

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18877

研究課題名（和文）微生物指標導入の嚆矢：廃水処理系微生物のオンサイト新計測技術

研究課題名（英文）Toward introduction of microbial indicators: a new on-site measurement technology for microbes in wastewater treatment plants

研究代表者

山田 剛史（Yamada, Takeshi）

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） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、廃水処理プロセス管理における微生物指標の将来的な導入へ向けて、廃水処理系微生物のオンサイト計測の基盤技術を開発することを試みた。とくに本研究では、複数種の標的微生物を識別するDNAアプタマーの選別方法を確立し、迅速・簡便な標的微生物の定量法の基盤を構築できた。改良する必要生はあるものの、本研究で採用した方法を用いることによって、メタン生成に関わる重要な微生物であるメタノサルシナ属アーキアを特異的かつ網羅的に識別できる分子ツールの獲得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数種の標的微生物を識別するDNAアプタマーの選別方法の確立は、廃水処理プロセス管理における微生物指標の導入に欠かすことのできない技術となる。標的微生物を識別できるDNAアプタマーを獲得できれば、それを核とするDNAアプタマー修飾金ナノ粒子による廃水処理で重要な微生物群の迅速・簡便な定量法の確立に大きく近づく。その点において、本研究で得られた成果は、当該分野における学術的および社会的意義は大きいと考えている。

研究成果の概要（英文）：This study tried to develop a basic technology for on-site measurement of wastewater treatment microorganisms toward the future introduction of microbial indicators in wastewater treatment process management. In particular, in this study, we established a method for selecting DNA aptamers that identify multiple types of target microorganisms, and were able to establish the basis for a rapid and simple method for quantifying target microorganisms. Although there is a need for improvement, the method adopted in this study succeeded in obtaining a molecular tool capable of specifically and comprehensively determining Methanosarcina archaea, which is an important microorganism involved in methanogenesis.

研究分野：廃水処理工学、微生物生態学

キーワード：アンモニア酸化細菌 亜硝酸酸化細菌 メタノサルシナ属アーキア Cell-SELEX法 DNAアプタマー 細胞表面タンパク

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は、廃水処理プロセス管理における微生物指標の将来的な導入へ向けて、廃水処理系微生物のオンサイト計測の基盤技術を開発することを目指す。微生物指標の導入は、廃水処理プロセスの安定化の尺度を客観的に表すことに繋がる。現在、生物学的廃水処理の管理は、pH、温度、BOD や COD など物理化学的指標に基づいており、廃水処理プロセスで機能する微生物は、半ばブラックボックス的に扱われている。そのため、処理水質の低下などプロセス運転が悪化した場合、その原因がわからずに現状回復に多大な労力を要求されることがある。生物学的廃水処理を適切に管理するには、物理化学的指標のみならず、廃水処理装置内部で機能する微生物も指標とした新たな管理方法の構築が必要である。一方、微生物指標を導入するには、特段の専門知識や技術を持たない現場管理者が、処理現場において簡便な操作で測定できる技術が必要となる。廃水処理装置は、多様な代謝機能をもつ複合微生物群で構成されるため、(1)微生物指標となる特定微生物のみを識別する方法と、(2)識別した微生物を定量する方法が求められる。これまで、リアルタイム定量PCR法や蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法などが開発されているが、清浄な測定環境の必要性や煩雑な操作性などから、特定微生物のオンサイト計測には必ずしも適していない。

2. 研究の目的

上述の技術的要件に応えるため、申請者は、機能性核酸分子 (DNA アプタマー) ((1)に対応する微生物識別法) と金ナノ粒子 ((2)に対応する微生物定量法) による廃水処理系微生物の新計測技術の原理を考案した。DNA アプタマーは、任意の標的分子に対して相補的な立体構造と親和性を示すため、標的微生物の細胞表面タンパクに相補的な DNA アプタマーは、特定微生物のみを選択的に識別できる。さらに、金ナノ粒子は、サイズや凝集状態に依存して、表面プラズモン共鳴と呼ばれる可視光周波数と共鳴する協奏的振動を電荷に引き起こす。そのため、機能性核酸分子修飾金ナノ粒子は、標的微生物に結合することで凝集を引き起こし、表面プラズモンのカップリングによって、微生物量に応じた色調変化に基づく定量が可能となる。当該技術の実現のため、本研究では、複数種の標的微生物を識別する DNA アプタマーを明らかにするとともに、DNA アプタマー修飾金ナノ粒子による定量法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 複数種の機能同一微生物を広範囲に識別する機能性核酸分子の獲得

