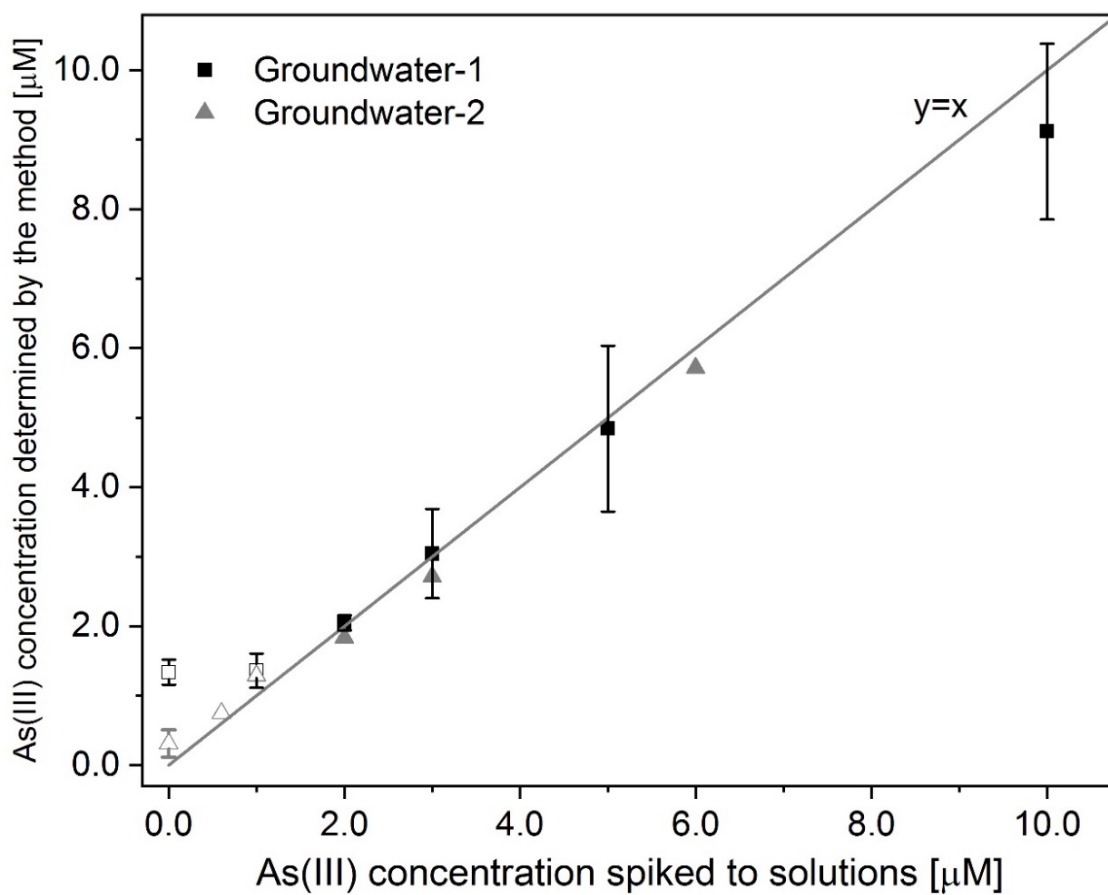


Figure 2-11 地下水サンプルに添加された As(III)濃度と本手法で定量された As(III)濃度との関係

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

ZhanらはArs-3とAuNPsを使用してAs(III)濃度を測定した[12]. Zhanらが開発した簡易As(III)分析法のLODは0.017  $\mu\text{M}$ であり, 本研究よりも低い[12]. この理由は本研究で使用したNaCl最終濃度の差, 及び使用したAuNPsの分析前における分散の程度に違いがある(Zhanらは実験室で作製したAuNPsを使用しており, 本研究では市販したAuNPsを使用した)ことが原因であると考えられる. しかし, 高濃度の金属イオンに対する阻害についての解決策は示されていない. WuらはArs-3, AuNPsを用いた比色法を利用したAs(III)測定用バイオセンサーを開発しており, 本簡易As(III)分析法との違いはAuNPsの凝集においてNaClの代わりにカチオン性ポリマーやカチオン性界面活性剤を使用していることである[18]. SongらはAu@Agコアシェルナノ粒子を利用した最先端のバイオセンサーを開発した[23]. これらの先行研究において検出限界値は本研究よりも低い. しかし, これらの先行研究は環境中のAs(III)濃度測定は行われていない. 先行研究で示された結果はArs-3とAuNPsを用いて水中のAs(III)濃度の測定が可能であることを示したが, 地下水中などの比較的高濃度の陽イオンが含まれているサンプルには適用していない. 本研究は陽イオン交換を前処理として組み合わせることでArs-3とAuNPsを用いた比色法で地下水中のAs(III)濃度が測定できたことを示した.

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 2.3.8 As(III)・As(V)混合サンプル中におけるAs(III)濃度測定

2.3.7 までの結果より, 本研究で開発した簡易 As(III)分析法によって地下水中の As(III)濃度を測定することができた. しかしながら, 地下水中の As は酸化還元状態, pH 値, バックグラウンドイオン, 有機物, 微生物の活性等の因子によって化学種が不安定であることが多く, 地下水中に As(III)と As(V)が混合している事例もある[24, 25]. Figure 2-8 より, 我々の開発した簡易 As(III)分析法は As(V)をはじめとした As(III)以外の金属イオンと反応しないことが明らかとなった. そのため, As(III)および As(V)共存サンプル中の As(III)濃度を選択的に定量可能だと考えた.

簡易 As(III)分析法を用いて, As(III)と As(V)を含む超純水中の As(III)濃度 (Figure 2-12)と地下水中の As(III)濃度 (Figure 2-13)を定量した. Figure 2-12 において, 本手法で定量された As(III)濃度は超純水中に添加した As(III)濃度とほぼ同じであった. また, 超純水中における, 本手法で定量された As(III)濃度と超純水中に添加した As(III)濃度との一致率(回収率)は 85~130%であった. Figure 2-13 では, As(III)濃度が 5.0  $\mu\text{M}$  以上の地下水における As(III)濃度の定量値は, 地下水に添加した As(III)濃度とほぼ同じであった. また, 地下水における, 本手法で定量された As(III)濃度と地下水に添加した As(III)濃度との一致率(回収率)は地下水中で 85-98%であった. しかし, As(III)を含まない地下水試料 (As(V) = 50  $\mu\text{M}$ ) では, 3.6  $\mu\text{M}$  と過大評価した. この過大評価の原因は, 本手法において, LOD より低い As(III)濃度を定量したことに起因するものだと考えられる. 従って, 本法は超純水や地下水中の As(V)等をはじめとした混合金属イオンを含む試料において, LOD 以上の As(III)濃度を定量することができた.

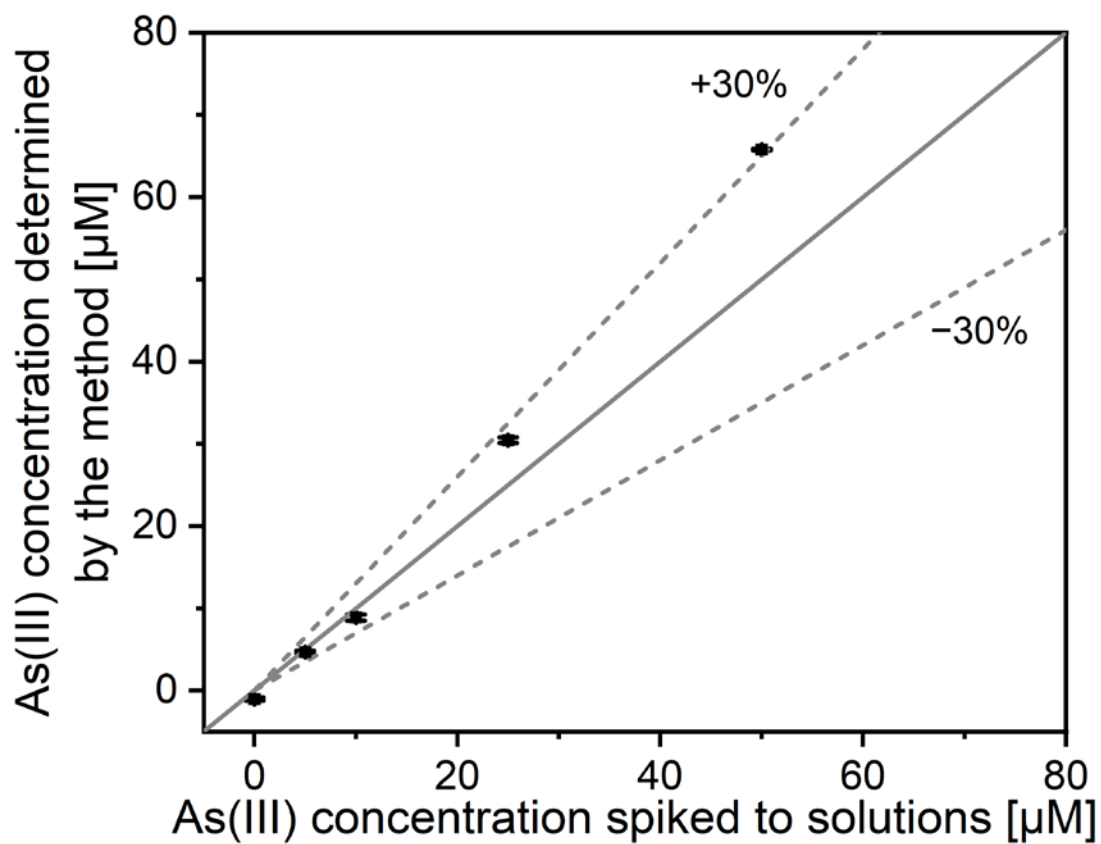


Figure 2-12 As(III)添加超純水サンプルの As(III)濃度と本手法で定量された As(III)濃度の関係.  
各試料溶液中の総 As 濃度 = 50 μM.

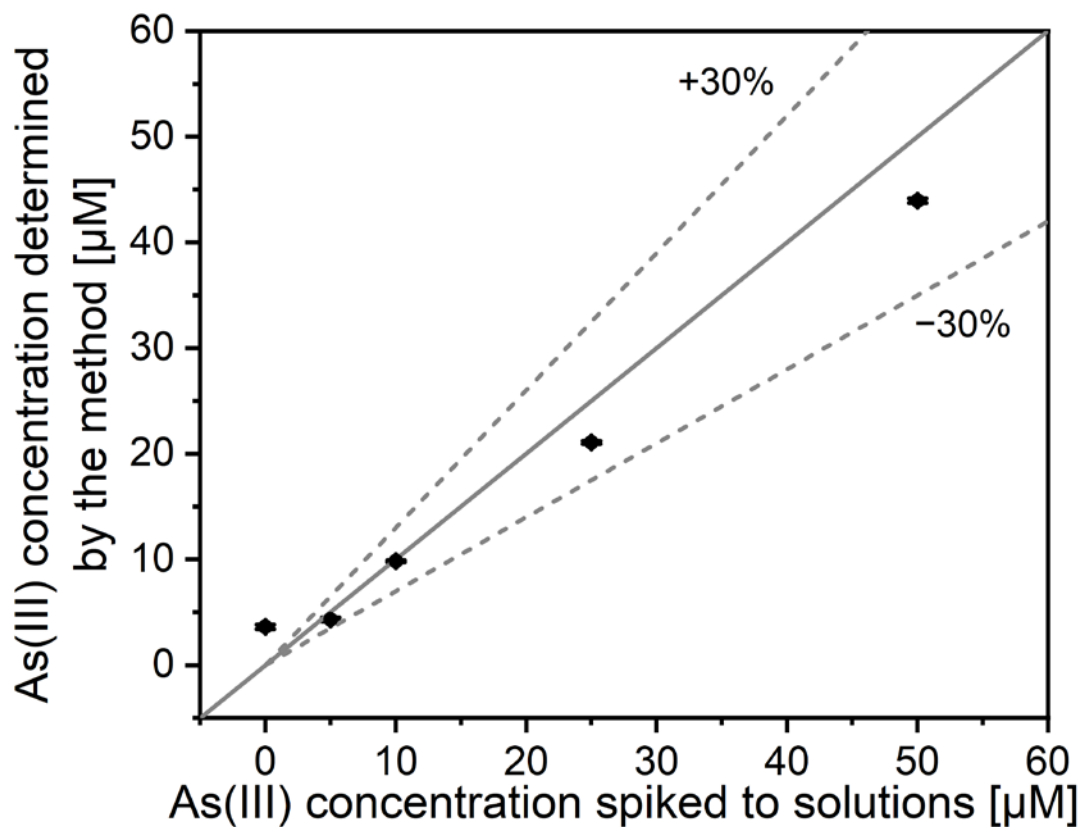


Figure 2-13 As(III)添加地下水サンプルの As(III)濃度と本手法で定量された As(III)濃度の関係.  
各試料溶液中の総 As 濃度 = 50 μM.

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 2.4 結論

本研究では, DNA アプタマーと AuNP を用いて, 地下水中の As(III)濃度を測定する簡易分析法を開発した. 本法の感度に影響を与えるパラメーターである, NaCl 最終濃度とインキュベーション時間, 緩衝液の pH を最適化した. 総分析時間は 65 分, LOD は 2.1  $\mu\text{M}$  であった. 陽イオン交換による前処理を行うことで, 様々な金属カチオンを高濃度で含む地下水の As(III)濃度を測定することができた. 高濃度の As(V)や様々な金属カチオンを含む超純水, 及び地下水中の As(III)濃度について, Ars-3 を用いて選択的に測定することができた.

上記の簡易 As(III)分析法の開発において, プローブ溶液中に分散している Ars-3 について, Ars-3 以外の他の ssDNA 配列を用いて, AuNPs 表面における Ars-3 と As(III)の相互作用を調べた. その結果, Ars-3 は As(III)に特異的に結合することはできず, 我々の開発した As(III)の簡易分析法は Ars-3 だけでなく, 他の ssDNA 配列を用いて As(III)濃度を定量できることが判明した. また, Ars-3 (100-mer)よりも短い ssDNA を用いると, 検量線の傾きが大きくなり, As(III)の検出感度が向上することが判明した.

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

### 参考文献

1. Chung CJ, Huang YL, Huang YK, et al (2013) Urinary arsenic profiles and the risks of cancer mortality: A population-based 20-year follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan. *Environ Res* 122:25–30. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.11.007>
2. Flora SJS (2015) *Handbook of Arsenic Toxicology*, 1st ed. © Academic Press 2015
3. Singh R, Singh S, Parihar P, et al (2015) Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 112:247–270. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.009>
4. Mohammed Abdul KS, Jayasinghe SS, Chandana EPS, et al (2015) Arsenic and human health effects: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 40:828–846. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.09.016>
5. WHO (2011) *Guidelines for Drinking-Water Quality - Fourth Edition*
6. USEPA (2018) *National Primary Drinking Water Regulations*. <https://www.epa.gov/groundwater-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>
7. Mandal BK, Suzuki KT (2002) Arsenic round the world: A review. *Talanta* 58:201–235. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00268-0)
8. Chowdhury UK, Biswas BK, Chowdhury TR, et al (2000) Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India. *Environ Health Perspect* 108:393–397. <https://doi.org/10.2307/3454378>
9. Ma J, Sengupta MK, Yuan D, Dasgupta PK (2014) Speciation and detection of arsenic in aqueous samples: A review of recent progress in non-atomic spectrometric methods. *Anal Chim Acta* 831:1–23. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.04.029>
10. Wu Y, Liu L, Zhan S, et al (2012) Ultrasensitive aptamer biosensor for arsenic(III) detection in aqueous solution based on surfactant-induced aggregation of gold nanoparticles. *Analyst* 137:4171–4178. <https://doi.org/10.1039/c2an35711a>
11. Kaur H, Kumar R, Babu JN, Mittal S (2015) Advances in arsenic biosensor development - A comprehensive review. *Biosens Bioelectron* 63:533–545. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.003>
12. Zhan S, Yu CM, Lv CJ (2014) Colorimetric Detection of Trace Arsenic ( III ) in Aqueous Solution Using Arsenic Aptamer and Gold Nanoparticles. *Aust J Chem* 67:813–818. <https://doi.org/10.1071/CH13512>

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

13. Jena BK, Raj CR (2008) Gold nanoelectrode ensembles for the simultaneous electrochemical detection of ultratrace arsenic, mercury, and copper. *Anal Chem* 80:4836–4844. <https://doi.org/10.1021/ac071064w>
14. 矢嶋撰子, 長岡勉, 椎木弘 (2021) 化学センサ・バイオセンサ. 共立出版
15. Kim M, Um HJ, Bang S, et al (2009) Arsenic removal from Vietnamese groundwater using the arsenic-binding DNA aptamer. *Environ Sci Technol* 43:9335–9340. <https://doi.org/10.1021/es902407g>
16. Cui L, Wu J, Ju H (2016) Label-free signal-on aptasensor for sensitive electrochemical detection of arsenite. *Biosens Bioelectron* 79:861–865. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.01.010>
17. Wu Y, Wang F, Zhan S, et al (2013) Regulation of hemin peroxidase catalytic activity by arsenic-binding aptamers for the colorimetric detection of arsenic(III). *RSC Adv* 3:25614–25619. <https://doi.org/10.1039/c3ra44346a>
18. Wu Y, Zhan S, Wang F, et al (2012) Cationic polymers and aptamers mediated aggregation of gold nanoparticles for the colorimetric detection of arsenic(iii) in aqueous solution. *Chem Commun* 48:4459–4461. <https://doi.org/10.1039/c2cc30384a>
19. Sankararamkrishnan N, Chauhan D, Nickson RT, et al (2008) Evaluation of two commercial field test kits used for screening of groundwater for arsenic in Northern India. *Sci Total Environ* 401:162–167. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.042>
20. Van Geen A, Cheng Z, Seddique AA, et al (2005) Reliability of a commercial kit to test groundwater for arsenic in Bangladesh. *Environ Sci Technol* 39:299–303. <https://doi.org/10.1021/es0491073>
21. Wu Y, Liu L, Zhan S, et al (2012) Ultrasensitive aptamer biosensor for arsenic(iii) detection in aqueous solution based on surfactant-induced aggregation of gold nanoparticles. *Analyst* 137:4171–4178. <https://doi.org/10.1039/c2an35711a>
22. Zhan S, Yu M, Lv J, et al (2014) Colorimetric detection of trace arsenic (III) in aqueous solution using arsenic aptamer and gold nanoparticles. *Aust J Chem* 67:813–818
23. Song L, Mao K, Zhou X, Hu J (2016) A novel biosensor based on Au@Ag core-shell nanoparticles for SERS detection of arsenic (III). *Talanta* 146:285–290. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.052>
24. Christodoulidou M, Charalambous C, Aletrari M, et al (2012) Arsenic concentrations in

## 第2章 DNA アプタマーと金ナノ粒子を用いた簡易ヒ素(III)分析法の開発

- groundwaters of Cyprus. *J Hydrol* 468–469:94–100. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2012.08.019>
25. Tao D, Shi C, Guo W, et al (2022) Determination of As species distribution and variation with time in extracted groundwater samples by on-site species separation method. *Sci Total Environ* 808:151913. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151913>
26. Zong C, Liu J (2019) The Arsenic-Binding Aptamer Cannot Bind Arsenic: Critical Evaluation of Aptamer Selection and Binding. *Anal Chem* 91:10887–10893. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02789>
27. Zong C, Zhang Z, Liu B, Liu J (2019) Adsorption of Arsenite on Gold Nanoparticles Studied with DNA Oligonucleotide Probes. *Langmuir* 35:7304–7311. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b01161>
28. Berlina AN, Sotnikov D V., Komova NS, et al (2021) Limitations for colorimetric aggregation assay of metal ions and ways of their overcoming. *Anal Methods* 13:250–257. <https://doi.org/10.1039/d0ay02068k>
29. Hoops S, Gauges R, Lee C, et al (2006) COPASI - A COmplex PAthway SIMulator. *Bioinformatics* 22:3067–3074. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl485>

## 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

### 3.1 背景

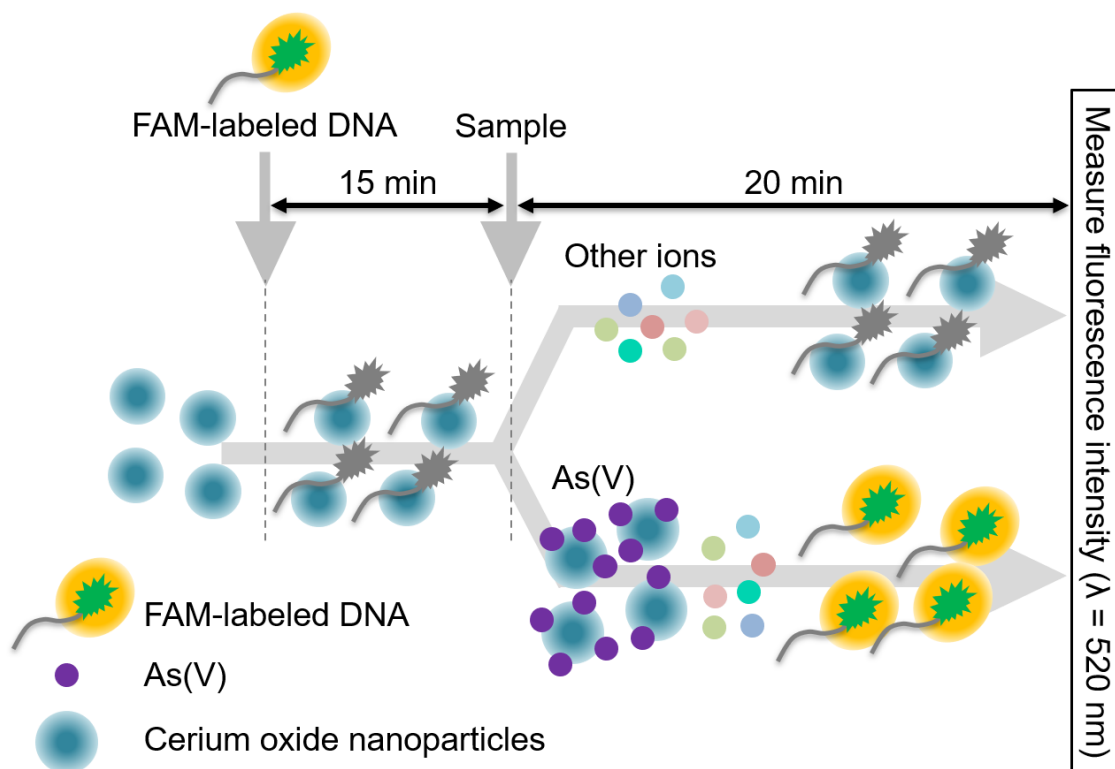
第2章では、DNA アプタマーと AuNPs を用いた、As(III)を標的とした簡易分析法を開発した。しかし、環境中には As(III)のみならず、As(V)も存在しており、これによる健康被害も発生している。無機態 As には、ヒ酸塩(As(V))と亜ヒ酸塩(As(III))の2つの一般的な酸化状態を持つ。As(V)は As(III)と比較すると毒性は弱いものの、好氣的な環境中で存在することが多いため、地下水のみならず、河川水や湖沼水中に存在することが多く、As(III)よりも広い地域で検出される。そのため、As(III)を標的とした簡易分析法のみならず、As(V)を標的とした簡易分析法も必要だと考えた。

