

研究種目：若手研究(B)	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19760377	
研究課題名（和文）	水質浄化プロセスの高度化を目指した迅速・簡便・正確な微生物モニタリング技術の開発
研究課題名（英文）	Development of rapid and accurate method to monitor microorganisms for the advancement of wastewater treatment processes
研究代表者	
	野田 尚宏 (NODA NAOHIRO)
	独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・研究員
	研究者番号：70415727

研究成果の概要：

ACE(Affinity Capillary Electrophoresis)法を基盤とした新規な複合微生物群解析手法の開発を行った。*Escherichia coli*および*Pseudomonas putida*からそれぞれ抽出したtotal RNAを用いて、2種混合模擬複合系を構築した。いずれの微生物をターゲットとした場合においても、total RNAの混合比率の増加とともに検出されるピーク面積が増加し、5-50%の範囲において定量的に検出可能であることが示された。また、実際の排水処理リアクターより採取した活性汚泥中の*E. coli*および*P. putida*の検出を行った結果、同時に行った定量的PCR法の結果とほぼ同等の定量結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1700000	0	1700000
2008年度	1600000	480000	2080000
年度			
年度			
年度			
総計	3300000	480000	3780000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：土木工学・土木環境システム

キーワード：RNA 定量, キャピラリー電気泳動, 複合微生物モニタリング, 16S rRNA

1. 研究開始当初の背景

20世紀が石油の世紀であったといわれるのに対し、21世紀は水の世紀であるといわれている。水質汚染による慢性的な水資源の不足はアフリカ・アジア諸国ではすでに深刻な問題となっており、将来を見据えた場合、わが国でも看過することのできない問題である。また、水資源は持続的な経済発展を支える根幹であることから、健全な水環境を創出し、国民にとっての共有財産である水資源を確保することは安全・安心で豊かな国民生

活を営む上で極めて重要かつ優先度の高い課題である。

湖沼・内湾等の水資源を健全な状態に保つためには、生活系、産業系排水中に含まれる有機物や栄養塩（窒素、リンなど）を安定的かつ高度効率的に除去することが重要である。下水処理場、事業場排水処理施設などにおける汚濁物質の除去には、微生物の浄化能力を利用した生物学的な水質浄化プロセス（活性汚泥法や生物膜法）が用いられることが多い。このようなプロセスでは様々な微生物が混在

している複合微生物群の浄化能力を有効に活用して、汚濁物質の除去を行っている。したがって、汚濁物質の除去を担っている微生物群を定性的かつ定量的に調べることが水質浄化プロセスを安定的かつ高度効率的に運転する上では必要不可欠である。

これらの点を踏まえ、本研究ではキャピラリー電気泳動装置を用いた迅速・簡便・正確でハイスループットな新しい遺伝子解析手法の開発を行い、本開発技術を用いて、活性汚泥に含まれる微生物相を実際に解析し、その結果を工学的に応用し、処理機能の安定化や高度化を図るという2点を目的として研究を推進していくこととする。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の二点である。

(1) アフィニティキャピラリー電気泳動法による新規な複合微生物群解析手法の開発

排水処理プロセスで用いられる活性汚泥や生物膜に存在する複合微生物群を構成する微生物種を定性的かつ定量的に解析するための新規手法の開発を行う。培養法やハイブリダイゼーション法などの既存の解析手法に比べ、迅速性、簡便性、正確性の点で上回るような新規遺伝子解析手法を創出すべく、研究を行う。具体的には DNA-RNA の相互作用を利用したアフィニティキャピラリー電気泳動法 (ACE; Affinity Capillary Electrophoresis) を基盤とした rRNA の新規な解析手法の開発を行うことを目的とする。本手法では環境サンプルより抽出した total RNA をマグネティックビーズ (磁性ビーズ) に固定化する。これをキャピラリー内に磁石を用いて保持し、蛍光プローブを泳動し、標的 rRNA 配列に結合させる。次に、核酸変性剤を導入し、結合させた蛍光プローブを解離させ、標的 rRNA の検出・定量を行う。これらの一連の作業を繰り返すことにより、複数種の微生物を短時間で解析する。既存の rRNA 定量手法の一つであるメンブレンハイブリダイゼーション法は反応に時間がかかり、結果を得るまでに 24 時間かかってしまうが、我々が考案したアフィニティキャピラリー電気泳動法を用いた方法では一つの遺伝子の解析にかかる時間はおよそ 1 時間である。また、本手法は自動化に適しており、マルチキャピラリー電気泳動装置を用いれば、ハイスループットな rRNA の自動定量が可能となる。このような迅速・簡便な新規技術の開発が本研究の独創的な点である。

