

表面科学

第31巻 第12号

2010年12月

DNAによる水晶振動子表面の修飾と キノコ菌種識別への応用

昆喜知郎^{1,2}・桑原敬司¹・下村雅人¹

¹長岡技術科学大学工学部生物系 ☎ 940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

²社団法人新潟県環境衛生中央研究所 ☎ 940-2127 新潟県長岡市新産2丁目 12-7

(2010年4月19日受付；2010年9月3日掲載決定)

Surface Modification of a Quartz Crystal Oscillation Unit with DNA for Application to Detection of Specific Fungus

Kichiro KON^{1,2}, Takashi KUWAHARA¹ and Masato SHIMOMURA¹

¹Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Nagaoka University of Technology,
1603-1 Kamitomioka-machi, Nagaoka, Niigata 940-2188

²Niigata Environment Hygiene Central Laboratory Co., 2-12-7 Shinsan, Nagaoka, Niigata 940-2127

(Received April 19, 2010 ; Accepted September 3, 2010)

Journal of The Surface Science Society of Japan

HYOMEN KAGAKU

Volume 31 Number 12

December 2010

DNA による水晶振動子表面の修飾と キノコ菌種識別への応用

昆喜知郎^{1,2}・桑原敬司¹・下村雅人¹

¹長岡技術科学大学工学部生物系 ☎ 940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1
²社団法人新潟県環境衛生中央研究所 ☎ 940-2127 新潟県長岡市新産 2 丁目 12-7

(2010 年 4 月 19 日受付 ; 2010 年 9 月 3 日掲載決定)

Surface Modification of a Quartz Crystal Oscillation Unit with DNA for Application to Detection of Specific Fungus

Kichiro KON^{1,2}, Takashi KUWAHARA¹ and Masato SHIMOMURA¹

¹Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Nagaoka University of Technology,
1603-1 Kamitomioka-machi, Nagaoka, Niigata 940-2188

²Niigata Environment Hygiene Central Laboratory Co., 2-12-7 Shinsan, Nagaoka, Niigata 940-2127

(Received April 19, 2010 ; Accepted September 3, 2010)

A quartz crystal oscillation unit was modified by immobilizing single-stranded DNA (ssDNA) on its surface and incorporated into a quartz crystal microbalance (QCM) system as a biosensor for the purpose of detecting specific fungus. The ssDNA having base sequence specific to 28S rDNA D2 domain of *Omphalotus guepiniformis*, which is a toadstool that often causes a false appetite resulting in poisoning, was immobilized on a gold electrode of the quartz crystal unit, and used as a probe for detection of complementary target DNA. The detection of target DNA was carried out by monitoring the decrease in oscillation frequency due to mass increase on the surface of the quartz crystal unit, which accompanied the hybridization of the probe and target DNAs to form double strands. In advance, the DNA hybridization was examined by the QCM method with a synthesized oligonucleotide (25 bases) having same sequence as that specific to *O. guepiniformis* 28S rDNA D2 domain, and the hybridization efficiency was estimated to be 97-101%. Subsequently, DNA was extracted from a minute piece (0.1 g) of *O. guepiniformis* fruit body, and the 28S rDNA D2 fragment was amplified by polymerase chain reaction (PCR). It was confirmed that fragment (308 bases) of the PCR product was detected by the QCM measurement which showed a marked decrease in oscillation frequency. In addition, the 28S rDNA D2 fragment of *O. guepiniformis* was detected for a mixture with those of *Lentinus edodes* and *Pleurotus ostreatus*. This result suggests that the DNA-modified quartz crystal unit can be applied to the detection of a specific toadstool included in leftover foods or vomited matter.

KEYWORDS : DNA, quartz crystal microbalance (QCM), biosensor, hybridization, *Omphalotus guepiniformis*

1. はじめに

キノコとは、系統学的分類において子囊菌門および担子菌門に属する真菌が孢子形成のために派生する器官(子実体)であり、視覚的に肉眼で認識可能なまでに巨大化した多細胞の菌体のことである。従来から、真菌の

同定は目視および顕微鏡による形態観察ならびに生理学的試験を主体に行われてきたが、キノコに限っては、その特徴的で複雑多彩な容姿や外観形態から、目視による簡易的な鑑定への依存度が高い傾向にある。さらに、キノコを発生する菌種の多くは難培養性であり、子実体の切片を種菌とした培養試験では、カビ類や酵母をはじめとする食品衛生学で扱われる多くの真菌に比べて培養時間が長く、培養温度や培地成分などの発生条件も菌種に

より大きく異なることが生理学的試験をより困難なものとしている。

一方、目視に依存したキノコの誤った鑑定によって毒キノコに起因とする食中毒が多発しており、その中でも、ツキヨタケ (*Omphalotus guepiniformis*) による食中毒の発生は1980年からの30年間に全国で死亡例を含み300件を超える^{1,2)}。ツキヨタケは、ブナの倒木や枯れ木上に重なるように群生し、形状や色調がシイタケ (*Lentinus edodes*) やヒラタケ (*Pleurotus ostreatus*) に似ており、ときには同一木に混生することから誤食され易い。その有毒成分はイルジンS (ラプテンロール) であり、摂食すると短時間に腹痛や嘔吐等の消化器系障害が発生する³⁾。ツキヨタケなど毒キノコによる食中毒は、一般的に臨床症状から原因が推定され、調理残の子実体について目視的に鑑定し、胞子を顕微鏡観察して同定される⁴⁾。しかし、調理後の子実体は目視的な形態観察が困難な場合が多いと考えられる。また、加熱などの調理工程を経ているために既に死滅している可能性も考えられ、この場合には生理学的試験による菌種の確定は見込めない。

