

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-46010

(P2005-46010A)

(43) 公開日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48 Z N A Z	2 G O 4 5
C 1 2 N 9/12	C 1 2 N 9/12	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/04	C 1 2 Q 1/04	4 B O 5 0
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50 P	4 B O 6 3
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	
審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 16 頁)		

(21) 出願番号	特願2003-202992 (P2003-202992)	(71) 出願人	503360115
(22) 出願日	平成15年7月29日 (2003.7.29)		独立行政法人科学技術振興機構 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
		(74) 代理人	100104673 弁理士 南條 博道
		(72) 発明者	黒田 章夫 広島県東広島市三永2-23-2
		Fターム(参考)	2G045 AA28 AA35 BA11 BB20 BB41 BB50 BB51 CB01 CB21 DA15 DA20 FA11 FB01 FB12 GC15 4B024 AA20 BA10 CA01 CA02 CA05 DA06 HA11 4B050 CC05 LL03 4B063 QA01 QQ05 QQ27 QQ63 QR07 QR42 QR74 QX02

(54) 【発明の名称】 改良されたATPの増幅方法およびその利用

(57) 【要約】

【課題】 1個の微生物の存在を検出し得る超高感度のアッセイ法を提供すること。

【解決手段】 ATP、AMPおよびポリリン酸化合物を含有する混合物にADPを含まないポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質(PKK-ADK)を作用させるATPの増幅方法を用いて、外因性の極微量のATPが増幅、検出される。細胞1個のレベルのATPを増幅し、検出できる超高感度のATP増幅法およびこのATP増幅法に基づく超高感度微生物アッセイ法が提供される。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

A T P、A M P およびポリリン酸化合物を含有する混合物に、ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質を作用させる工程を含む、A T P の増幅方法。

【請求項 2】

前記ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質が、A D P を含まない融合タンパク質である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

A T P、A M P およびポリリン酸化合物を含有する混合物に、ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質を作用させて、A T P を増幅する工程；および、該増幅した A T P を検出する工程；を包含する A T P の検出方法。

10

【請求項 4】

前記ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質が、A D P を含まない融合タンパク質である、請求項 3 に記載の検出方法。

【請求項 5】

微生物の存在を迅速に検出する方法であって、

微生物含有試料を処理して、A T P 含有試料を調製する工程；

該 A T P 含有試料を A T P 増幅系に添加して A T P を増幅する工程；および、

該増幅した A T P を検出する工程；を包含し、

該 A T P 増幅系が A M P、ポリリン酸化合物、および A D P を含まないポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質を含む、方法。

20

【請求項 6】

微生物の存在を迅速に検出するためのキットであって、A M P、ポリリン酸化合物、および A D P を含まないポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質、を含有する A T P 増幅試薬と、A T P を検出する A T P 検出試薬を包含する、キット。

【請求項 7】

さらに細胞溶解用試薬を備える、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

A T P、A M P、およびポリリン酸化合物の混合物に、アデニレートキナーゼ、および A D P を含まないポリリン酸キナーゼを作用させて A T P を増幅する方法。

30

【請求項 9】

ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質。

【請求項 10】

A D P を含まない、ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、A T P の増幅方法および該方法を用いて微生物の存在を迅速に検出する方法、並びのそのためのキットに関する。

【0002】

40

【従来の技術】

迅速かつ高感度で微生物を検出する方法は、例えば、食中毒予防のための食品製造工場における微生物の検出などの環境微生物の制御、食品（例えば、ミルクなどの乳製品）における微生物の混入の検査など、食品業界、酪農業界などにおいて非常に重要である。従来の栄養培地を用いて生細胞を検出する方法においては、生存微生物をカウントするまでに数日を要する。

【0003】

このような微生物の検出に、全ての生物に存在する A T P を利用する方法が検討されている。A T P を検出する方法として、ホタルルシフェラーゼを用いる生物発光アッセイが知られている。この方法は、A T P を測定する確立された方法であり（非特許文献 1 参照）

50

、迅速な衛生学的なモニタリングとして用いられている（非特許文献2）。さらに、最近ではバイオテロに対する対抗技術として、ATPアッセイが提案されている（非特許文献3）。

【0004】

しかし、従来のATPのアッセイ法には検出限界（例えば、約 10^4 大腸菌コロニー形成単位（CFU）/アッセイ）がある。この感度では、工業的な応用には十分な感度とはいえない。

【0005】

コンピューターシミュレーションでは、アデニレートキナーゼ（ADK）およびピルビン酸キナーゼ（PK）を用いるATP増幅は、高感度の光度計を用いなくとも、非常に低いレベルのATPを検出し得る可能性があることが示唆されている（非特許文献4）。しかし、この方法は、実際に行われていない。

【0006】

微量のATPをアッセイするために、ATPを増幅させる方法が提案されている（特許文献1）。この特許文献1に示される方法を図1で説明する。図1において、ADKはアデニレートキナーゼ（adenylate kinase）、poly Pはポリリン酸（polyphosphate）、PPKはポリリン酸キナーゼ（polyphosphate kinase）を意味する。以下、本明細書においても、この略号を使用するときがある。図1aは、ATPの非存在下では、理論的には、AMPとポリリン酸とからはATPが生成しないことを示している。図1bに示すように、ATPが存在すると、ADKによって、ATPからAMPへのリン酸基転移反応が起こり、2分子のADPが生成する（第1反応）。この第1反応で生じた2分子のADPは、PPKの作用により、ポリリン酸からリン酸基を受け取り、2分子のATPを生じる（第2反応）。この第2反応で生じた2分子のATPは、再度、第1反応に使用され、4分子のADPを生成し、この4分子のADPはPPKによって4分子のATPに変換される。

