

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2015～2016  
課題番号：15K12229  
研究課題名(和文)迅速・簡便・オンサイト型硝化・脱窒細菌計測法の開発と廃水処理槽管理指標への応用

研究課題名(英文)Development of rapid, simple, on-site measurement method for nitrifying and denitrifying bacteria and its application to management index for wastewater treatment process

研究代表者  
山田 剛史(Takeshi, YAMADA)  
豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90533422  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アンモニア酸化細菌(AOB)を検出するCTC(5-cyano-2,3-ditolyl-2-tetrazolium chloride)法の最適条件の検討を行った。さらに、AOBの細胞表層タンパクに特異的に結合するDNAアプタマーとDNAアプタマーの高感度化に関する研究を行った。AOB生菌数を計測するCTC最適反応条件は、CTC濃度5mMおよびCTC反応時間3時間であることを明らかにした。さらに、AOBに結合するDNAアプタマー候補の濃縮にも成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the optimum condition of CTC (5-cyano-2,3-ditolyl-2-tetrazolium chloride) method for detection of ammonia oxidizing bacteria (AOB). In addition, we studied on DNA aptamer that specifically bound to cell surface protein of AOB and on the high sensitivity of DNA aptamer. The optimized CTC conditions for measuring the number of AOB viable cells revealed that the CTC concentration was 5 mM and the CTC reaction time was 3 hours. Furthermore, we succeeded to concentrate the candidate DNA aptamer that bind to AOB.

研究分野：環境保全学

キーワード：CTC DNAアプタマー 微生物指標 廃水処理 多重染色 簡易微生物測定 硝化・脱窒

### 1. 研究開始当初の背景

現在、生物学的硝化—脱窒プロセスでは、pH、温度などの水質指標に基づき制御・管理されており、処理水質の低下などプロセス運転が悪化した場合、現状回復に多大な労力が要求される。当該プロセスを適切に管理するには、水質指標のみならず、プロセス内で硝化および脱窒反応を行う微生物の生菌数も指標化し、水質と微生物との相互補完的な管理が必要不可欠である。しかし、現在のところ、硝化菌（アンモニア酸化菌や亜硝酸酸化菌）や脱窒菌の生菌数をオンサイトで迅速・簡便に計測する技術がないのが現状である。これまで申請者は、(1)「簡便な操作性」、(2)「迅速な検出」、および(3)「オンサイトで測定可能」という研究開発コンセプトのもと本計測技術の確立を目指してきた。CTC法は好気性細菌である硝化菌の計測には問題ないが、無酸素環境下で硝酸呼吸を行う脱窒菌の計測にCTC (5-cyano-2,3-ditolyl-2-tetrazolium chloride) 法が利用できるかは不明であった。先の研究では、アルゴンパージをしたバイアル瓶内でCTC反応を行うことで、脱窒菌の硝酸呼吸由来のCTCフォルマザンの微弱蛍光を観察することに成功した。しかし、廃水中に還元性物質が多く含まれる場合、非生物学的なCTCフォルマザンの形成や、物理的な力による細胞からCTCフォルマザンの剥離も数多く認められた。CTC法の高感度化は当面の課題でもあるが、このことは、CTC法の利用のみでは、硝化菌や脱窒菌の生菌数の正確な計数ができないことを意味している。そこで本研究では、この問題を克服しつつ当初の目標を達成すべく、硝化菌や脱窒菌の細胞表面タンパクを認識する蛍光アプタマーの探索と活用方法の検討が必要となる。

### 2. 研究の目的

本研究では、生物学的硝化・脱窒プロセスの鍵となる微生物の一つであるアンモニア酸化細菌 (AOB) を標的として、AOBを測定可能なCTC法の最適化とAOBの細胞表面タンパクに特異的に結合するDNAアプタマーの探索を目的とした。さらに、本研究では、in situ DNA-hybridization chain reaction (HCR) 法を応用することによって、DNAアプタマー由来の微生物蛍光を高感度化と均一化を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) AOB生菌を捉えるCTC法の高感度・迅速測定法の確立