しかしながら、第2章で紹介した DNA アプタマーを用いる方法では As(V)は分析できない。As(V)は中性付近の pH において陰イオンとして存在しており[1, 2], DNA アプタマーを形成しているリン酸骨格と静電的な反発を起こすため、特異的な結合ができないと考えられる。また、As(V)の第一酸解離定数 ( $pK_{a1}$ ) = 2.24 であり、pH を変化させて As(V)の電荷を  $\pm 0$  にしてから DNA アプタマーと結合させようとする、pH を 2.24 未満にする必要がある。この pH 条件下では、DNA は脱プリン反応によって、アデニン・グアニンが切断され DNA アプタマーの塩基配列が変化する。このため、DNA アプタマーを用いて As(V)を検出することは不可能である。よって、簡易 As(V)分析法は DNA アプタマーとは異なるアプローチを用いた方法で開発する必要がある。As(V)のみを検出することは困難であるが、As(V)のみを検出する手法はいくつか開発されており、ポリマーハイドロゲル、低分子、金ナノ粒子、二価金属ナノ粒子を使用している[5]。しかしながら、これらの報告ではプラットフォームの開発までは実施されているものの、実環境への適用評価まではなされていない。

近年、ナノマテリアルを分析に利用することが注目されている。ナノマテリアルは一般的に高い比表面積を持ち、高い感度を獲得できる可能性がある。その一つが金属酸化物ナノ粒子(MONP)である。MONP は、DNA の吸着による蛍光の消光[3], 特定のアニオンの存在下では吸着された DNA の脱着の能力について実験された[21]。DNA を吸着させた MONP は、アニオン検出用のセンサープラットフォームとして有用であると考えられる。これまでの研究では、酸化鉄ナノ粒子( $Fe_3O_4NP$ )が As(V)センサーとして使用されているが、これは As(V)が  $Fe_3O_4NP$  の表面に吸着する性質を利用した手法である[21, 22]。別の研究では、酸化セリウムナノ粒子( $CeO_2NP$ )が、多くの基質を酸化できる一般的な酸化酵素であることが示された[3]。また、 $CeO_2NP$  はその表面に As(V)を吸着し、その DNA 吸着親和性は  $Fe_3O_4NP$  よりも強かった[5, 21, 23]。しかし、選択性に乏しいため、環境モニタリングへの応用は極めて限られていた[5, 24]。

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

本研究では、様々な種類の地下水に含まれる As(V)濃度を蛍光分光法で測定するための簡便な分析法を開発した。Scheme 3-1 は、本手法のセンシングメカニズムを示している。まず、フルオレセイン (FAM) 修飾 DNA を CeO<sub>2</sub>NP とインキュベートさせる。FAM 修飾 DNA は CeO<sub>2</sub>NP の表面に吸着され、蛍光が消される可能性がある。次に、サンプルを溶液中に加える。As(V)が存在しない場合、FAM 修飾 DNA -CeO<sub>2</sub>NPs 複合体は溶液中に留まっている。一方、As(V)が存在すると、吸着していた FAM 修飾 DNA が CeO<sub>2</sub>NPs から脱着し、その結果、蛍光シグナルが回復する。従って、FAM に由来する蛍光強度 (Ex:495nm, Em:520nm) を測定することで、As(V)の濃度を定量的に分析することができる。



Scheme 3-1 FAM 修飾 ssDNA と酸化セリウムナノ粒子を用いた水溶液中の As(V)比色検出法の原理の模式図

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

#### 3.2 実験方法

##### 3.2.1 本研究にて用いた試薬

すべての FAM 修飾 DNA は、ユーロフィンズ・ゲノミクス株式会社(東京, 日本)から入手した. Table 3-1 に本研究で使用した塩基配列の一覧を示す. 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)は、ナカライテスク株式会社から入手した. CeO<sub>2</sub>NPs (カタログ番号 643009-100ML)は、Sigma-Aldrich Japan から入手した. As(V)は、富士フイルム和光純薬株式会社から入手した 60%ヒ酸溶液 (H<sub>3</sub>AsO<sub>4</sub>)を使用した. すべての溶液は Milli-Q 水(メルクミリポア)で調製した.

Table 3-1 本研究で使用した DNA 配列 (FAM:フルオレセイン)

DNA 名称	塩基配列
FAM-C <sub>6</sub>	5'-[FAM]-CCCCCC-3'
FAM-C <sub>12</sub>	5'-[FAM]-CCCCCCCCCCCC-3'
FAM-C <sub>18</sub>	5'-[FAM]-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-3'
FAM-C <sub>24</sub>	5'-[FAM]-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-3'
FAM-C <sub>30</sub>	5'-[FAM]-CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC-3'

##### 3.2.2 CeO<sub>2</sub>NPs と FAM 修飾 ssDNA を用いた As(V)の定量試験

10-mM HEPES 緩衝液 (pH:7.6) に CeO<sub>2</sub>NPs 分散液と FAM 修飾 DNA 溶液を加えてプローブ溶液を調製した. 15 分後, プローブ溶液 20 μL をマイクロチューブに加えた. その後, サンプル溶液 20 μL をマイクロチューブ内のプローブ液と混合した. この混合液を室温で 20 分間インキュベートした後, 混合液の波長 518 nm の蛍光強度を測定した.

CeO<sub>2</sub>NPs と FAM 修飾 ssDNA の濃度, FAM 修飾 ssDNA の塩基長, 試料とのインキュベーション時間が, 本手法の感度に及ぼす影響を調べた. CeO<sub>2</sub>NPs の濃度を最適化するために, 試験溶液の最終的な CeO<sub>2</sub>NPs 濃度を 0 から 60 μg/mL まで変化させた. 1 μM の As(V)を添加した試料 (POS)と As(V)を添加しない試料 (NEG)の波長 518 nm での蛍光強度を比較し, R Version 3.5.2 を用いて Student's t-test で POS と NEG の差を分析した.

CeO<sub>2</sub>NP からの FAM 修飾 ssDNA の離脱定数 (K<sub>d</sub>)を算出するために, 吸着平衡実験を行った. 吸着平衡実験では, 1.5 mL チューブにプローブ溶液 (10-mM HEPES 緩衝液 (pH:7.6) 中に, CeO<sub>2</sub>NPs 分散液 (0~60 μg/mL)と FAM 修飾 ssDNA 溶液 (400 nM)を混合した溶液)を 20 μL 加えた. コントロール試料として 10-mM HEPES 緩衝液 (pH:7.6)を用意した. 蛍光スペクトルを測定し

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

その後、波長 518 nm の蛍光強度と FAM 修飾 DNA の濃度の検量線を用いて、吸着した ssDNA の濃度を算出した。得られたデータは、式(3-1)を用いて Langmuir モデルにフィットさせた。

$$q_e = \frac{Q_m b C_e}{1 + b C_e} \quad (3-1)$$

ここで、 $q_e$  は  $CeO_2$ NPs に吸着した ssDNA の濃度 [nM]、 $C_e$  は非吸着 ssDNA の平衡濃度 [nM]、 $Q_m$  は ssDNA の最大吸着容量 [nM]、 $b$  は吸着エネルギーの定数である。

FAM 修飾 ssDNA の濃度を最適化するために、 $CeO_2$ NPs の最終濃度を最適化した後に、プローブ溶液とサンプル溶液の混合溶液中の FAM 修飾 ssDNA の最終濃度を 0 から 500 nM まで変化させ、POS と NEG のサンプルの蛍光強度を比較した。

DNA 塩基長を最適化するために、FAM 修飾 poly-Cytosine DNA (表 1) を用いて、As(V) による DNA 解離反応を調べた。すべてのデータを用いて、POS サンプルと NEG サンプルの蛍光強度の差 ( $\Delta F$ ) を算出した。

サンプル添加後のインキュベーション時間を最適化するために、POS サンプルと NEG サンプルのそれぞれ 3 つのプローブ溶液とサンプル溶液の混合溶液を、サンプル添加後 30 分間インキュベーションし、6 分ごとに蛍光強度を測定して  $\Delta F$  を算出した。

上述のパラメーターを最適化した後、さまざまな As(V) 濃度で本手法の検量線を作成した。10 個のブランク試料 (Milli-Q 水) と、個々の As(V) 濃度の As(V) 標準溶液の 3 つの試料の蛍光スペクトルを測定した。518nm の蛍光ピークを対応する As(V) 濃度に対してプロットした。また、 $0.5 \mu\text{M}$  以上の As(V) 濃度で直線回帰を行い、検量線を得た。この結果に基づいて、検出限界 (LOD) 値を  $3\sigma/s$  の式を用いて推定した。ここで  $\sigma$  は 10 個のブランク試料の標準偏差、 $s$  は回帰直線の傾きである。

本法の選択性は、環境的に重要なアニオンである As(V) に対して、 $H_3AsO_4$ 、 $NaAsO_2$ 、 $H_3BO_3$ 、 $NaHCO_3$ 、 $Na_2CO_3$ 、 $NaNO_3$ 、 $NaF$ 、 $K_2HPO_4$ 、 $Na_2SO_3$ 、 $Na_2SeO_4$ 、 $KBr$ 、 $KI$  を  $10 \mu\text{M}$  添加した溶液の蛍光強度を測定することで評価した。陽イオンでは、 $NaCl$ 、 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 $KCl$ 、 $CaCl_2$ 、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、 $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 、 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 、 $CoCl_2$ 、 $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 、 $ZnCl_2$ 、 $HgCl_2$ 、 $(CHCOO)_2Pb \cdot 3H_2O$  を選択性試験として用いた。 $\Delta F$  は、Steel 検定を用いて比較した。

地下水サンプルは 2019 年 2 月に北海道大学より採取した。地下水には As が含まれていなかったため、定量試験のために As(V) を異なる濃度で地下水にスパイクした。試料は、 $0.2 \mu\text{m}$  の孔径の膜 (ADVANTEC 株式会社) でろ過した後、陽イオン交換カラム (MetaSEP IC-MC, GL Sciences 社) に通した。その後、ICP-MS および HPLC-ICP-MS を用いて、As(V) 濃度を測定し、両者を比較

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

した.

#### 3.2.3 実験装置とソフトウェア

蛍光強度は, 蛍光分光光度計 FP-6600(日本分光株式会社, 東京)を用いて測定した. 地下水中の金属イオン濃度は, 高速液体クロマトグラフ(島津製作所, SLC-10Avp システム)に接続された GelPack GL-IC-A カラム(日立化成)を通過させ, 誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS, Thermo, iCAP Qc)に導入し, ICP-MS システムで測定した(Kamei-Ishikawa, Segawa, et al.2017). 本研究では, 統計解析において R Version 3.5.2 を使用した.

3.3 結果と考察

3.3.1 蛍光強度に及ぼす CeO<sub>2</sub>NP と FAM 修飾 DNA の濃度の影響

CeO<sub>2</sub>NPs と FAM 修飾 ssDNA の濃度は、全パラメーター中最重要であるため、CeO<sub>2</sub>NPs の最終濃度と FAM 修飾 DNA の濃度が蛍光強度に及ぼす影響を調べた。Figure 3-1 は、POS および NEG サンプルの蛍光強度に対する CeO<sub>2</sub>NPs 最終濃度の影響を示したものである。両サンプルとも、CeO<sub>2</sub>NPs の濃度が高くなるにつれて、蛍光強度が低下した。15 μg/mL の CeO<sub>2</sub>NP 濃度でのみ、POS サンプルの蛍光強度は NEG サンプルよりも高くなり、統計的に有意な差が見られた ( $p=0.05$ )。POS 試料と NEG 試料の蛍光強度の差は、本手法の感度に関係するため、試験液の最終的な CeO<sub>2</sub>NP 濃度は 15 μg/mL とした。

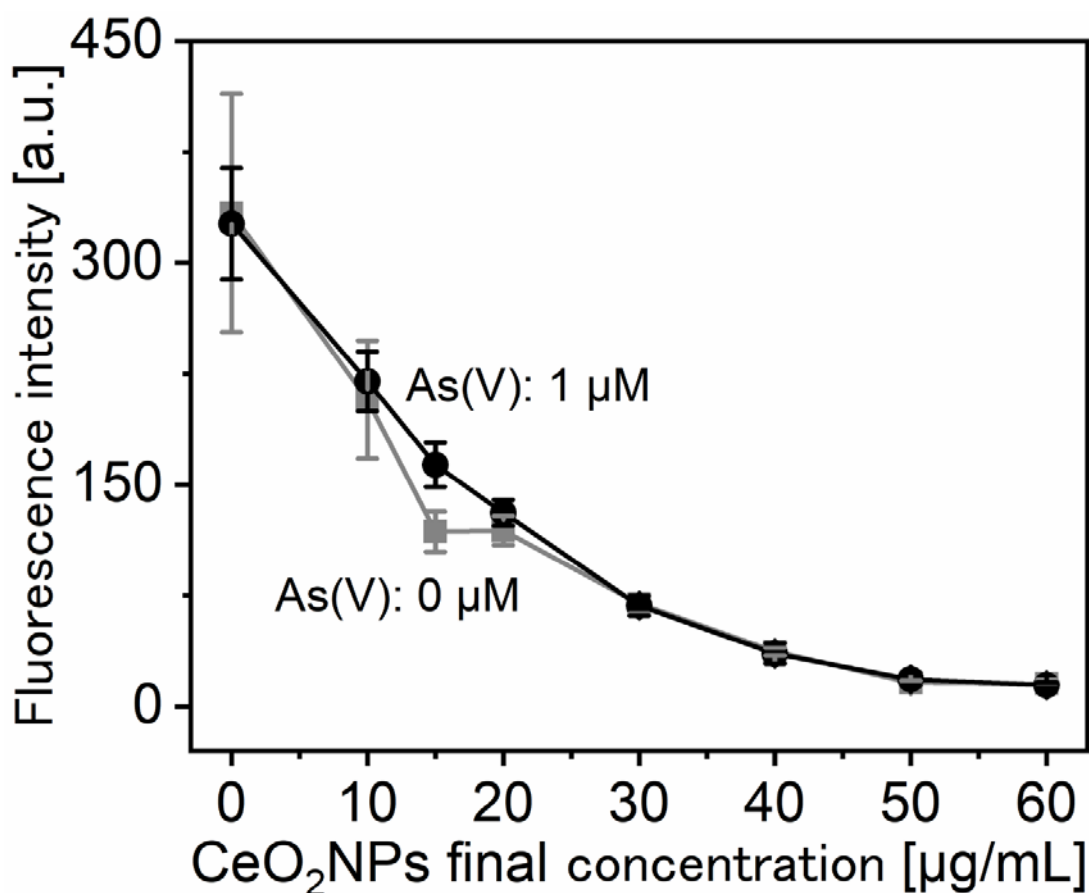


Figure 3-1 As(V)存在下(POS)および非存在下(NEG)におけるサンプル溶液の CeO<sub>2</sub>NPs 最終濃度が蛍光強度に与える影響。FAM 修飾 ssDNA として FAM-C<sub>6</sub>を使用。FAM-C<sub>6</sub>最終濃度 = 375 nM。試料添加後のインキュベーション時間 = 20 分。

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

0-10  $\mu\text{g/mL}$  では、解離した  $\text{As(V)}$  の量が少ないため、POS と NEG の間に差はなかった。20  $\mu\text{g/mL}$  以上では、試験液中の  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  の量が  $\text{FAM-C}_6$  の量よりも多かった。これは、遊離した  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  に  $\text{As(V)}$  が吸着し、 $\text{FAM-C}_6$  を添加しても脱離しなかったためと考えられる。NEG サンプルのプロットに結合曲線を当てはめ、 $\text{CeO}_2\text{NPs}$  からの DNA の脱離定数( $K_d$ )は 5.17  $\mu\text{g/mL}$  と算出された(Figure 4-2)。

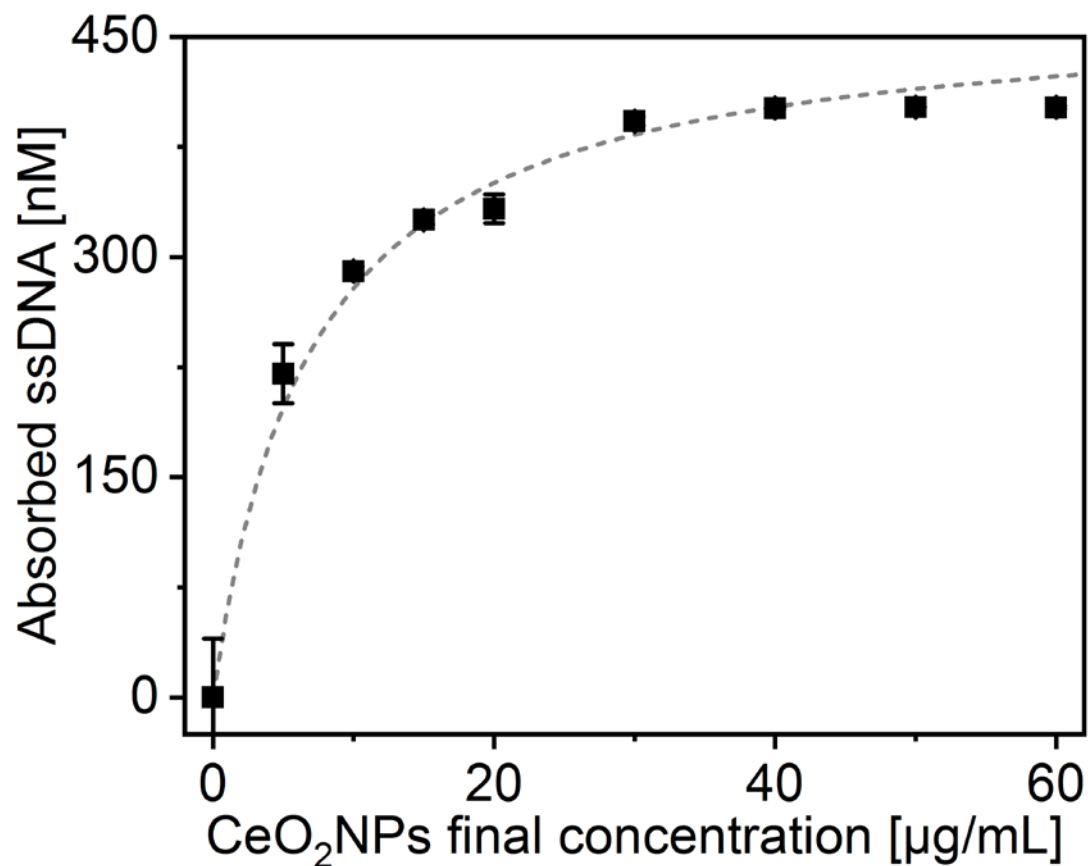


Figure 3-2  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  最終濃度に対する ssDNA 吸着濃度. 点線はラングミュア近似曲線.

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

また, FAM 修飾 ssDNA の最終濃度についても最適化した(Figure 4-3). NEG サンプルにおいて, FAM 修飾 ssDNA 最終濃度が 200 nM 以上で蛍光強度が高くなり始めた. FAM 修飾 ssDNA 最終濃度 = 300~400 nM では蛍光強度が線形的に増大したが, FAM 修飾 ssDNA 最終濃度 = 500 nM では蛍光強度の増大の程度が小さくなった. 理論上, 蛍光強度が高くなり始めた後は FAM 修飾 ssDNA 最終濃度が増大するにつれて, 蛍光強度は線形的に増大するが, 本実験では FAM 修飾 ssDNA が 500 nM では線形的な増大ではない, 理論とは異なる結果が得られた. この原因は実証できなかったが, 400 nM と 500 nM の結果に統計的に有意な差( $p = 0.05$ )がなかったため, 測定誤差によるものだと考えた. 一方で POS サンプルにおいて, FAM 修飾 ssDNA 濃度 = 100 nM 以上になると蛍光強度がわずかに増大し始めた. その後, FAM 修飾 ssDNA 濃度 = 200 nM, 300 nM, 400 nM となるにつれて蛍光強度が大幅に増大し, 400 nM のときに蛍光強度が最も高くなった. これは FAM 修飾 ssDNA 濃度 = 100 nM まで CeO<sub>2</sub>NPs 表面上に何も吸着されていないフリー-CeO<sub>2</sub>NPs が存在しており, フリー-CeO<sub>2</sub>NPs 表面に As(V)が吸着していたと考えられる. FAM 修飾 ssDNA 濃度 = 200 nM 以上になると, フリー-CeO<sub>2</sub>NPs が無くなり, FAM 修飾 ssDNA が吸着された CeO<sub>2</sub>NPs に As(V)が吸着され, FAM 修飾 ssDNA が脱着されたため, 蛍光強度が増大したと考えられる. FAM 修飾 ssDNA 濃度が 500 nM になると蛍光強度が減少したが, 400 nM と 500 nM の結果に統計的に有意な差( $p = 0.05$ )がなかったため, NEG サンプルと同様に測定誤差と考えた. POS サンプルと NEG サンプルの蛍光強度の差は, FAM 修飾 DNA 最終濃度が高くなるにつれて大きくなり, FAM 修飾 ssDNA 最終濃度 = 400 nM で最大となった. これらの結果から, FAM 修飾 ssDNA の最終濃度は 400 nM と判断した.