【0007】

このように、特許文献1では、過剰のAMPとポリリン酸を存在させて、ADKとPPKの平衡状態をそれぞれ、ADP生成方向（第1反応）およびATP生成方向（第2反応）に向かわせるようにし、第1反応と第2反応を1つの反応系として、 n 回この反応系を繰り返すことにより、1個のATPが 2^n 個に増幅される。従って、この方法は、優れたATPの増幅方法である。

【0008】

この特許文献1の方法は、従来のレベルよりも高い感度で、細胞の存在を検出し得る点では優れた方法であるが、この方法では、理論的には起こらないATP非存在下でのATPの増幅が、低いレベルであるが、時折見られることが判明し、外因性の（外部から添加した）ATPのみを増幅し、検出するという確実性に欠けるという問題がある。すなわち、細胞1個のレベルのATPを増幅し、検出し得るまでの感度を確実に提供できないという問題がある。さらに、ADKとPPKとの活性の調整などの問題もある。

【0009】

【特許文献1】

特開2001-299390号公報

【非特許文献1】

デルカおよびマッセルロイ（DeLuca, M. and W. D. McElroy.）「Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions」 Biochemistry 26巻、921-925頁（1974年）

【非特許文献2】

バウティスタ（Bautista, D. A.）ら、「Adenosine triphosphate bioluminescence as a method to determine microbial levels in scald and

10

20

30

40

50

chill tanks at a poultry abattoir」 *Poult Sci.* 73巻、1673 - 1678頁(1994年)

【非特許文献3】

スペンサーおよびライトフット(Spencer, R. C. and N. F. Lightfoot) 「Preparedness and response to bioterrorism」 *J. Infect.* 43巻104 - 110頁(2001年)

【非特許文献4】

チトック(Chittock, R. S.)ら、「Kinetic aspects of ATP amplification reactions」 *Anal. Biochem* 255巻、120 - 126頁(1998)

【非特許文献5】

アキヤマ(Akiyama, M.)ら、「The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein」 *J. Biol. Chem.* 267巻、22556 - 22561頁(1992年)

【非特許文献6】

ブルーン(Bruner, M.)ら、「Cloning and sequencing of the adenylate kinase gene (*adk*) of *Escherichia coli*」 *Nucleic Acids Res.* 13巻、7139 - 7151頁(1985年)

【非特許文献7】

ニューハード J、および Y. ニガード(Neuhard, J., and Y. Nygaard) 「Purines and pyrimidines」 445 - 473頁、ネイドハルト(F. C. Neidhardt)ら編、*Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, ASM press, Washington, D. C. (1987年)

【非特許文献8】

ネイドハルト(F. C. Neidhardt) 「Chemical composition of *Escherichia coli*」 3 - 6頁、ネイドハルト(F. C. Neidhardt)ら編、*Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology*, ASM press, Washington, D. C. (1987年)

【非特許文献9】

ベルト(Bert, F.)ら、「Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit」 *J. Hosp. Infect.* 39巻、53 - 62頁(1998年)

【非特許文献10】

オルソン(Olsson, T.)ら、「Extraction and determination of adenosine 5'-triphosphate in bovine milk by the firefly luciferase assay. *Biotech Appl. Biochem* 8巻、361 - 369頁(1986)

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

そこで、外因性の A T P の効率的な増幅方法が望まれており、特に、外因性の A T P のみを増幅させる方法およびこの方法を用いて 1 個の細胞の存在を検出し得る高感度の検出方法が望まれている。

【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上記課題を解決することを目的として行われたものであり、本発明の A T P 増幅方法により、極微量の A T P が検出され、さらに、1 個の細胞の存在さえも検出し得る。

【 0 0 1 2 】

本発明は、A T P、A M P およびポリリン酸化合物を含有する混合物に、ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質を作用させる工程を含む、A T P の増幅方法を提供する。

10

【 0 0 1 3 】

好ましい実施態様においては、前記ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質が、A D P を含まない融合タンパク質である。

【 0 0 1 4 】

また、本発明は、A T P、A M P およびポリリン酸化合物を含有する混合物に、ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質を作用させて、A T P を増幅する工程；および、該増幅した A T P を検出する工程；を包含する A T P の検出方法を提供する。

20

【 0 0 1 5 】

好ましい実施態様においては、前記ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質が、A D P を含まない融合タンパク質である。

【 0 0 1 6 】

さらに、本発明は、微生物の存在を迅速に検出する方法であって、微生物含有試料を処理して、A T P 含有試料を調製する工程；該 A T P 含有試料を A T P 増幅系に添加して A T P を増幅する工程；および、該増幅した A T P を検出する工程；を包含し、該 A T P 増幅系が A M P、ポリリン酸化合物、および A D P を含まないポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質を含む方法を提供する。