本研究では、AOBの1種である *Nitrosomonas europaea* NBRC14298株を用いた。CTC反応液は、50mM MOPS溶液 (pH6.5) および0.1mM KCNを用いた。CTC反応の基質は、アンモニア (1 mM) とした。最終的な反応液中のCTC濃度は、0.1~7.0mMとなるように調整した。AOBの最適CTC反応条件は、CTC濃度やCTC反応時間をもとに決定した。CTC

染色細胞および全菌細胞は、CMOSデジタルカメラD5Qi2搭載の蛍光顕微鏡BX53にて細胞由来の蛍光を観察した。CTC染色細胞数の割合は、10視野分の写真を撮影した後、Syber Green Iで計測した全菌数をCTC染色細胞数で除して算出した。CTC染色細胞の割合の増加しない条件を境界として、CTC最適反応条件を決定した。

(2) AOBの細胞表面タンパクに特異的なアプタマー配列の探索

DNAアプタマーの探索は、Cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Cell-SELEX) 法 (図1) を利用して行った。Selection buffer (137 mM NaCl<sub>2</sub>, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.4 mM MgCl<sub>2</sub>) 内のssDNAランダムライブラリー (88mer) (100 pmol・μL<sup>-1</sup>) は、95℃で5分間変性させた。変性させたssDNAランダムライブラリーは、ただちに、氷浴で15分間静置させた。次に、ssDNAランダムライブラリーとSelection bufferの混合溶液に対して、Selection bufferを用いて10<sup>7</sup> cells・mL<sup>-1</sup>に調整した *N. europaea* NBRC14298株の菌液 850 μL 添加した。 *N. europaea* NBRC14298株とssDNAランダムライブラリーは、恒温振盪器を用いて、室温条件下で攪拌させた (攪拌条件 : 220 rpm)。ssDNAを結合させた菌体からssDNAを回収するため、菌体に対してDNA/RNA-free waterを添加し、95℃で5分間加熱させた。菌体から溶出させたssDNAを鋳型としたPCR増幅反応は、アシメトリックPCR反応法を利用した。アシメトリックPCR反応は、初期変性 (95℃, 2 min) の後、変性 (95℃, 1 min), アニール (65℃, 30 sec), 伸長 (72℃, 40 sec) の40回のサイクルと最終伸長反応 (72℃, 5 min) とした。得られたPCR産物から、ssDNAのみを選択的に精製した。

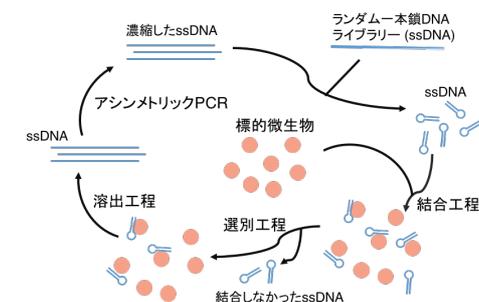


図1 アンモニア酸化細菌を特異的に検出するアプタマーを探索するために行ったCell-SELEX法の概略図

(3) 蛍光標識アプタマーによる高感度化と蛍光の均一化の検討

モデル微生物は、*E. coli* K12株を用いた。DNAアプタマーは、大腸菌を広く検出できるP12-17、P12-31、P12-52およびP12-55DNAアプタマーを用いた。さらにin situ DNA-HCR法を応用するために上述のアプタマーの5'

末端に initiator 配列)を付加したものを設計し、高感度化の検証に用いた。DNA アプタマーの結合実験には、上述した AOB の DNA アプタマー探索で行った方法を採用した。*E. coli* K12 株へ DNA アプタマーを結合後、HCR 反応によって蛍光強度の増幅および均一化を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) AOB 生菌を捉える CTC 法の高感度・迅速測定法の確立

