ホタルルシフェラーゼによる魚肉中の ATP 量の 迅速定量法について

上西由翁, 松野知之, 進藤 穰
御木英昌, 西元 諄一

(1992 年 4 月 16 日受付)

A Rapid Determination of ATP in Fish Muscle Using Luciferase of American Firefly *Photinus pyralis*

Yoshio Kaminishi,* Tomoyuki Matsuno,* Jo Shindo,*
Hidemasa Miki,* and Jun-ichi Nishimoto*

The quantitative method of ATP in fish muscle was investigated by the measurement of emitted light intensity using luciferase of the American firefly. The peak of the emitted light spectrum was shown at 554 nm. The sensitive assay for ATP was improved by increasing the concentration of the enzyme with the presence of bovine serum albumin, DTT, and EDTA. The regression line was obtained between the emitted light intensity and the ATP concentration in the ranges from 1 to 50 μ M. The bioluminescent reaction was not inhibited by the dilution of neutralized perchlorate as extractive solvent with 100 volumes of distilled water.

The ATP contents in the extracts of fish muscle were determined both by bioluminescent reaction and by column chromatography. The values obtained by the two different methods almost agreed. Consequently, the bioluminescent reaction of American firefly luciferase could be used for the rapid determination of the ATP contents in fish muscle.

魚類市場において“活きもの”とは死後硬直前の極めて鮮度状態のよいものを指し、死後硬直後のものと比較して市場価格が異なる。田中¹⁾は、ヒラメにおいて大阪市場での両者の価格から死後硬直前のものでは硬直後のものと比較して約 2 割高い値で取り引きされていると報告している。死後硬直の要点は、いくつかの総説^{2,3)}で述べられているように adenosin 5'-triphosphate (ATP) 含量と深く関連しており、ATP が完全に消失した時点で死後硬直はピークに達する。したがって、ATP を指標に死後硬直状態を追跡すれば生鮮度保持の研究に役立つと考えられる。魚類筋肉中の ATP 含量の定量法として連続濃度勾配カラムクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーを用いた方法があるが、測定に時間がかかるため多量の試料分析には適さない。

ホタルルシフェラーゼ (Lase) は ATP と Mg^{2+} 、ルシフェリン (Lf) の存在下で発光反応を示し、次の反応により発光する。⁴⁾

Lf は Lase により $Lase \cdot Lf \sim AMP$ となり酸素と反応し、オキシルシフェリン (L) となって解離する課程で発光 ($h\nu$) する。また、ATP 以外の核酸関連物質への反応性は乏しく ATP にかなり強い特異性を有していることが報告^{5,6)}されている。

これらの特性を利用して、Chappelle *et al.*⁷⁾は微生物中の ATP 含量と微生物数の間に高い相関を見だし、Lase を用いた微生物数の定量法を提案している。本研究では、魚類筋肉から得られた抽出液中の ATP 含量を Lase を用いて定量を試みた。さらに、従来法の連続濃度勾配カラムクロマトグラフィーとの比較を行い、迅速定量法としての利用性について検討した。

試料および方法

供試試薬 Lase, Lf および標品 ATP はベーリンガー社製のものを使用した。Lase 1 mg をあらかじめ 0°C に保持した 0.5 M トリス酢酸緩衝液 (pH 7.5) 1 ml に溶解させ、50 μ l ずつ分取し -40°C に凍結保管した。この濃縮溶液を使用直前に解凍後蒸留水で希釈し、氷水中

* 鹿児島大学水産学部食糧保蔵学研究室 (Laboratory of Food Preservation, Faculty of Fisheries, Kagoshima Univ., Shimoarata, Kagoshima 890, Japan).

Table 1. Composition of assay buffers

TED buffer (pH 7.75)	
500 mM	Tris-acetate buffer
20 mM	EDTA
600 mM	DTT
BM buffer* ¹	
0.15%	Bovine serum albumin
20 mM	MgSO ₄
2 ml	TED buffer
Diluted to 10 ml with water	
Assay buffer (pH 7.75)	
460 μ l	BM buffer
20 μ l	Lase* ² (5–40 μ g/ml)
20 μ l	Lf* ³ (2.5 mM)

*¹ BM buffer was prepared just before use.*² Luciferase was dissolved in 0.5 M Tris-acetate buffer (pH 7.5).*³ Luciferin was dissolved in the diluted solution of TED buffer with 9 volumes of distilled water.