【 0 0 1 7 】

また、本発明は、微生物の存在を迅速に検出するためのキットであって、A M P、ポリリン酸化合物、および A D P を含まないポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質、を含有する A T P 増幅試薬と、A T P を検出する A T P 検出試薬を包含するキットを提供する。

30

【 0 0 1 8 】

好ましい実施態様においては、さらに細胞溶解用試薬を備えるキットである。

【 0 0 1 9 】

本発明は、さらに、A T P、A M P、およびポリリン酸化合物の混合物に、アデニレートキナーゼ、および A D P を含まないポリリン酸キナーゼを作用させて A T P を増幅する方法を提供する。

40

【 0 0 2 0 】

また、本発明は、ポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質、並びに、A D P を含まないポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質を提供する。

【 0 0 2 1 】

【発明の実施の形態】

(融合タンパク質)

本発明に用いられるポリリン酸キナーゼとアデニレートキナーゼとの融合タンパク質(以下、P P K - A D K ということがある)は、P P K 活性および A D K 活性を有していれば、結合状態に特に制限はない。N 末端側に P P K を、C 末端側に A D K を含む融合タンパ

50

ク質であることが好ましい。この融合蛋白質は、PPKとADKとが直接結合されていてもよいが、スパーサーを介して結合されていてもよい。また、融合タンパク質のC末端には、それぞれの酵素の発現に影響を与えないタグを付着させることが、融合タンパク質の精製に有用である。

【0022】

PPKをコードする遺伝子ppkおよびADKをコードする遺伝子adkは、これらの遺伝子配列が特定されていれば、その由来に特に制限はない。大腸菌の配列が好ましく用いられる。これらの遺伝子配列に基づいて適切なプライマーを調製し、PCRを行うことにより、それぞれの遺伝子配列を得ることができる。

【0023】

ppk遺伝子を調製するための適切なプライマーとして、例えば、以下のプライマーの組合せが好ましい：(1)ppk遺伝子の5'末端の上流に適切な制限酵素認識配列を導入するための配列を有するプライマー；および(2)スパーサー(例えば、グリシン)配列、およびスパーサー部位またはその下流に適切な制限酵素認識配列を導入するための配列を有するプライマー。この2つのプライマーをセットにしてPCRを行うと、C末端にスパーサーを有するPPKを発現するppk遺伝子を含む断片が容易に回収される。

10

【0024】

adk遺伝子を調製するための適切なプライマーとしては、ppk遺伝子と同様、以下のプライマーが好ましい：(1)adk遺伝子の5'末端の上流に適切な制限酵素認識配列を導入するための配列を有するプライマー；および(2)C末端タグ(例えば、ヒスチジン)配列を有し、かつC末端タグの下流に適切な制限酵素認識配列を導入するための配列を有するプライマー。この2つのプライマーをセットにしてPCRを行うと、C末端にタグを有するADKを発現するadk遺伝子を含む断片が容易に回収される。

20

【0025】

上記プライマーの制限酵素は、ppkあるいはadkの遺伝子配列、組込むベクターのクローニング部位を考慮して、決定すればよい。

【0026】

大腸菌の染色体DNAを鋳型とし、上記プライマーを用いてPCRを行い、得られたDNA断片を、それぞれ、制限酵素で切断し、ppk遺伝子を含む断片、およびadk遺伝子を含む断片を回収する。得られたそれぞれの遺伝子を含む断片を、ppk-adkの順となるように適切なベクターに組み込むことにより、PPK-ADKの融合タンパク質を発現する組換えベクターが得られる。

30

【0027】

得られたベクターを適切な宿主(例えば、大腸菌)に導入し、組換えベクターを発現させることにより、PPK-ADK融合タンパク質が生産される。ヒスチジンタグ(Hisタグ)を有するように設計された融合タンパク質は、ハイトラップキレートカラム(Hitrap chelating column)を用いることにより、容易に精製、回収される。

【0028】

得られた融合タンパク質であるPPK-ADKは、このまま、ATP増幅反応に用いることができる。しかし、後述のように、外因性のATPのみを測定する場合、不都合があることが判明した。この原因として、ADPがPPKと結合した状態で存在することが考えられる。このPPKに結合しているADPは、ポリリン酸化合物の存在下、PPKの基質とされ得、このADPがPPKによりATPに変換され得る。すなわち、図1に示すような反応系において、ATP非存在下であっても、まず第2反応であるADPからATPへの反応が生じ、このATPが第1反応で使用されることにより、自動的にATP増幅反応が開始すると考えられる。従って、外因性のATPのみを測定するためには、PPKに結合したADPを予め除去しておくことが必要である。

40

【0029】

PPKに結合している不純物であるADPの除去は、例えば、アピラーゼ処理により行わ

50

れる。アピラーゼは、ATPまたはADPからリン酸基を除去し、AMPを生成する。アピラーゼ処理は、適切な量のピロリン酸存在下で行うことが好ましい。ピロリン酸により、PPK-ADKに結合したADPの遊離が促進され、ADPがアピラーゼによるアタックを受けやすくなる。アピラーゼ処理したPPK-ADKは、再び、ハイトラップキレートカラムを用いて、回収される。回収されたPPK-ADKは、アピラーゼ処理によっても、それぞれの活性（すなわち、PPK活性およびADK活性）を維持している。

