

CTC 法と DNA アプタマーを用いたアンモニア酸化細菌の簡易的蛍光検出法の開発

豊橋技術科学大学 学生会員 ○萩原達也、正会員 山田剛史

阿南工業高等専門学校 正会員 川上周司

1. はじめに

生物学的硝化・脱窒プロセスの管理は、pH、温度などの物理化学的指標に基づいており、プロセス内で処理を担う硝化菌などは、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、プロセス運転が突発的に悪化した場合、その原因がわからずに現状の回復に多大な労力を要求されることがある。廃水処理プロセスを適切に管理するためには、水質指標と微生物指標に基づく相互補完的な管理が重要となってくる。微生物指標に基づいた管理方法を導入するには、迅速・簡便に廃水処理プロセス内の微生物数をオンサイトで測定可能な技術が必要となる。しかしながら、これまで報告されている *Fluorescence in situ hybridization* やリアルタイム定量 PCR 法などの微生物測定法は、DNA や RNA を標的とした分子生物学的技法や培養法に依存しており、上述した技術的要件を必ずしも満たしてはいないのが現状である。

迅速・簡便に微生物数をオンサイトで測定する技術を開発するため、本研究では、5-cyano-2,3-ditolyl-2-tetrazolium chloride (CTC) 法による微生物生菌の識別と DNA アプタマーによる微生物種の識別に基づく測定原理を考案した。しかしながら、生物学的硝化・脱窒プロセスにおいて重要な役割を担うアンモニア酸化細菌 (AOB) の生菌数計測に対して、CTC 法が応用された事例はなく、AOB を特異的に識別できる DNA アプタマーも報告されていない。そのため本研究では、CTC 法による AOB の最適検出条件の調査と AOB を特異的に検出できる DNA アプタマーの探索を目的とした。

2. 実験方法

本研究では、AOB の 1 種である *Nitrosomonas europaea* NBRC14298 株を対象とした。CTC 反応液は、既報¹⁾に若干の修正を加えて調整した。とくに、CTC 反応で利用する基質は、アンモニア (1mM) を用いた。

AOB の最適 CTC 反応条件は、CTC 染色細胞数の割合が高い CTC 濃度や CTC 反応時間をもとに決定した。CTC 染色細胞数の割合は、(1)式に示すとおり 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。

$$\text{CTC 染色細胞数の割合} = \frac{\text{CTC 染色細胞数}}{\text{Syber Green I 染色細胞数}} \times 100 \quad (1)$$

次に、ランダム 1 本鎖 DNA ライブラリー (88mer) の中から *N. europaea* NBRC14298 株の細胞表層タンパクに特異的に結合する DNA アプタマー候補を探索するため、従来の Cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Cell-SELEX) 法²⁾に若干の修正を加えて行った (図 1)。Cell-SELEX 法において、菌体に結合させた Single strand DNA (ssDNA) を鋳型とした PCR 増幅には、アシンメトリック PCR を利用した。PCR 増幅産物は、アクリルアミド電気泳動法にて確認した。

3. 実験結果・考察

CTC 反応液に対して、 $10^7 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 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。

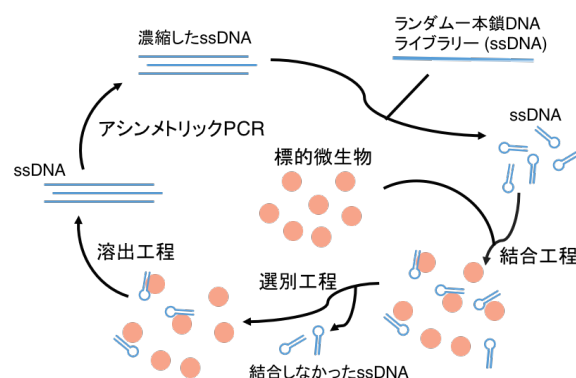


図 1 アンモニア酸化細菌を特異的に検出するアプタマーを探索するために行った Cell-SELEX 法の概略図

キーワード アンモニア酸化細菌、DNA アプタマー、CTC 法

連絡先 〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1 豊橋技術科学大学 環境・生命工学系 TEL 0532-44-6925