本研究では、複数種の機能同一微生物として、アンモニア酸化細菌 (AOB)、亜硝酸酸化細菌 (NOB) およびメタノサルシナ属アーキアを選択した。AOB を広範囲に識別する DNA アプタマーを獲得するために、*Nitrosomonas europaea* NBRC14298 株、*Nitrosomonas stercoris* NBRC110753 株、*Nitrosomonas nitrosa* DSM28438 株、*Nitrosomonas eutropha* DSM101675 株、*Nitrosomonas communis* DSM28436 株および *Nitrospira multififormis* DSM101674 株を用いた。NOB を網羅的に識別可能な機能性核酸分子を獲得するためには、*Nitrobacter winogradskyi* DSM10237 株、*Nitrobacter hamburgensis* DSM10229 株および *Nitrobacter vulgaris* DSM10236 株を用いた。酢酸資化メタン生成アーキアは、*Methanosarcina barkeri* NBRC100474 株および *Methanosarcina mazei* MBRC101201 株を用いた。それぞれの機能同一微生物を網羅的に識別する DNA アプタマーを獲得するため、Cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Cell-SELEX) 法に変更を加えて行った。まず、調製した Random library nucleotides (5'-CGTACGGAATTCGCTAGC-N₄₀-GGATCCGAGCTCCACGTG-3' [100 pmol・ μ L⁻¹]) と Selection buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄・7H₂O, 1.5 mM KH₂PO₄, 1.4 mM MgCl₂) を混合した。その後、AOB または NOB 生菌は、混合溶液に添加した後、振盪器を用いて攪拌 (220 rpm) しながら、室温で 45 分間反応させた。反応液と菌体を遠心分離させた後、反応液のみを捨てることで、生菌体に結合した Random library nucleotide を回収した。その後、Selection buffer を用いて、Random library nucleotide が結合した生菌体を 2 回洗浄した。生菌体に結合した Random library nucleotide は、DNA/RNA free-water を添加して、95 °C で 5 分間温めて溶出させた。菌体から溶出させた single strand DNA (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、変性 (95 °C, 30 sec), アニールリング (56.3 °C, 30 sec), 伸長 (72 °C, 10 sec) の 15 回の条件で行った。得られた PCR 産物から、ssDNA のみを選択的に精製した。アシメトリック PCR 反応後の溶液は、1.5mL 容プラスチックチューブに全て回収した後、アシメトリック PCR 増幅産物は、12% (w/v) アクリルアミドゲル電気泳動によって確認した。濃縮された ssDNA は、再び、別のメタン生成菌種へ結合させた。Cell-SELEX 法による操作をそれぞれの対象微生物に対して合計 30 回実施した。さらに、特異性の高い DNA アプタマーを得るため、Cell-SELEX 法の途中過程において、非標的微生物を用いたカウンターセレクションを行った。なお、カウンターセレクションでは、非標的微生物に結合しなかった ssDNA のみを回収する。精製した ssDNA 配列は、次世代シーケンサーによって解析した。ssDNA 配列の中から、プライマー領域を持つ配列のみを抽出した後、Sickle ver1.33 プログラムを利用して高クオリティの信頼性のある配列を持つリードのみを抽出した。その後、PEAR0.9.10 プログラムを用いて、フォワードリードとリバースリードを結合させた。USEARCH v9.0.2132 プログラムによって、次世代シーケンサーで得られた ssDNA 配列の母集団における配列相同性 100% の ssDNA 塩基配列の特定と母集団における存在比を得た。