近年、水晶振動子を利用とした様々なバイオセンサーが研究されている。水晶振動子は、本来高周波発振用の素子であるが、表面の質量増加に応じて共振周波数が減少し、 10^{-9} g レベルの質量変化を追跡しうることから微量天秤として利用できることが見出されている⁵⁾。このため、この質量追跡法は水晶振動子マイクロバランス (Quartz Crystal Microbalance, QCM) と呼ばれている。水晶振動子の表面に特異的な分子認識能を有する原子団を導入することにより、これまで観測が困難であった生体内分子 (ペプチド、タンパク質、糖鎖、脂質単分子膜など) の相互作用を周波数変化として検出可能であることから、QCMは、化学をはじめとして、生化学、分子生物学、微生物学などの分野で応用が試みられている。その例として、ホスト/ゲスト相互作用の観測⁶⁻⁸⁾、生化学プロセスに伴うタンパク質の変化^{9,10)}、病原ウイルスまたはその抗体の検出^{11,12)}、血清の直接分析¹³⁻¹⁵⁾などがあげられる。筆者らは、水晶振動子表面上でのDNAの2本鎖形成 (ハイブリダイゼーション) を利用したDNAセンサーについて報告しており¹⁶⁾、この手法によってツキヨタケの28S rDNAのD2領域にある特異的な塩基配列の検出が可能であると考えた。rDNAは生物に普遍的に存在するリボソームRNA遺伝子であるが、その28SサブユニットのD1/D2領域 (600塩基対程度) が真菌の同定および系統解析に最も有用であり、さらに、比較的近縁な菌種では、D2領域 (約300塩基対) のみの解析でも十分に同定が可能であることが知られている¹⁷⁾。

しかし、近年、医学分野で急速に進展しているNCBI (National Center for Biotechnology Information) の提供するGenbankやDDBJ (DNA Data Bank of Japan), EMBL (European Molecular Biological Laboratory) などへの塩基配列の登録は、疾患の原因となるウイルスや細菌が中心であり、食用を目的としたキノコに関するデータベースの構築は進んでいないのが現状である。

本研究では、まず、ツキヨタケ、シイタケおよびヒラタケの微小切片から抽出したDNAの28S rDNAのD2領域をPCR (Polymerase Chain Reaction) によって増幅合成し、シーケンス反応により各々の塩基配列を解析した。その結果に基づき、これら3種のキノコの識別に利用しうる特異的な塩基配列について検討を行った。次いで、この塩基配列を有する1本鎖DNAを水晶振動子の表面にプローブとして固定し、これと相補的なターゲットDNAの検出をQCM法によって実施した。さらに、3種のキノコの28S rDNA D2領域の混合試料についてツキヨタケ含有の識別を試み、調理残や患者の嘔吐物などに含まれる複数種の子実体の微小切片から、特定の毒キノコを識別できる可能性を示した。

2. 実 験

2.1 試薬

硫酸、過酸化水素水 (30%)、塩酸、塩化ナトリウムおよびTE緩衝液 (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) は、和光純薬工業から購入した特級試薬を使用した。その他の試薬についても市販品を使用した。実験中のすべての希釈や洗浄には、超純水製造装置 (アドバンテック東洋製) で精製した精製水 (18 MΩcm) を用いた。また、水晶振動子の洗浄に用いた精製水およびTE緩衝液 (pH 7.5, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl) の液温は、使用の間、40°Cに保持した。

2.2 供試菌体

2009年6-9月に新潟県魚沼市の浅草山麓周辺においてブナの倒木から採取されたツキヨタケ、シイタケおよびヒラタケの3種のキノコ (子実体) を三井農林の遺伝子解析による菌種の同定ののちに供試菌体として用いた。すべての子実体は直接凍結維持法¹⁸⁾により実験まで保存した。シーケンス分析用の試料には、無菌的に切り出された子実体の内部組織をPDA平板寒天培地に接種し、発育させた菌糸体を用いた。菌糸体の詳細な培養手法は既報¹⁹⁾に詳しく述べたとおりである。また、キノコ識別のための試料DNAの調製には、無菌的に切り出された子実体の内部組織を直接用いた。