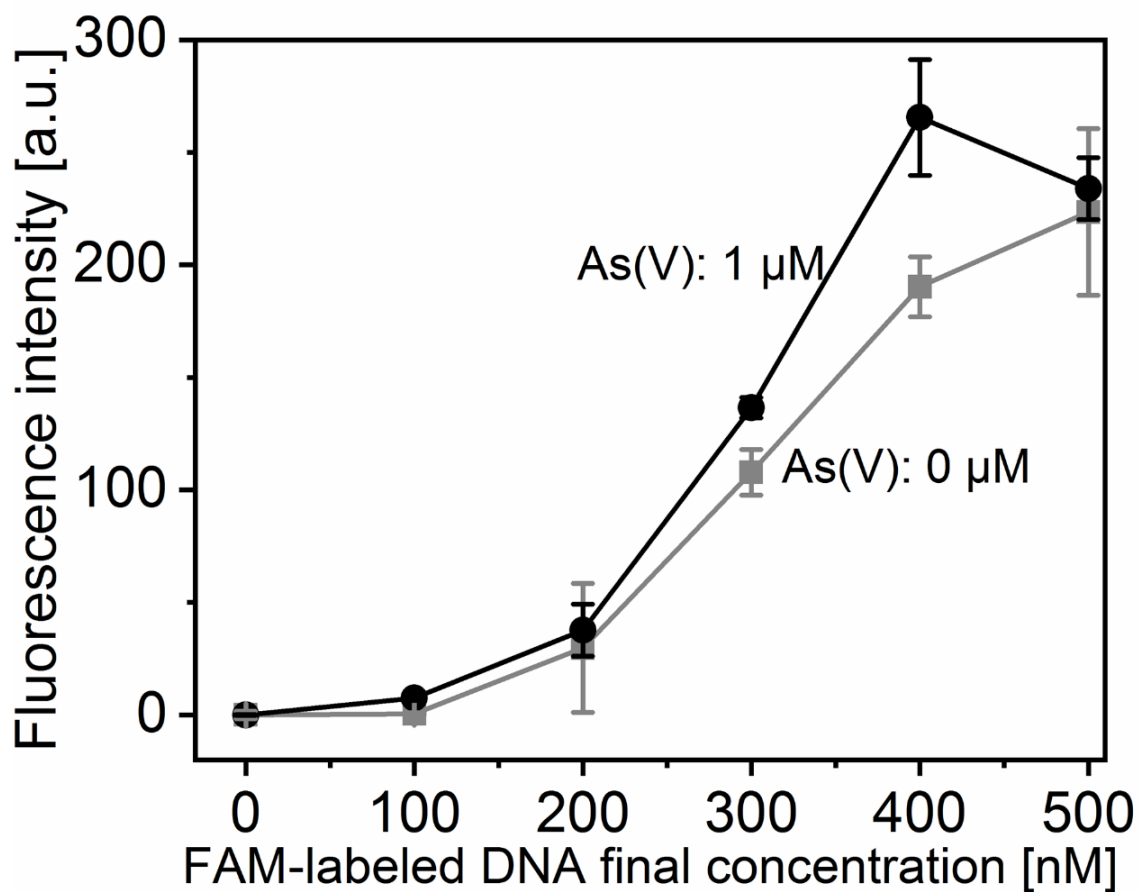


Figure 3-3 POS および NEG におけるサンプル溶液中の FAM 修飾 DNA 最終濃度による蛍光強度への影響.  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  最終濃度 =  $15 \mu\text{g/mL}$ , FAM 修飾 DNA として FAM- $\text{C}_6$  を使用, 試料添加後のインキュベーション時間 = 20 分.

3.3.2 FAM 修飾 ssDNA の塩基長が蛍光強度に及ぼす影響

ssDNA の塩基長が As(V) による ssDNA 解離反応に影響を与えることが予想された[22]. そこで, ssDNA の長さが  $\Delta F$  に与える影響を調べた. 使用したのは FAM-C<sub>n</sub> (n の変化量は 6 から 30 まで) である (Figure 3-4). これまでの研究で, 吸着はリン酸骨格を介して行われていることがわかっている. さらに, C<sub>6</sub> は 4 種類の塩基の中で最も高い吸着, 脱着親和性を示した[5, 22]. その結果, CeO<sub>2</sub>NPs に吸着した FAM-C<sub>6</sub> が脱着することで, As(V)濃度の増加に伴って蛍光強度が増加することがわかった (Figure 3-4, Scheme 3-1). C<sub>12</sub> 以上の塩基長の ssDNA は CeO<sub>2</sub>NPs 表面に強く吸着され, サンプル中に高濃度の As(V)が含有していても FAM-C<sub>n</sub> が脱着しなかったため,  $\Delta F$  が増大しなかった. 先行研究では, FAM-A<sub>15</sub> を MnO<sub>2</sub>NP に[25], FAM-C<sub>15</sub> を Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>NP に使用して[22], 蛍光消光と回復を実現している. このことから, CeO<sub>2</sub>NP 表面は, より短い FAM-C<sub>n</sub> を用いることで高感度化を狙えるユニークな特性を持つと結論づけた.

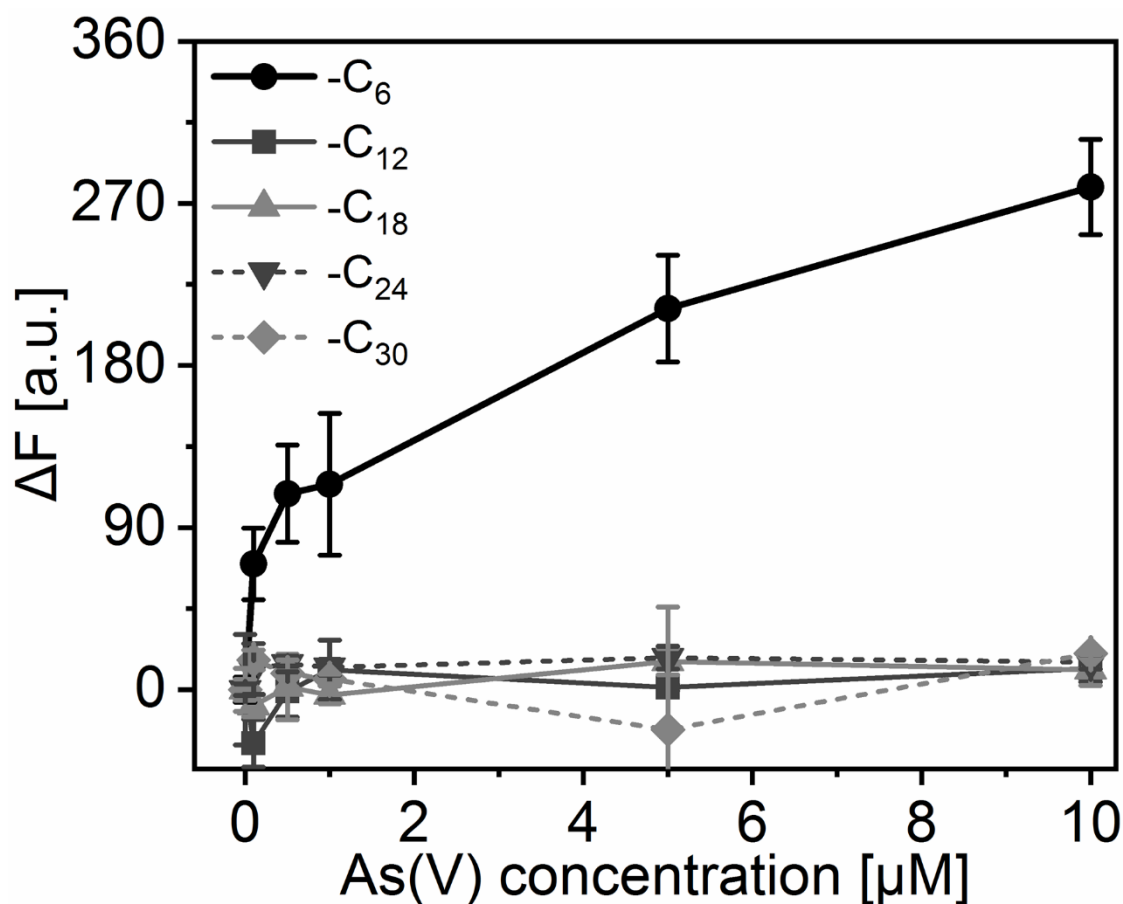


Figure 3-4 FAM 修飾 ssDNA の塩基長が検量線に与える影響. CeO<sub>2</sub>NPs の最終濃度: 15 μg/mL, 各 FAM 修飾 ssDNA の最終濃度: 400 nM, サンプル添加後のインキュベーション時間: 20 分とした.

3.3.3 試料添加後のインキュベーション時間が蛍光強度に及ぼす影響

Figure 3-5 は,  $\Delta F$  の時間変化を示したものである.  $\Delta F$  は最初の 6 分以内にすぐに増加し, FAM 修飾 ssDNA の  $\text{CeO}_2\text{NP}$  からの剥離が最初の 6 分以内に起こったことを示している.  $\Delta F$  の最大値は 18 分であった. 一方,  $\Delta F$  は 18 分までは増加せず, それ以降は増加した. これらの結果から, サンプル添加後の最適なインキュベーション時間は 6 分と決定された. この最適インキュベーション時間は,  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NP}$  や  $\text{MnO}_2\text{NP}$  を用いた過去の研究 (30 分以上) よりも短かった[22, 25]. このような迅速なシグナル変化は, As(V)簡易分析には優れた点である. これは,  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  表面の FAM- $\text{C}_6$  の密度が  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$  や  $\text{MnO}_2\text{NPs}$  よりも高かったため, 置換反応が促進されたものと考えられる.

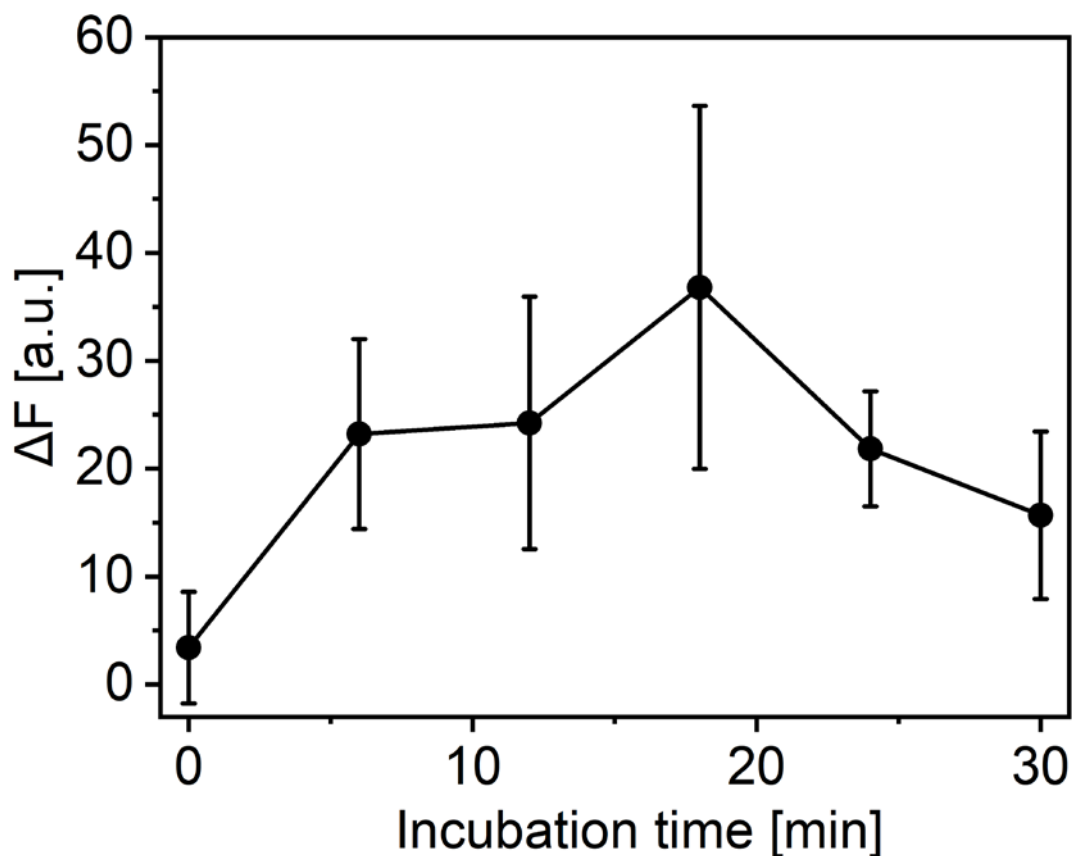


Figure 3-5 POS と NEG における試料添加後の試験液の  $\Delta F$  の時間変化.  $\text{CeO}_2\text{NPs}$  最終濃度 = 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , FAM 修飾 DNA として FAM- $\text{C}_6$  を使用, 最終 FAM- $\text{C}_6$  最終濃度 = 400 nM.

3.3.4 本手法の検量線

Figure 3-6 は、本法による As(V) の検量線である。試験液の  $\Delta F$  は、As(V) が  $0.5 \mu\text{M}$  未満では変化せず、As(V) 濃度が  $0.5 \mu\text{M}$  から  $100 \mu\text{M}$  への増加に伴い、蛍光強度が 40 から 385 まで対数的に増加した。検出限界 (LOD) は、 $0.44 \mu\text{M}$  と算出された。

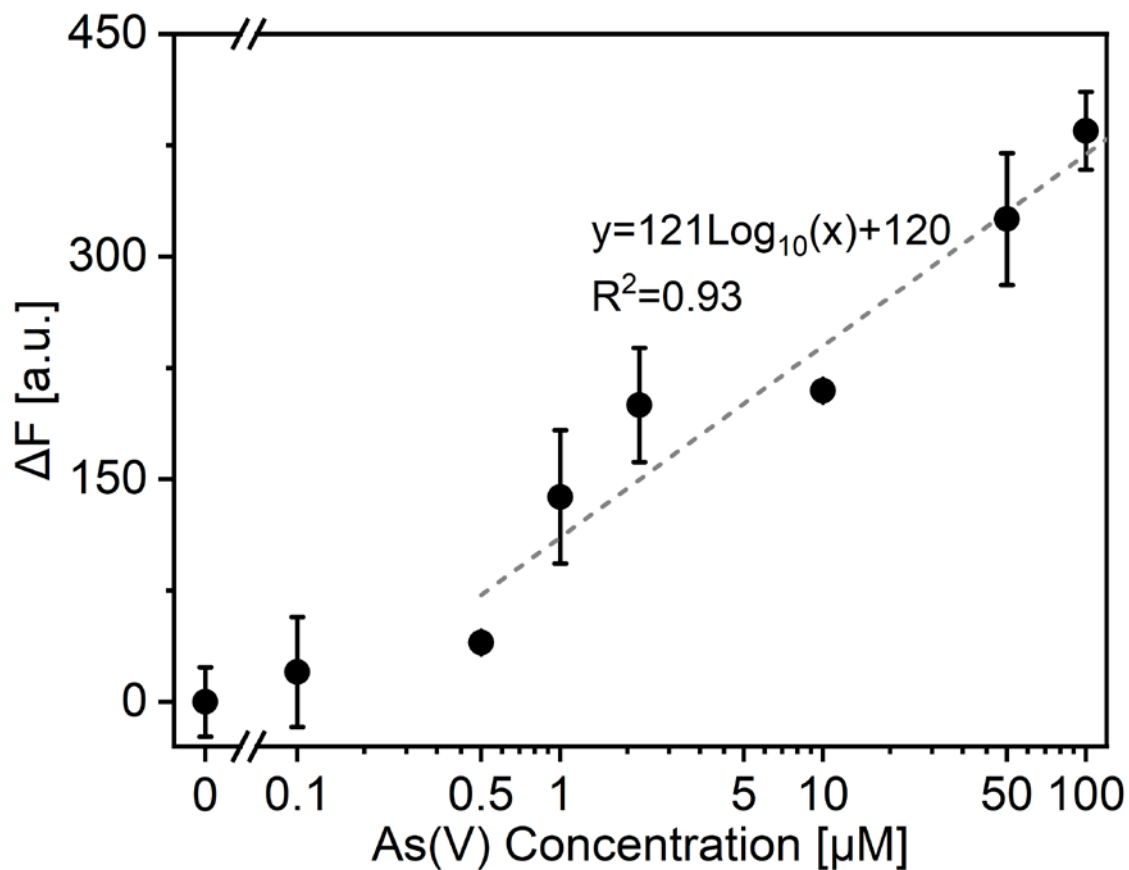


Figure 3-6 本手法の検量線. 点線は近似曲線を示す.

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

#### 3.3.5 本手法の選択性

Figure 3-7 は、異なるアニオンを含む試料の  $\Delta F$  を示している。As(V)を含む溶液の  $\Delta F$  は、ブランクサンプルの  $\Delta F$  よりも著しく高かった。硫酸塩を含む試料の  $\Delta F$  はブランク試料よりわずかに高く、炭酸塩とリン酸塩を含む試料の  $\Delta F$  はブランク試料よりわずかに低かった。陰イオンの中で統計分析を行った。ブランクと他のアニオン(As(V)を除く)の間には、統計的に有意な差( $p > 0.05$ )はなかった。しかし、100  $\mu\text{M}$  のアニオンを用いて阻害試験を行ったところ、ホウ酸塩とリン酸塩が妨害となった(Figure 3-8)。また、As(V)の代わりにホウ酸塩とリン酸塩を用いて本法の検量線を作成したところ、これらのアニオンの増加に伴い、蛍光強度が増加した(Figure 3-9)。このことから、本法ではホウ酸塩とリン酸塩が主な妨害物質であることがわかった。

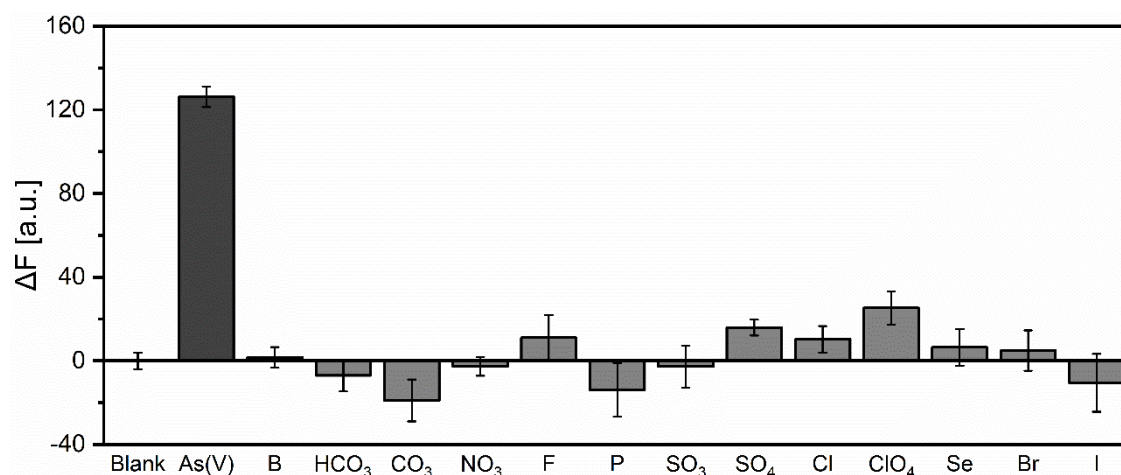


Figure 3-7 本手法のアニオンに対する選択性. 各アニオン濃度 = 10 $\mu\text{M}$ .

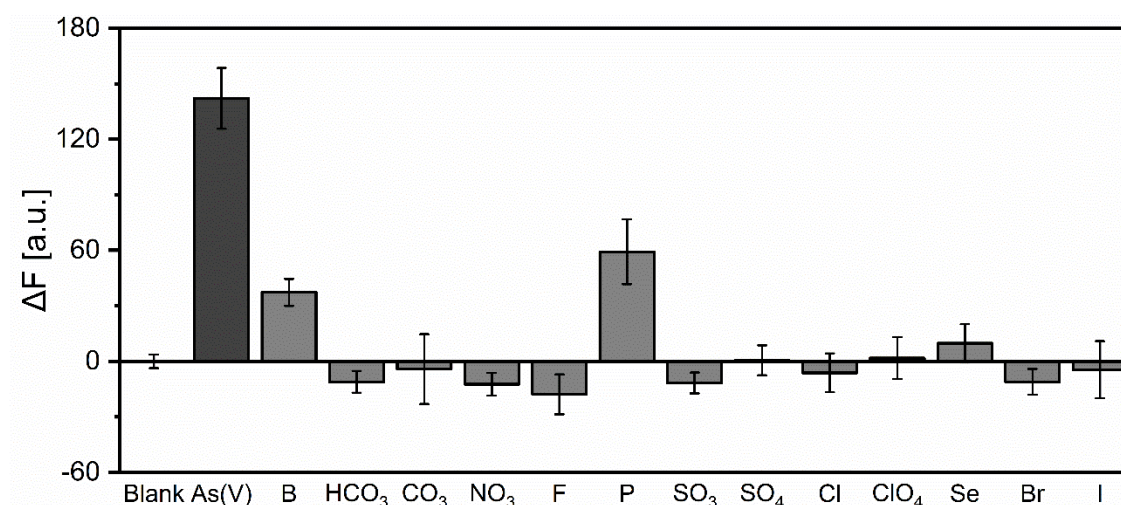


Figure 3-8 本手法のアニオンに対する選択性. As(V) = 10  $\mu\text{M}$ , その他 = 100  $\mu\text{M}$ .