【0030】

（PPK-ADKを用いるATPの増幅）

本発明のPPK-ADKを用いるATPの増幅は、ATP、過剰のAMP、および過剰のポリリン酸化合物にPPK-ADKを作用させることによって行なわれる。すなわち、AMP、ポリリン酸化合物およびPPK-ADPの混合物にATPを添加することにより、あるいは、ATP、AMP、およびポリリン酸化合物の混合物にPPK-ADKを添加することにより、行なわれる。反応形式は、図1と同じであり、図1に示す第1反応および第2反応が繰り返されて、ATPが増幅される。

10

【0031】

ATPの増幅は、適切な緩衝液中で、適切な温度（例えば、30～40）で、適切な時間（例えば、5分～2時間）行われる。ATPの存在が微量と思われる場合は、1時間ほど増幅反応を行うことが好ましい。

【0032】

なお、ポリリン酸化合物としては、ポリリン酸あるいはその塩が用いられる。好ましくは、10～1000個、好ましくは10～100個のリン酸が直鎖状に重合したものが好ましく用いられる。ポリリン酸は、バクテリア由来でもよく、化学合成で得られたものでもよい。あるいは、ポリリン酸合成酵素を用いてATPから合成してもよい。

20

【0033】

（ATPの検出）

増幅されたATPの検出方法には、当業者が通常用いる方法が使用されるが、特に制限がない。一般には、ルシフェラーゼとATPとの反応による蛍光発光量を測定することにより行われる。例えば、市販のルシフェラーゼを用いるATP測定キットが用いられる。

【0034】

（微生物の存在を迅速に検出する方法）

この方法は、すべての生物の細胞にはATPが含まれることに着目して、微生物含有試料からATPを含む試料を調製し、上記ATP増幅方法を用いて、ATPを増幅し、検出する方法である。ADP除去処理を行ったPPK-ADKを用いることにより、外因性ATPのみを測定することが可能となる。例えば、1個の細胞に含まれるATPを測定可能なレベルまで増幅できることから、微生物の存在を検出することができる。従来の方法では、1アッセイあたり、 10^4 個のコロニー形成ユニット（CFU）の大腸菌が検出限界であったことを考慮すると、検出感度が少なくとも10,000倍に上昇する。

30

【0035】

なお、微生物には、ADPも含まれる。ADP除去処理を行ったPPK-ADKを用いる場合、本発明の増幅系にADPを加えると、ADPがATPに変換され、ATP増幅反応が開始される。従って、微生物を検出するための前処理中にATPがADPに分解されても、本発明の感度に影響しない点で、本発明の増幅方法は優れている。以下、微生物の検出において、測定するATPの試料について言及するときは、試料中にADPが含まれる場合も意図する。

40

【0036】

微生物含有試料からのATP含有試料の調製方法には、特に制限はない。細胞を溶解してもよいが、その細胞に含まれるPPK、ADKなどの酵素の影響を考慮すると、加熱処理を行って、ATPを溶出させるか、細胞を溶解して、ATPを溶出させ、そして他の酵素を失活させる加熱処理を行う方法が最も好ましく用いられる。加熱処理は、例えば、100、1～5分行われる。細胞溶解処理は、例えば、市販のATPアッセイキットに附属

50

しているような、溶解緩衝液を用いて、行うことができる。

【0037】

このような、ATP溶出処理を行って得られるATPを含むと思われる試料を、AMP、ポリリン酸化合物およびPPK-ADKの混合物に添加して、ATP増幅反応を行い、例えばルシフェラーゼを用いるATP検出方法を用いて、ATPの存在を検出する。試料中にATPが含まれていれば、ルシフェラーゼと反応して蛍光が観察される。なお、ATPが増幅されているので、高感度の発光分析器は必ずしも要求されない。

【0038】

本発明では、また、このような微生物の存在を迅速に検出するためのキットを提供する。すなわち、AMP、ポリリン酸、およびADPを含まないPPK-ADKを含有するATP増幅試薬と、ATPを検出するATP検出試薬を包含するキットが提供される。このキットには、さらに、細胞溶解用試薬が含まれる。細胞溶解用試薬は、対象となる細胞（例えば、微生物、体細胞など）に応じて、その組成を変化させ得る。

10

【0039】

微生物を含有すると思われる試料を加熱処理し、このキットのATP増幅試薬に添加して、適切な時間、増幅反応を行い、ついで、ATP検出試薬で、ATPの存在を確認することによって、微生物の存在が迅速に確認できる。この方法は、ADP除去処理を行って得られたPPK-ADKを用いることによって、外因性のATPのみを検出できることが可能になったことにより、達成された。なお、ATP検出試薬としては、ルシフェラーゼ-ルシフェリン反応系を用いる試薬が一般的であり、用語「ATP検出試薬」は生物発光（

