

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：53101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04328

研究課題名（和文）オンサイトで迅速に利用可能な核酸抽出不要の微生物解析技術の開発

研究課題名（英文）Development of nucleic acid extraction-free microbial analysis technology that can be used rapidly onsite

研究代表者

川上 周司（Kawakami, Shuji）

長岡工業高等専門学校・環境都市工学科・准教授

研究者番号：00610461

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、環境中の微生物をDNA抽出を必要とせずに検出できる技術の開発を目的として、段階希釈法で調製した細菌サンプルに結合したアプタマーの数をリアルタイムPCRで測定し、細菌の存在数を変化させた結果を検討した。実験の結果、初期の細菌量とアプタマー量には相関があり、細菌数を定量できる可能性が示された。また、すべてのサンプルにおいて、従来の遺伝子をターゲットとした場合の増幅曲線と比較して、増幅の立ち上がりが速く、従来の遺伝子定量法よりも高感度で検出できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特定の微生物を定量する方法としてreal-time PCR法があるが、real-time PCR法は、DNAの数を計測できる技術であり、標的とする微生物のDNAを抽出後、標的遺伝子をPCR法で増幅させ、その増幅の速度からもとの試料中の微生物数を算出する手法である。しかしながら、DNAの抽出に専門的な知識や、コンタミネーションを防ぐクリーンな実験室の施設を必要とすることから、屋外等の現場レベルでの作業が困難という問題点がある。本研究はDNA抽出不要の微生物定量技術を提案するものであり、これら課題を解決できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：With the aim of developing a technique for detecting microorganisms without the need for DNA extraction, this study examined the results of real-time PCR measurements of the number of aptamers bound to bacterial samples prepared by step dilution and with different numbers of bacteria present. The experimental results showed that there was a correlation between the initial bacterial abundance and the amount of aptamer, indicating the possibility of quantifying the number of bacteria. In addition, all samples showed a faster amplification rise compared to the amplification curve when targeting conventional genes, indicating the possibility of detection with higher sensitivity than conventional gene quantification methods

研究分野：環境微生物

キーワード：環境微生物 aptamer シングルセル

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

従来、微生物の検出・定量には、培養法が広く用いられてきた。培養法は、微生物を培地を用いた培養により増殖させ、コロニーの形成や培地の懸濁などに基づいて、もとの試料中の微生物量を計測する方法である。また、特定の微生物を定量する方法として real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) 法があるが、real-time PCR 法とは、DNA の数を計測できる技術であり、標的とする微生物の DNA を抽出後、標的遺伝子を PCR 法で増幅させ、その増幅の速度からもとの試料中の微生物数を算出する手法である。

しかしながら、前者の方法は結果を得るのに数日を必要とし、また微生物のなかには培養が困難なものも存在することから、万能な方法とは言えない。さらに後者の方法も DNA の抽出に専門的な知識や、コンタミネーションを防ぐクリーンな実験室の施設を必要とすることから、屋外等の現場レベルでの作業が困難という問題点がある。したがって、DNA を抽出することなく、短時間で容易に微生物を検出・定量する技術が求められている。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、標的分子に特異的に結合する DNA aptamer と real-time PCR 法を組み合わせることで DNA 抽出を介さずに試料中の任意の細菌数を定量できないかと考えた。aptamer は一本鎖の DNA で、相補配列に依存して安定な固有の立体構造を形成することで、特定の標的に強固に結合する物質である。本研究は、段階希釈で作成した存在数の異なる細菌サンプルを作成し、それらに結合した aptamer の数を real-time PCR 法で計測した。これら結果から、開発を目指す技術の実現可能性について検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 標的細菌と DNA aptamer

本研究では、標的の細菌として *Escherichia coli* K 12 株 (NBRC3033) を選定した。*E. coli* は LB 培地で培養後、対数増殖期に回収し、OD 値からおおよその細菌数を算定した。それらを段階希釈し、 $10^8$  cell/mL から  $10^5$  cell/mL まで計 4 つのサンプルを作成した。また、DNA aptamer は *E. coli* を検出する P12-55 aptamer の配列情報を既報 1) から参照し、DNA 合成会社に依頼して作成したものをを用いた。