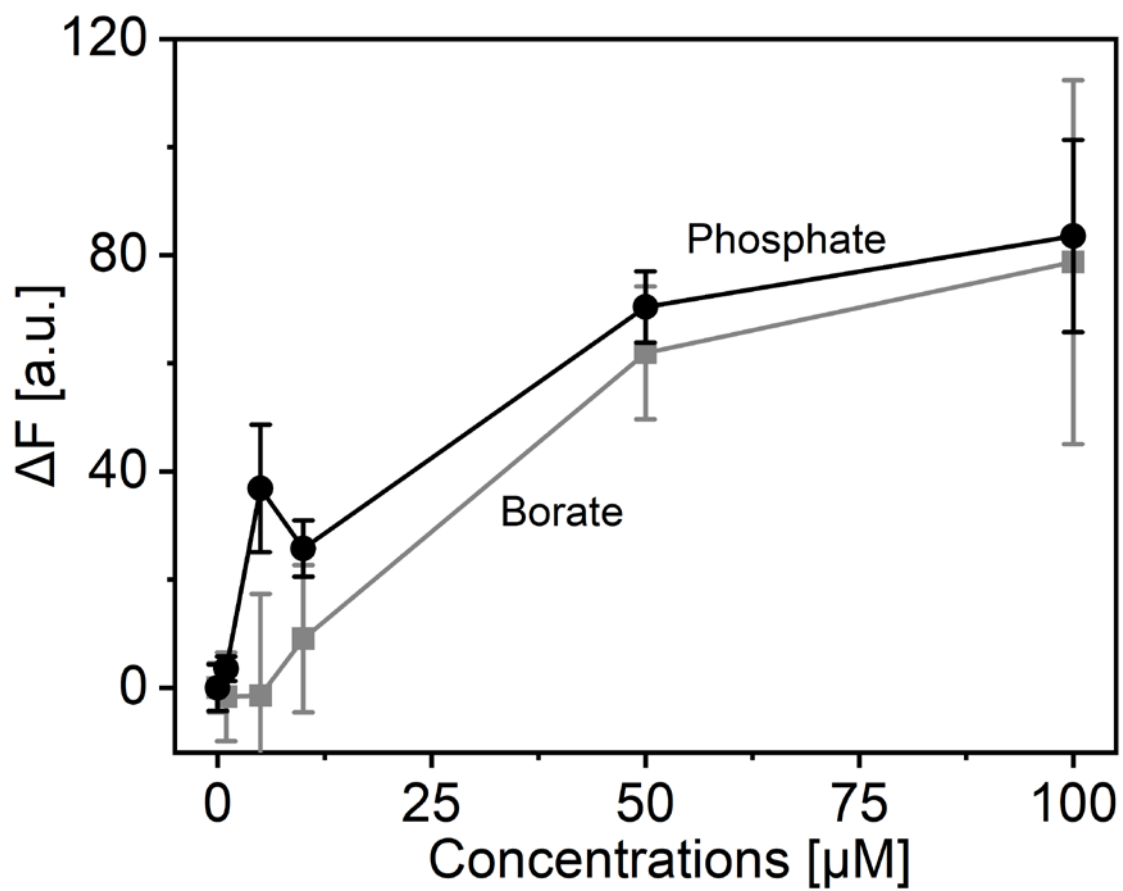


Figure 3-9 本手法に対するホウ酸塩とリン酸塩の影響

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾DNAを用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

Figure 3-10 は、異なるカチオンを含む試料の  $\Delta F$  を示す。As(V)を添加した溶液の  $\Delta F$  は、ブランク試料の  $\Delta F$  よりも有意に高かった。As(III), K(I), Ca(II), Mn(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Ni(II)の各溶液の  $\Delta F$  には、ブランク試料に対する統計的な有意差はなかった ( $p = 0.05$ )。一方、 $\Delta F$  値は、Na(I), Mg(II), Fe(III), Zn(II)の溶液ではわずかに高く、Cu(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II)の溶液では有意に高かった。しかし、本研究で適用した前処理によって、これらのイオンを除去することができた (Figure 3-11)。これらの結果は、前処理後の As(V)に対する本手法の高い選択性を示している。

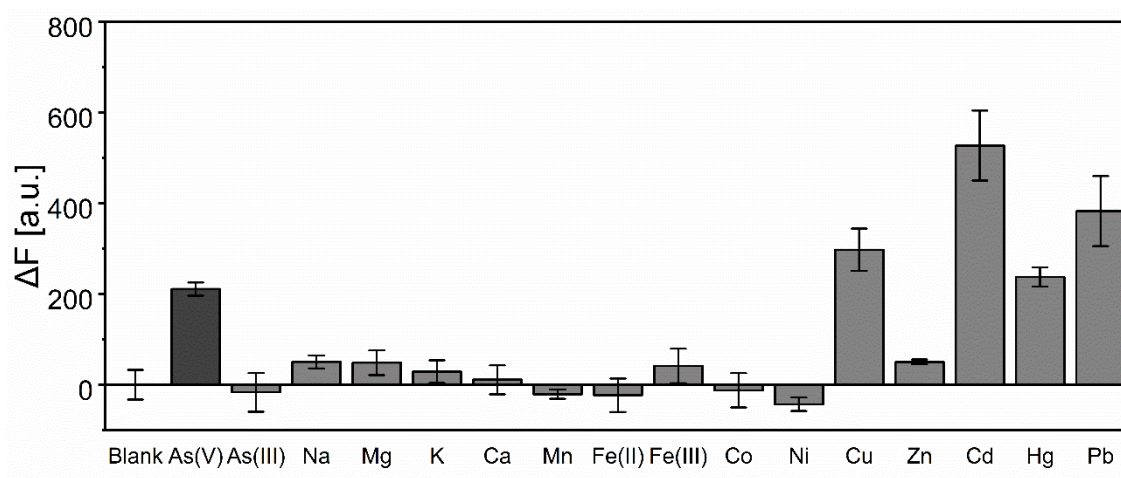


Figure 3-10 本手法の As(V), As(III), カチオンに対する選択性. 各イオン濃度 = 10 $\mu$ M.

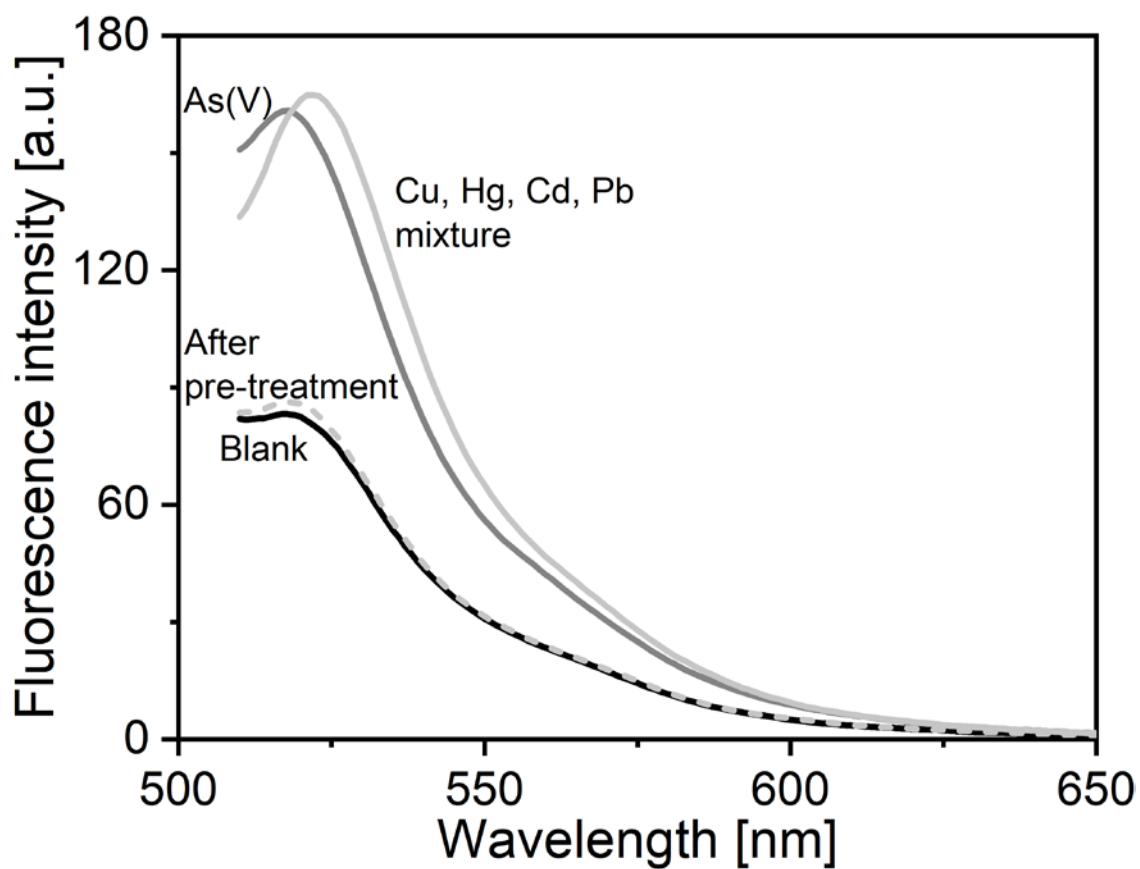


Figure 3-11 前処理(陽イオン交換)による阻害物質への影響

3.3.6 地下水サンプルの分析

As(V)を含まない地下水を本手法に供したところ、518 nm の蛍光強度のピークが大幅に増加した(Figure 3-12). この蛍光バンドの増加は、サンプル中のイオンによって FAM-C<sub>6</sub> が切り離されたことに起因すると考えられる(Table 3-2). そこで、前処理として孔径 0.2 μm のメンブレンフィルターと陽イオン交換を実施した. メンブレンフィルターでは、地下水中の妨害イオンは除去できなかった(Figure 3-12). 一方、ろ過後に陽イオン交換を行った試料の蛍光強度のピークは、ブランク試料とほぼ同じであった(Figure 3-12). このことから、ろ過後に陽イオン交換を行うことで、地下水のマトリックスの干渉効果を大幅に低減できることがわかった. 地下水には 2 価のカチオン(Mg(II)と Ca(II))が含まれており(Table 3-2), これが蛍光バンドのピークを増大させていると考えられる(Figure 3-13). これらの結果から、GW 中の金属イオン濃度は陽イオン交換によって効率的に除去され、代わりに Na(I)が放出されたことがわかる.

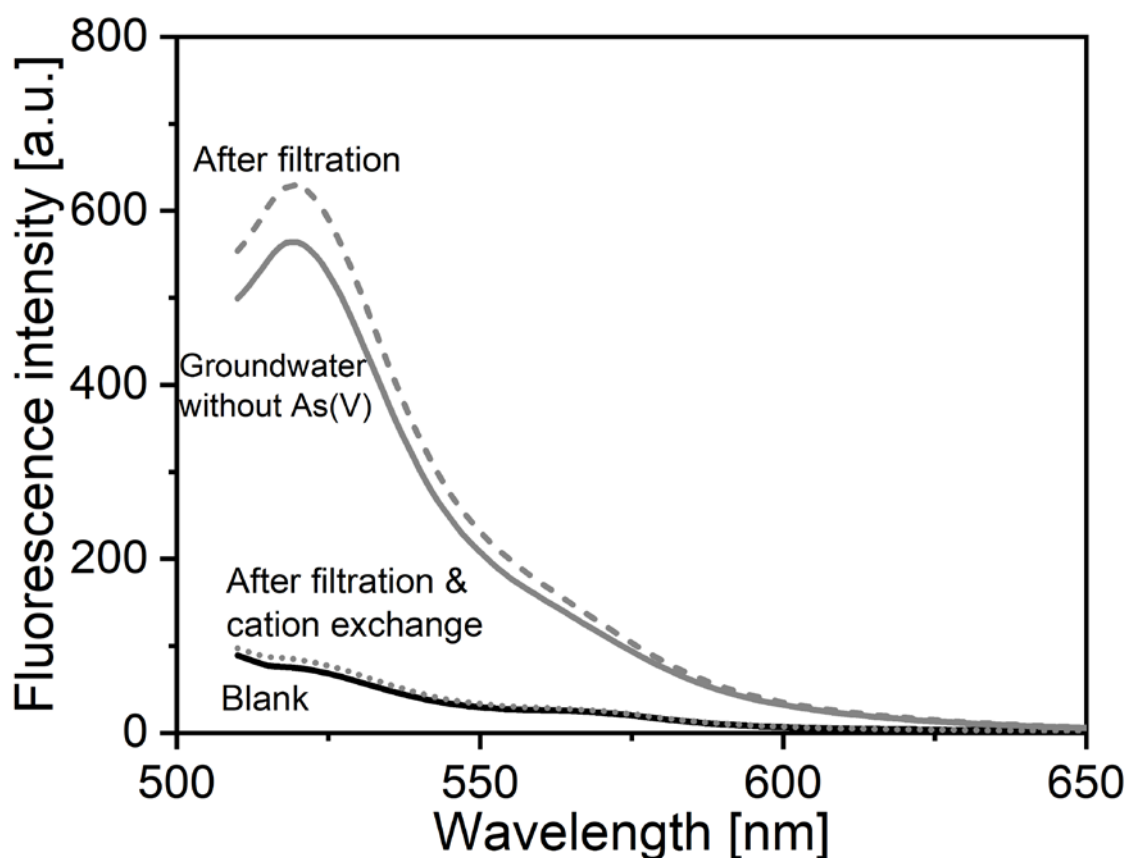


Figure 3-12 地下水, 孔径 0.2μm のメンブレンフィルターでろ過した地下水, 孔径 0.2μm のメンブレンフィルターでろ過し陽イオン交換樹脂に通した地下水の FAM 修飾 DNA の蛍光スペクトルへの影響.

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

Table 3-2 地下水サンプル中のイオン濃度( $\mu\text{M}$ ). "Bef" は陽イオン交換処理前、"Aft" は陽イオン交換処理後のサンプルをそれぞれ示す. 各イオン濃度は ICP-MS で測定.

Ions	GW	
	Bef	Aft
B	-	-
Na	940	1,904
Mg	590	0.0667
Al	1.69	0.40
P	<0.00	<0.00
K	128	0.62
Ca	1,085	<0.00
Mn	0.242	<0.00
Fe	3.68	<0.00
Cu	0.09	<0.00
Zn	0.35	<0.00
As	<0.00	0.04

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

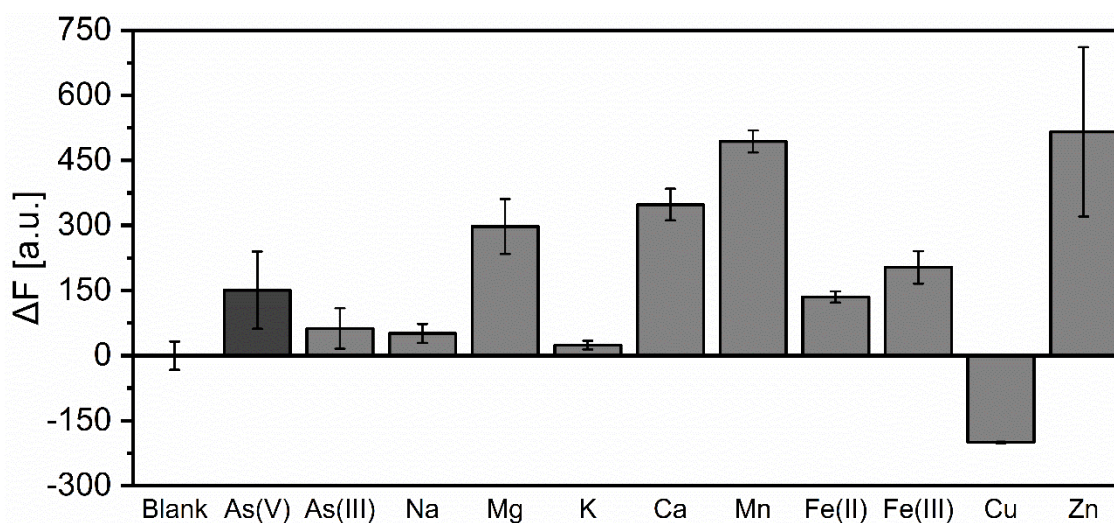


Figure 3-13 地下水中に高濃度で含まれる金属イオンの影響. As(V) = 10 $\mu$ M, その他 = 100 $\mu$ M

本手法と ICP-MS で測定した GW 中の As(V)濃度の関係を Figure 3-14 に示す. いくつかのプロットでは, 本手法で測定した As(V)濃度が ICP-MS で測定した濃度とほぼ同じであることが示された. しかし, ほとんどの試料の As(V)濃度は本手法では過小評価された. この過小評価は, 前処理試料中に存在する唯一のイオンが Na(I)であり (Table 3-2), 測定結果の標準誤差が大きかったため, 測定誤差によるものであると考えられる. そのため, 測定誤差を小さくするためには, 測定方法を変更する必要がある.

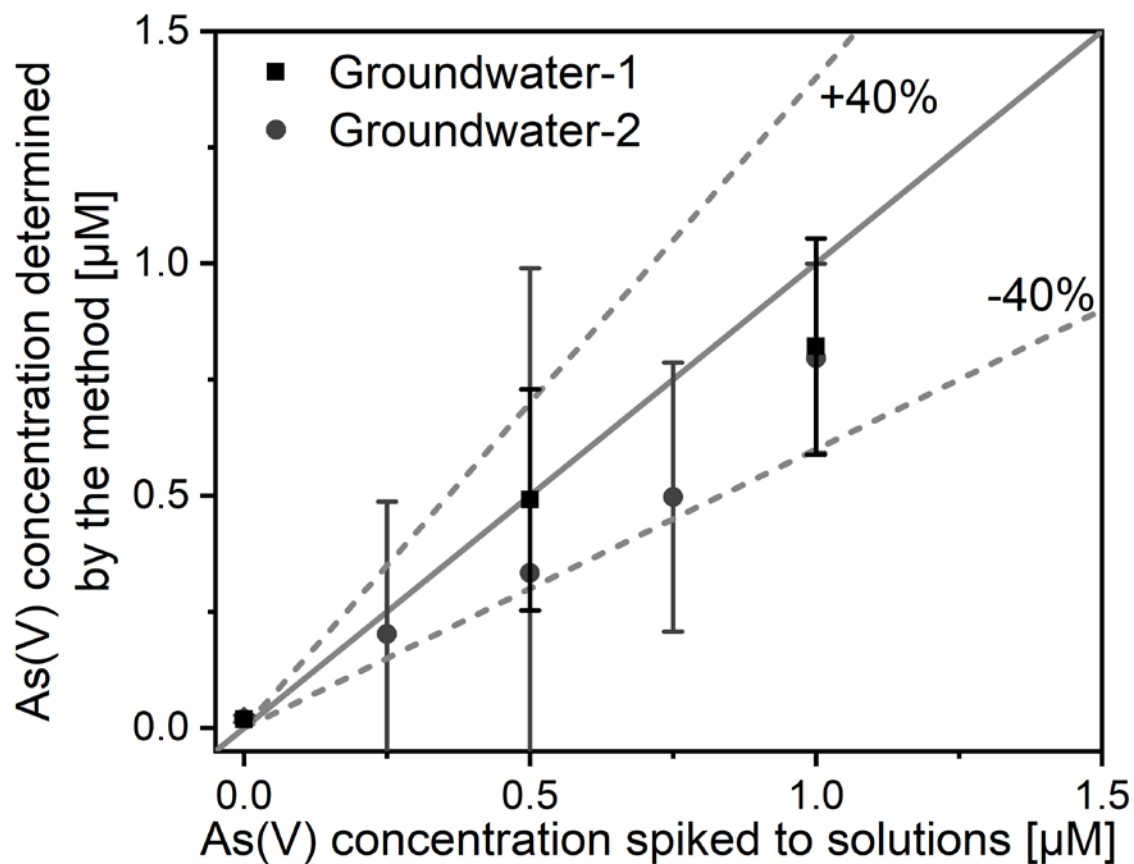


Figure 3-14 As(V)添加地下水試料と本法による測定値との関係

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

#### 3.3.7 As(III), As(V)混合サンプル中における As(V)濃度測定

3.3.6 までの結果より, 我々の開発した簡易 As(III)分析法によって地下水中の As(V)濃度を測定することができた. しかしながら, 第2章でも触れたように, 地下水中に As(III)と As(V)が共存していることがある[26, 27]. そのため, 第2章の2.3.7で実施した As(III)・As(V)混合サンプル中の As(III)濃度定量と同様に, 2.3.7で用いた As(III)・As(V)混合サンプル中の As(V)濃度について本簡易 As(V)分析法で定量した.

簡易 As(V)分析法を用いて, As(III)と As(V)を含む超純水中の As(III)濃度 (Figure 3-15)と地下水中の As(III)濃度 (Figure 3-16)を定量した. Figure 3-15 において, 本簡易 As(V)分析法で測定した超純水中の As(V)濃度は, 超純水中に添加した As(V)濃度とほぼ同じであり, 回収率は100~120%と算出された. Figure 3-16 では, 本手法で定量された地下水中の As(V)濃度は, 地下水に添加した As(V)濃度とほぼ同じであり, 回収率は100~122%と算出された. しかし, 超純水中の As(V) = 5  $\mu$ M において本簡易 As(V)分析法で定量した結果は 8.3  $\mu$ M であり, 同様に地下水中の As(V) = 5  $\mu$ M において本簡易 As(V)分析法で定量した結果は 8.9  $\mu$ M であった. この原因は本実験時に作製した検量線から算出された LOD (4.9  $\mu$ M) とほぼ同じであり, 測定誤差によるものだと考えられる.

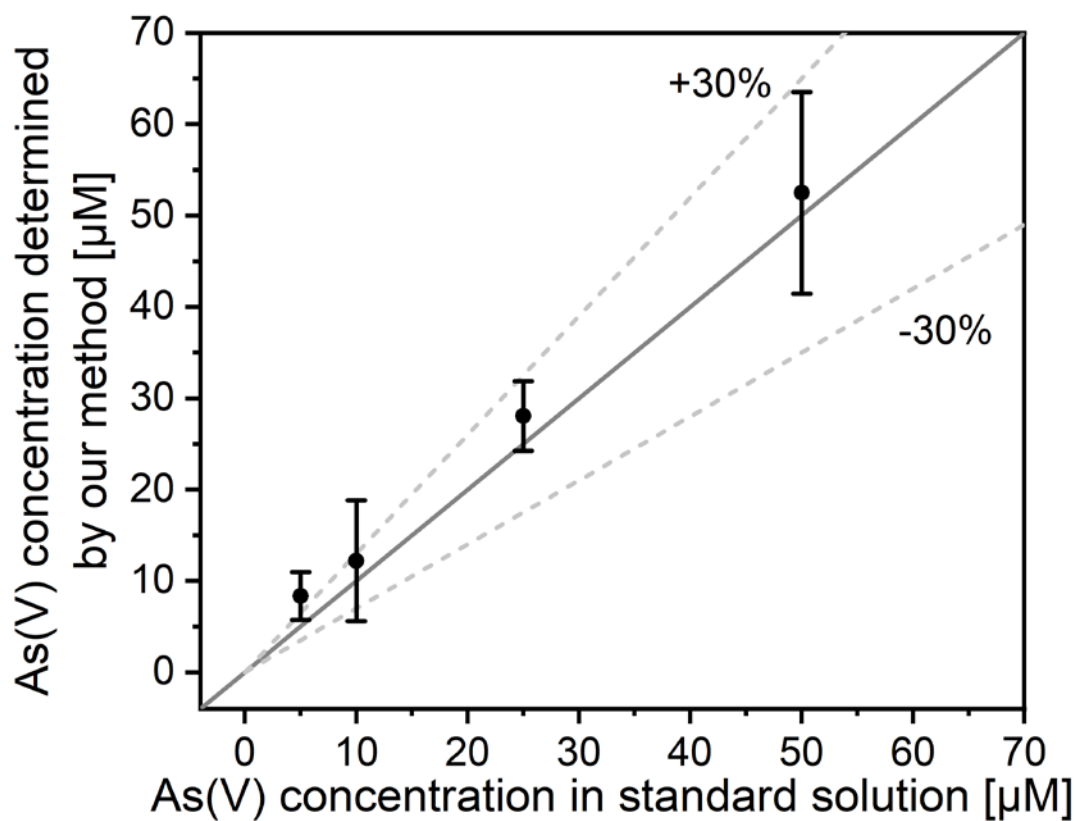


Figure 3-15 As(V)を添加した超純水サンプル中の As(V)濃度と本手法で定量した As(V)濃度の関係. 各サンプル溶液中の総 As 濃度 = 50 μM.