2.3 28S rDNA D2領域の増幅合成

3種のキノコからのDNAの抽出は、凍結したままの

子実体の切片 0.1 g (およそ 5 mm 角) をホモジナイザーにより粉碎し, PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent (Applied Biosystem 製) 200 μ l を加え, 振とうのうちに 100°C において 10 分間加熱した。2 分間の室温放置したのち, 遠心分離によって DNA 抽出液を得た。抽出された DNA をテンプレートとして, 28S rDNA D2 領域の全域 (約 300 塩基対) を PCR により増幅合成した。PCR には MicroSep D2 rDNA Fungal PCR Kit (Applied Biosystem 製) を用いた。DNA 抽出液 10 μ l に精製水 990 μ l を加えて希釈し, この希釈液 15 μ l に前述の Kit の PCR Master Mix 15 μ l を加えた。次いで, Thermal Cycler Dice Gradient TP600 (TaKaRa 製) により, 95°C において 10 分間反応させたのちに, 95°C で 30 秒間, 53°C で 30 秒間, 72°C で 1 分間の反応を 1 サイクルとして, これを 35 サイクル繰り返し, その後に 72°C で 10 分間保持して反応を終了した。アガロースゲル電気泳動法による PCR 生成物の確認を行い, すべての菌体から約 300 塩基対の断片のみが得られたことを確認した。

また, GeneQuant 1300 (GE ヘルスケアジャパン 製) による紫外 (波長 260 nm) の吸光度から PCR 生成物の DNA 濃度を算出した結果, いずれの菌種においても, 120-140 μ g/ml 程度の 28S rDNA D2 断片が合成されていることがわかった。

2.4 シーケンス分析

PCR 生成物を ExoSAP-IT (Amersham Biosciences 製) で精製し, サイクルシーケンス反応のテンプレートとした。サイクルシーケンス反応には MicroSeq D2 LSU rDNA Fungal Identification Sequencing Kit (Applied Biosystems 製) を用い, PCR の反応条件はキットのプロトコルに従った。塩基の検出および解析には ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer および MicroSeq ID Analysis Software (Applied Biosystems 製) を用いた。

2.5 DNA の合成

ツキヨタケの識別に利用可能な特異的な配列をもつ 25 塩基の 1 本鎖 DNA (ターゲット DNA), ターゲット DNA と相補的な塩基配列をもつ DNA (プローブ DNA) およびプローブ DNA とは非相補的な塩基配列をもつ DNA (非ターゲット DNA) の合成はオペロンバイオテクノロジー社に委託した。

2.6 水晶振動子マイクロバランス (QCM) 装置

QCM センサーチップと水晶振動子の形状を Fig. 1 に示す。センサーチップ (サンライズ工業製) は, 基本周波数が 21 MHz の AT カット水晶振動子を用いており, 測定溶液に浸して使用するディップ型であるために測定溶液中で導通しないように水晶振動子の片面が封止され, 両面に電極として直径 2.6 mm の円形の金 (800 Å)

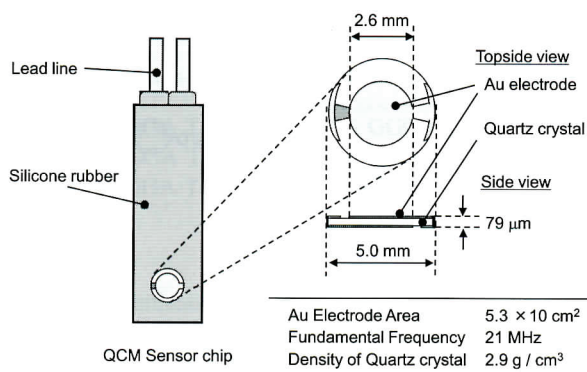


Fig. 1. Immobilization of probe DNA on Au electrode of quartz crystal unit.

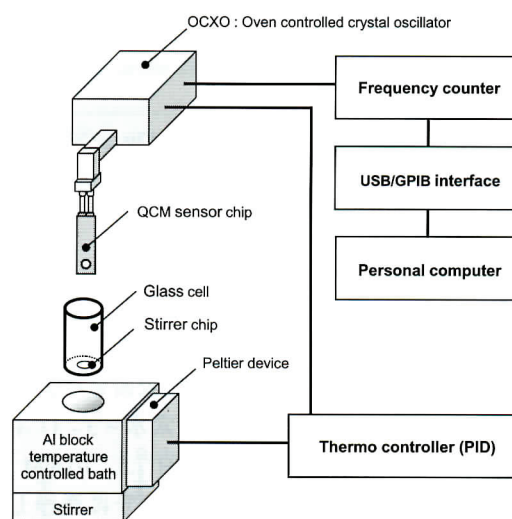


Fig. 2. QCM sensor chip and quartz crystal unit.

が蒸着してある。この水晶振動子では, 表面の 53 pg の質量増加により 1 Hz の共振周波数減少が生ずる⁵⁾。周波数測定には, 恒温槽付水晶発振器 (Oven Controlled Crystal Oscillator, OVCXO) とアルミブロック恒温槽およびマグネチックスターラーを備えた QCM センシングシステム (サンライズ工業製) を用いた。測定溶液としては, すべて TE 緩衝液 (pH 7.5, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl) を用い, 測定溶液と発振器の温度は 40 \pm 0.1°C に設定した。周波数の読み取りには, OVCXO と接続された周波数カウンター (Agilent Technologies 製) 使用し, コンピューターを用いて 1 秒ごとに周波数の記録を行った。測定システムの概略を Fig. 2 に示す。

2.7 水晶振動子表面へのプローブ DNA の固定化とターゲット DNA の検出

プローブ DNA の 5' 末端にはジルスフィド結合とジメトキシトリチル基を含む原子団を結合させてあり, Fig.