#### (2) aptamer との結合と分離

標的細菌の *E. coli* と aptamer とを結合させ、結合した aptamer のみ分離、回収する操作を行った。実験は Yilmaz *et al.*<sup>2)</sup> の方法を参考に検討した。手順は以下の通りである。低吸着チューブに *E. coli* を 398  $\mu$ L と 10 pmol/ $\mu$ L の P12-55 aptamer を 2  $\mu$ L 入れ、室温で 15 分間インキュベートしたのち、8000 rpm で 5 分間の遠心を行った。結合力の弱い aptamer を除去するため、上澄み液を捨て、1 $\times$ PBS を 700  $\mu$ L 入れ、8000 rpm で 5 分間の遠心を行った。1 $\times$ PBS による洗浄は 2 回繰り返した。その後、加熱によって水素結合を切断し、標的細菌と aptamer を分離させるため、20 mM NaOH を 400  $\mu$ L 入れてピペティングし、75 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 3 分間加熱した。また、溶液を中和させるために 6 mol/L の塩酸を 4  $\mu$ L 入れ、8000 rpm で 15 分間遠心した。上澄み液を 10 kDa cut-off tube のフィルターに集め、14000rpm で 30 分間遠心した。残留物を処理するため、RNase-free Water を 100 $\mu$ L 入れ、14000 rpm で 15 分間遠心した。フィルターに残った上澄み液を回収するため、RNase-free Water を 10  $\mu$ L 加え、10 分放置したのち、新しいチューブにフィルターを逆さにセットし、8000 rpm で 3 分間遠心した。これにより回収した上澄み液を 95 $^{\circ}$ C のヒートブロックで 3 分加熱後、保冷剤と冷却台を用いて 1 分間冷却した。

#### (3) Real-time PCR

(2)より得られた aptamer が浮遊する上澄み液を template として real-time PCR を行った。PCR に用いたプライマーは既報 1) の BRf-r プライマーペアを用いた。Real-time PCR による aptamer の定量は以下の手順で行った。MyGo real-time PCR 専用チューブを 5 本用意し、それぞれ、No.1, No.2, No.3, No.4, No.5 とした。それぞれのサンプルと試薬などの容量は、Table1 に示す。PCR 条件は、95 $^{\circ}$ C で 15sec, 65 $^{\circ}$ C で 30sec の 2stepPCR とし、40 cycle 行った。

Table 1 Volume of reagents etc. to be placed in each tube (μL)

No.	1	2	3	4	5
sam ple	10 <sup>8</sup> cell/m L	10 <sup>7</sup> cell/m L	10 <sup>4</sup> cell/m L	10 <sup>5</sup> cell/m L	M Q (negative)
	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
TB Green II	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
BRf primer	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
BRr primer	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
M Q	9.00	9.00	9.00	9.00	9.00

#### 4. 研究の成果

##### (1) 結果および考察

段階希釈した *E. coli* に対し P12-55 aptamer を結合させ、熱変性によって剥がされた aptamer の数を real-time PCR で計測した結果を Fig. 1 に示す。結果、すべてのサンプルから aptamer が検出された。

増幅曲線の立ち上がりは 10<sup>8</sup> cell/mL が最も早く、段階希釈に応じてその立ち上がりは遅くなっていく傾向が見られた。このことから、初期菌体量と aptamer の量は相関性が見られ、細菌数を定量できる可能性を示すものだと判断できる。しかしながら、初期菌体量と PCR 増幅の立ち上がりにおけるサイクル数 (Ct 値) の両者間には、通常の遺伝子定量時における検量線サンプルで見られるような均等な間隔での立ち上がりにはならなかった。これは細菌の段階希釈において細胞固定を行わなかったことが原因であると思われる、実験過程の中でも細菌の増殖が見られたことなどが要因と考えられる。

また、すべてのサンプルにおいて、通常の遺伝子を標的とした際の増幅曲線と比較して増幅の立ち上がりが早かった (データ非表示)。これは、通常の遺伝子定量法よりも高い感度で検出できたことを示す。このことは、極めて微量で生息する細菌に対しても検出・定量が可能であることを示唆している。