で貯蔵したものを Lase 溶液として用いた。Lf 溶液の調製は、Lf 1 mg を 2 mM EDTA*¹ と 60 mM DTT*² を含む 50 mM トリス酢酸緩衝液 (pH 7.75) 28.54 ml に溶解し、1 ml ずつ褐色ビン中に分取した後、窒素置換し 4°C で保管した。なお、Lf は光と酸素によって品質が劣化しやすいため³ 調製は暗所にて速やかに行った。当研究室にて窒素置換後、遮光状態で貯蔵性を確認したところ、2 カ月以上使用可能であった。使用の際は、Lf の品質劣化を防ぐため氷水中にて保存した。

発光強度の測定 発光強度の測定はルミノメーターを用いるのが好ましいが、本実験では光電子増倍管を備えている蛍光分光光度計 EP-777 (日本分光) を使用した。使用の際、励起光の侵入を防ぐため励起側をシャットアウト (装置内蔵) し発光強度を求めた。

実験に用いた反応溶液の組成を Table 1 に示した。あらかじめ表中に示す濃度の Tris, EDTA, DTT の pH 7.75 の緩衝液 (TED buffer) を作成した。実験の直前に 2 ml の TED buffer を含む 10 ml の 0.15% 牛血清アルブミン (BSA), 20 mM MgSO₄ 緩衝液 (BM buffer) を調製後、Lase と Lf を石英セル (10×10×43 mm) 中の BM buffer に加え 500 μ l の assay buffer を得た。石英セルを蛍光分光光度計にセットし、ATP 溶液の注出口をセルの底面に接触させ装置の蓋を閉じた。測定波長 550 nm, 蛍光側バンドワイド (SBW) 20 nm, 測定時間 20 秒に設定した後測定を開始し、5 秒後に 500 μ l の ATP 試料溶液を注入した。その際得られたピークの高さから発光強度を求めた。

試料の抽出 ティラピア *Tilapia nilotica* は鹿児島県

*² Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt.*³ Dithiothreitol.

Fig. 1. Emitted light spectrum of ATP using luciferase of the American firefly.

The emitted light spectrum was measured by a fluorescence spectrophotometer shielding the exciting light.

指宿市で漁獲した。断頭即殺後、4°C に 48 時間貯蔵した背肉から江平ら⁹⁾ の過塩素酸 (PCA) 抽出法により抽出液を得た。ATP 濃度の異なる試料液を作成するために、得られた抽出液に任意量の ATP を添加し、それぞれの ATP 添加試料に対して連続濃度勾配カラムクロマトグラフィーおよび Lase 発光反応により ATP 含量を求めた。連続濃度勾配カラムクロマトグラフィーによる ATP 含量の測定は江平らの方法⁹⁾ に準じ、Dowex 1×4,400 メッシュのカラム (0.6×6 cm) を用いて 260 nm の吸光度から求めた。

結果および考察

Lase 発光反応に及ぼす各因子の影響 発光強度に及ぼす共存試薬の影響ならびに装置の設定条件について検討した。まず、発光スペクトルを調べたところ、Fig. 1 に示すように 554 nm に発光ピークを持つスペクトルが得られたことから、測定波長は 550 nm (SBW 20 nm) で行った。次に、ATP 濃度が発光パターンに及ぼす影響について検討したところ、ATP 濃度の高いもの (Fig. 2 (a)) では反応初期に高い発光強度で、反応時間とともに発光強度の低下を示すいわゆる“ピーク型”の発光パターンであった。ATP 濃度の低いもの (Fig. 2 (c)) では反応時間に発光強度が影響しない“定常型”の発光を示し、ATP 濃度の違いにより異なる発光パターンが得られた。このような発光パターンの違いは、Lf と ATP から酵素反応によって生成したオキシフェリンが基質阻害

Fig. 2. Typical light-emission curves under various concentrations of ATP.

ATP concentration was (a) 2, (b) 0.2, and (c) 0.02 mM, respectively. The reaction was started by injecting 500 μ l of ATP solution into 500 μ l of the assay buffer of Table 1. The final concentration of luciferase was 0.8 μ g/ml.