(2) 複合微生物系における新規 ACE 法の検証

水質浄化プロセスに存在することが知られているいくつかの種類の微生物から抽出した RNA を既知の量で混合して、開発したアフィニティキャピラリー電気泳動法で解

析し、正確に初期の RNA 量 (比) を反映した結果を示すことができるか評価する。さらに水質浄化プロセスに存在することが知られているいくつかの種類の微生物を既知の濃度で混合した模擬複合微生物系を構築する。構築した模擬複合微生物系から RNA を抽出し、同様に本手法で解析する。実際に初期の混合比を定量的に解析することができる泳動条件やプローブの濃度などを探索する。また、複数種の微生物について連続的な解析が可能かどうか検証する。さらにこれらの検証で得られた知見を利用して、活性汚泥内の微生物相を実際に評価する。

3. 研究の方法

PCR 法を用いて調製した 16S rRNA 遺伝子ライブラリを用いて *in vitro* 転写を行い、*E. coli* および *P. putida* の 16S rRNA を調製した。これらの 16S rRNA および、活性汚泥から ISOGEN (Nippon Gene) を用いて抽出した RNA について、5'EndTag Nucleic Acid Labeling System および Biotin Long Arm Maleimide (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて 5'末端をビオチン化した。その後、ビオチン化 16S rRNA 0.4 μg を 200 μg のマグネティックビーズ (Dynabeads M-280 Streptavidin, Invitrogen Dynal AS) と反応させた (図 1(A))。このビーズ懸濁液 (1 mg/ml) をキャピラリー内に導入し (1 psi, 5 min)、泳動液 (8 mM MgCl_2 を含む Tris-Borate buffer) を送液しながらキャピラリー内を移動させた (1.0 psi, 30 min) (図 1(B))。ビーズ懸濁液導入後にホルムアミド溶液 (100% ホルムアミド) をキャピラリー内に導入した (0.5 psi, 10 s)。次に、プローブとして *E. coli* 特異的プローブである Eco997 probe (3'末端 FITC 標識, 1.5 μM) あるいは *P. putida* 特異的プローブである PSMG probe (3'末端 FITC 標識, 1.5 μM) をキャピラリー内に導入 (0.5 psi, 10 s) し (図 1(C))、電気泳動を行った (-15 kV, 25 min) (図 1(D))。その後、変性剤としてホルムアミド溶液 (ホルムアミド 100%) をキャピラリー内に導入し (0.5 psi, 10 s)、圧力をかけて送液した (1.0 psi, 10 min) (図 1(E))。キャピラリー温度はビーズの導入時は 25°C、プローブの泳動時および変性剤の導入時は 45°C とした。本手法の全体の概要を図 1 に示す。

4. 研究成果

E. coli および *P. putida* の 16S rRNA を用いた検量線を作成したところ、0.4 μg の範囲で高い相関が見られた。また、両者を混合したサンプルを測定したところ、それぞれを定量的に検出することができた (図 2)。