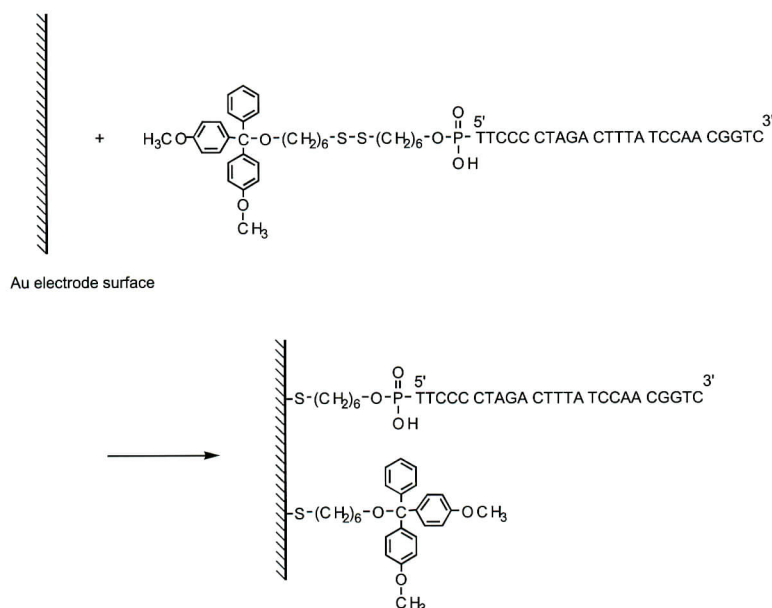


Fig. 3. Apparatus for QCM measurement.

3に示す反応を経て水晶振動子の金電極表面にプローブDNAとジメトキシトリチル基が結合する。このプローブDNAを次の手順によって水晶振動子の表面に固定化した。まず、センサーチップの金電極表面をピランハ溶液（体積比 濃硫酸：30% 過酸化水素水=3：1）に10分間浸漬し、精製水とTE緩衝液（pH 7.5, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl）で十分に洗浄した。QCM装置に取り付けたセンサーチップをガラスセル内のTE緩衝液4 mlに浸漬し、発振周波数が安定したことを確認したのち、基本周波数を測定した。次に、濃度が0.5 μ MとなるようにプローブDNA（20 μ M, 100 μ l）をガラスセル内に加え、この際の周波数変化を経時的に測定し、50 Hz程度の低下（0.33 pmolのプローブDNA結合に相当）を確認したのちに、センサーチップを一旦装置から取り外し、精製水とTE緩衝液で十分に洗浄した。再びセンサーチップを装置に取り付け、新たに測定溶液としてガラスセル中の新たなTE緩衝液4 mlに浸漬し、安定した発振周波数が得られることを確認した。その後、測定溶液中の最終濃度が0.5 μ MになるようにターゲットDNA（20 μ M, 100 μ l）を加え、この際の周波数変化を経時的に測定した。また、対照実験として非ターゲットDNAを用いた場合の周波数変化も同様の手法で測定した。

2.8 28S rDNA D2 遺伝子に含まれるツキヨタケの識別領域の検出

2.3に述べたツキヨタケのPCR生成物のDNA濃度を吸光度から算出し、TE緩衝液（pH 7.5, 10 mM Tris-

HCl, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl）で200 μ Mになるように希釈し、100°Cで5分間加熱して熱変性により2本鎖のDNAを1本鎖とした。プローブDNAの固定化したQCMセンサーチップをガラスセル内のTE緩衝液4 mlに浸漬し、加熱処理したDNA試料溶液10 μ lを濃度0.5 μ Mになるように高温のままガラスセル内に加え、1本鎖DNAのツキヨタケ識別領域をターゲットとしてQCM法による発振周波数変化の追跡を行った。

2.9 キノコ子実体混合物からのツキヨタケの検出

2.3に述べた方法によって得たツキヨタケ、シイタケ、ヒラタケの3種のPCR生成物を等モル濃度になるように混合したのち、TE緩衝液（pH 7.5, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl）で200 μ Mになるように希釈し、100°Cで5分間加熱して熱変性した。この加熱処理したDNA試料溶液について、2.8と同様の方法により、1本鎖DNAのツキヨタケ識別領域を対象としてQCM法による発振周波数変化の追跡を行った。また、対照実験として、シイタケおよびヒラタケのPCR生成物を等モル濃度になるように混合した溶液についても、同様に発振周波数変化を測定した。

3. 結果および考察

3.1 プローブDNAおよびターゲットDNA（ツキヨタケの識別領域）の塩基配列の選定

シーケンス分析により決定したツキヨタケ、シイタケおよびヒラタケの塩基配列をもとに、ツキヨタケの識別に利用可能と考えられる25塩基の特異的な配列を選出

Table 1. Characterization of 28S rDNA D2 fragments of fungi.