を引き起こすため⁴⁾で、本実験においても ATP 濃度が高い場合、反応時間とともに発光強度の低下を引き起こす基質阻害の影響が認められた。したがって、ATP 含量に比例した発光強度を得るためには基質阻害のみられない反応初期のピーク高を測定することが好ましいと思われる。以後ピークの高さを発光強度とした。

BSA, EDTA, DTT の共存が発光強度に及ぼす影響について予備的に調べたところ、3 試薬が共存すると共存しないときに比べ約 7 倍近い発光強度の増加がみられ、酵素の機能活性にこれらの試薬が重要な役割を示したものと考えられた。また、測定装置の設定条件においても BSW を 10 から 20 nm に広くすることにより発光強度は約 3 倍に増加し、発光強度の低いときと比べてノイズと思われる影響が低減され変動の少ない安定した値を得ることができた。以下の測定では、BSA, DTT, EDTA が共存した反応混液を用い、測定波長は 550 nm (BSW 20 nm) の条件下で行った。

発光強度に及ぼす Lase 濃度の影響は、Lase の終濃度 0.05–0.80 μ g/ml の範囲において直線関係がみられ (Fig. 3)、この範囲で Lase 濃度が増加すると発光強度も順次増加した。Lase 濃度の増加にともなう発光強度の増加は、先述のようにノイズの影響と思われる発光強度の変動を低減させるため、本実験では Lase 濃度は 0.80 μ g/ml で行なった。

Fig. 3. Effect of luciferase concentration on emitted light intensity.

The concentration of ATP was 2 mM and the experimental conditions were identical to those described in Fig. 2 except for luciferase. The concentration of luciferase was expressed as a final concentration of the reaction mixture.

Lf が発光強度に及ぼす影響については、図示しないが開封直後のものでは高い値を示すのに対し、開封 30 分まで約 50% の発光強度の急激な低下がみられ、その後 360 分まで安定な発光状態を示した。この発光強度の急激な低下は、Lf が光の照射によって励起状態になり、

Fig. 4. Effect of ATP concentration on emitted light intensity.

The experimental conditions were identical to those described in Fig. 2 except for ATP concentration.

そのとき空気中の酸素と自然に反応することによるが、開封後 30 分以上静置することで使用に差し支えないと判断した。

ATP 標準曲線の作成 標品 ATP を用い、上記実験条件のもとで検量線の作成を試みた。予備実験において、Lase 濃度 0.05 と 0.80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のもので大まかな検量線を作成したところ、前者では 10^{-2} – 1 mM の ATP 濃度において、また、後者では 10^{-3} – $5 \times 10^{-1}\text{ mM}$ の ATP 濃度において少なくとも直線が得られることがわかり、Lase 濃度の調節が必要とする範囲の ATP 標準曲線が作成できるものと考えられた。ここでは、高い検出感度の標準曲線を得るために Lase 濃度は 0.80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を用いた。その結果、Fig. 4 のように 1 から 50 μM の ATP 濃度において、発光強度の対数値と ATP の対数値の間に回帰直線 ($r=0.98$) が得られ、ATP の検量線が作成できた。ATP の低濃度では多少ばらつきが大きくなるようであるが、Cappelle *et al.*³⁾ も述べているように検出感度の高いルミノメーター等を用いればばらつきも抑制され、さらにはより幅広い濃度の検量線の作成も可能と考えられる。いずれにしても、生体試料中のように幅広い濃度の ATP 含量を測定するには適した方法であると思われた。

Lase 法と連続濃度勾配カラムクロマトグラフィーによる ATP 濃度の比較 筋肉から PCA 法で抽出された試料中の ATP 含量を Lase 反応によって定量を試みる前に、PCA が発光反応に及ぼす影響について検討した。5% 濃度の PCA 溶液を KOH で中和し、遠心分離で過塩素酸カリの沈澱物を除去した溶液を順次蒸留水で

Fig. 5. Effect of concentration of neutralized perchlorate on emitted light intensity.

The concentration of ATP was 2.0 mM and the experimental conditions were identical to those described in Fig. 2.

