

## 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

豊橋技術科学大学 応用化学・生命工学系 学生会員 ○坪井重太郎、岡崎祐輝  
 阿南工業高等専門学校 創造技術工学科 正会員 川上周司  
 豊橋技術科学大学 応用化学・生命工学系 正会員 山田剛史  
 豊橋技術科学大学 応用化学・生命工学系 非会員 大門裕之

### 1. はじめに

嫌気性廃水処理プロセスの運転管理は、pH、温度および生成するバイオガスの量やガス組成などの物理化学的な指標に基づいて行われている。しかしながら、物理化学的な指標のみに基づく運転管理は、未だ満足なものではない。この問題を克服するには、嫌気性廃水処理プロセスで重要な役割を担う微生物 (例えばメタン生成アーキア) も指標とした相互補完的な運転管理が必要となる。嫌気性廃水処理プロセスでメタン生成アーキアを計測する既存技術として Fluorescence *in situ* hybridization 法や定量 PCR 法が存在するが、測定時間の長さ、清浄な測定環境や高度な専門技術を要するなど、幾つかの欠点が知られている。メタン生成アーキアを嫌気性廃水処理プロセスの運転管理指標とするためには、廃水処理現場で簡便・迅速に特定微生物を計測する技術が必要だが、そのような要件を満たす計測技術の報告例はない。当該計測技術を確立するため、本研究では、メタン生成アーキアを特異的に識別する DNA アプタマーを用いた微生物定量技術を考案した。当該測定技術を構築するため、本研究では、嫌気性廃水処理プロセスにおいて、メタン生成に大きく関与する酢酸資化性メタン生成アーキアに着目した。特に本研究では、嫌気性廃水処理プロセスで優占化す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する DNA アプタマーの獲得と特性を明らかにすることを目的とした。

### 2. 実験方法

メタノサルシナ属アーキア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、2 種のメタノサルシナ属アーキア (*Methanosarcina barkeri* NBRC100474<sup>T</sup> 株 および *Methanosarcina mazei* NBRC101201<sup>T</sup> 株) を標的微生物として、一本鎖 DNA (ssDNA) ランダムライブラリー (76 mer) を用いた Cell-SELEX 法を 30 回行った。選別される DNA アプタマーの標的微生物に対する特異性を高めるため、非

標的微生物として *Moorella* sp. (NBRC113395 株)、*Comamonas testosteroni* (NBRC14951<sup>T</sup> 株) および *Pseudomonas aeruginosa* (NBRC12689<sup>T</sup> 株) を用いたカウンターセレクトション法も行った。Cell-SELEX 法により得られた DNA サンプルの塩基配列は、次世代シーケンサーにより解析した。最終的な DNA アプタマー候補の塩基配列は、塩基配列解析から得られた全リード (10~20 万リード) をもとに、Usearch9.02 プログラムを用いて選別した。得られた塩基配列の中から、Cell-SELEX 法 30 回目のサンプルにおいて、全体のリードに占める割合が大きい順に 8 種の DNA アプタマー候補を選別した。DNA アプタマー結合反応条件下において、獲得した 8 種の DNA アプタマー候補の 2 次構造は、Mfold ソフトウェア<sup>2)</sup>を用いた *in silico* 解析により推定した。DNA アプタマー候補の標的微生物に対する特異性は、マイクロプレートリーダーによって得られた標的微生物および水素資化性メタン生成アーキアを中心とした非標的微生物に結合させた DNA アプタマー由来の蛍光強度の測定結果をもとに評価した。標的微生物および非標的微生物に結合する DNA アプタマー由来の蛍光は、蛍光顕微鏡下においても視覚的に評価した。特異性のある DNA アプタマー候補の標的微生物に対する結合親和性の評価は、メタノサルシナ属アーキア 2 種に対する解離定数 ( $K_d$ ) をもとに行なった。メタノサルシナ属アーキア 2 種に対して、蛍光付加した DNA アプタマー候補の濃度 (12.5~400 nM) 条件において結合させて得られた蛍光強度をもとに、Prism 8 ソフトウェアを用いた非線形回帰分析により  $K_d$  を算出した。

### 3. 実験結果と考察

メタノサルシナ属アーキアを標的とした 30 回の Cell-SELEX 法を行った後、メタノサルシナ属アーキアを特異的に識別する DNA アプタマー候補を選別した。標的微生物に対する特異性の評価を行うため、DNA アプタマー候補として、100%塩基配列相同性を有する配列の中から、リード占有率 1.0~34.5%を占める上位 8

種類 (MSARap1~MSARap8) を獲得した。8 種の DNA アプタマー候補の 2 次構造を推定した結果、標的微生物との結合に関与すると推定される特徴的なステムループ構造を有していた。DNA アプタマー候補の特異性評価は、2 種の標的微生物と水素資化性メタン生成アーキアや嫌気性細菌 (非標的微生物) を用いて行った。その結果、8 種の DNA アプタマー候補の間でも、得られる蛍光強度や識別できる微生物種に違いが生じることが分かった。それらの内、MSARap4 (リード占有率: 7.5%) アプタマーは、非標的微生物よりも標的微生物 (2 種) に対する蛍光強度が高く、2 種の標的微生物を特異的に識別できる DNA アプタマーであることが判明した。さらに、Cell-SELEX 法で用いた微生物種以外である *Methanosarcina horonobensis* NBRC102577<sup>T</sup> 株とも結合するため、MSARap4 アプタマーは、メタノサルシナ属アーキアを網羅的に識別できることが示唆された (図 1)。