(2) 獲得した機能性核酸分子の特異性評価

5'端に Fluorescein を付加した DNA アプタマーは 95 ° で 5 分間加熱した後、DNA アプタマー溶液は、直ちに氷上で 15 分間静置させた。その後、Cell-SELEX 法と同様な手順で標的微生物と非標的微生物にそれぞれ結合させた。微生物に結合しなかった機能性核酸分子を含む上澄みを取り除いた後、Selection buffer により生菌体を 3 回洗浄した。菌体洗浄後、DNA/RNA-free water を用いて菌体を分散させた。蛍光付加 DNA アプタマーが結合した菌体の蛍光強度は、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。蛍光強度測定における励起波長と蛍光波長は、それぞれ 494 nm と 520 nm とした。標的微生物および非標的微生物と蛍光付加機能性核酸分子を反応させた後、蛍光顕微鏡とモノクロデジタルカメラを用いて、微生物細胞に結合した蛍光付加 DNA アプタマー由来の蛍光を撮像した。

標的微生物への結合親和性を評価するため、解離定数 (K_d) の算出を行った。DNA アプタマーの濃度は、12.5 nM、25 nM、50 nM、100 nM、200 nM および 400 nM とした。蛍光付加 DNA アプタマーが結合した菌体の蛍光強度は、マイクロプレートリーダーを用いて測定した。反応時に使用した DNA アプタマー濃度と得られた蛍光強度をもとに、Prism 8 ソフトウェアを用いて非線形回帰曲線を作成し、 K_d を算出した。

4. 研究成果

(1) 複数種の機能同一微生物を広範囲に識別する機能性核酸分子の獲得

AOB、NOB およびメタノサルシナ属アーキアを標的とした Cell-SELEX 法で得られた ssDNA は、12% (v/v) ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、76mer 付近に単一のバンドが確認できた。カウンターセクションでも同様に、76mer 付近に単一のバンドが確認できており、Cell-SELEX 法において標的微生物への結合する DNA アプタマーが濃縮できた可能性が示唆された。それぞれ標的とした Cell-SELEX 法では、Cell-SELEX 法の回数を繰り返すことによって、一部の DNA アプタマーの濃縮割合が高くなることが判明した。それらの内、AOB、NOB およびメタノサルシナ属アーキアに結合する可能性が高い DNA アプタマー配列を選択した。DNA アプタマー配列は、リード占有率が 1% 以上の中からそれぞれ 18 種の DNA アプタマーを選択した。in silico によって DNA アプタマー最終候補の二次構造解析を行ったところ、全て DNA アプタマーは、最適反応条件下においてステムループを持つ安定した 2 次構造の形成が可能であることがわかった。

(2) 獲得した機能性核酸分子の特異性評価

AOB および NOB を標的としたそれぞれ 18 種の DNA アプタマーの特異性を評価した。マイクロプレートリーダーを用いて、それぞれの DNA アプタマーを標的微生物と非標的微生物に結合させた際の蛍光値を測定した結果、標的微生物と非標的微生物とも得られた蛍光値に大きな差異がないことが判明した。蛍光顕微鏡でも蛍光観察を試みたものの、微生物細胞由来の蛍光を観察することができなかった。今回使用した Cell-SELEX 法を検証するため、細胞構造に特徴があるメタノサルシナ属アーキアを用いて、AOB と NOB で使用した Cell-SELEX 法に基づいて得られた DNA アプタマー 18 種の特異性評価を行った。特異性評価を実施できた 8 種の DNA アプタマーの内、メタノサルシナ属アーキアだけを特異的に識別する 2 種の DNA アプタマーの獲得に成功した。また、選別した DNA アプタマーを用いて蛍光顕微鏡でも観察を行ったところ、標的するメタノサルシナ属アーキアのみ蛍光付加 DNA アプタマー由来の蛍光を観察することができた。これらの事は、AOB と NOB に適用した Cell-SELEX 法は、DNA アプタマーの選別には有効に機能していることを示していた。ただ、グラム陰性である AOB と NOB は細胞構造の違いが少ないことが特異性を担保する障害になっている可能性が示唆された。そのため、AOB と NOB の特異性を得るためには、類似の細胞構造を持つ微生物を用いたカウンターセクションの回数を増やす必要があることが示唆された。

メタノサルシナ属アーキアを特異的かつ網羅的に識別できる DNA アプタマーの解離定数 (K_d) を算出した結果、DNA アプタマーの *Methanosarcina barkeri* NBRC100474 株および *Methanosarcina mazei* MBRC101201 株に対する K_d は、それぞれ 21.2 ± 7.19 nM および 8.03 ± 3.28 nM であることがわかった。