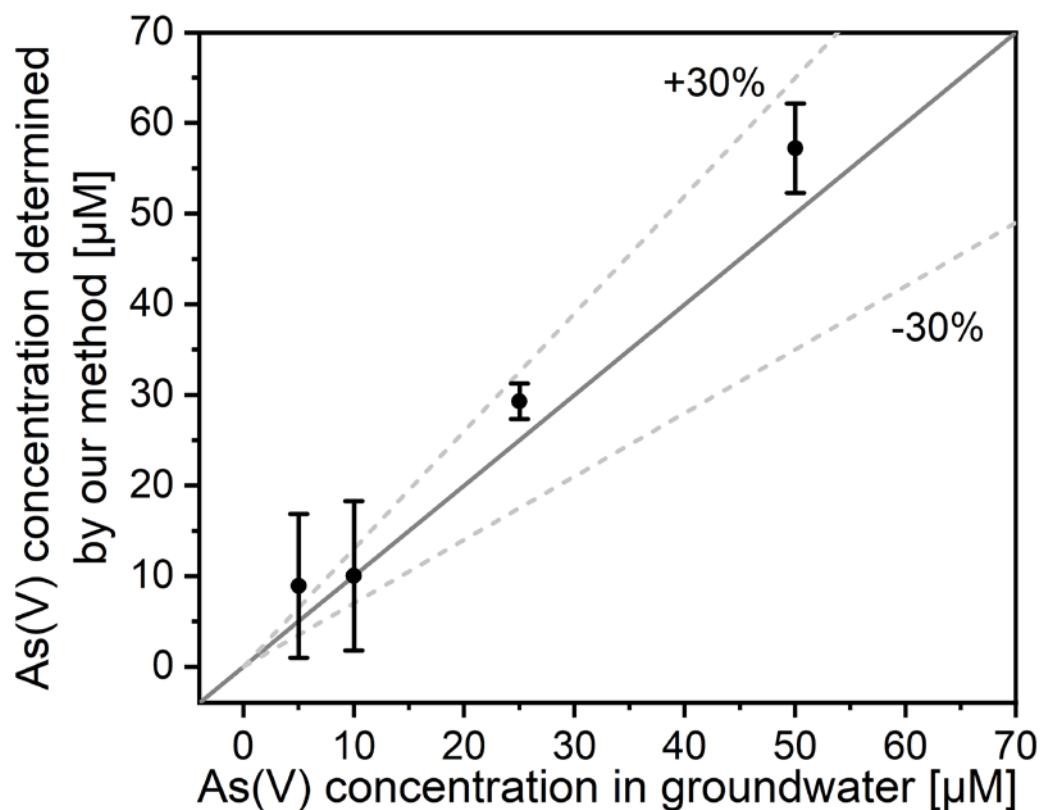


Figure 3-16 As(V)を添加した地下水サンプル中の As(V)濃度と本手法で定量した As(V)濃度の関係. 各サンプル溶液中の総 As 濃度 = 50  $\mu$ M.

As(III)や As(V)をはじめとした様々な化学種を分別定量することは、かなり困難な作業である。LC-ICP-MS のような分析機器を用いた方法は、様々な重金属の化学種の濃度を分別定量するには用いられるが、広く普及した方法ではない。この点で、様々な As の化学種を分別定量する方法を開発することは重要であると考えられる。

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

#### 3.4. 結論

本研究では、CeO<sub>2</sub>NPs と FAM 修飾 ssDNA を用い簡易 As(V)分析法を開発し、地下水中の As(V)濃度の測定を試みた。CeO<sub>2</sub>NPs の最終濃度(15 μg/mL)と FAM 修飾 DNA (400 nM), FAM 修飾 DNA の配列と長さ(FAM-C<sub>6</sub>), 試料とのインキュベーション時間(6分以上)など、本法の性能に影響を与えるパラメーターを最適化した。パラメーターを最適化した結果、総分析時間は約 20 分, LOD は 0.44 μM となった。この方法は、同濃度の Cu(II), Cd(II), Hg(II), Pb(II)に対して有意な選択性を示し、同濃度の硫酸塩および炭酸塩に対してはわずかな選択性を示した。バックグラウンド阻害を引き起こすカチオンを除去するための陽イオン交換による前処理が、様々なカチオンを高濃度で含む地下水中の As(V)濃度の測定に有効であった。しかし、この方法では、As(V)を添加した地下水中の As(V)濃度を過小評価する可能性があった。標準偏差を小さくし、CeO<sub>2</sub>NPs への FAM 修飾 DNA と As(V)の吸着・脱着を安定させる必要があると考えられる。また、第 2 章で開発した簡易 As(III)分析法と組み合わせて、地下水中の As を化学種毎に測定した結果、サンプルの As(III)の影響を受けることなく As(V)を定量できた。このため、第 2 章で開発した簡易 As(III)分析法と本章で開発した簡易 As(V)分析法を組み合わせることで、地下水中の As(III)と As(V)を化学種毎に定量できることが示された。

#### 参考文献

1. Smedley PL, Kinniburgh DG (2002) A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Appl Geochemistry* 17:517–568. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5)
2. Viraraghavan T, Subramanian KS, Aruldoss JA (1999) Arsenic in drinking water — Problems and solutions. *Water Sci. Technol.* 40:69–76
3. Pautler R, Kelly EY, Huang PJJ, et al (2013) Attaching DNA to nanoceria: Regulating oxidase activity and fluorescence quenching. *ACS Appl Mater Interfaces* 5:6820–6825. <https://doi.org/10.1021/am4018863>
4. Wang X, Lopez A, Liu J (2018) Adsorption of Phosphate and Polyphosphate on Nanoceria Probed by DNA Oligonucleotides. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b01482>
5. Lopez A, Zhang Y, Liu J (2017) Tuning DNA adsorption affinity and density on metal oxide and phosphate for improved arsenate detection. *J Colloid Interface Sci* 493:249–256. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2017.01.037>
6. Chung CJ, Huang YL, Huang YK, et al (2013) Urinary arsenic profiles and the risks of cancer mortality: A population-based 20-year follow-up study in arseniasis-endemic areas in Taiwan. *Environ Res* 122:25–30. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2012.11.007>
7. Singh R, Singh S, Parihar P, et al (2015) Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. *Ecotoxicol Environ Saf* 112:247–270. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.009>
8. Flora SJS (2015) *Handbook of Arsenic Toxicology*, 1st ed. © Academic Press 2015
9. Clancy TM, Hayes KF, Raskin L (2013) Arsenic waste management: A critical review of testing and disposal of arsenic-bearing solid wastes generated during arsenic removal from drinking water. *Environ Sci Technol* 47:10799–10812. <https://doi.org/10.1021/es401749b>
10. WHO (2011) *Guidelines for Drinking-Water Quality - Fourth Edition*
11. USEPA (2018) *National Primary Drinking Water Regulations*. <https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations>
12. Das J, Sarkar P (2016) A new dipstick colorimetric sensor for detection of arsenate in drinking water. *Environ Sci Water Res Technol* 2:693–704. <https://doi.org/10.1039/C5EW00276A>
13. Wu Y, Liu L, Zhan S, et al (2012) Ultrasensitive aptamer biosensor for arsenic(iii) detection in aqueous solution based on surfactant-induced aggregation of gold nanoparticles. *Analyst*

- 137:4171–4178. <https://doi.org/10.1039/c2an35711a>
14. Kaur H, Kumar R, Babu JN, Mittal S (2015) Advances in arsenic biosensor development - A comprehensive review. *Biosens Bioelectron* 63:533–545. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.003>
  15. Matsunaga K, Okuyama Y, Hirano R, et al (2019) Development of a simple analytical method to determine arsenite using a DNA aptamer and gold nanoparticles. *Chemosphere* 224:538–543. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.182>
  16. Zhan S, Yu CM, Lv CJ (2014) Colorimetric Detection of Trace Arsenic ( III ) in Aqueous Solution Using Arsenic Aptamer and Gold Nanoparticles. *Aust J Chem* 67:813–818. <https://doi.org/10.1071/CH13512>
  17. Wu Y, Liu L, Zhan S, et al (2012) Ultrasensitive aptamer biosensor for arsenic(iii) detection in aqueous solution based on surfactant-induced aggregation of gold nanoparticles. *Analyst* 137:4171–4178. <https://doi.org/10.1039/c2an35711a>
  18. Pena-Pereira F, Villar-Blanco L, Lavilla I, Bendicho C (2018) Test for arsenic speciation in waters based on a paper-based analytical device with scanometric detection. *Anal Chim Acta* 1011:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.01.007>
  19. Xu X, Wang L, Zou X, et al (2019) Highly sensitive colorimetric detection of arsenite based on reassembly-induced oxidase-mimicking activity inhibition of dithiothreitol-capped Pd nanozyme. *Sensors Actuators B Chem* 298:126876. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126876>
  20. Baghbaderani SS, Noorbakhsh A (2019) Novel chitosan-Nafion composite for fabrication of highly sensitive impedimetric and colorimetric As(III) aptasensor. *Biosens Bioelectron* 131:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.01.059>
  21. Liu B, Liu J (2015) Comprehensive Screen of Metal Oxide Nanoparticles for DNA Adsorption, Fluorescence Quenching, and Anion Discrimination. *ACS Appl Mater Interfaces* 7:24833–24838. <https://doi.org/10.1021/acsami.5b08004>
  22. Liu B, Liu J (2014) DNA adsorption by magnetic iron oxide nanoparticles and its application for arsenate detection. *Chem Commun* 50:8568. <https://doi.org/10.1039/C4CC03264K>
  23. Bülbül G, Hayat A, Mustafa F, Andreescu S (2018) DNA assay based on Nanoceria as Fluorescence Quenchers (NanoCeracQ DNA assay). *Sci Rep* 8:2426. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20659-9>
  24. Muppudathi M, Perumal P, Ayyanu R, Subramanian S (2019) Immobilization of ssDNA on a

### 第3章 酸化セリウムナノ粒子と蛍光色素修飾 DNA を用いた簡易ヒ素(V)分析法の開発

- metal-organic framework derived magnetic porous carbon (MPC) composite as a fluorescent sensing platform for the detection of arsenate ions. *Analyst* 144:3111–3118. <https://doi.org/10.1039/c9an00139e>
25. Wang L, Huang Z, Liu Y, et al (2018) Fluorescent DNA Probing Nanoscale MnO<sub>2</sub>: Adsorption, Dissolution by Thiol, and Nanozyme Activity. *Langmuir* 34:3094–3101. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.7b03797>
  26. Christodoulidou M, Charalambous C, Aletrari M, et al (2012) Arsenic concentrations in groundwaters of Cyprus. *J Hydrol* 468–469:94–100. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2012.08.019>
  27. Tao D, Shi C, Guo W, et al (2022) Determination of As species distribution and variation with time in extracted groundwater samples by on-site species separation method. *Sci Total Environ* 808:151913. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151913>

### 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

#### 4.1 背景

レジオネラ細菌 (*Legionella pneumophila*; Lp) は病原性のグラム陰性菌であり、冷却塔、温水分配システム、飲料水、公衆浴場、温水プール、噴水、廃水処理場などの人工水系内で世界的に広がっている[1]. 近年、ヨーロッパや北米にて、レジオネラ症 (*Legionella Disease*; LD) の患者数が増加している[2]. LD の発生件数の増加は、インフラの老朽化や感染しやすい高齢者の増加、LD の診断数や報告数の増加など、いくつかの要因に起因する[3]. 日本では、LD を発症する人が徐々に増加しており、2019 年には年間 2314 件を占めている. さらに、SARS-CoV-2 との同時感染例も報告されている[4]. この LD 感染者数の増加は、都市部での人口増加、インフラの老朽化、人口の高齢化によるものと考えられる. WHO は、給湯器や温泉に生息するレジオネラ属菌の基準値を 1 cfu/100mL と低く設定している.

現在、水中の Lp を検出するための ISO 公定法には、標準的なプレートカウント法 (AFNOR NF T90-431, ISO 11731) と qPCR (AFNOR NF T90-471, ISO/TS 12869) の 2 種類がある. プレートカウント法は Lp を BCYE 寒天培地等の選択培地で培養し、Lp のコロニーをカウントする. この手順には 4~14 日間程度かかるため、検出から対策・措置を行うまでに時間がかかり、アウトブレイク発生の恐れがある. 培養法は、生存しているが培養できない Lp 細胞 (Viable but non culturable; VBNC) が存在することで、システム内の感染性 Lp の真の量が過小評価されることである. 一方で、qPCR 法は Lp 中の DNA を定量することで検査する方法である. 培養法よりも優れている点は、迅速な判定時間、高い感度と特異性、検出限界の低さ、VBNC 細胞を検出可能な点である. しかし、qPCR は死細胞も検出するため、一般的に寒天培地培養法よりも Lp 負荷量を過大評価し、PCR 阻害剤の存在が qPCR 法の使用を制限する可能性がある. さらに、サンプルの準備が煩雑であるため、qPCR 法の全体的なコストが増加する. 死細胞由来の DNA を不活性にしてから、生菌と VBNC 細胞由来の DNA を qPCR によって定量する EMA-qPCR 法もあるが[5], この時に使用する Ethidium Monoazide (EMA) は高価な試薬であるため、qPCR 以上に高価になるという問題点がある.

バイオセンサーは、従来の細菌検出法で発生した問題を解決できる方法である. バイオセンサーを用いた方法は、流体中のタンパク質、ペプチド、細胞などの分析標的物を、リアルタイムかつオンサイトで、前処理なしに評価・定量するために使用される[6]. バイオセンサーには、抗体、レクチン、タンパク質、アプタマーなど、さまざまな生体認識素子が用いられることが多い. その中でも、DNA アプタマーは、その容易な改変性と汎用性により、標的に対する高い親和性と特異性を持つことから、多くの研究者の注目を集めている[7]. アプタマーは、特定の安定した構造に折り畳むこ

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

とができ、形状相補性(アプタマー構造による結合)、水素結合、静電的相互作用、およびスタッキング相互作用を介して標的と相互作用して結合する。アプタマーは、リガンドとなる核酸を微量精製(選別)したうえで、PCR を用いて指数関数的に増幅させる過程をシステムティックに複数回繰り返す、リガンドの試験管内系統的進化選抜法(SELEX; Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)によって生成することができる[8]。細菌細胞等の場合は、細胞表面の構造を認識する DNA アプタマーを得るために、Cell-SELEX が用いられる。しかし、典型的な Cell-SELEX では、10~30 ラウンドが必要な場合があり、全体的に手順が複雑で時間がかかる。また、PCR を含む複数のラウンドでは、副産物の配列だけでなく、標的に対する親和性が低い偏った配列が増幅される可能性があることが報告されている[8]。

本研究は、Lp のうち、感染例の報告が多い *Legionella pneumophila* (Serogroup1) (Lp(SG1)) を検出可能なバイオセンサーの開発を目的とし、その第一段階として、Lp(SG1)と結合可能な DNA アプタマーを開発した。我々は、ポリマー増強キャピラリー過渡的等速電気泳動法(PectI)に着目し、PectI 選抜法を用いた Lp(SG1)結合型 DNA アプタマー選抜法を試みた。PectI では、細菌が泳動の初期段階に過渡的等速電気泳動(tITP)の原理に基づき、狭い単一ゾーンに集約する。tITP モードが完了した後、キャピラリーゾーン電気泳動(CZE)モードに移行し、細菌-ssDNA 複合体と非結合 ssDNA のゾーンを分離する[9]。分離された単一細胞ゾーンは、泳動バッファー中に添加されたポリエチレンオキサイド(PEO)の効果により、CZE モード中でも単一ピークとして維持される。このようにして、特異的な結合親和性を有する DNA アプタマーを得ることができる。ここで PectI 法をアプタマー選抜に使用することの利点について述べる。第一に、細菌細胞に対する DNA アプタマーの効率的な選抜を行うためには、細菌-DNA アプタマー複合体と結合不活性 DNA とを高度に分離する手法が必須である。PectI 法は、細菌ピークを単一ピークとして検出可能である上、DNA ピーク(結合不活性 DNA)のオンライン濃縮も同時に行える方法であるため、これらの高度な相互分離が見込める。さらに PectI 法による、細菌と DNA ライブラリーの混合試料の泳動では、細菌-DNA アプタマー複合体は細菌ピークと同じ位置に泳動される(この理由は第 1 章で詳しく述べる)。したがって、一回目の選抜操作においても複合体ピーク位置を把握することが出来る。よって、細菌と結合不活性 DNA の完全分離を達成し、細菌ピークのみを精密に分取することが出来れば、複合体を結合不活性 DNA のコンタミネーションが一分子も存在しない条件で回収可能となる。また、ここで回収される DNA は泳動される間、細菌に結合し続けた DNA であるため、結合力の強い(解離反応速度定数の小さい)DNA だけが選抜されることになる。よって、細菌と DNA ライブラリーの分離に PectI 法を用いることで、一回の分取・増幅のみで高アフィニティーな DNA アプタマーの選抜が可能になると考えた。第二に、SELEX 法では特異な立体構造を有す

#### 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

る特殊な配列を得なければならないため、できるだけ多くの配列パターンを試行することが望ましい。そのため、CE 法の特徴である数 nL という微量な試料注入量は、選抜にかかる配列パターン数を減少させてしまい、アプタマー選抜においては欠点となってしまう。一方、PectI 法では、過渡的等速電気泳動法を利用しているため、約 1  $\mu$ L もの CE としては非常に大きな試料注入量であっても、細菌類を単一のピークとして再現性良く検出することが可能である。さらに細菌のみならず、DNA プールも同時に濃縮されるので、両ピークのバンド幅は狭くなる。すなわち大容量の試料注入を行っても、細菌と DNA ライブラリーの非常に高度な分離が可能となると期待した。よって PectI 法による大容量試料注入－濃縮－分離によって、「試行される配列パターンの減少」という CE-SELEX の課題を克服可能であると着想した。

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

### 4.2 実験方法

#### 4.2.1 本研究で実施した PectI 選抜法, 及びアプタマー配列の決定法

PectI 選抜法は, 細胞上の様々な標的物質に対して高い結合能を持つアプタマーを獲得するために, キャピラリー電気泳動(CE)における細胞の電気泳動方法と, 非結合型 DNA から分離した細胞-アプタマー複合体の精密分取法とを組み合わせた選抜法である. PectI 選抜法では非結合型 DNA を混入させることなく, 細胞アプタマー複合体を回収可能であり, アプタマーを含む DNA プールをわずか 1 ラウンドで獲得できる. 一般的に, 細胞の分離をキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)によって行くと, 各細胞は培養条件や試料調整条件などが細胞表面構造の多様性に影響を与え, 個々の細胞によって多様な電気移動度を与えるため, 再現性のない複数のピークが観測されてしまう. そこで, Saito らは, 細胞ピークの分離検出のために, キャピラリー過渡的等速電気泳動法(ctITP; capillary transient isotachopheresis)と高分子(PEO 600,000)の添加を組み合わせた CE 法である, PectI 法を開発した[9]. この手法は, まず ctITP によって一時的なキャピラリー等速電気泳動法(cITP; capillary isotachopheresis)による細胞の濃縮後にキャピラリーゾーン電気泳動法(CZE; capillary zone electrophoresis)へと泳動様式を自動的に移行して試料の濃縮-分離を行う. PEO 600,000 の泳動液への添加による細胞のフォーカシング効果と ctITP 法を組み合わせることで, 細菌をはじめとした粒子系の分離検出を可能とした. 本手法は, CEを用いて細菌類を 50 万段もの高理論段数で単一ピークとして再現性良く検出することに初めて成功している[9].

従来法である Cell-SELEX 法において課題となっていたのが, 理論上存在する  $4^N$  種類の ( $N$ : ランダム領域を構成する塩基数)の DNA 配列すべてを選抜に導入することが出来ないという点である. 一般的に, アプタマーの選抜ではランダム領域 30 ~ 50 塩基程度から構成されるライブラリーを使用するため, 理論上  $4^{30} \sim 4^{50}$  すなわち  $10^{18} \sim 10^{30}$  種類の DNA 配列が存在することになる. しかし, 一般的にアプタマー選抜に導入可能な DNA 分子数は  $10^{12} \sim 10^{15}$  分子であるため, 全配列のごく一部 ( $1 / 10^3 \sim 10^{12}$ )しか選抜に供していないことになる. これは, 高性能なアプタマー分子を選抜に導入できていない可能性があることを意味し, その結果として高性能なアプタマーを取り逃がしてしまっていたと考えられる. 細菌類表面上の多様なターゲットに結合する高性能なアプタマー全てを一度の選抜にて獲得することを目標にした場合, この事実は致命的な課題である.