Fungus	Molecular weight	Number of total bases	Specific sequence of 25 bases
<i>O. guelpiniformis</i>	95788	308	5'-GACCG TTGA TAAAG TCTAG GGGAA-3'
<i>L. edodes</i>	95757	308	5'-GATCA ATGA TAAAA GTTTG AGGGA-3'
<i>P. ostreatus</i>	89379	287	5'-GGTCG CTGA TAAAG GTCAG AGAAA-3'

Table 2. Base sequence of oligonucleotide prepared for determination of *O. guelpiniformis*.

Oligonucleotide	Base sequence	Number of bases mismatched to probe DNA
Probe DNA	5'-TTCCC CTAGA CTTTA TCCAA CGGTC-3'	—
Target DNA	5'-GACCG TTGA TAAAG TCTAG GGGAA-3'	0
Non-Target DNA	5'-CTGGC AACCT AGGTC AGATC CCCTT-3'	25

Table 3. Result of QCM measurements for immobilization of probe DNA and hybridization with target DNA.

Process	Frequency decrease (Hz)	Mass increase (ng)	Molar amount of DNA (pmol)
Immobilization of probe DNA	48-58	2.5-3.1	0.31-0.38
Hybridization with target DNA	44-62	2.3-3.3	0.30-0.42

した。水晶振動子の共振周波数変化は、質量変化の他に、表面近傍の粘性変化によっても影響されるが、25塩基程度のペプチド鎖の導入では粘性変化による影響が非常に小さく^{20,21)}、また、25塩基程度であると主に鎖が伸びた構造をとるが、それ以上になるとランダムコイル構造をとると報告されている²²⁾。これらの報告を考慮して、本研究では25塩基の配列に着目することにした。さらに、選定の条件は(1)3つの菌種とも識別の対象とする塩基配列が28S rDNA D2領域のほぼ同位置にあること、(2)3つの菌種間で相互に最も相違が見られること、(3)選出する識別領域と他の領域とでは塩基配列の相同性が低いこと(25塩基中8塩基以上異なること)とした。その結果、3つの菌種ともに、28S rDNA D2領域の153-175番目の25塩基が選出された。各菌種の識別対象とする塩基配列をTable 1に示す。この結果に基づき、Table 2に示すような25塩基からなる3種類の合成オリゴペプチド、すなわち、ツキヨタケの識別対象領域と同一の塩基配列をもつもの(ターゲットDNA)、これと相補的な配列をもつもの(プローブDNA)および非相補的な配列をもつもの(非ターゲットDNA)を用意した。

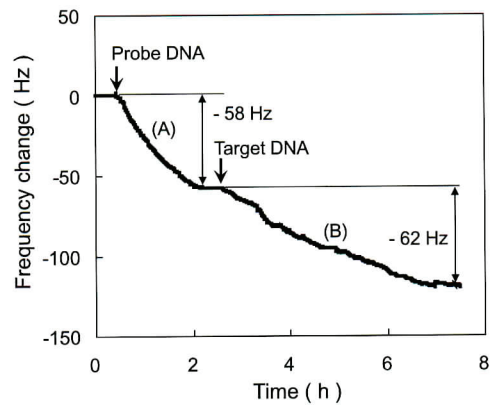


Fig. 4. Frequency change by immobilization of probe DNA on quartz crystal unit (A) and hybridization of probe DNA with target DNA (B).

3.2 プローブ DNA の固定化およびターゲット DNA の結合による発振周波数の変化

水晶振動子表面へのプローブ DNA の固定化および固定化されたプローブ DNA とターゲット DNA とのハイブリダイゼーションによる2本鎖形成をQCM法によって追跡した。結果の一例をFig. 4に示す。また、これと同様の実験を繰り返して求められたプローブ DNA の固定化量とターゲット DNA の結合量をTable 3にまとめ

た。プローブ DNA の固定化は発振周波数の低下が 50 Hz 程度で終了しているが、50 Hz の周波数低下に相当するプローブ DNA の固定量は 0.33 pmol となる。プローブ DNA の物質質量 (mol) と、ほぼ同等のターゲット DNA が結合したと考えられ、ハイブリダイゼーション効率は 97-101% であった。0.33 pmol のプローブ DNA が固定化されているとすれば、水晶振動子の金電極の見かけ上の面積 $5.3 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$ に対して、約 2.0×10^{11} 本の DNA 鎖が導入されたものと見積もられる。つまり、金電極の約 27 nm^2 あたり 1 本のプローブ DNA が固定化されたことになり、DNA の二重らせんの直径が約 2.0 nm^2 であることを考慮すると²³⁾、ターゲット DNA がプローブ DNA に接近し、2 本鎖を形成するのに十分なスペースが確保されており、これにより高いハイブリダイゼーション効率が得られたものと考えられる。なお、ハイブリダイゼーション効率が 100% を超えていることから、わずかながら DNA の非特異的な吸着が起こっているものと考えられる。この非特異的な吸着はターゲット DNA のハイブリダイゼーション後に行う洗浄操作に依存している可能性もある。