20

【0040】

（ADKおよびADPを含まないPPK用いるATP増幅）

また、本発明は、ATP、AMP、およびポリリン酸を含む混合物に、ADKおよび、ADPを含まないPPKを作用させてATPを増幅する方法をも提供する。ADPを含まないPPK遺伝子は、例えば、上記融合タンパク質の調製と同様の方法で調製される。簡潔に述べると、ppk遺伝子の5'末端の上流に適切な制限酵素認識配列を有するプライマーと、Hisタグ配列を有し、かつその下流に適切な制限酵素認識配列を有するプライマーとを用いて、His-タグを有するPPKを発現するppk遺伝子を含むDNA断片を回収する。得られたDNAを適切なベクターに導入して組換えプラスミドを得、これを大腸菌に導入して、PPKを発現させる。PPKを、ハイトラップキレートカラムを用いて生成し、ピロリン酸存在下、アピラーゼ処理を行い、再びハイトラップキレートカラムにかけて、ADPを除去したPPKを回収する。このPPKを、図1に示す反応系に用いることにより、外因性ATPのみを増幅し、検出する方法が提供される。

30

【0041】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に制限されることはない。

【0042】

この実施例において、AMPおよびATPは和光純薬（大阪）およびシグマから、それぞれ購入して用いた。AMPは、TSHゲルSAXカラム（トーソー）を用いて0.2M KClおよび1% EDTA（pH10）を溶媒として用いて、さらに精製して用いた。ポリリン酸は、平均鎖長65のポリリン酸（シグマ）を用いた。生物発光アッセイキット（CLSI）はルシフェリンとルシフェラーゼを含み、ロシュから購入して用いた。アピラーゼはシグマから購入して用いた。

40

【0043】

（実施例1：PPK-ADKの調製）

大腸菌（E.coli）のポリリン酸キナーゼをコードする遺伝子（ppk）（非特許文献4参照）を取得するためのプライマーは、以下の通りである：

GGATCTAGATGAATAAACAAGGAGTAAAAGT（配列番号：1）、お

50

よび

G G A G G A T C C G C C G C C G C C T T C A G G T T G T T C G A G T G A T
T T (配列番号: 2)。

【0044】

配列番号1のプライマーはppk遺伝子の5'末端側に制限酵素XbaI認識配列を導入するための配列を有する。配列番号2は、4つのグリシンがPPKのC末端に付着するように設計され、さらに3'末端側に制限酵素BamHI認識配列を導入するための配列を有している。

【0045】

大腸菌のアデニル酸キナーゼ遺伝子をコードする遺伝子(adk)(非特許文献5)を取得するためのプライマーは、以下の通りである:

G G A G G A T C C A T G C G T A T C A T T C T G C T T G G C (配列番号: 3)および

G G A A A G C T T G C C G A G G A T T T T T C C A G (配列番号: 4)。

【0046】

配列番号3のプライマーはadk遺伝子の5'末端側に制限酵素BamHI認識配列を導入するための配列を有する。配列番号4のプライマーは、C末端タグであるヒスチジンがADKのC末端に付着するように設計され、さらに3'末端側に制限酵素HindIII認識配列を導入するための配列を有する。

【0047】

大腸菌の染色体DNAを鋳型とし、上記プライマーを用いて、常法によりPCRを行い、それぞれppk遺伝子およびadk遺伝子を含むDNA断片を取得した。得られたppk遺伝子を含むDNA断片を、pGEMTベクター(プロメガ)に導入し、pGEMTppkを得た。得られたadk遺伝子を含むDNA断片を、pGEMTベクター(プロメガ)に導入し、pGEMTadkを得た。

【0048】

pGEMTppkをXbaI-BamHI処理して得られた2.1kbの断片、およびpGEMTadkをBamHI-HindIII処理して得られた0.6kb断片を、pETベクター(ストラタジーン)のXbaI-HindIII消化物に連結させることによって、プラスミドpETppkadkを構築した。このプラスミドは、PPKとADKとが4つのグリシンを介して結合され、C末端にHisタグを有するような融合タンパク質をコードする遺伝子含有している。

【0049】

このプラスミドpETppkadkを大腸菌(E.coli BL21)に導入し、得られた形質転換体を2時間培養し、ついで、1mMのIPTGを生育培地に添加した。4時間培養後に、形質転換体を遠心分離して集め、0.5M NaClを含有する20mMリン酸緩衝液(pH7)に懸濁した。細胞をB-PER溶液(ピアース)を用いて溶解し、ついで1mM PMSF存在下、DNaseおよびRNaseで処理した。遠心分離により上清を得、0.2μmのフィルターを用いて濾過し、ついで、ハイトラップキレートカラム(Hitrap chelating column)(Amersham Bioscience)にロードした。カラムを0.1M ピロリン酸、20mM リン酸、0.5M NaCl、50mM イミダゾール、および20%グリセロール(pH7.4)を用いて洗浄した。PPK-ADK融合タンパク質は、0.1M ピロリン酸、20mM リン酸、0.5M NaCl、0.5M イミダゾールおよび20%グリセロール(pH7.4)で溶出した。

【0050】

得られたPPK-ADK融合タンパク質は、ADK(43U/mg)およびPPK(38U/mg)の活性を有しており、AMPとポリリン酸からATPを生成した。なお、1ユニットのPPKは、37で、ADPおよびポリリン酸から1.0μmol/分のATPを合成する。1ユニットのADKは、37で、ADPから1.0μmol/分のATP