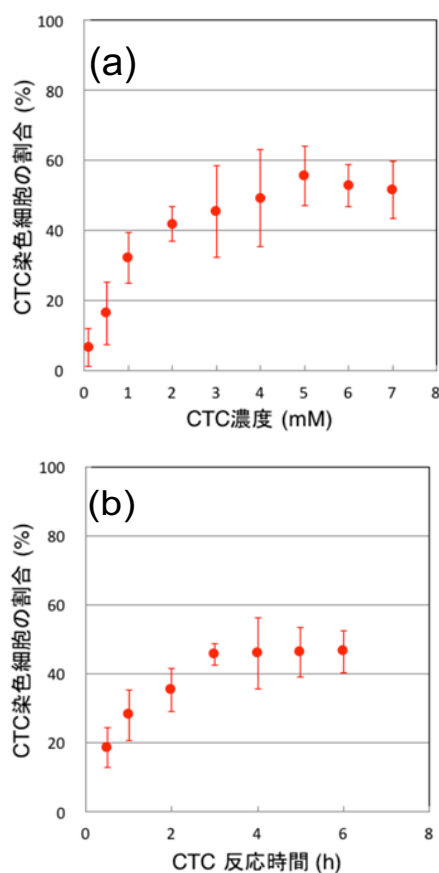


図 2 (a) CTC 濃度ごとにおける *N. europaea* NBRC14298 株の CTC 染色細胞の割合 (b) CTC 反応時間ごとにおける *N. europaea* NBRC14298 株の CTC 染色細胞の割合

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 2a)。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 2b)。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 時間が好適であることを示していた。

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 株の細胞表層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 (図 3)。現在、3 回の ssDNA の選別工程を行っており、濃縮された DNA アプタマー候補は、*N. europaea* NBRC14298 株の細胞表層タンパクに特異的に結合する可能性がある。今後、選別工程を進めることにより、さらなる DNA アプタマー候補の濃縮を行い、*N. europaea* NBRC14298 株の細胞表層タンパクに特異的に結合する DNA アプタマー配列を獲得する予定である。

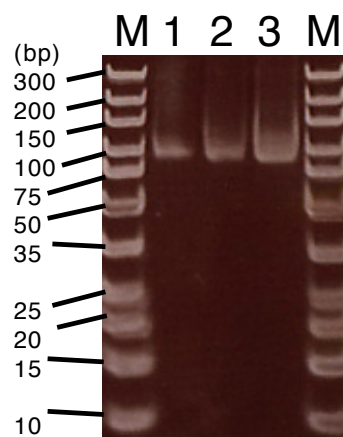


図 3 Cell-SELEX 法により濃縮したアンモニア酸化細菌に特異的に結合すると思われるアプタマー候補の電気泳動図 M: 泳動マーカー 1: 溶出後の ssDNA を鋳型としたアシンメトリック PCR 産物 (1 ラウンド) 2: 溶出後の ssDNA を鋳型としたアシンメトリック PCR 産物 (2 ラウンド) 3: 溶出後の ssDNA を鋳型としたアシンメトリック PCR 産物 (3 ラウンド)

4. まとめ

本研究では、CTC 法による AOB の最適検出条件を明らかにするとともに、Cell-SELEX 法を用いて、AOB を検出できる可能性がある DNA アプタマー候補を濃縮することができた。

謝 辞

本研究の一部は、科学研究費 学術研究助成基金助成金 挑戦的萌芽研究 (15K12229) および 2016 年度クリタ水・環境科学振興財団 (16A077) の支援により行った。ここに深謝の意を表する。

参考文献

- 1) Yoshida N. *et al. Microbes Environ.*, vol. 21 No.4 : p.272-277 (2006)
- 2) Marton S. *et al. PLoS ONE*, vol. 11 (4) : e0153637 (2016)