3.3 QCM 法による DNA 検出の選択性

水晶振動子の表面に固定化したプローブ DNA と相補的な塩基配列をもたない非ターゲット DNA について QCM 測定を行い、ターゲット DNA についての結果と

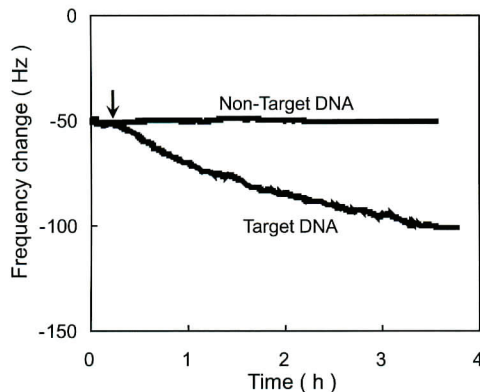


Fig. 5. Selectivity of DNA sensing by QCM method.

比較した。プローブ DNA の固定化によって 50 Hz 程度の発振周波数低下が生じた水晶振動子を用いて、プローブ DNA とターゲット DNA および非ターゲット DNA との 2 本鎖形成を追跡、比較した結果を Fig. 5 に示す。発振周波数の低下はターゲット DNA についてのみ観測され、非ターゲット DNA については周波数変化がほとんど見られないことから、プローブ DNA は自ら相補的な塩基配列をもつターゲット DNA のみを選択的に認識して 2 本鎖を形成することが確認された。プローブ DNA と非ターゲット DNA の末端をずらして、両者の塩基配列の相補性を確認してみると、プローブ DNA の 5' 末端から 3' 末端の方向に 8 塩基ずらして非ターゲット DNA を並べた場合に 17 塩基対のうち 8 塩基対に断続的な相補性が見られる。しかしながら、この程度の相補性はハイブリダイゼーションには寄与せず、ターゲット DNA として検出の対象とはならないことが示唆される。

3.4 ツキヨタケから抽出した DNA (28S rDNA D2 断片) の検出

2.3 に述べたとおり、PCR によってツキヨタケの 28S rDNA D2 領域の断片が 120-140 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に増幅された。これを 200 μM になるように希釈し、熱変性した後

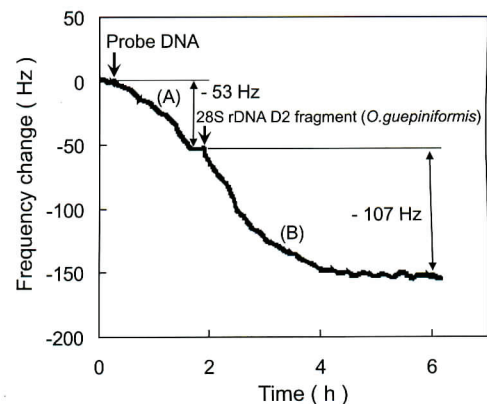


Fig. 6. Frequency change by immobilization of probe DNA on quartz crystal unit (A) and hybridization of probe DNA with 28S rDNA D2 fragment of *O. guepiniformis* (B).

Table 4. Result of QCM measurements for immobilization of probe DNA and hybridization with 28S rDNA D2 fragment of *O. guepiniformis*.

Process	Frequency decrease (Hz)	Mass increase (ng)	Molar amount of DNA (pmol)
Immobilization of probe DNA	53	2.8	0.35
Hybridization with 28S rDNA D2 fragment of <i>O. guepiniformis</i>	107	5.7	0.06

に 10 μ l を QCM 装置のガラスセル内の TE 緩衝液 (4 ml) に加え、プローブ DNA を固定化した水晶振動子を用いて QCM 測定を行った。観測された発振周波数の変化を Fig. 6 に、その際の試料 DNA の結合量を Table 4 に示す。試料溶液の添加と同時に発振周波数の低下が始まり、107 Hz 低下した後に周波数は一定となった。シーケンス分析によって決定した塩基配列からツキヨタケの 28S rDNA の D2 断片の 1 本鎖 DNA (識別対象の塩基配列を含む 308 塩基) の分子量は 95788 であることから、当該 DNA の結合量は 0.06 pmol と見積もられ、ハイブリダイゼーション効率は 17% であった。

水晶振動子表面に固定化されたすべてのプローブ DNA (0.35 pmol) が 28S rDNA の D2 断片の 1 本鎖と結合した場合、発振周波数の低下は約 630 Hz となる。Fig. 6 の結果で周波数低下が 107 Hz にとどまっているのは、プローブ DNA に結合した長鎖の 1 本鎖 DNA がヘアピンループなどの高次構造をとり、立体障害が生じているためと考えられる²⁴⁾。固定化した 25 塩基のプローブ DNA を用いて 308 塩基の 1 本鎖 DNA を検出しようとするれば、当然、それに付随する立体障害の影響は当初から想定される問題である。この点に関して、長鎖の DNA を短鎖に断片化するには、制限酵素による処理 (消化) が必要であり、これには十分に精製された高濃度の長鎖 DNA と切断部位に応じた複数種類の制限酵素が多量に必要である。また、処理により得られた DNA 断片においても、不要な断片や未反応物、あるいは副生成物や分解物を QCM の測定系に持ち込まないために、精製や濃縮などの操作が別に必要となる。さらに、精製の不十分な DNA 断片を検出対象として用いると、水晶振動子表面に固定化されたプローブ DNA は、ハイブリダイゼーションの障害と非特異的な吸着の両方を検出することになる。しかしながら、長鎖のままの DNA を用いれば、これらの操作は一切不要である。また、短鎖よりも一本鎖あたりの重量が大きいため、ハイブリダイゼーション効率が低い場合であっても、QCM による質量変化が観測しやすい利点もある。つまり、たとえ長鎖の DNA によって立体障害が生じて、ハイブリダイゼー