を合成する。

【0051】

0.16 μg の PPK-ADK、10 μM AMP、400 μM ポリリン酸、8 mM MgCl_2 および 60 mM Tris-HCl (pH 7.4) を含む混合液 50 μl を調製し、5 μl の反応混液をサンプリングして、40 μl の ATP 生物発光アッセイ試薬 (ロシュ) と混合し、直ちに、マルチプレート蛍光測定計 (アルボ、ワラス) を用いて、発光を測定した。

【0052】

図 2 の PPK-ADK に示すように、この ATP を含まない反応系で、ATP の増幅が起こり、蛍光が観察された。この原因を検討したところ、ADP が PPK に結合しており、この ADP が PPK に利用されて、最初に図 1 に示す第 2 反応が起こって ATP が生成し、この ATP が増幅された可能性が示唆された。

10

【0053】

(実施例 2: PPK-ADK に結合した ADP の除去)

実施例 1 で取得した PPK-ADK に結合している不純物の ADP を除くために、60 mM Tris-HCl (pH 8) および 8 mM MgCl_2 、および 10 mM ポリリン酸の存在下、180 μg の PPK-ADK と アピラーゼ (apyrase) (200 U) とを 1 時間反応させた。反応終了後、再度、ハイトラップキレートカラムを用いて、ADP が除去された PPK-ADK を回収した。以下、この PPK-ADK を、アピラーゼ処理した PPK-ADK という。なお、1 ユニットの アピラーゼは、ATP または ADP から、30 で、1 μmol のリン酸を遊離する。

20

【0054】

0.16 μg のアピラーゼ処理した PPK-ADK、10 μM AMP、400 μM ポリリン酸、8 mM MgCl_2 および 60 mM Tris-HCl (pH 7.4) を含む混合液 50 μl を調製し、5 μl の反応混液をサンプリングして、40 μl の ATP 生物発光アッセイ試薬 (ロシュ) と混合し、直ちに、マルチプレート蛍光測定計 (アルボ、ワラス) を用いて、発光を測定した。

【0055】

図 2 に示すように、アピラーゼ処理した PPK-ADK を用いた反応では、60 分間反応させた後でも、蛍光が観察されなかった。なお、図示していないが、この混合液に ATP を添加したところ、蛍光が観察された。このことから、アピラーゼ処理は、PPK-ADK の ADK 活性および PPK 活性に影響を与えないこと、およびアピラーゼ処理により不純物の ADP が除去された結果、内因性の ATP 増加が認められなかったことが判明した。従って、ATP 添加による蛍光の観察は、純粋に外因性の ATP によると考えられる。従って、アピラーゼ処理した (ADK を含まない) PPK-ADK は、外因性 ATP のアッセイに極めて有用である。

30

【0056】

なお、アピラーゼ処理に際して、ハイトラップキレートカラムへの PPK-ADK の吸着および同カラムからの溶出に際し、洗浄緩衝液および溶出緩衝液にピロリン酸を添加することが好ましい。0.1 M のピロリン酸は、PPK-ADK から ADP を遊離させる効果があり、ADP の除去をより効果的に行うことができる。

40

【0057】

(実施例 3: 超高感度生物発光アッセイ)

0.16 μg のアピラーゼ処理した PPK-ADK、10 μM AMP、400 μM ポリリン酸、8 mM MgCl_2 および 60 mM Tris-HCl (pH 7.4) を含む混合液 48 μl を調製し、ついで、2 μl の ATP サンプルをこの混合液に添加し、ATP を増幅した。5 μl の反応混液を経時的にサンプリングして、40 μl の ATP 生物発光アッセイ試薬と混合し、直ちに、マルチプレート蛍光測定計を用いて、蛍光を測定した。なお、ATP の増幅を行わず (PPK-ADK を添加せず)、そのまま、蛍光を測定したものを比較とした。蛍光値は、それぞれ異なった 3 回の測定の平均値 \pm 標準偏差を表す

50

。蛍光の経時的増加を図3に、60分後のATP増幅の結果を表1に示す。

【0058】

【表1】

ATP(fmol)	蛍光(rlu)	
	ATP増幅	
	無	有
330	813 ± 22	28,180 ± 1606
33	113 ± 14	18,793 ± 241
3.3	50 ± 6	8,767 ± 443
0.33	52 ± 9	4,455 ± 36
0.033	53 ± 12	2,734 ± 233
0.0033	62 ± 12	1,553 ± 102
0	51 ± 2	229 ± 26

10

【0059】

図3に示すように、アピラーゼ処理したPPK-ADKは、外因性のATPがないときは、60分の増幅処理にもかかわらず、全くATPの増幅がないことがわかった。さらに、図3および表1に示すように、ATPの初期濃度が低いにもかかわらず、蛍光測定可能な程度まで増幅できることがわかった。この結果は、このATP増幅反応が、超高感度生物発光アッセイに応用可能であることを示している。すなわち、0.0033フェムトモル (fmol: 10^{-15} mol = 3.3アトモル: 10^{-18} mol) 濃度のATPを含む試料を、60分間ATP増幅処理を行うことにより、検出可能なレベルまで、ATPを増幅できることが示された。すなわち、数アトモル (amol: 10^{-18} mol) 濃度のATPが検出可能となった。これに対して、従来の生物発光は、数十フェムトモル (fmol: 10^{-15} mol) のATPが、その発光を測定するために必要である(表1)