Table 2. Relationship between ATP contents obtained from column chromatography and from bioluminescence reaction

ATP contents (mM) by column chromatography (usual method)	ATP contents (mM) by bioluminescence
0.20	0.23
0.35	0.36
0.90	0.93
1.55	1.66

希釈し、2 mM ATP に対して発光強度を調べた。PCA 中和液を含まない対照に比べて、希釈していないもので約 8%, 5 倍希釈液で約 60% の発光強度しか示さなかったが、100 倍希釈では発光強度にほとんど影響はなかった (Fig. 5)。そこで本実験では、抽出液を 100 倍に希釈しあらかじめ得られた検量線から ATP の定量を行った。なお、今回は連続濃度勾配カラムクロマトグラフィー法との比較のため PCA を用いたが、発光反応への影響の少ない抽出溶媒について現在検討中である。抽出法の改善により希釈倍率を変化させることで、今後検出感度の向上が図れるものと考えられる。

次に、5% PCA 溶液で抽出された試料液に任意量の標品 ATP を加えた試料液に対して連続濃度勾配カラムクロマトグラフィー法と Lase 法によって ATP 含量の定量を行った。連続濃度勾配カラムクロマトグラフィーによる ATP の回収率は 2 mM ATP に対して 93.5% であり、この回収率値を用いて ATP 含量を算出した。また、Lase 法では ATP 含量を算出するための検量線は直前に作成されたものを使用した。その結果、Table 2 に示すようにそれぞれの値はほぼ一致し、両者の間には相関係数 0.999 の高い正の相関 ($Y=9.39 \times 10^{-3}X +$

3.58×10^{-7}) がみられたが, Lase 法が若干高い値であった。この原因については, カラムクロマトグラフィーの回収率や抽出液中の夾雑物が発光反応に影響していることが推察されるが, ほぼ一致するとみなすことができ, 従来法に代わる ATP 定量法として利用できるものと考えられる。測定時間についても連続濃度勾配カラムクロマトグラフィー法で 3 時間, 高速液体クロマトグラフィーで約 30 分間要していたものが, Lase 法では測定に 30 秒以内, 準備も含めると 1 検体当り 3 分以内で測定可能であり, 迅速定量法としても有用なことがわかった。しかしながら, Lf の貯蔵期間で発光強度が異なるため検量線を毎回作成しなければならないなどの難点があるが, 測定時間が短いため多量の検体処理には適した方法であるといえる。また, 幅広い ATP 濃度で検出が可能なことや, 抽出液の選択により希釈倍率が今後改善されるとかなり低濃度の ATP 濃度まで検出できると考えられるため, 生鮮度保持への応用ばかりでなく細胞レベルでの ATP 検出に将来利用が期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり, ルシフェラーゼに関する資料を御提供下さった(株)キッコーマン研究本部研究推進室の杉崎祐司氏に感謝する。

文 献

- 1) 田中武夫: 新流通法の試行とその市場評価「死後硬直の遅延に基づく生鮮魚の新流通法の開発」(研究代表者 橋本周久), 昭和 63 年度科研費(試験研究 I) 研究成果報告書, pp. 57-73 (1989).
- 2) 関 伸夫: 魚類筋原繊維タンパク質と生鮮度, 「魚の低温貯蔵と品質評価法」(小泉千秋編), 恒星社厚生閣, 東京, 1986, pp. 66-76.
- 3) 西元諄一, 御木英昌: 鮮度保持の応用生化学, 冷凍, **44**, 1087-1092 (1987).
- 4) K. Wulff: Methods of enzymatic analysis-volume I Fundamentals. (ed. by H. U. Bergmeyer), Third edition, Verlag Chemie, Weinheim, 1983, pp. 351-354.
- 5) J. D. Moyer and J. F. Henderson: Nucleoside triphosphate specificity of firefly luciferase. *Analytical Biochemistry*, **131**, 187-189 (1983).
- 6) 渡辺治夫: ルシフェラーゼ, 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 192-199 (1988).
- 7) E. W. Chappelle and G. V. Levin: Use of the firefly bioluminescent reaction for rapid detection and counting of bacteria. *Biochemical Medicine*, **2**, 41-52 (1968).
- 8) H. O. Beutler and M. Supp: Methods of enzymatic analysis-volume II Samples, Reagents, Assessment of results. (ed. by H. U. Bergmeyer), Third edition, Verlag Chemie, Weinheim, 1983, pp. 363-364.
- 9) 江平重男, 内山 均, 宇田文昭: 魚類筋肉 ATP 関連化合物の定量, 「水産生物化学・食品学実験書」(斎藤恒行, 内山 均, 梅本 滋, 河端俊治編), 恒星社厚生閣, 東京, 1974, pp. 17-31.