ション効率が低下しても、相応の識別能を有していれば、長鎖のままの DNA を用いる方が有利であり、QCM 法による微小質量の変化が観測可能である。結果的には、ツキヨタケの 28S rDNA の D2 断片については、ハイブリダイゼーション効率がわずかに 17% であったが、大きな周波数低下が見られ、十分に検出可能であることが明らかとなった。

3.5 異種キノコの DNA を含む混合物からのツキヨタケの検出

ツキヨタケ、シイタケ、ヒラタケの 3 種から抽出した DNA の PCR 生成物 (28S rDNA D2 断片) の混合物を試料として、プローブ DNA を固定化した水晶振動子を用いて QCM 測定を行い、ツキヨタケの検出を試みた。観測された発振周波数の変化を Fig. 7 に、その際の試料 DNA の結合量を Table 5 に示す。試料溶液の添加と同時に発振周波数の低下が始まり、29 Hz 低下した後に周波数は一定となった。この周波数低下がツキヨタケの 28S rDNA D2 領域の結合によるものとすれば、その結合量は 0.02 pmol であり、ハイブリダイゼーション効率は 6% となる。

3.4 で述べたように、ツキヨタケの 28S rDNA D2 断片

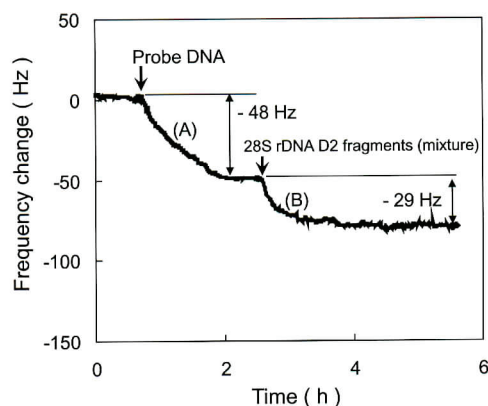


Fig. 7. Frequency change by immobilization of probe DNA on quartz crystal unit (A) and hybridization of probe DNA with the mixture of 28S rDNA D2 fragments of *O. guepiniformis*, *L. edodes* and *P. ostreatus* (B).

Table 5. Result of QCM measurements for immobilization of probe DNA and hybridization with the mixture of 28S rDNA D2 fragment of *O. guepiniformis*, *L. edodes* and *P. ostreatus*.

Process	Frequency decrease (Hz)	Mass increase (ng)	Molar amount of DNA (pmol)
Immobilization of probe DNA	48	2.5	0.31
Hybridization with the mixture of 28S rDNA D2 fragments	29	1.5	0.02

のみを試料とした場合のハイブリダイゼーション効率は17%であったが、シイタケ、ヒラタケのDNAの混合によってその値は6%まで低下した。この原因として、混合試料中のツキヨタケのDNA濃度が単独試料の1/3であったことを考慮しなければならないが、3.4と同様のツキヨタケのみのDNAを用いた実験系において、DNA濃度を1/3とした場合に、ハイブリダイゼーション効率が同等の17%前後の値であったこと、さらに、水晶振動子表面に固定化されているプローブDNAの濃度が0.31-0.38 pmolであるのに対し、ツキヨタケのDNA濃度が1/3であっても、測定溶液(4 ml)中に存在するツキヨタケのDNAは約670 pmolであることから、検出対象としてのDNAは十分に存在すると考えられる。これ以外に、ツキヨタケのDNAがシイタケおよびヒラタケのDNAと共存することによって、水晶振動子表面に固定化されたプローブDNAとの相互作用に何らかの阻害が生じたことなどが考えられる。

一方、シイタケ、ヒラタケの2種のみから抽出したDNAのPCR生成物(28S rDNA D2領域)の混合物を試料とした対照実験では、発振周波数の変化がほとんど見られなかった。このことから、28S rDNAのD2領域という300塩基対を超える比較的長鎖のDNA断片の混合物であっても、特異的な識別対象領域を有したDNAだけを選択的に検出しうることが確認された。