##### (2) まとめ

本研究は、段階希釈で作成した存在数の異なる細菌サンプルを作成し、それらに結合した aptamer の数を real-time PCR 法で計測した結果から、開発を目指す技術の実現可能性について検討を行った。結果、細菌数を定量できる可能性を示すものだと判断できた。また、極めて微量で生息する細菌に対しても検出・定量が可能であることが示唆された。今後は実験方法の検討とともに、複数種の細菌を混合した系や、培養法との定量結果の比較などの検討を行う必要がある。

##### (3) 文献

- 1) Marton *et al.*, "Isolation of an Aptamer that Binds Specifically to *E. coli*", *PLoS One*, 11(4):e0153637(2016).
- 2) Yılmaz *et al.*, "SELEX against whole-cell bacteria resulted in lipopolysaccharide binding aptamers", *Journal of Biotechnology*, Vol.354, Pages 10-20, (2022)

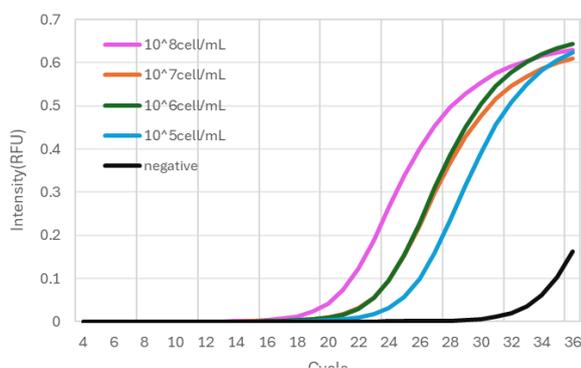


Fig. 1 Amplification curve for quantification of P12-55 aptamer bound to a step-diluted sample of *E. coli* by real-time PCR.

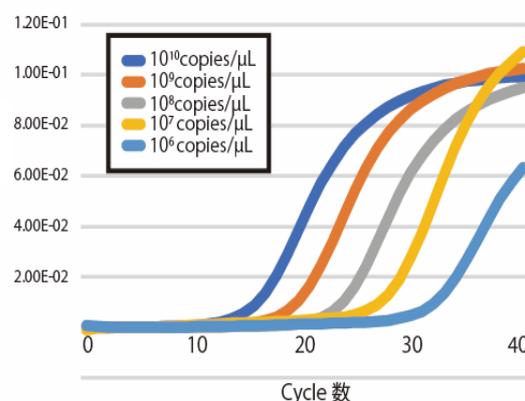


Fig.2 Amplification curve for quantification of rRNA gene of *E. coli* by real-time PCR.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 上村光輝 , 川上周司 , 押木守 , 青木仁孝 , 土田勝範 , 渡利高大 , 荒木信夫	4. 巻 79
2. 論文標題 異なる溶存酸素条件が複合微生物系における好気性脱窒細菌群に与える影響	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 土木学会論文集	6. 最初と最後の頁 23-25034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masataka Aoki , Yasuyuki Takemura , Shuji Kawakami , Wilasinee Yoochatchaval , Thao Tran P , Noriko Tomioka , Yoshitaka Ebie , Kazuaki Syutsubo	4. 巻 18
2. 論文標題 Quantitative detection and reduction of potentially pathogenic bacterial groups of Aeromonas, Arcobacter, Klebsiella pneumoniae species complex, and Mycobacterium in wastewater treatment facilities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0291742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 角野晴彦 , 河村将和 , 川上周司 , 竹村泰幸 , 珠坪一晃	4. 巻 65
2. 論文標題 USB反応槽による電子産業排水を想定した脱窒処理	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 用水と廃水	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林勇貴、関口未来莉、川上周司、渡利高大、山口隆司、幡本将史
2. 発表標題 DNA aptamerを用いたDNA抽出不要の微生物定量技術の開発
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田灯乃助, 川上周司, 渡利高大, 松浦哲久
2. 発表標題 多重染色 FISH 法を用いた Comammox 細菌の視覚的検出
3. 学会等名 第58回日本水環境学会年会講演集
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 藤田祐樹, 川上周司, 新部陽向
2. 発表標題 深層学習による河川から取得可能なデータを用いた BOD 予測技術の開発
3. 学会等名 第58回日本水環境学会年会講演集
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関