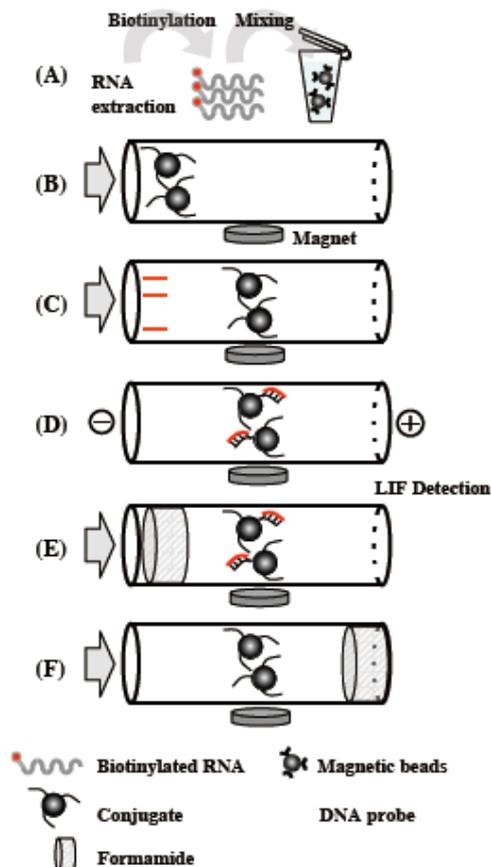


図1 ACE法の概要

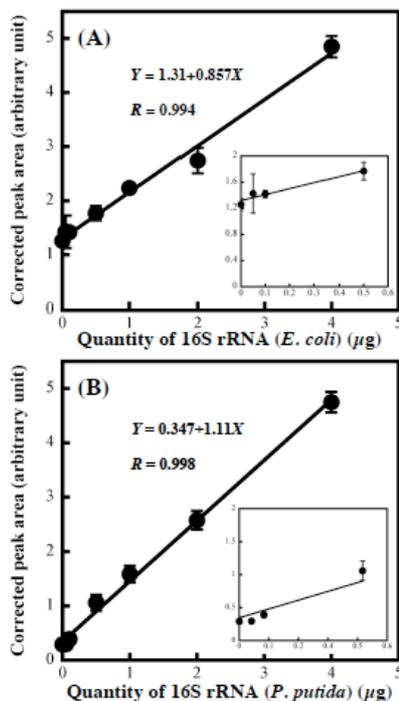


図2 *E. coli* と *P. putida* の定量結果

さらに、ビーズをキャピラリー管内に保持させた状態で、Eco997 プロブおよび PSMG プロブを交互に供試し、繰り返し測定についての検討を行った。

その結果、異なるプロブの結合・解離を交互に繰り返し行ったところ、5回までそれぞれのRNA量を反映したピーク面積が検出された。従って本手法は、5種類のターゲットをそれぞれ定量的に検出可能であると考えられる。

活性汚泥から抽出したRNAにこれらの16S rRNAを添加した模擬環境サンプルについても測定を行ったところ、添加量を反映した結果を得ることができた。これらの結果より、MB-ACE法は連続的に標的16S rRNAを定量可能な手法であることがわかった。

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)

①足立賢, 山口正裕, 中繁誠, 金川貴博, 鳥村政基, 常田聡, 関口勇地, 野田尚宏(CA), Affinity capillary electrophoresis with magnetic beads for multiplex quantitative analysis of bacterial 16S rRNA, *J. Biosci. Bioeng.*, 107(6), 662-667(2009), 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

①足立賢, 山口正裕, 中繁誠人, 金川貴博, 常田聡, 関口勇地, 野田尚宏, マグネティックビーズを用いたアフィニティキャピラリー電気泳動法による16S rRNAの検出, 化学工学会第74年会, 2009.03, 横浜

②山口正裕, 足立賢, 中繁誠人, 常田聡, 関口勇地, 野田尚宏, アフィニティキャピラリー電気泳動法を用いた特定rRNAの連続的定量手法の開発, 2008年度日本生物工学会大会, 2008.08, 仙台

③山口正裕, 足立賢, 中繁誠人, 常田聡, 関口勇地, 野田尚宏, アフィニティキャピラリー電気泳動法を用いた特定rRNAの連続的定量手法の開発, 日本農芸化学会2008年度大会, 2008.03, 名古屋

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 尚宏 (NODA NAOHIRO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・研究員

研究者番号：70415727