4. ま と め

本稿では、水晶振動子の表面に1本鎖DNAを固定化し、このQCMシステムを組み込んで特定のキノコ菌種の識別に応用した結果について論じた。毒キノコを対象として、その28S rDNAのD2領域にある特異的な25塩基の配列を選定し、これと相補的な塩基配列をもつプローブDNAを水晶振動子の金電極表面に固定化したQCMセンサーを作製した。プローブDNAと相補的な合成DNAをターゲットDNAとして、プローブDNAとのハイブリダイゼーションを追跡した結果、2本鎖形成に伴う微小質量変化を発振周波数の低下として検出できることが確認できた。さらに、ツキヨタケ、シイタケおよびヒラタケの子実体切片(0.1 g)からそれぞれ28S rDNA D2断片(約300塩基対)を抽出し、QCM法による菌種識別を行った。ツキヨタケのDNAについては、立体障害に起因すると考えられるハイブリダイゼーション効率の低下が見られたものの、顕著な発振周波数低下が観測されたことから十分に識別可能であった。一方、シイタケおよびヒラタケから抽出したDNAの混合物を試料とした対照実験で発振周波数の変化がほとんど見られないことを確認した後、ツキヨタケ、シイタケおよび

ヒラタケのDNAの混合試料についてツキヨタケの識別を試みた。その結果、ツキヨタケはこの混合試料からも検出可能であり、DNAで表面修飾した水晶振動子を用いて料理残や嘔吐物に含まれる特定の毒キノコ菌種を識別可能であることが示唆された。

DNAのハイブリダイゼーション効率を高めるためには検出対象とする1本鎖DNAがより短く、また、濃度の高い試料調整が望ましい。このためには特異的なプライマーを用いる非対称PCR法^{25,26)}あるいは、サプレッションPCR法²⁷⁾によって検出領域を含む1本鎖DNAのみ増幅することが有効であり、これによりQCM測定によるDNA検出の信頼性を大幅に向上させるものと考えられる。

文 献

- 1) 田村行弘: 東京予防医学会協会年報 **31** (2002).
- 2) 例えば, 厚生労働省: 食中毒統計資料 (2008).
- 3) 田島 眞, 豊田正武編: “食品衛生学” (同文書院, 1998) p. 95.
- 4) 日本薬学会編: “衛生試験法注解 2000” (金原出版株式会社, 1972) p. 278.
- 5) G. Sauerbrey: *Z. Phys.* **155**, 206 (1955).
- 6) 大島賢治, 小林幸太, 山内 健, 下村雅人, 宮内信之助: *日本化学会誌* **6**, 405 (2000).
- 7) Y. Kanekiyo, M. Sano, R. Iguchi and S. Shinkai: *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* **38**, 1302 (2000).
- 8) M. Naito, Y. Sasaki, T. Dewa, Y. Aoyama and Y. Okahata: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 11037 (2001).
- 9) Y. Ebara and Y. Okahata: *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11209 (1994).
- 10) H. Matsuno, K. Niikura and Y. Okahata: *Chem. Eur. J.* **7**, 3305 (2001).
- 11) I.B.-Dov, I. Willner and E. Zisman: *Anal. Chem.* **69**, 3506 (1997).
- 12) S. Babacan, P. Pivarnik, S. Letcher and A.G. Rand: *Biosens. Bioelectron.* **15**, 615 (2000).
- 13) J.M. Abad, F. Pariente, L. Hernandez and E. Lorenzo: *Anal. Chim. Acta* **368**, 183 (1998).
- 14) K.D. Pavey, Z. Ali, C.J. Olliff and F. Paul: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **20**, 241 (1999).
- 15) C. Wang, H. Wang, Z. Wu, G. Shen and R. Yu: *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 803 (2002).
- 16) K. Kon, N. Tsukahara and M. Shimomura: *Sensors and Actuators B* **123**, 647 (2007).
- 17) 杉田 隆: “DNA塩基配列解析に基づく真菌の迅速同定法” *Bio WAVE* **24** (2003)
- 18) 馬場崎勝彦: “微生物遺伝資源利用マニュアル (5)” (農業生物資源研究所, 1999) p. 3.
- 19) 宮内信之助, 昆喜知郎, 山内 健, 下村雅人: *日本菌学会会報* **39**, 83 (1998).
- 20) Y. Okahata, M. Kawase, K. Niikura, F. Ohtake, H. Furusawa and Y. Ebata: *Analytical Chemistry* **70**, 1288 (1998).

- 21) 森田耕太郎, 内田達也, 桜井千鶴, 寺前紀夫 : 分析化学 **54**, 555 (2005).
- 22) M.J. Tarlov and A.B. Steel : "Biomolecular Films" (Design, Function, and Applications, 2003) p. 545.
- 23) A.G. Leslie, S. Arnott, R. Chandrasekaran and R.L. Ratliff : J. Mol. Biol. **143**, 49 (1980).
- 24) H. Mayama, T. Iwataki and K. Yoshikawa : Chem. Phys. Lett. **318**, 113 (2000).
- 25) E. Giakoumak, M. Minunni, S. Tombelli, I.E. Tothill, M. Mascini, P. Bogani and M. Buiatti : Biosens. Bioelectron. **19**, 337 (2003).
- 26) X. Mao, L. Yang, X. Su and Y. Li : Biosens. Bioelectron. **21**, 1178 (2006).
- 27) A. Chenchik, L. Diatchenko, P. Siebert, S. Lukianov, K. Lukianov, N. Gurskaya, V. Tarabykin, E. Sverdlov : U.S. Patent No. 5,565,340 (1996).