20

30

【0060】

(実施例4: 単一微生物の検出における超高感度生物発光アッセイの応用)

大腸菌の培養液 (2×10^9 CFU/ml) を、純水を用いて適切な濃度に希釈した。細胞懸濁液 (500 μ l) を溶解緩衝液 500 μ l (生物発光アッセイキット、ロシュ) に加えて、100、2分間加熱して、細胞からATPを放出させた。加熱サンプル 2 μ l をATP増幅アッセイにかけ、生物発光を測定した。

なお、ATP増幅を行わず (PPK-ADKを添加せず)、そのまま、蛍光を測定したものを比較とした。蛍光値は、それぞれ異なった3回の測定の平均値 \pm 標準偏差を表す。蛍光の経時的増加を図4に、60分後のATP増幅の結果を表2に示す。

40

【0061】

【表2】

アッセイ当りの大腸菌数 (CFU)	蛍光 (rlu)	
	ATP増幅	
	無	有
100,000	1,126 ± 255	39,722 ± 1,596
10,000	296 ± 34	33,903 ± 2,244
1,000	52 ± 4	16,901 ± 1890
100	37 ± 4	6,823 ± 205
10	39 ± 6	3,280 ± 604
1	37 ± 7	1,714 ± 44
0	43 ± 12	364 ± 73

10

【0062】

表2および図4に示すように、アッセイに用いた大腸菌の数に依存して、蛍光量が変化した(図4)。表2に示すように、ATP増幅を行わなかった場合に比べ、ATP増幅を行った場合の蛍光発色は著しく増強された。ATP増幅がない場合、表2の10,000CFUの場合でも蛍光発光の程度は極めて低く、有意な生物発光のレベルに達するには、数万CFUの大腸菌が必要であった。これに対して、本発明のATP増幅技術を用いた場合、単一の大腸菌(1CFUの大腸菌のレベル)という、最も低レベルでも、明確な蛍光が観察された。このことは、ATP増幅をしなかった場合に比べて、10,000倍以上の感度があることを示している。

20

【0063】

大腸菌生細胞の細胞内ATPレベルは、約 $7\mu\text{mol/g}$ 乾燥菌体と報告されている(非特許文献7)。大腸菌1個の乾燥重量は約 $2.8 \times 10^{-13}\text{g}$ である(非特許文献8)から、大腸菌は、細胞1個あたり、約2アトモルのATPを含有している。このレベルのATPは、この超高感度生物発光アッセイの検出限界の値とほとんど同じである。

30

【0064】

(実施例5：衛生学上のモニタリングへの超高感度生物発光アッセイの応用)

本発明の方法が、大腸菌のスワブモニタリングに応用できるか否かについて検討した。大腸菌の細胞懸濁液をポリスチレン製ペトリ皿にひろげ、空気乾燥して市販の綿棒で拭き取った。市販の綿棒は有意な量のATPを含有しているので、予め121、75分のオートクレーブ処理を行い、ATPをAMPとリン酸に分解した。4cm²の表面積から拭き取ったサンプルを400μlの溶解緩衝液に浸漬し、ついで100、2分間加熱した。加熱サンプル(10μl)をATP増幅反応溶液(40μl)に添加し、60分間、ATP増幅反応を行った。そのうちの25μlを生物発光アッセイに用いた。結果を表3に示す。

40

【0065】

【表3】

大腸菌数 (CFU)	蛍光 (rlu)	
	ATP増幅	
	無	有
120,000	223	30,630
12,000	62	23,835
1,200	52	10,215
120	51	2,685
12	53	1,653
0	65	404

10

【0066】

このスワブモニタリングにより、約12大腸菌CFU/cm²のレベルでの測定が可能となった。本発明の方法が大腸菌のスワブモニタリングに応用できることが判った。

【0067】

(実施例6：飲料水中のバクテリアの検出)

20

本発明の方法が、飲料水中のバクテリアの検出に有効か否かを検討した。加熱した水サンプル(2μl)を、ATP増幅反応溶液(50μl)に添加し、60分間、ATP増幅反応を行った。表4に結果を示す。表4において、水道水(1)は、広島市の上水道から得られたものである。水道水(2)は、広島大学内で再生された水である。ボトル詰めの水は、市販品を購入した。滅菌水は、蒸留水をオートクレーブして、調製した。池水は、広島大学の池の水である。コロニー数(CFU)は、1mlの水のサンプルをニュートリエント寒天培地(1.6gのトリプトン、1gのイーストエキス、0.5gのNaCl、15gの寒天、水1L)に塗布し、28、3日間培養後、形成されたコロニーをカウントして、求めた。

【0068】

30

【表4】

サンプル源	蛍光 (rlu)		コロニー数 (CFU)
	ATP増幅		
	無	有	
水道水(1)	15	1,400	33
水道水(2)	13	413	1
ボトル水	30	239	>1
滅菌水	23	254	>1
池	9	3100	59