また, PectI 選抜法を含む, アプタマーのシングルラウンド選抜手法では, 高性能アプタマーを高速に獲得可能である利点を有する一方で, 分取プール中から高性能アプタマー配列を抽出する配列解析技術が確立できていないという, Cell-SELEX 法とは異なる問題点を有している. 従来法である Cell-SELEX 法では 30 回程度のラウンドの繰り返しによって, アプタマー配列を濃縮させていくため, 分取プールを構成する DNA の配列決定を行った場合, カウント数の多い配列をアプタ

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

マー配列として判断する。一方で、シングルラウンド選抜手法では、アプタマー配列の濃縮は原理的に発生せず、各配列のカウント数は理論上全て等しくなるため、分取プール中に非特異的に混入してきた配列とアプタマー配列の判別にカウント数の違いを利用することは出来ない。そのため、シングルラウンド選抜手法によってアプタマー候補は配列を抽出するためには、配列データ中からアプタマー配列を判別するための NGS カウント数に代わる判別基準が必要であった。

本研究ではこれらの二点の問題(①選抜に全ての配列を導入できない, ②配列データ中からアプタマー配列を判別できない)を克服するため、PectI 法による ssDNA 選抜を実施後、獲得できた DNA 配列読み取り後に実施するアプタマー配列決定のプロセスで、クラスタリング解析 (CL) とディープラーニング解析 (DL) を実施した。具体的には、ランダム領域の塩基数を 25 と比較的短いランダム DNA ライブラリーを用い、さらに類似配列群 (ファミリー) を構成する類似配列のパターン数 (以下類似配列数) をカウント数に代わる、アプタマー配列の判別基準とした。比較的短い 25 塩基のランダム DNA ライブラリーを用いることで、ランダム DNA ライブラリー中に含まれる DNA は  $10^{15}$  種類程度となる。DNA アプタマーのターゲット認識に関与する領域は 5 塩基程度からなる領域であり、それ以外の領域は高次構造の形成に関わっていると考えられているため、比較的短いランダム DNA ライブラリーを用いることに問題はないと考えられる。また、25 塩基のアプタマー配列の 4~6 塩基を他の塩基に置き換えてもアプタマーの解離平衡定数  $K_d$  は大きく変化しないため、ランダム領域 25 塩基中の 4 塩基を置き換えてもアプタマーの性能に大きな差異は生じないと考えられる。よって、類似した配列群の各配列について、解離平衡定数等の結合に関するパラメータが等しいと近似する。すなわち、類似した配列を同等の DNA アプタマー配列であると仮定する。これによって、類似配列数を SELEX 法におけるカウント数同様に、プール中のアプタマー配列と置けるため、大規模配列データの中で類似配列数が多いものがアプタマー配列であると判別が可能と考えた。

ここで、実際の PectI 選抜法における類似配列数を考える。PectI 選抜によって選抜された DNA プール (選抜プール) に含まれる配列は次世代シーケンサーによって配列決定される。ここで、得られた配列データ中におけるアプタマーの類似配列数 (類似配列を 25 塩基中 21 塩基以上一致するものと定義) は以下の(4-1)および(4-2)式から計算される。

$$N_0 = (\text{PectI 選抜に供する全 DNA 分子数}) \times \sum_{i=0}^4 \frac{25C_i \times 3^i}{4^{25}} \quad (4-1)$$

$$N = N_0 \times \frac{[\text{Lp(SG1)}]_0}{[\text{Lp(SG1)}]_0 + K_d} \times \exp(-k_d t) \times \frac{12}{60} \times \frac{(\text{配列決定で読みだされた DNA 配列数})}{(\text{配列決定に供された DNA 分子数})} \quad (4-2)$$

#### 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

(4-1)式について説明すると、「PectI 選抜に導入する DNA 分子数」を  $5 \times 10^{12}$  分子と仮定した場合、 $N_0 = 5 \times 10^{12} \times (1.1 \times 10^6) / (1.1 \times 10^{15}) = 5000$  となるため、ある任意の一つの DNA 配列に対して、5000 種類の類似配列を PectI 選抜に導入することになる。これは、類似配列を同等の DNA 分子であると近似することにより、全種類の DNA 分子を各 5000 分子ずつ選抜に導入しているとみなせる。また、(4-2)式において、 $[Lp(SG1)]_0$  は Lp(SG1) 上のアプタマーの結合サイトのみかけの溶液中濃度、 $K_d$  はアプタマーの解離平衡定数、 $k_d$  はアプタマーの解離反応速度定数、 $t$  は PectI 法における解離反応時間を表している。(4-2)式の各項について、右辺第 2 項は、PectI 選抜における結合工程(試料調整時における平衡状態)での類似配列数の減少割合を表している(解離平衡反応による影響)、第 3 項は、PectI 分離における CZE モードでの一次解離反応による類似配列数の減少割合を表している、第 4 項は、分取プール 60  $\mu\text{L}$  のうち 12  $\mu\text{L}$  の DNA を PCR 増幅するため、類似配列数  $N$  が減少することを表している。

この  $N_0$  がどのように変化するかを見積もるため、(4-2)式の各パラメーターを以下のように設定した。まず解離反応時間  $t$  については、PectI 法による濃縮が解除されてから分取されるまで、すなわち分離時間であるため、概ね 4 分間程度 ( $t = 240 \text{ sec}$ ) とした。また、 $[Lp(SG1)]_0$  について以下のように見積もった。まず、Lp(SG1) を円柱と仮定して、Lp(SG1) の表面積について顕微鏡画像より擬似的に算出した ( $7.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2$ )。この表面積より、Krylov らの研究で示された 80 塩基の一本鎖の DNA が占める面積 ( $3 \times 10^{17} \text{ m}^2$ ) で割った値を、一細胞あたりに DNA が非特異的に結合するサイト(NS)の最大数とした ( $(\text{一細胞あたりの NS 数}) = 2.4 \times 10^7 \text{ 個} = (2.4 \times 10^7) / (6.02 \times 10^{23}) \text{ mol/cell} = 3.9 \times 10^{-17} \text{ mol/cell}$ ) [10]。次に、この値から、アプタマーが特異的に結合するサイト(S)の数を推定した。先行研究のフローサイトメトリーによるアプタマーの  $K_d$  測定では、非特異的な結合をすと考えられる蛍光標識化ランダム DNA ライブラリーが Lp(SG1) 細胞と結合した時の蛍光強度 (FITC) は 5000 程度であったが、DNA アプタマーの特異的結合による蛍光強度は 100 ~ 500 程度であった。よって、S は NS の 1/50 ~ 1/10 程度であるを見積もることができる。以上のことから、PectI 選抜に使用する LP(SG1)濃度が  $2 \times 10^5 \text{ cells/mL}$  の場合、 $[NS]_0 = (2 \times 10^5 \text{ cells/mL}) \times (3.9 \times 10^{-17} \text{ mol/cell}) = 8 \times 10^{-9} \text{ M}$  となり、 $[S]_0 = (8 \times 10^{-9} \text{ M}) / 50 (\sim (8 \times 10^{-9} \text{ M}) / 10) = (2 \sim 8) \times 10^{-10} \text{ M}$  と推測した。(4-2)式では、 $[Lp(SG1)]_0$  を特異的結合サイトの濃度として考えることとし、 $[LP(SG1)]_0 = 8 \times 10^{-10} \text{ M}$  と見積もった。

(4-2)式の第 5 項について、(配列決定で読みだされた DNA 配列数)/(配列決定に供された DNA 分子数) = 1 であると仮定をすると、上記の見積もりを踏まえることで(4-2)式は  $N \geq 4$  となる。すなわち、 $K_d \leq 200 \text{ nM}$ ,  $k_d = 2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  の高性能アプタマーであれば、類似配列数 4 以上の類似配列群(ファミリー)として選抜される条件としては、 $[DNA]_0 = 50 \mu\text{M}$  ( $N_0 = 3000$ ),  $[Lp(SG1)]_0 =$

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

$2 \times 10^5$  cells/mL が設定できる. また, この条件で非特異結合型 DNA ( $K_d = 2 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{off}} = 1.8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) でも同様に計算をすると,  $N = 3.1 \times 10^{-3}$  となる. 以上の結果から, 高性能アプタマーでは, 類似配列数 4 以上のファミリーを形成するが, 非特異結合型 DNA では, ファミリーを形成しない. よって, 類似配列数を判断基準とすることで配列データ中のアプタマー配列を判別可能であると推測された.

以上より, PectI 選抜法は, ランダム領域が 25 塩基と比較的短いランダム DNA ライブラリーを用い, 配列が類似した DNA 分子が同等の DNA 分子であると近似することによって, 全種類の DNA 分子を選抜へ導入可能であり, PectI 分離による濃縮・分離効果により細胞-アプタマー複合体を非結合型 DNA の混入なく分離可能である. さらに, ファミリー形成に基づく配列データからのアプタマー配列の抽出を行うことで, 従来法の Cell-SELEX 法では不可能であった, 細胞表面上に存在する多様なターゲットに結合する高性能なアプタマーを 1 ラウンドでの選抜により, 取り逃しなく獲得可能な方法となり得ると考えた.

### 4.2.2 遠心分離導入型 PectI 選抜法の検討

本研究では PectI 選抜法を実施する際に前処理として遠心分離を実施することで, NGS 解析に供する ssDNA 配列のうち, 非結合 ssDNA 配列, 及び標的との結合力の弱い ssDNA の割合を少なくし, 標的と強い結合をした ssDNA 配列を選抜することを試みた. 次世代シーケンサーによる配列解析を行う全 ssDNA 分子数  $X$  についての導出式 ((4-3)式), 及び次世代シーケンサーによる配列解析により得られた配列データ中のアプタマーファミリーの構成配列数  $N$  についての導出式 ((4-4)式) によって, 遠心分離の条件と回数を検討した.

$$X = \left\{ \prod_k^i \{ \exp(-At_k) \} \times \left( \frac{[\text{ssDNA}]_0}{[\text{ssDNA}]_0 + K_d} [\text{NS}]_0 - \frac{B}{A} \right) + \frac{B}{A} \right\} \times \exp(-k_{\text{off}}t) \times (100 \times 10^{-9}) \times (6.02 \times 10^{23}) \times \frac{12}{60} \times \frac{[\text{Complex}]_3}{[\text{Complex}]_3 + [\text{Blocking DNA}]} \quad (4-3)$$

$$N = N_0 \times \frac{[S]_0}{K_d + [S]_0} \times \prod_k^i \{ (1 - \alpha)^k + \alpha^k \times \exp(-k_{\text{off}}t) \} \times \exp(-k_{\text{off}}t) \times \frac{12}{60} \times$$

$$\frac{\text{(配列決定で読み出された ssDNA 分子数)}}{\text{(配列決定に供された ssDNA 分子数)}} \quad (4-4)$$

まず, (4-3)式について, Lp(SG1)を標的とした DNA アプタマーに関する先行研究は本研究実施当

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

時無かったため、大腸菌 (*E.coli*) 結合型 DNA アプタマーの選抜についての先行研究[11], 及び PC-9 結合型 DNA アプタマーの選抜についての先行研究[12]を基に,  $K_d = 7 \mu\text{M}$ ,  $k_{\text{off}} = 1.8 \times 10^{-2} / \text{s}$  と仮定した. (4-4)式では, 典型的な細菌結合型 DNA アプタマーの値から,  $K_d = 100 \text{ nM}$ ,  $k_{\text{off}} = 2.0 \times 10^{-4} / \text{s}$  とした. PectI 分離時の解離反応時間については, 両式共に, PectI 分離の分離時間として,  $t = 6 \text{ 分} = 360 \text{ 秒}$  とした. また, (1-32)式の遠心分離効率  $\alpha$  は実験によって求め, その結果,  $\alpha \approx 0.8$  であった(実験結果は掲載せず). そのため, 上記の計算により遠心分離の条件について, 遠心力を  $6,000 \times g$ , 緩和時間(遠心分離後, ssDNA と Lp(SG1)が結合する時間)を 15 分, 遠心分離回数を 4 回と設定した. 従って, Lp(SG1)と ssDNA を結合後, 4 回遠心分離による洗浄と CE による分離を実施し, 選抜プールを獲得した. また, 遠心分離による洗浄回数によって NGS 解析によって得られる配列データの違いについて検証するため, Lp(SG1)と ssDNA を結合後, 1 回遠心分離による洗浄と CE による分離を実施した選抜プールも用意した.

### 4.2.3 本研究で用いた試薬

本研究では *Legionella pneumophila* (Serogroup 1) (Lp(SG1)) を使用し, American Type Culture Collection (ATCC) より購入した(カタログ番号:33152). Lp(SG1)用の培地(BCYE 寒天培地)は酵母エキス(ベクトン・ディッキンソン製), N-(2-Acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES) (同仁化学工業製), 活性炭(SIGMA-ALDRICH 製), 水酸化カリウム(富士フィルム和光純薬製), 寒天(関東化学工業製), L-Cysteine HCl (Sigma-Aldrich 製), Fe-pyrophosphate (Sigma-Aldrich 製) を使用した.

トリス-(ヒドロキシメチル)アミノメタン(Tris), 塩化ナトリウム, 塩化カリウム, 塩化マグネシウム水酸化ナトリウム, 水酸化カリウムは, 富士フィルム和光純薬製のものを使用した. グリシン(Gly)は関東化学工業製の純度 99%以上の物を使用した. 水酸化マグネシウムは東京化成製のものを使用した. 高純度塩酸は, 多摩化学工業製の分析用高純度試薬(純度 99.99999999%)を使用した. ポリエチレンオキサイド 600,000 (PEO 600,000)は, SIGMA-ALDRICH 製のものを使用した. ホウ酸は富士フィルム和光純薬製の純度 99.5%のものを使用した. エチレンジアミン二ナトリウム二水和物は和光純薬製の 99.5%以上のものを用いた. N,N-メチレンビス(アクリルアミド)は和光純薬製の 99.0%の電気泳動用のものを用いた. アクリルアミドは東京化成(Tokyo, Japan)製の純度 99%以上のものを用いた.

DNA は 65-mer のランダム ssDNA ライブラリー, フルオレセイン(FAM)修飾フォワードプライマーおよびビオチン修飾リバースプライマーは, Integrated DNA Technologies 社(Coralville, USA)から購入した. Table4-1 に, ランダム ssDNA ライブラリー, FAM 修飾フォワードプライマー, ビオチン



## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

合 ssDNA を含む Lp(SG1)のピークは、デュアル UV 吸光検出器 CE システムを用いた方法で分離した[11]. 溶出時間(所望のピークの前後 30 秒)は次の(4-5)式で計算した.

$$t_{\text{elut}} = \frac{(L_T - L_{\text{eff}2})t_1 - (L_T - L_{\text{eff}1})t_2}{L_{\text{eff}1} - L_{\text{eff}2}} \quad (4-5)$$

ここで,  $t_{\text{elut}}$ ,  $t_1$ ,  $t_2$  は, それぞれ目的とする泳動ピークの溶出時間, 第 1 検出器, 及び第 2 検出器での検出時間を,  $L_T$  は CE 分離で使用したキャピラリー全長,  $L_{\text{eff}1}$  はキャピラリー入口から第一検出器までの有効長を,  $L_{\text{eff}2}$  はキャピラリー入口から第二検出器までの有効長を表している.

PectI 選抜後, PCR 酵素キットを用いて PCR 増幅を行った. PCR の条件は, 95°C で 3 分間加熱後, (95°C で 30 秒, 53°C で 30 秒, 74°C で 10 秒) × 25 サイクル, そして 74°C で 10 分間の最終伸長ステップを実施した. PCR 精製キットを用いて生成物を精製し, 続いて PAGE で Lp(SG1) に結合した ssDNA の増幅を確認した. PCR 増幅後に精製した dsDNA は, ストレプトアビジン磁気ビーズキットを用いて ssDNA に変換した.

選抜された DNA プール中の DNA 配列の決定では, PectI セレクションで得られた DNA テンプレート 12 µL の溶液を, 未修飾のプライマーを用いて PCR 増幅した. 増幅された DNA は, バーコード領域とシーケンスプライマー結合領域でアダプターにタグ付けされたものを使用した.

### 4.2.5 NGS データから Lp(SG1)結合型 DNA アプタマー配列の抽出

DNA 配列解析後, Lp(SG1)と結合しうるアプタマー候補配列を抽出した. 23~27 塩基のランダムな長さの配列データについて, 5' と 3' のプライマー領域をトリミングし, FASTA ファイルをエクスポートした後, Cluster Database at High Identity with Tolerance (CD-HIT) プログラムを用いたクラスタリング (CL) 解析と, 深層学習 (Deep Learning; DL) 解析を実施した.

CL 解析では, 先述した CD-HIT プログラムを用いた解析を実施した. CD-HIT は元々配列間の一致率が高いものを取り除き, 膨大なデータの扱いを容易にするためのプログラムである[13]が, 一致率の高い配列の集合体の出力も可能である. CD-HIT-EST プログラム (核酸の塩基配列の CL 解析に最適化されたプログラム) を用いたクラスター (ファミリー) 探索のアルゴリズムを紹介する[13]. まず, NGS 解析で出力された配列データからランダム領域部分を抽出した FASTA ファイルを作成・入力し, 配列の長い順に整列させる (同じ塩基長の配列は FASTA ファイル中の並びに準ずる). 次に, 先頭の配列を親配列として分類し, 次の配列以降 (参照配列) を親配列と比較して親配列との一致率を算出する. 配列間一致率が予め設定した閾値より大きい親配列が存在する場合は, そ

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

の親配列が定義するクラスター(ファミリー)の子配列として参照配列を分類し、以降のアライメントは行わない。閾値以上となる親配列が見つからない場合は、新たなファミリーを定義する親配列となる。配列間一致率の閾値を満たすファミリーが複数存在する場合は、最初に見つかったファミリーに分類される。この操作を繰り返し実施することで、配列間一致率が予め設定した閾値以上のファミリーが得られる[14]。

また、CD-HIT-EST プログラムでは、グローバルアライメントとローカルアライメントの2種類の方式から選択して実行することができる[14]。グローバルアライメントは配列中の塩基全てを比較対象とした方式である。グローバルアライメントでは、親配列と参照配列において、それぞれの塩基配列の一致・不一致、及び塩基配列の短縮の有無でスコア化し、スコアの合計が最も大きくなるように実施される。配列間一致率は参照配列の全塩基のうち親配列と一致した塩基の割合で計算される。一方でローカルアライメントではランダム領域の塩基配列のうち、 $n$  塩基以上を比較することでアライメントを実施する方式である。すなわち、全配列中の  $n$  塩基配列部分の一致度合いを検索できる。スコア化方法はグローバルアライメントと同様である。

DL 解析は、CD-HIT-EST による CL 解析では、アルゴリズムより連続した配列の一致率を基にアライメントを実施しているため識別不可能なモチーフがあると考え、先述した CL 解析で分類したファミリー内に存在すると考えられる結合能の高いアプタマー配列を獲得することを目的とした。CL 解析で分類したファミリー配列内に存在する全配列の評価を実施し、ファミリー内で結合能のより高い配列を判別した。DL 解析で出力されたデータは、 $pO$  値(ある NGS データに含まれない配列と分類される確率の常用対数を取り、符号を反転させた値)を定義し、この  $pO$  値から各塩基配列を評価した。

### 4.2.6 Lp(SG1)結合型 DNA アプタマー候補配列の結合能評価

DNA 配列の類似配列群(ファミリー)から選んだアプタマー候補を、5'末端をフルオレセインで修飾したものを、CE-LIF を用いた結合アッセイに供した。Lp(SG1)を混合し、サンプルバッファー中で DNA(0-50,000 nM)と1時間インキュベートした。1時間後、CE-LIF に供して Lp(SG1)-DNA アプタマー複合体のピークを獲得した。その後、Lp(SG1)-DNA アプタマー複合体のピーク面積を算出し、DNA アプタマー濃度との関係を導出し、以下の(4-4)式によって近似式を作成し、解離平衡定数 ( $K_d$ )を算出した。

$$A - A_0 = \frac{A_{\max} \times [DNA]}{K_d + [DNA]} \quad (4-7)$$

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

ここで,  $A$  は DNA-Lp(SG1)複合体のピーク面積,  $A_0$  は Lp(SG1)のピーク面積,  $A_{\max}$  はピーク面積の最大値,  $[DNA]$ は DNA アプタマー濃度[nM]である.

また, CE 泳動中に外部圧力をかけることでLp(SG1)-DNA アプタマー複合体の泳動時間を調整し, 各ピーク面積と泳動時間の関係を導出し, 以下の(4-5)式によって近似式を作製し, 解離反応速度定数 ( $k_{\text{off}}$ )を算出した. なお, Lp(SG1)とアプタマーの結合反応は先行研究と同様に一次反応であると仮定した[11].

$$A_t = A_{t0}e^{-k_{\text{off}}t} \quad (4-8)$$

ここで,  $A_t$  はピーク検出時間 =  $t$  における DNA-Lp(SG1)複合体のピーク面積,  $A_{t0}$  はピーク検出時間 = 0 における DNA-Lp(SG1)複合体のピーク面積,  $t$  は DNA-Lp(SG1)複合体のピーク検出時間 [min],  $e$  はネイピア数である.

### 4.2.7 実験装置

細胞に結合した DNA アプタマーを分離・選抜するための Beckman Coulter P/ACE MDQ CE-UV 検出システムは, UV/Vis 検出器 (MAYA2000; Ocean Optics, FL, USA) を装着できるように改造して使用し, 入口から検出器までのキャピラリーカセットの有効長を決定した (第一検出器; インレット先端から UV/Vis 検出器までの有効長 ( $L_{\text{eff1}}$ ) = 40.5 cm, 第二検出器; インレット先端から CE 電気泳動装置にある検出器までの有効長 ( $L_{\text{eff2}}$ ) = 52.3 cm), 全長 ( $L_{\text{Total}}$ ) 62.5cm, 内径 100  $\mu\text{m}$  のフューズドシリカキャピラリーは, GL サイエンス社から購入した. 選抜された DNA プールを評価するための PectI-LIF 検出には, Ar イオンレーザー ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ; 3 mW) を用いたレーザー誘起蛍光検出 (LIF) ユニットの備えた別の P/ACE MDQ CE システムを用いた. PCR の増幅には, Wako WK-0232 サーマルサイクラーを用いた. AE-6200 ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) システムを使用した. 蛍光顕微鏡測定は, オリンパス FV1000D 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (東京, 日本) を用いて, 半導体レーザーによる 473nm の励起で行った. NGS 解析は MiSeq (Illumina, Inc. USA) 機器と MiSeq Reagent Kit v3 (600-cycle) (Illumina, Inc. USA) を使用した. DNA アプタマーの二次元構造は Mfold を用いて解析した[15].

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

### 4.3 結果と考察

#### 4.3.1 PectI 選抜法による Lp(SG1)結合型アプタマーの選抜

Lp(SG1)細胞とランダム化した ssDNA ライブラリー (Table 4-1 参照) の混合物について PectI 選抜を実施した (Figure 4-1). 本実験より, バッファーを分離した結果, 電気浸透流 (EOF) 以外のピークは検出されず, バッファー中の成分によって CE による泳動には影響しなかった. また, ssDNA では約 18 分で ssDNA 由来のピークが, Lp(SG1)では約 8 分で Lp(SG1)由来の鋭利なピークが検出され, ssDNA と Lp(SG1)の混合液ではその両方が検出された.

ここで, 本研究で克服する問題点の一つであり, かつ従来法の Cell-SELEX がラウンドを繰り返さなければならない理由である非結合型 DNA のコンタミネーションの影響について考える. PectI 法で濃縮-分離した細胞-DNA アプタマー複合体ピークおよび非結合型 DNA の理論段数はそれぞれ 260,000 および 20,000 であり, 分離度は 16 - 28 であることが明らかとなっている. 本研究では,  $6 \times 10^{14}$  分子の ssDNA を PectI 法に供していることから, 非結合型 DNA ピークを正規分布と仮定し, その標準偏差を  $\sigma$  とすると,  $10\sigma$  以上離れた泳動位置には, DNA は理論上一分子も存在しないことになる. 一方, 分取区画である Lp(SG1)由来のピークは, 非結合型 DNA ピークから約  $30\sigma$  だけ離れた位置に泳動されたことが確認できた. したがって, Lp(SG1)由来ピークを含む区画を精密分取することにより, ssDNA Library ピークからの非結合型 ssDNA を全く混入させることなく, 細胞に結合する ssDNA だけを回収することが可能である. 以上の事から, 従来法の Cell-SELEX 法とは異なり, 非結合型 ssDNA と細胞-ssDNA 複合体を高度に分離可能であるため, かつ 1 ラウンドでの細胞結合型アプタマーを選抜可能である. 従って, デュアル検出器 CE-UV システムを用いて, 60 秒の間隔で含まれる DNA 複合体を含む Lp(SG1)ピークの正確な分取を実施した.