CTC 反応液に対して、 $107 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$  に調整した *N. europaea* NBRC14298 株と様々な濃度に調整した CTC (0.1~7mM) を添加し、AOB 生菌数の検出に最適な CTC 濃度を調査した。CTC 染色細胞の割合は、CTC 濃度を高めるにつれて増加する傾向が確認できたが、CTC 濃度 5mM 以上の添加は、CTC 染色細胞の割合の変化にはほとんど影響しないことがわかった (図 2-a)。次に、CTC 最適反応時間を決定するため、CTC 最適濃度条件において、*N. europaea* NBRC14298 株と CTC の反応時間を 0.5~6 時間の間で変化させた。CTC 染色細胞数の割合は、CTC 反応時間を長くすることによって増加する傾向が確認されたが、3 時間以上の反応時間では、CTC 染色細胞数の割合にほとんど変化がなかった (図 2-b)。

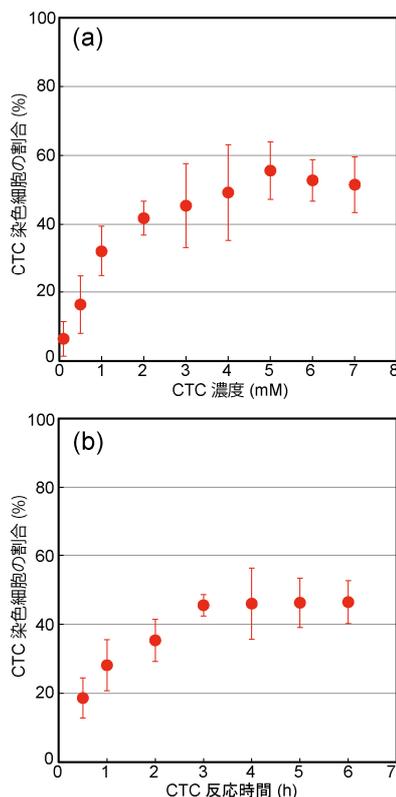


図2 (a) CTC 濃度ごとにおける *N. europaea* NBRC14298 株の CTC 染色細胞の割合 (b) CTC 反応時間ごとにおける *N. europaea* NBRC14298 株の CTC 染色細胞の割合

これらのことは、AOB 生菌数を計測する CTC 最適反応条件として、CTC 濃度 5mM および CTC 反応時間 3 時間が最適であることを示していた。

##### (2) AOB の細胞表面タンパクに特異的なアプタマー配列の探索

次に、アシンメトリック PCR 法を利用した Cell-SELEX 法を用いて、*N. europaea* NBRC14298 株の細胞表面タンパクに特異的に結合する DNA アプタマーの探索を行った。DNA アプタマーの選別工程では、*N. europaea* NBRC14298 株に結合させた ssDNA を鋳型としたアシンメトリック PCR 法にて PCR 増幅を行った。10%ポリアクリルアミドゲルを使用し電気泳動にて、増幅した PCR 増幅産物を確認したところ、目的とする 88mer の PCR 断片が増幅されていることがわかった。5 回の ssDNA の選別工程を経ており、*N. europaea* NBRC14298 株の細胞表面タンパクに特異的に結合できる DNA アプタマー候補を濃縮することに成功した。

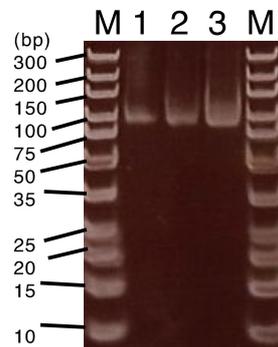


図3 Cell-SELEX 法により濃縮したアンモニア酸化細菌に特異的に結合すると思われるアプタマー候補の電気泳動図 M: 泳動マーカー 1: 溶出後の ssDNA を鋳型としたアシンメトリック PCR 産物 (1 ラウンド) 2: 溶出後の ssDNA を鋳型としたアシンメトリック PCR 産物 (2 ラウンド) 3: 溶出後の ssDNA を鋳型としたアシンメトリック PCR 産物 (3 ラウンド)