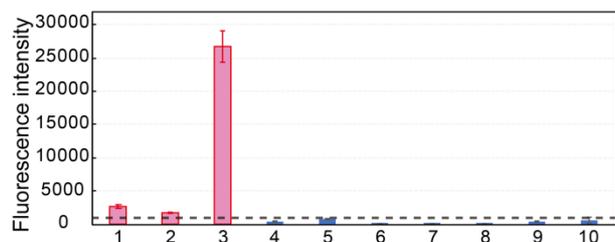


図 1 標的微生物および非標的微生物を用いた MSARap4 アプタマーの特異性評価。図中の 1~10 は、それぞれ *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina horonobensis*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobacterium formicicum*, *Methanosaeta concilii*, *Methanosprillum hungatei*, *Methanosprillum stamsii*, *Methanothermobacter thermautrophicus* および *Clostridium acetobutylicum* を表す。図中の点線以下は、DNA アプタマー由来の蛍光は、蛍光顕微鏡下では観察されないことを示している。

さらに、蛍光付加した MSARap4 アプタマーは、標的微生物および非標的微生物と結合させた。蛍光顕微鏡を用いて観察した結果、MSARap4 アプタマー由来の蛍光が標的微生物細胞から確認された。一方、MSARap4 アプタマー由来の蛍光は、非標的微生物細胞から検出されなかった。これらのことは、MSARap4 アプタマーは、メタノサルシナ属アーキアに対して特異的かつ網羅的に結合することを示していた。MSARap4 アプタマーの標的微生物 2 種に対する  $K_d$  を算出した結果、MSARap4 アプタマーの *Methanosarcina barkeri* および *Methanosarcina mazei* に対する  $K_d$  が、それぞれ  $21.2 \pm 7.19$  nM (図 2-a) および  $8.03 \pm 3.28$  nM (図 2-b) であることがわかった。他の微生物を対象とした

既存の DNA アプタマー<sup>3)</sup>と比較して、MSARap4 アプタマーは低い  $K_d$  を有するため、標的微生物に対する高い結合親和性があることを示していた。

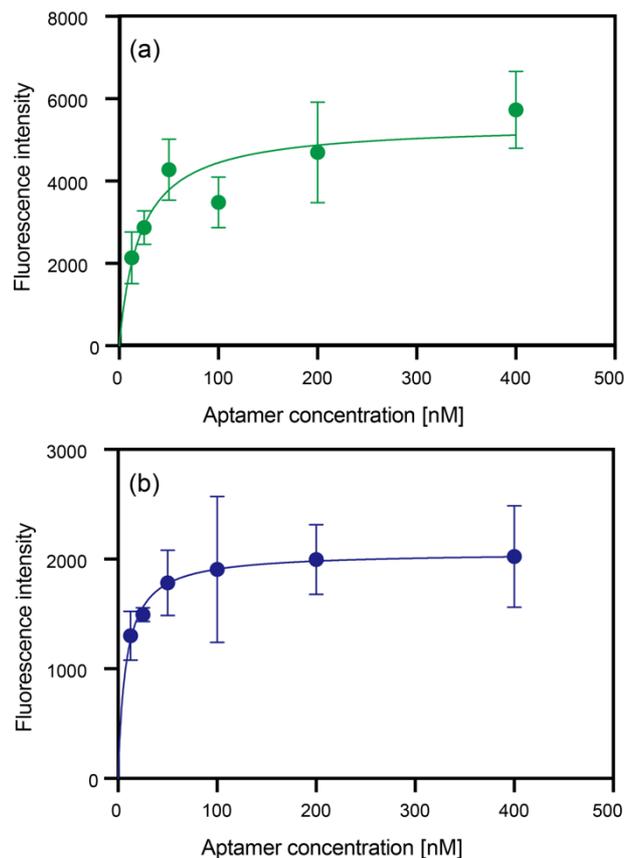


図 2 マイクロプレートリーダーを用いた MSARap4 アプタマーの標的微生物に対する  $K_d$  の評価 (a) *Methanosarcina barkeri* および (b) *Methanosarcina mazei* を用いた評価結果を表す。

#### 4. まとめ

本研究では、Cell-SELEX 法と次世代シーケンサーを用いてメタノサルシナ属アーキアを識別する 8 種の DNA アプタマー候補を選別することに成功した。それらの内、MSARap4 アプタマーが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ことを明らかにした。MSARap4 アプタマーは、 $K_d$  をもとに、標的微生物であるメタノサルシナ属アーキアに対して高い親和性を有することがわかった。本研究で獲得した DNA アプタマーを用いることで、嫌気性廃水処理プロセスのメタノサルシナ属アーキアをオンサイトで検出する技術の構築が期待できる。

#### 参考文献

- 1) Edgar C. R., *Bioinformatics*, 26 (19): 2460-2461 (2010)
- 2) Zuker M., *Nucleic Acids Res.*, 31 (13): 3406-3415 (2003)
- 3) Zhang Z. et al., *Food Control*, 106: 106719 (2019)