PectI 選抜後, 分取した Lp(SG1)ピークに存在する ssDNA (選抜プール) を PCR で増幅し, 続いて PAGE で検出した (Figure 4-2). また, ネガティブコントロール (Lp(SG1)を添加せずに調製した DNA ライブラリーサンプル溶液を注入・PectI 分離した後に得られた同等の画分) には, 65mer の ssDNA が含まれていないことを確認した. さらに, 選択されたプールは, その後, PectI-LIF システムによる分析の前に Lp(SG1)と混合された (Figure 4-3). その結果, 選抜プールに含まれる結合 DNA が細胞表面に観察され, 鋭いピークが検出された. また, Lp(SG1)陽性のコントロール (FAM 標識ランダム化 ssDNA) では, Lp(SG1)-FAM 標識 ssDNA 複合体に由来するシャープなピークが得られないことが確認された. このように, Lp(SG1)の表面に結合した ssDNA を選択的にプールして得ることができた.

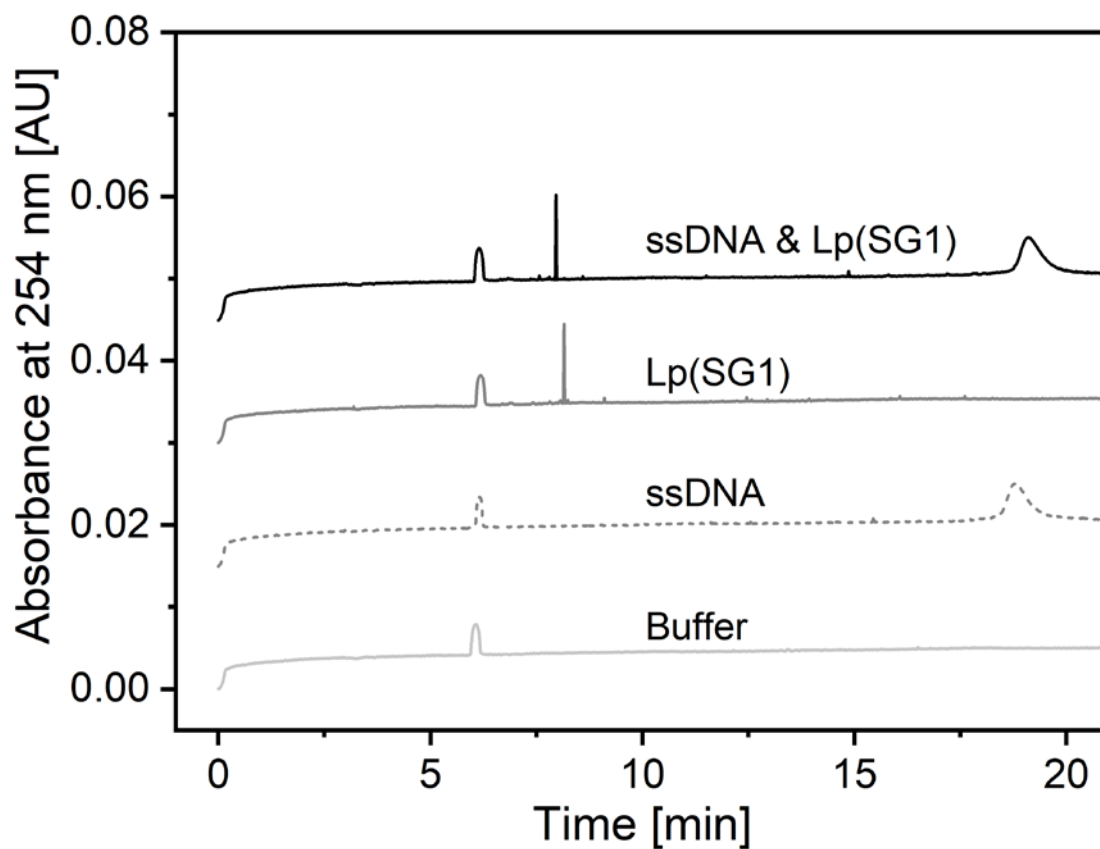


Figure 4-1 典型的な PectI によるバッファー, ssDNA Library, Lp(SG1), Lp(SG1)と ssDNA 混合溶液の電気泳動図. Lp(SG1) =  $1.9 \times 10^5$  cfu/mL, ssDNA Library = 5  $\mu$ M, 注入量 = 100 nL, 印加電圧 = 25 kV

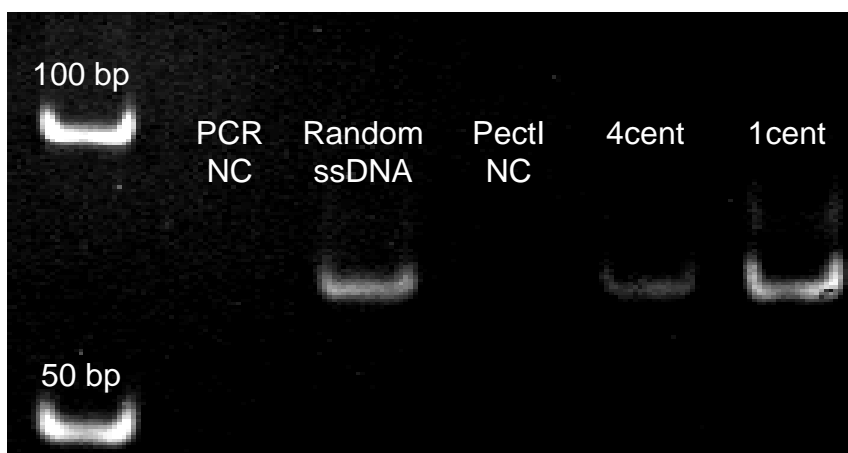


Figure 4-2 PectI 選抜プール(1cent, 4cent), PectI 選抜時のネガティブコントロール(PectI NC), Random ssDNA, PCR ネガティブコントロール(PCR NC)の PAGE 画像

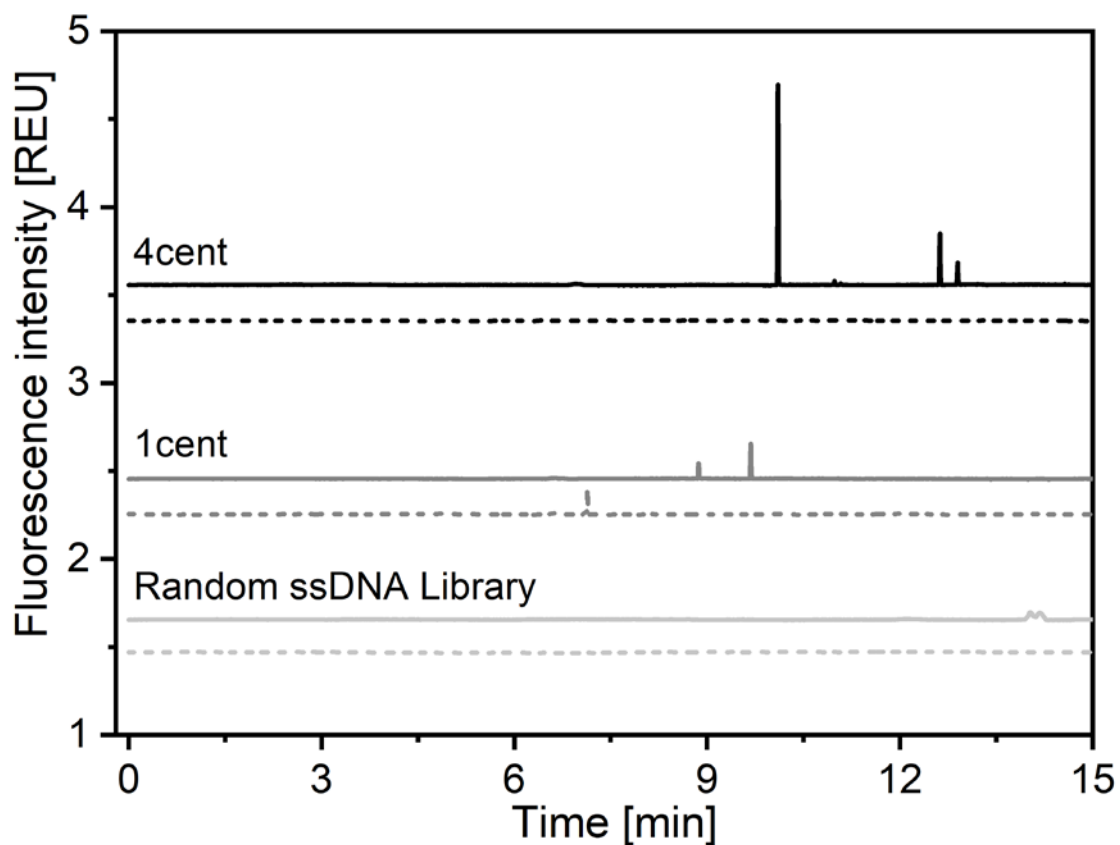


Figure 4-3 FAM 修飾ランダム ssDNA ライブラリー, 及び Lp(SG1)結合後の各選抜プールの電気泳動図. 点線は Lp(SG1) なし, 実線は Lp(SG1) あり; Lp(SG1) =  $1.9 \times 10^5$  cfu/mL, ssDNA = 100 nM, 注入量 = 100 nL, 印加電圧 = 25 kV

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

### 4.3.2 CL 解析と DL 解析による DNA アプタマー候補配列の決定

1cent, 4cent, ポジティブコントロール(ランダム DNA ライブラリー)の各プールを NGS によって配列決定した。配列のリード数は、それぞれ 252,190, 16,177, 394,888 であった。CD-HIT ソフトウェアを用いたペアワイズ分類アライメントにより、ファミリー(類似性の高い配列)を形成している配列の数、及び DL 解析による特徴分析で、ファミリー内に存在すると思われる結合能のより高いアプタマー配列を獲得するために、4cent の選抜プールについて全配列のファミリー区分と評価を行い、ファミリーの中で結合能がより高い配列を判別し、かつペアワイズ分類アライメントで識別不可能なモチーフを評価した。このペアワイズ分類アライメントによる CL 解析と DL 解析を組み合わせ、Lp(SG1)結合型 DNA アプタマー配列を同定した(Figure 4-4, Table 4-2)。また、本研究で選抜された DNA アプタマー候補配列の二次元構造について Figure 4-5 に示す。Figure 4-4(A)・(B)より、ファミリー構成配列数( $N_{\text{obs}} = 6$ )の配列群は DL によって 1cent の選抜プールの傾向があると判断された。一方で、 $N_{\text{obs}} = 4$  の一部の配列群は DL によって 4cent の選抜プールの傾向があると判断された。また、Figure 4-4(D)・(E)より、 $N_{\text{obs}} = 6$  の配列群、 $N_{\text{obs}} = 4$  の一部の配列群が 4cent の選抜プールの傾向があると判断された。これらのファミリーの中に Lp(SG1)と結合する DNA アプタマーが存在すると考え、これらのファミリーの親配列を抽出して DNA アプタマー候補配列とした。また、 $N_{\text{obs}} = 4 \sim 6$  のファミリーは ssDNA ライブラリーの傾向ではないと判断されたため、ssDNA ライブラリー由来のものではないことが示唆された。

#### 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

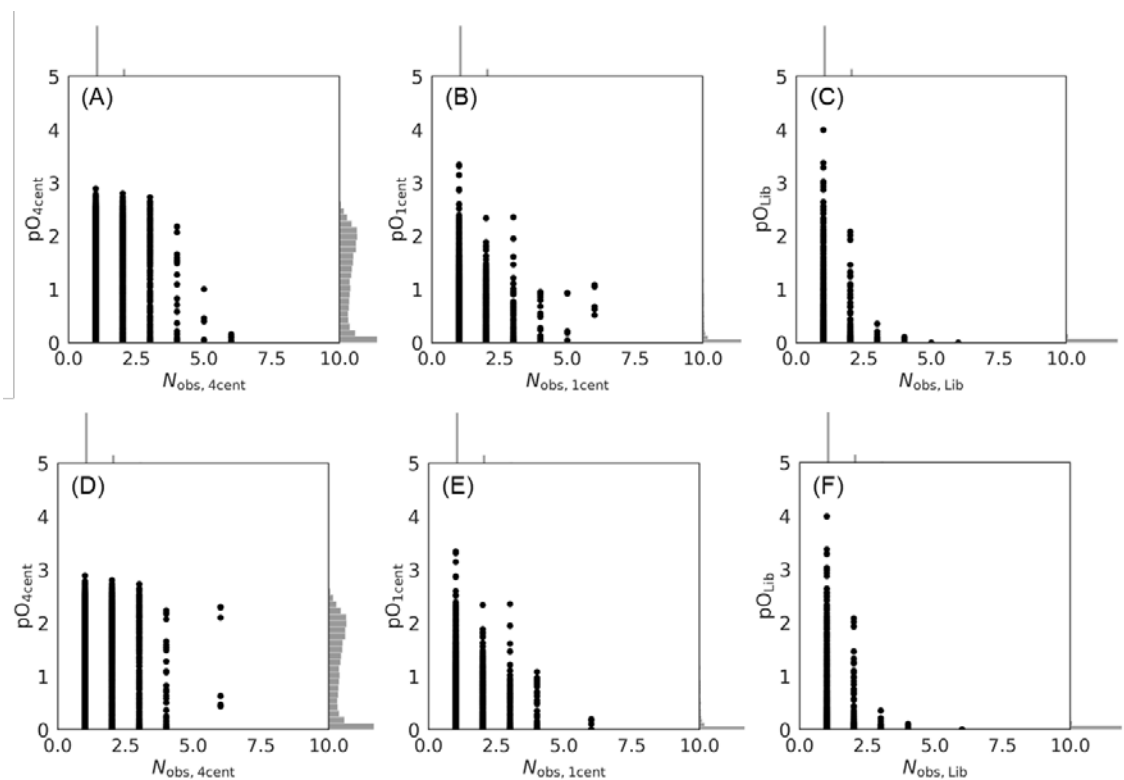


Figure 4-4 Lp(SG1)結合 ssDNA のペアワイズ分類アライメント(CL)による解析と DL による特徴づけの相関図。縦軸は DL 解析により算出された指定された選択プール  $x$  に分類される確率( $pO_x$ )、横軸は各ファミリーを構成する配列数( $N_{obs}$ )である。(A)-(C):アライメント間隔:20 塩基, 一致率 96% (6 塩基の違いまで許容). (D)-(F):アライメント間隔:全ランダム領域, 一致率 84% (4 塩基の違いまで許容). (A) (D):縦軸に 4cent 選抜プールに分類される確率( $pO_{4cent}$ ), (B)(E):縦軸に 1cent 選抜プールに分類される確率( $pO_{1cent}$ ), (C)(F):縦軸に ssDNA ライブラリーに分類される確率( $pO_{Lib}$ ).

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

Table 4-2 本研究で選抜された DNA アプタマー候補配列

アプタマー名称	ファミリー 構成配列数	NGS による 総カウント数	pO <sub>x</sub> 平均値		
			pO <sub>4cent</sub>	pO <sub>1cent</sub>	pO <sub>Lib</sub>
Lp1	6	11	0.080	0.84	0.0015
Lp2	6	17	1.37	0.083	0.00042
Lp3	5	7	0.39	0.46	0.0013
Lp4	4	19	1.60	0.038	0.000095
Lp5	4	17	1.38	0.018	0.0023
Lp6	4	8	0.50	0.30	0.00060
Lp7	4	6	0.056	0.91	0.0012

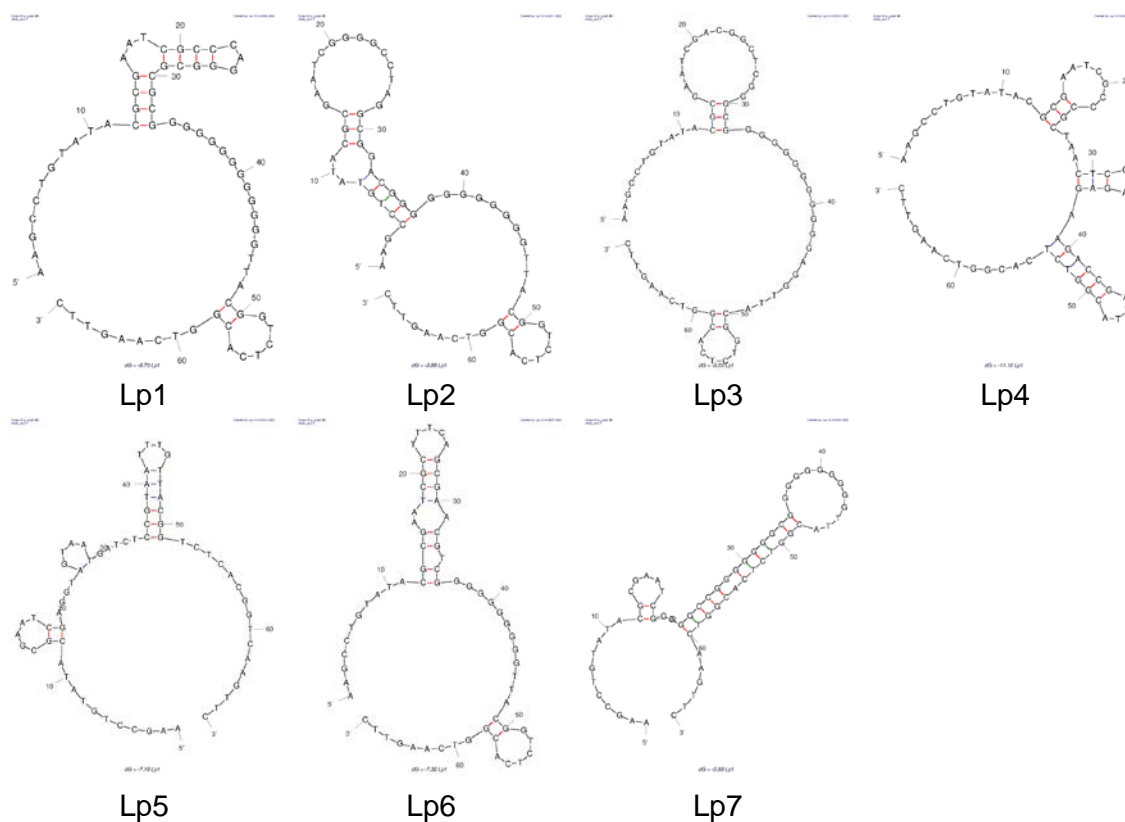


Figure 4-5 Mfold によって決定された Lp1-Lp7 の二次元構造

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

### 4.3.3 DNA アプタマー候補配列の結合試験と配列の同定

4.3.2の結果より、各ファミリーを形成した配列の親配列(アプタマー候補配列)を7つ抽出、及び先行研究[16]で選抜されたアプタマー配列について結合試験を実施し、解離定数( $K_d$ )を算出した(Figure 4-6, Table 4-3). 今回 PectI 選抜法で選抜されたアプタマー候補配列のうち、Lp1, Lp2, Lp4, Lp7 は先行研究のアプタマー配列(R10C1)よりも低い  $K_d$  を示した. このため、本研究で選抜されたアプタマー候補配列のうち、いくつかは Lp(SG1)に対して先行研究で選抜された DNA アプタマーよりも高い結合能力を示した. また、Table 4-2 と比較すると、Lp1, Lp7 は 1cent の選抜プール中の配列群に近いと判断された配列であり、Lp2, Lp4 は 4cent の選抜プール中の配列群に近いと判断された配列であった. このため、先行研究よりも低い  $K_d$  が算出されたアプタマーと、PectI 分離前に実施した遠心分離の回数は関連が見られなかった.

また、PectI 選抜法における細菌-DNA 複合体の DNA ライブラリーからの高度な分離は、複合体を非平衡場に置くことに他ならず、複合体が泳動されている間、結合し続けた DNA だけを取り出す方法である. 従って、泳動中に解離してしまうような緩く細胞と結合した解離速度の速い DNA を完全に除いた状態での選抜できる. また、泳動時間を外部圧力によって調整することで、解離速度の速い DNA の除去量の調整が可能となる. ここでは、本研究で選抜されたアプタマー候補配列のうち、最も低い  $K_d$  が算出された配列(Lp1,  $K_d = 568 \pm 330$  nM),  $K_d$  が R10C1 よりも低い配列の中で最も高い  $K_d$  が算出された配列(Lp4,  $K_d = 1592 \pm 1150$  nM), 最も高い  $K_d$  が算出された配列(Lp5,  $K_d = 8779 \pm 6187$  nM), 先行研究で示された R10C1 ( $K_d = 3632 \pm 1491$  nM), 及びランダム ssDNA Library ( $K_d = 16175 \pm 15068$  nM) について解離反応速度 ( $k_d$ ) の評価を行い、PectI 選抜法が解離速度の遅い DNA アプタマー選抜法となり得るかを検証した(Figure 4-7, Table 4-3). 本研究で選抜した DNA アプタマー候補配列は先行研究で選抜された DNA アプタマーやランダム DNA Library よりも低い  $K_d$ ,  $k_d$ , 長い  $t_{1/2}$  であった. 従って、本研究で選抜した DNA アプタマーは Lp(SG1)に対して高いアフィニティーを有する( $K_d$ ,  $k_d$  が先行研究で選抜されたアプタマー配列よりも小さい) DNA アプタマーが選抜できた. 一般的な Cell-SELEX 法では、得られた配列の多くが非結合性の配列であることも多くあるが、PectI 選抜法では高いヒット率で DNA アプタマーを選抜できることを示している. これは、PectI 選抜法により、回収する細菌-DNA アプタマー複合体を DNA Library から完全に分離された結果であると考えられる. また、PectI 選抜法における複合体と DNA ライブラリーの分離は、自由溶液中で完全分離を行う非平衡系であり、泳動中に解離速度の速い DNA を除去できたことが示唆された.