##### (3) 蛍光標識アプタマーによる高感度化と蛍光の均一化の検討

次に、本研究では、大腸菌を広く検出できるも P12-17、P12-31、P12-52 および P12-55 DNA アプタマーによる *E. coli* K12 株の検出で得られる蛍光強度を評価した。しかしながら、当該 DNA アプタマーは大腸菌を特異的に検出できるにもかかわらず、得られる蛍光は微弱であった。そこで、DNA アプタマーの投入量や洗浄条件等を検討したところ、*E. coli* から蛍光が得られた。一方、この検討によって、蛍光強度は高まったものの、特異性の確保は困難であった。この結果は、本研究で用いた HCR 法のさらなる最適化が必要であることを示していた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yamaguchi, T., B. M. Fuchs, R. Amann, S. Kawakami, K. Kubota, M. Hatamoto, T. Yamaguchi, Rapid and sensitive identification of marine bacteria by an improved in situ DNA hybridization chain reaction (quickHCR-FISH), Syst. Appl. Microbiol. 査読有, vol. 38, 2015, pp. 400-405,  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0723202015000958?via%3Dihub>)

〔学会発表〕(計 9 件)

木村圭佑, 山口剛士, 山口隆司, 川上周司, Click chemistry を用いた新規高感度 FISH 法の開発, 第 50 回日本水環境学会年会, 2016 年 3 月 16~18 日, アステイ徳島 (徳島市)

Yamada, T., M. Hamada, H. Tsuji, A. Hiraishi, Characterization of methane production process treating poly (L-lactic acid) that enhances chemical hydrolysis efficiency, 10<sup>th</sup> International Society for Environmental Biotechnology conference 2016 (国際学会), 2016 年 6 月 1 日~6 月 3 日, Barcelona, Spain

Yamada, T., D. Sekiya, A. Nakano, Identification of causative microbes that are associated with anaerobic bulking during start-up process in expanded granular sludge blanket reactors, 16th International Symposium on Microbial Ecology (国際学会), 2016 年 8 月 21~26 日, Montreal, Canada

山田剛史, 小川耕汰, 浜田雅子, 高温嫌気性消化リアクターにおけるポリ乳酸の処理特性と微生物群集構造解析, 第 51 回日本水環境学会年会, 2017 年 3 月 15~17 日, 熊本大学 (熊本市)

萩原達也, 山田剛史, アンモニア酸化細菌の細胞表面タンパクに結合する DNA アプタマーの探索, 第 51 回日本水環境学会年会, 2017 年 3 月 15~17 日, 熊本大学 (熊本市)

岡崎祐輝, 山口剛士, 中野淳, 山田剛史, quickHCR-FISH 法を用いたバルキングに關与する微生物の視覚的検出, 第 51 回日本水環境学会年会, 2017 年 3 月 15~17 日, 熊本大学 (熊本市)

小川耕汰, 浜田雅子, 山田剛史, ポリ乳酸を処理する高温嫌気性消化リアクターにおける乳酸酸化細菌の解析, 第 51 回日本水環境学会年会, 2017 年 3 月 15~17 日, 熊本大学 (熊本市)

川上周司, 山口剛士, 山田剛史, 山口隆司, 蛍光標識 aptamer による E.coli の視覚的検出-高感度化と蛍光の均一化の検討-, 第 51 回日本水環境学会年会, 2017 年 3 月 15~17 日, 熊本大学 (熊本市)

木村圭佑, 山口剛士, 山口隆司, 川上周司,

Click chemistry を利用した新規高感度 FISH 法の開発, 第 51 回日本水環境学会年会, 2017 年 3 月 15~17 日, 熊本大学 (熊本市)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 剛史 (YAMADA, Takeshi)  
豊橋技術科学大学・大学院工学研究科・講師  
研究者番号：9 0 5 3 3 4 2 2

(2) 研究分担者

川上 周司 (KAWAKAMI, Shuji)  
阿南工業高等専門学校・創造技術工学科・講師  
研究者番号：0 0 6 1 0 4 6 1