40

【0069】

この結果は、従来の生物発光アッセイでは検出できないレベルでも、バクテリアが検出できたことを示している。表4の結果が示すように、本発明の方法を用いて、水サンプルについて60分間のATP増幅処理を行うことにより、1CFU/mlのバクテリアが検出可能であることがわかる。従来の栄養培地を用いる方法は、バクテリアの混入を検出する

50

のに、典型的には数日を要した(表4)。病原菌である緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)が水道水で検出されたとの報告がある(非特許文献9)が、本発明により、このような微生物の存在が容易にかつ迅速に、検出される。

【0070】

(実施例7：ミルク中のバクテリアの検出)

酪農業における応用について検討した。バクテリアの混入は、ミルク業界に大きなダメージを与えるため、ミルク中のバクテリアを検出するための、迅速で信頼のおけるテストが開発されている。本発明者は、さらに、ミルク中の黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)を検出する感度の高いアッセイを検討した。黄色ブドウ球菌の培養液を適切な濃度に希釈し、ミルク中に加えた。ミルク中に含まれる乳腺および体細胞からの非バクテリア性ATPを除去するために、0.5mlのミルクを、0.45μmのメンブランを用いて濾過した。このメンブランを0.2% Triton X-100、100mM Tris-HCl (pH 7.8) および2mM EDTAを含む10mlの溶液(非特許文献10)で洗浄した。洗浄後、このメンブランを200μlの溶解緩衝液に浸漬し、100、5分加熱した。加熱サンプル(20μl)を60分間のATP増幅にかけた。次いで、生物発光アッセイに供した。結果を表5に示す。

10

【0071】

【表5】

20

黄色ブドウ球菌数 (CFU) /0.5ml ミルク	蛍光(rlu)	
	ATP増幅	
	無	有
750,000	399	39,491
75,000	84	10,011
7,500	47	4,141
750	50	1,790
75	37	1,156
0	49	432

30

【0072】

アッセイの結果、75CFU(黄色ブドウ球菌)/0.5mlミルクが検出できた。黄色ブドウ球菌の検出感度は大腸菌の検出感度より低い、ミルク中の黄色ブドウ球菌を検出する感度は、従来の生物発光アッセイを用いた場合の感度の約10,000倍に増大した。本発明の微生物の存在を迅速に決定する方法は、環境中の微生物のみならず、幅広い範囲の衛生学上のモニタリングに応用可能である。

【0073】

【発明の効果】

本発明のPPK-ADK融合タンパク質は、ATP、AMPおよびポリリン酸化合物の混合物に作用して、ATPを増幅する。特に、不純物であるADPを含まないPPK-ADKを用いることによって、外因性ATPのみを増幅することが可能となり、細胞1個のレベルの微生物のATPを増幅できる。増幅したATPは、ルシフェラーゼアッセイなどで、検出できる。従って、従来、数日間かかってやっと検出できた微生物を、極めて迅速に検出でき、しかも、たった1個の細胞でも検出可能である。

40

【0074】

【配列表】

Sequence Listing

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Improved method for amplification of ATP and use thereof

<130> P103K16133

<160> 4

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

ggatc tagat gaata aaacg gagta aaagt 30

<210> 2

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

ggagg atccg ccgcc gccgc ctcca ggttg ttcga gtgat tt 42

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

ggagg atcca tgcgt atcat tctgc ttggc 30

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ggaaa gcttg ccgag gattt tttcc ag 27

【図面の簡単な説明】

【図1】ADKおよびPPKを用いるATP増幅機構を示す模式図である。

【図2】PPK-ADKおよびアピラーゼ処理したPPK-ADKを用いるATP増幅の結果を示す図である。

【図3】極微量のATPを含有するサンプルについて、ATP増幅反応を行った結果を示す図である。

10

20

30

40

50

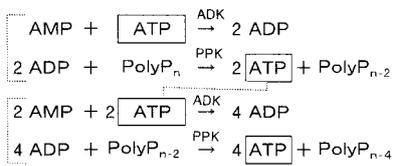
【図4】所定の細胞濃度を含むサンプルについて、ATP増幅反応を行った結果を示す図である。

【図1】

(a) ATP不存在下

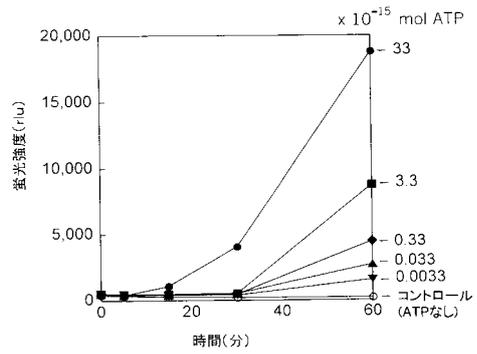


(b) ATP存在下

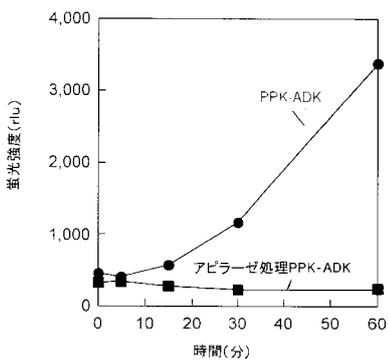


ADK: アデニレートキナーゼ
PPK: ポリリン酸キナーゼ

【図3】



【図2】



【図4】