第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

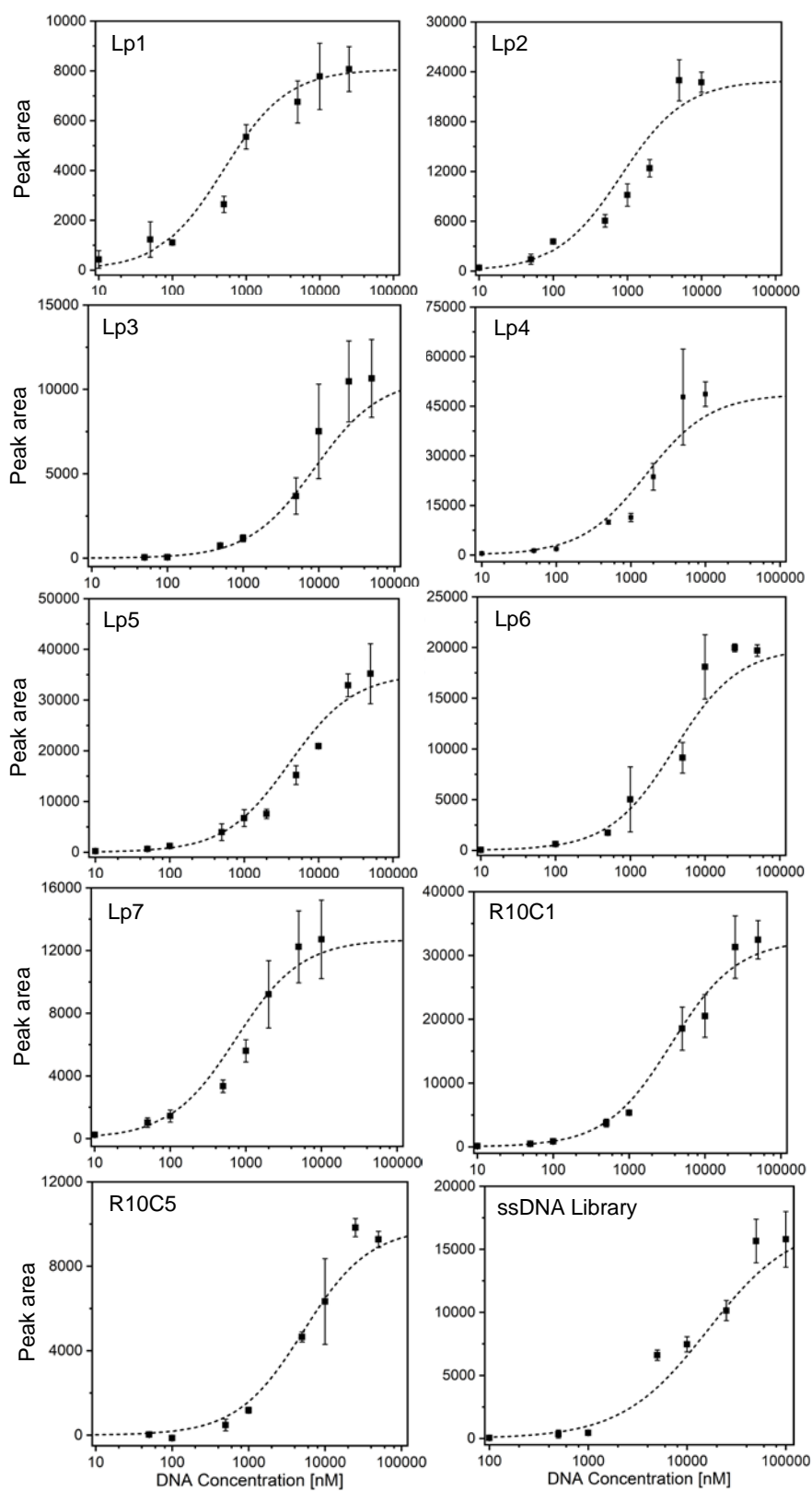


Figure 4-6 本研究で選抜した DNA アプタマー、先行研究で選抜された DNA アプタマー、およびランダム DNA ライブラリーと Lp(SG1)複合体の結合曲線

第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

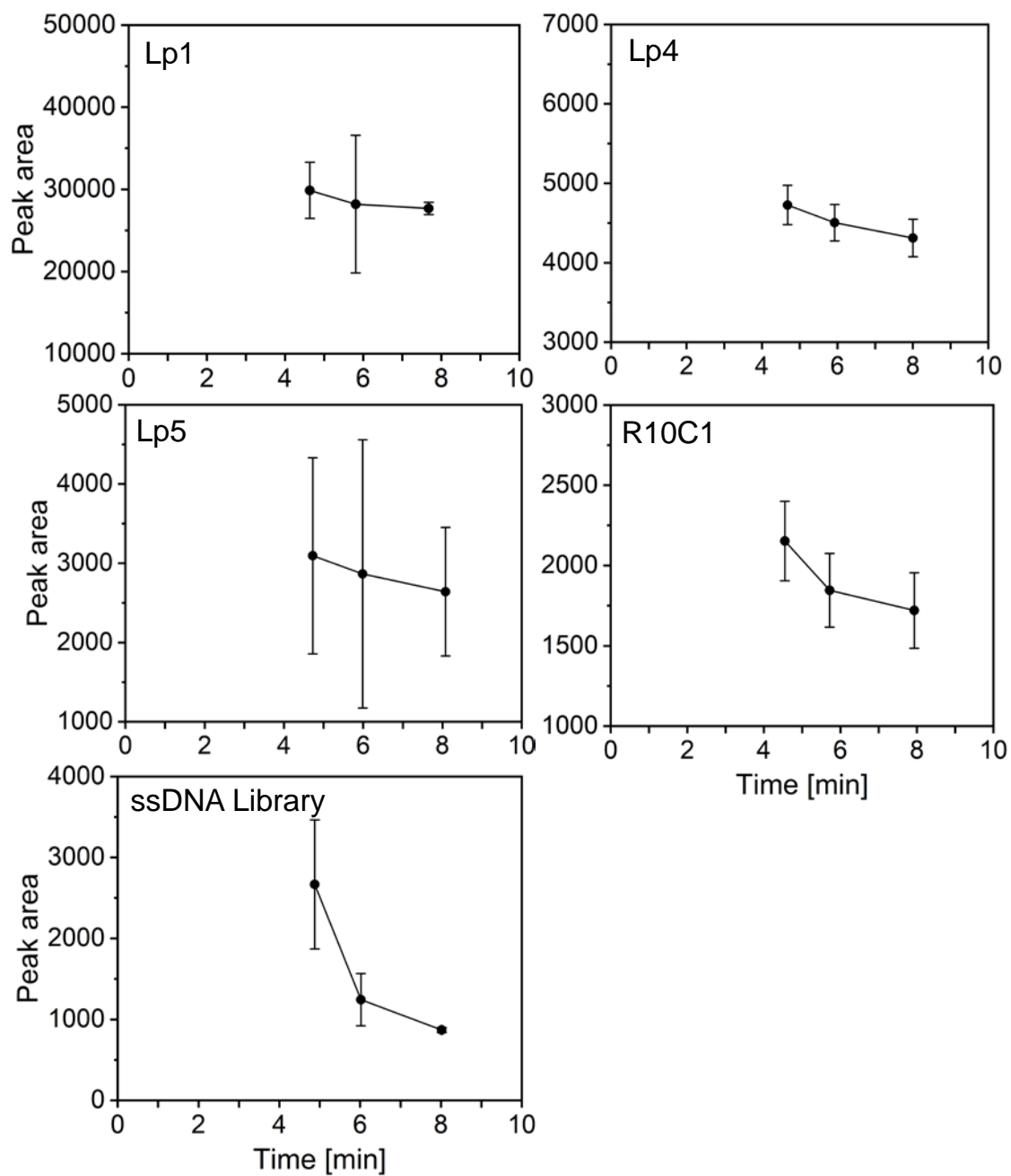


Figure 4-7 本研究で選抜した DNA アプタマー, 先行研究で選抜された DNA アプタマー, ランダム DNA ライブラリーと Lp(SG1)複合体ピークの移動時間変化によるピーク面積の影響

#### 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

Table 4-3 本研究で算出した DNA アプタマーと Lp(SG1)複合体の解離平衡定数, 解離反応速度定数, 半減期

アプタマー 名称	ランダム領域の塩基配列	$K_d$ [nmol L <sup>-1</sup> ]	$k_d$ [ $\times 10^{-4}$ sec. <sup>-1</sup> ]
Lp1	CCCAGGGCGCGCGGGGGGGGGGGGG	568±330	3.6±4.5
Lp2	GGGCCTAGGCGGACGGGGGGGGGGG	822±648	
Lp3	ACGGCTCGGGCGGGGGGGGGGGGAGG	4076±1840	
Lp4	CCCGCTAACTCGTAGAGAAGACCGA	1592±1150	1.8±1.9
Lp5	AGGTAGTAATGATCTCCGTAATTTG	8779±6187	6.1±10.4
Lp6	CTTTCAGCGAACGTCGGGGGGGGGG	3868±1819	
Lp7	GGGGCCGGGGGGGCGGGGGGGGGG	735±560	
R10C1	CCACCCACGCTGCTCC	3632±1491	7.8±2.3
R10C5	GGACAGTGCTGAAAAGTGTGACCCCC	7040±1982	
Randomized library	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	(More than) 16175±15068	50.1±6.9

## 第4章 シングルラウンド選抜法によるレジオネラ細菌結合型 DNA アプタマーの探索

### 4.4 結論

本研究は新規の Lp(SG1)結合 DNA アプタマーについて、PectI 選抜法によるシングルラウンド選抜と、類似配列群に分けるクラスタリング法とディープラーニングを用いた定量的処理に基づく大規模 NGS 解析によって選抜することができた。このアプタマー選抜システムは、細胞由来のサンプルに対して、自由溶液中でシンプルな CE 分画を 1 回で完了するものである。従来の Cell-SELEX では通常 10~20 ラウンドを実施するが、1 ラウンドあたりのアプタマー選抜は複雑なプロセスであり、完了させるまでに長い時間を要する。また、Cell-SELEX では、複数のラウンドで選択すると、配列の種類が大きく偏るという問題がある。そのため、より少ないラウンド数で選抜できるプロセスが望まれている。一方で、本研究で実施した選抜法は、Cell-SELEX とは対照的に、短時間でアプタマー選抜が終了し、簡単な半自動 CE 分離法を用いて蛍光標識された配列決定済みのアプタマーを獲得できた。細菌細胞と DNA の複合体は、破壊された細菌細胞や死んだ細菌細胞から放出された原形質要素を CE 分離過程で分離できるため、この PectI 選抜法では、無傷の細胞表面に対してのみ選択的なアプタマーを得ることができる手法である。この選抜システムで獲得できた DNA アプタマーの配列は、先行研究における、従来の Cell-SELEX で選抜された DNA アプタマーと比較して低い  $K_d$ ,  $k_d$  を持っており、平衡論的、反応速度論的に Lp(SG1)と高い結合能を持った DNA アプタマーを獲得できた。すなわち、先行研究で選抜された DNA アプタマーよりも Lp(SG1)と特異的に結合し、安定した複合体を形成するアプタマーであると考えられ、我々が目標としているバイオセンサーの開発に適した DNA アプタマーを選抜できたと考えられる。今後は戦術したように、本アプタマーを用いたバイオセンサーを開発し、実際の環境中に存在する Lp(SG1)の検出が可能かどうか検討する。また、本研究で採用した PectI 選抜法は細菌のみならず、粒子系であれば適用でき、これまでに HL-60 等の動物細胞にも適用できたが、細菌よりも小さな粒子系に適用した事例はない。そのため、細菌や動物細胞以外の粒子系に対しても適用可能かどうか検討する。具体的な標的は細胞外小胞体(エクソソーム)やウイルスを対象とする。

参考文献

1. Polo-López MI, Castro-Alfárez M, Nahim-Granados S, et al (2017) Legionella jordanis inactivation in water by solar driven processes: EMA-qPCR versus culture-based analyses for new mechanistic insights. *Catal Today* 287:15–21.  
<https://doi.org/10.1016/j.cattod.2016.10.029>
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2011) Legionellosis --- United States, 2000-2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 60:1083–1086
3. Waak MB, LaPara TM, Hallé C, Hozalski RM (2018) Occurrence of Legionella spp. in Water-Main Biofilms from Two Drinking Water Distribution Systems. *Environ Sci Technol* 52:7630–7639. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01170>
4. Arashiro T, Nakamura S, Asami T, et al (2020) SARS-CoV-2 and Legionella co-infection in a person returning from a Nile cruise. *J Travel Med* 27:1–3.  
<https://doi.org/10.1093/jtm/taaa053>
5. Mansi A, Amori I, Marchesi I, et al (2014) Legionella spp. survival after different disinfection procedures: Comparison between conventional culture, qPCR and EMA-qPCR. *Microchem J* 112:65–69. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2013.09.017>
6. Seok Kim Y, Ahmad Raston NH, Bock Gu M (2016) Aptamer-based nanobiosensors. *Biosens Bioelectron* 76:2–19. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.06.040>
7. Zhao Y, Yavari K, Liu J (2021) Critical evaluation of aptamer binding for biosensor designs. *TrAC Trends Anal Chem* 135907. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116480>
8. Saito S (2021) SELEX-based DNA Aptamer Selection: A Perspective from the Advancement of Separation Techniques. *Anal Sci* 37:17–26.  
<https://doi.org/10.2116/analsci.20SAR18>
9. Saito S, Massie TL, Maeda T, et al (2012) On-column labeling of gram-positive bacteria with a boronic acid functionalized squarylium cyanine dye for analysis by polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis. *Anal Chem* 84:2452–2458.  
<https://doi.org/10.1021/ac2031145>
10. Cherney LT, Obrecht NM, Krylov SN (2013) Theoretical modeling of masking DNA application in aptamer-facilitated biomarker discovery. *Anal Chem* 85:4157–4164.  
<https://doi.org/10.1021/ac400385v>
11. Saito S, Hirose K, Tsuchida M, et al (2016) Rapid acquisition of high-affinity DNA aptamer

- motifs recognizing microbial cell surfaces using polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis. *Chem Commun* 52:461–464. <https://doi.org/10.1039/C5CC07268A>
12. Hirose K, Tsuchida M, Asakura H, et al (2017) A single-round selection of selective DNA aptamers for mammalian cells by polymer-enhanced capillary transient isotachopheresis. *Analyst* 142:4030–4038. <https://doi.org/10.1039/C7AN00909G>
  13. Fu L, Niu B, Zhu Z, et al (2012) CD-HIT: Accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* 28:3150–3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
  14. Saito S, Sakamoto T, Tanaka N, et al (2021) Single-Round DNA Aptamer Selection by Combined Use of Capillary Electrophoresis and Next Generation Sequencing: An Aptamomics Approach for Identifying Unique Functional Protein-Binding DNA Aptamers. *Chem – A Eur J* 1–11. <https://doi.org/10.1002/chem.202100177>
  15. Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31:3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>
  16. Saad M, Chinerman D, Tabrizian M, Faucher SP (2020) Identification of two aptamers binding to *Legionella pneumophila* with high affinity and specificity. *Sci Rep* 10:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65973-3>

### 第5章 総括

#### 5.1 本研究で得られた知見

本研究は誰でも手軽に安全な水へのアクセスを可能にするため、金属イオンと細菌を標的とした簡易分析法の開発と実用化を目的として実施した。この目的に向け、本研究では水中の重金属、及び細菌の簡易分析法を開発した。水中の重金属は As(III)及び As(V)を標的とした簡易分析法を開発した。また、水中の Lp(SG1)を標的とした簡易分析法の開発に向け、Lp(SG1)結合型 DNA アプタマーを開発した。

簡易 As(III)分析法は As(III)と結合する DNA アプタマー「Ars-3」を使用し、AuNPs を媒体とした比色法を開発した。各条件を検討・最適化した後に検量線を作成した結果、検出限界値は 2.1  $\mu\text{M}$  となった。また、地下水に As(III)を適量添加した擬似地下水に対して本手法を適用したところ、添加したサンプルの As(III)濃度と検出された As(III)濃度が概ね一致した。また、サンプル中に As(V)が共存していた場合でも、本簡易 As(III)分析法によって As(V)の影響を受けることなく、As(III)濃度を定量できた。このため、本手法は地下水中の As(III)の検出、濃度の定量に使用可能であることが示唆された。また、2019 年に報告された Zong らの論文を参考に、我々は上記の簡易 As(III)分析法における、プローブ溶液中に分散した Ars-3、及び Ars-3 以外の他の ssDNA 配列を用いて、AuNPs 表面における Ars-3 と As(III)の相互作用を調べた。その結果、Ars-3 は As(III)に特異的に結合することはできなかった。さらに、AuNPs をベースとした簡易 As(III)分析法は Ars-3 だけでなく、他の ssDNA 配列を用いても As(III)濃度を定量でき、As(III)検出メカニズムは Ars-3 ではなく AuNPs が重要であることが示唆された。

簡易 As(V)分析法は、DNA や As(V)を吸着する CeO<sub>2</sub>NPs を基にした、蛍光色素修飾 DNA を用いた手法を開発した。各条件を検討・最適化した後に検量線を作成した結果、検出限界値は 0.44  $\mu\text{M}$  となった。本手法で測定した地下水中の As(V)濃度は HPLC-ICP-MS での測定結果と概ね一致した。また、第 2 章で開発した簡易 As(III)分析法と組み合わせることで、共存金属イオンによる阻害を受けることなく、As(III)濃度、As(V)濃度をそれぞれ化学種毎に測定できた。今後は、標準偏差を小さくし、CeO<sub>2</sub>NP への FAM 修飾 DNA と As(V)の吸着・脱着を安定させる必要があると考えられる。本手法は現場での分析に応用できる As(V)センサーの開発につながる可能性があり、簡易 As(III)分析法と組み合わせることで、環境水中の As について正確に評価できると考えられる。

Lp(SG1)結合型 DNA アプタマーの開発は、第 4 章の背景で述べた、従来の SELEX 法が抱えていた問題点を克服した新規選抜法である、「CE による PectI 選抜法及びアプタマー配列の網羅

## 第5章 総括

的同定法」によって選抜した. CE による泳動条件を検討後, 泳動図において Lp(SG1)由来とされるピーク位置を分取し, 選抜プールとした. 分取した選抜プール中に存在した ssDNA は Lp(SG1)と結合することが判明した. この選抜プール中の ssDNA 配列を NGS によって配列解析後, CL 解析・DL 解析によって Lp(SG1)結合型 DNA アプタマー候補配列を決定した. この候補配列について, 結合試験によって  $K_d$ , 及び  $k_d$  を算出したところ, Lp1 (AAGCCTGTATACGCGAATCGCCCA-GGGCGCGCGGGGGGGGGGGTACGGTCTCACGGTCAAGTTC) が最も低い  $K_d$ ,  $k_d$  を示し, 先行研究にて開発された DNA アプタマー配列よりも Lp(SG1)と高い結合能を持ったアプタマー配列を探索できた.

### 5.2 本研究の課題と今後の展望

As(III)・As(V)簡易検出法については, 現在のところ, 日本の地下水に対して適用評価を実施したところまでで留まっている. 特に簡易 As(III)分析法は実際に自然由来の As(III)を含む地下水に対して適用評価を実施していない. 世界では, バングラディッシュをはじめとして, 自然由来の As(III)を高濃度に含む地下水や, As 濃度が mg/L スケールで存在する地域が広く分布しており, これらの地下水を対象とした本手法の適用評価ができていない. そのため, As 含有地下水に対して簡易分析法とする地下水の種類を多くすることが課題として挙げられる. また, 本研究で開発した簡易 As(III)検出法と簡易 As(V)検出法を組み合わせた地下水中の As の価数ごとの分析に挑戦し, 従来では LC-ICP-MS でしかできなかった As 化学種毎の分析が本研究で開発した手法でできるのかについて評価しようと考えている.

Lp(SG1)結合型 DNA アプタマーの開発では, 現時点で Lp(SG1)との結合能の高い DNA アプタマーの開発までしかできておらず, この DNA アプタマーを用いたセンサーの開発までは至っていない. そのため, 今後は本研究で開発した Lp(SG1)結合型 DNA アプタマーを用いたセンサー開発に着手する予定である. また, PectI 選抜法に特有の現象として, グアニン(G)リッチな DNA アプタマー (DNA アプタマーのランダム領域中に G の占める割合が多いアプタマー配列) が選抜される傾向にある. なぜ PectI 選抜法によって G リッチな DNA アプタマー配列が選抜される傾向があるのかについては理論的には不明である. さらに, PectI 選抜法において, ctITP モードで細菌等の粒子系が濃縮された状態を維持する際にポリエチレンオキシド(PEO)を添加しているが, なぜ PEO を添加することで濃縮状態が維持されるのかについても未だ分かっていない. そのため, 今後はなぜ G リッチな DNA アプタマーが選抜される傾向にあるのか, PEO を添加することでなぜ粒子系の濃縮状態が維持されるのかについて, 理論的なメカニズムの解明も必要である.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり指導して下さいました北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻教授 佐藤久先生に心より感謝いたします。佐藤先生には、筆者が修士学生の時から数多くのご指導を賜りました。佐藤先生にご指導いただいたおかげで、数多くの貴重な経験をさせて頂いたと共に、本論文を執筆することができました。本当にありがとうございました。

第4章については、研究の遂行にあたり、多くのご助言を賜りました埼玉大学理工学研究科物質科学部門物質基礎領域教授 齋藤伸吾先生に深く感謝いたします。齋藤先生には筆者が博士課程の時より Lp(SG1)結合型 DNA アプタマー分子の PectI 選抜システム、及び CL 解析、DL 解析の設計を基礎からご指導賜りました。本当にありがとうございました。また、埼玉大学理工学研究科物質科学部門物質基礎領域齋藤研究室の先輩、同輩、後輩の皆様にも、様々な面で大変お世話になりました。深く感謝いたします。

元北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻教授 高橋正宏先生には私が修士課程在籍時に、研究室でのゼミを通じ、多くの的確なご助言を賜り、本論文の副査も引き受けて頂きました。深く感謝いたします。また、同助教 深澤達矢先生、中屋佑紀先生には研究室での研究活動を通じ、多くのご指導を賜りました。心より感謝いたします。

北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻教授 岡部聡先生、木村克輝先生、同環境創生工学専攻准教授 松下拓先生には本論文の副査を引き受けて頂き、貴重なご意見、ご助言を賜りました。心より感謝いたします。

北海道大学大学院工学研究科環境創生工学専攻水質変換工学研究室秘書 菊池朋子様には、出張申請など、数多くのご協力を賜りました。深く感謝いたします。

中央大学工学部人間総合理工学科(理工学研究科都市人間環境学専攻)教授 山村寛先生、国立研究開発法人土木研究所流域水環境研究グループ水質チーム主任研究員 對馬育夫先生、元同水質チーム研究員 武田文彦先生、同研究所流域水環境研究グループ水質チームの皆様には学部時に研究指導を賜りました。本論文には学部時に実施した研究は書いておりませんが、学部時に数多くの貴重な経験をさせて頂きました。心より感謝いたします。

本研究の一部は、独立行政法人日本学術振興会平成 31 年度科学研究費補助金(特別研究員奨励費)に行われました。ここに記して謝意を表します。

末筆ながら、これまでの学生生活を支えてくれた両親をはじめ家族に心から感謝いたします。