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

豊橋技術科学大学 学生会員 ○HER PHONESACHANH、非会員 萩原達也・大門裕之、正会員 山田剛史
長岡技術科学大学 正会員 川上周司

1. はじめに

現在、生物学的廃水処理プロセスの運転・管理は、pHや温度など、水質指標に基づいて行われており、生物学的廃水処理装置の中で実際に機能している微生物はブラックボックス的に扱われているのが現状である。そのため、処理効率や処理水質の悪化など、突発的に問題が発生した場合、原因究明に多大な労力を要求される。そのため、生物学的廃水処理プロセスの適切な運転・管理には、従来の水質指標とともに、廃水処理プロセス内で重要な役割を担う微生物 (特定微生物) も指標とした相互補完的な管理方法の導入が望ましい。特定微生物を指標化するためには、特定微生物を迅速・簡便に処理現場内で測定できる技術が必要となる。しかしながら、現在まで、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法やリアルタイム定量PCR法などが開発されているが、上述した技術要件を必ずしも満たしていないのが現状である。

本研究では、上述の技術用件を満たすため、特定微生物の細胞表層タンパクに対して特異的に結合するDNA アプタマーを利用することを考案した。とくに本研究では、生物学的廃水処理の内、窒素除去処理にとって重要な亜硝酸酸化細菌 (NOB) に焦点を当てた。本研究では、複数の NOB の細胞表層タンパクを特異的かつ網羅的に認識する DNA アプタマーを獲得とその特異性を評価することを目的とした。

2. 実験方法

NOBの細胞表層タンパクを特異的かつ網羅的に識別するDNAアプタマーを獲得するために、3種類のNOB (*Nitrobacter winogradskyi* DSM10237株、*Nitrobacter humburgensis* DSM10229株および*Nitrobacter vulgaris* DSM10236株) と一本鎖DNA (ssDNA) ライブラリー (76 mer) を用いたCell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Cell-SELEX) 法を18回行った (図1)。また、NOBに特異的なDNAアプタマーを効率的に選択するため、非標的微生物 (*Escherichia coli* Top10株、*Blastomonas natatoria* NBRC15649株および *Nitrosomonas earopaea* NBRC14298株) を用いたカウンターセレクション法 (3回) を適用した (図1)。それぞれのDNAアプタマーの塩基配列は、次世代シーケンサーによって解析した。最終的なDNAアプタマーは、およそ140万リードの中から、Usearch9.0プログラム[1)]を用いて選別した。DNAアプタマーの二次構造は、Mfoldソフトウェア[2)]を用いて評価した。

3. 実験結果・考察

3 種類の NOB を用いて Cell-SELEX 法を 18 回繰り返すことによって、NOB の細胞表層タンパクを特異的かつ網羅的に認識する DNA アプタマー候補の選別を行った (図 2)。次世代シーケンサーを用いて、それぞれの濃縮過程の DNA アプタマープールの塩基配列を解析したところ、Cell-SELEX 法を繰り返すことで、進化工学的に DNA アプタマーが徐々に収斂されていくことがわかった (図 3)。NOB の細胞表層タンパクを特異的かつ網羅的に認識できるDNA アプタマー候補は、約 140 万リードの配列情報をもとに、100 %塩基配列