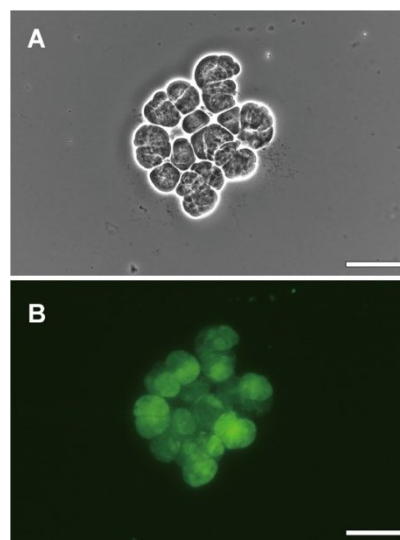


図 1 蛍光付加 DNA アプタマーを結合させた際のメタノサルシナ属アーキアの (A)位相差顕微鏡写真と (B) 蛍光顕微鏡写真 (bar = 20 μm)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 萩原達也, 川上周司, 大門裕之, 山田剛史
2. 発表標題 アンモニア酸化細菌を識別するDNAアプタマーの選別と特異性評価
3. 学会等名 平成30年度日本水環境学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 HER PHONESACHANH, 萩原達也, 山田剛史
2. 発表標題 廃水処理系指標微生物の簡便な特異的検出法の開発
3. 学会等名 東三河生態系ネットワークフォーラム2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 萩原達也, 川上周司, 大門裕之, 山田剛史
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた微生物識別によるアンモニア酸化細菌の簡易計測技術の開発
3. 学会等名 第55回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuya Hagihara, Shuji Kawakami, Hiroyuki Daimon, Takeshi Yamada
2. 発表標題 Cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Cell-SELEX) for screening DNA aptamers binding to cell surface proteins of <i>Nitrosomonas europaea</i>
3. 学会等名 Irago conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 HER PHONESACHANH, 萩原達也, 大門裕之, 山田剛史
2. 発表標題 亜硝酸酸化細菌を識別するDNAアプタマーの選別と特異性評価
3. 学会等名 平成30年度土木学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sofia Imana, Shuji Kawakami, Tsuyohi Yamaguchi, Takeshi Yamada, Takahiro Watari, Shinya Maki, Masashi Hatamoto, Takashi Yamaguchi
2. 発表標題 Selection of DNA aptamers targeting environmental bacteria cells
3. 学会等名 第53回日本水環境学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 萩原達也, 川上周司, 大門裕之, 山田剛史
2. 発表標題 機能性核酸分子によるアンモニア酸化細菌のオンサイト検出技術の開発
3. 学会等名 第53回日本水環境学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪井重太郎, 岡崎祐輝, 川上周司, 大門裕之, 山田剛史
2. 発表標題 メタノサルシナ属アーキアを特異的に識別するDNAアプタマーの獲得と特性評価
3. 学会等名 令和元年度土木学会中部支部研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川上周司, 北野晴哉, 山口剛士, 渡利高大, 幡本将史, 山口隆司, 山田剛史
2. 発表標題 分離株のない細菌種からDNAアプタマーを合成する新規SELEX法の開発
3. 学会等名 第54回日本水環境学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 亜硝酸酸化細菌に結合する核酸分子並びに核酸分子を用いた亜硝酸酸化細菌の検出方法、検出キット及び検出試薬	発明者 山田剛史, 萩原達也, ハーボウンサチャン, 大門裕之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-225112	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アンモニア酸化細菌に結合する核酸分子、その核酸分子を用いるアンモニア酸化細菌の検出方法及び検出キット	発明者 山田剛史, 萩原達也	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-037698	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 メタン生成菌に結合する核酸分子並びに核酸分子を用いたメタン生成菌の検出方法、検出キット及び検出試薬	発明者 山田剛史, 萩原達也, 坪井重太郎, 大門裕之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-228705	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川上 周司 (Kawakami Shuji) (00610461)	阿南工業高等専門学校・創造技術工学科・講師 (56101)	
研究協力者	大門 裕之 (Daimon Hiroyuki) (60335106)	豊橋技術科学大学・グローバル工学教育推進機構・教授 (13904)	