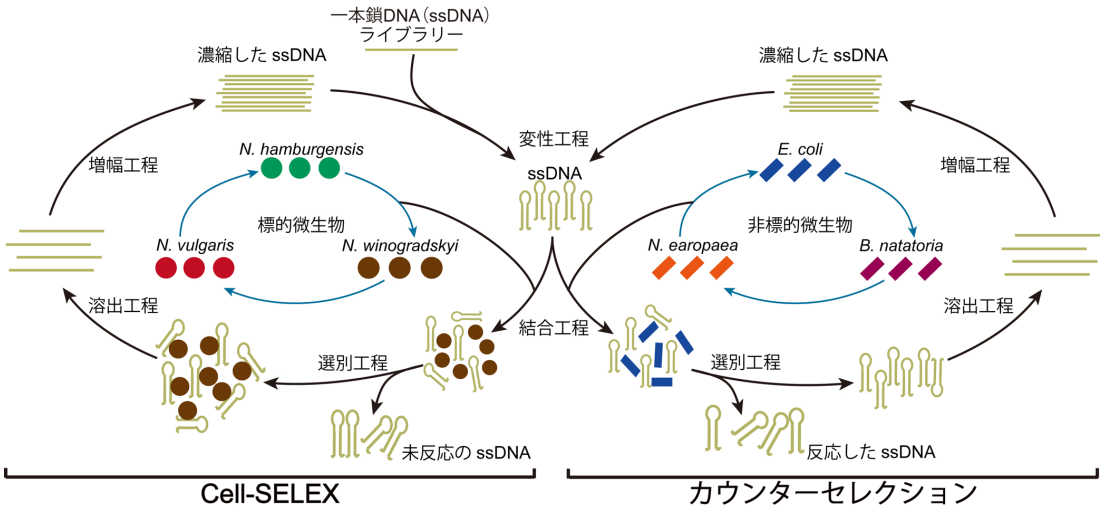

図１ Cell-SELEX 法による NOB を特異的かつ網羅的に識別する DNA アプタマーの選別の概略図

相同性を持つ塩基配列の中から決定した。特に、リード占有率 3.3～13.5%を占める上位 8 種類の塩基配列 (配列名: NBap1～NBap8) を最終的な DNA アプタマーとして選択した。次に、選択した DNA アプタマーの二次構造を評価した結果、選択した全ての DNA アプタマーは、NOB の細胞表層タンパクとの結合に関与すると想定されるいくつかのステムループの構造を有していることが示された。

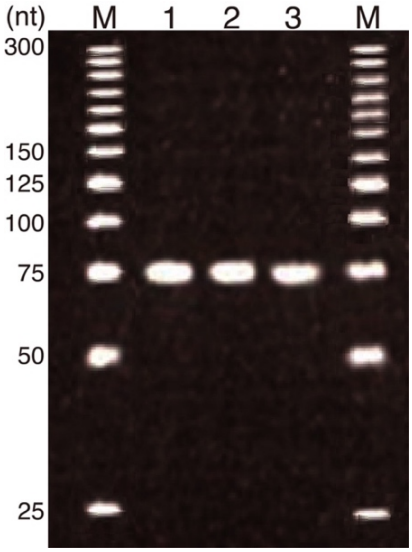

図２ NOBに特異的なDNAアプタマー候補の電気泳動写真（図中のM、1、2および3は、泳動マーカー、6回目、12回目、18回目におけるCell-SELEX法適用後の電気泳動を示す）

4. まとめ

本研究では、NOBを特異的かつ網羅的に識別できる可能性のある8種類のDNAアプタマーを得ることに成功した。今後、得られたDNAアプタマーの特異性を評価する予定である。

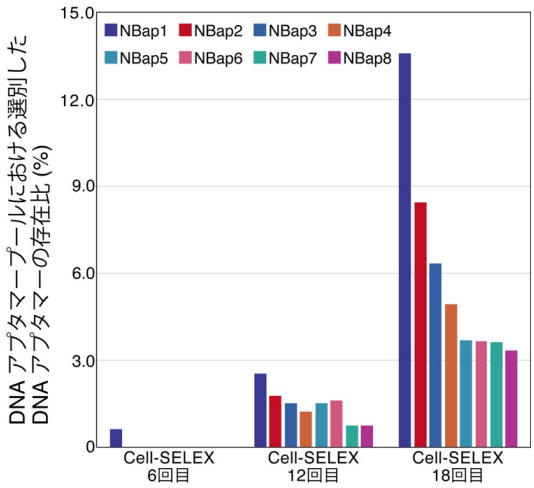

図３ 複数のNOBを標的微生物として用いたCell-SELEX法によって濃縮されたDNAアプタマー候補の存在比の変化

謝　辞

本研究は、科学研究費補助金 (18K18877)、公益財団法人日東科学振興財団第35回研究助成および公益財団法人立松財団第26回研究助成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) Edgar, R. C., *Bioinformatics*, 26(19): 2460-2461 (2010)

2) Zuker, M., *Nucleic Acids Res.*, 31(13): 3406-3415 (2003)