

Aptamer を用いた活性汚泥中の未培養微生物群の検出

長岡工業高等専門学校 非会員 ○小林息吹
長岡工業高等専門学校 正会員 川上周司
長岡技術科学大学 正会員 幡本将史
新潟工科大学 非会員 行方一真

1. 背景と目的

有機性排水を処理する生物学的排水処理技術の一つである活性汚泥法は、世界中の下水処理場において広く普及している。これまで、活性汚泥中の微生物は培養に依存した方法で解析されてきた。しかしながら、地球上に存在する微生物の 99%以上は、培養されていない微生物 (未培養微生物) または、培養できない微生物 (難培養微生物) であると言われており、従来からの培養に依存した方法による解析では活性汚泥の処理効率の向上や未培養な微生物が原因と考えられる問題の解決は困難である。

我々の研究グループでは、下水処理場の活性汚泥に生息する未培養微生物の分類に用いる方法として、微小な水滴内に微生物を封入することで内部の微生物の培養・分類することが可能となるドロップレット法に注目して研究を進めている。さらに、ドロップレット法にアプタマーを用いることを考えている²⁾。アプタマーとは特定の物質に高い親和性を示す一本鎖の DNA や RNA であり、標的となる物質に特異的に結合することができる。通常、アプタマーは特定の微生物を検出する用途で利用されるが、本研究では活性汚泥中に生息する微生物を網羅的に検出できるアプタマーの選抜を試みた。微生物を網羅的に検出できるアプタマーが選抜できれば、このアプタマーで検出されない微生物を回収することで、活性汚泥中の少数派の微生物を回収できるのではないかと考えた。そこで本研究では、まず活性汚泥を標的微生物として cell-SELEX 法を用いてアプタマーの選抜を試みた。

2. 実験方法

2.1 活性汚泥サンプル

本研究で標的とする微生物は活性汚泥内に生息する複合微生物群であるため、まず活性汚泥を大量に培養するラボスケールのリアクターを構築し運転した。流入には人工下水を用い、COD の除去率が常に 80%を達成し、MLSS が約 2000 mg/L になるように運転した。

2.2 Cell-SELEX 法

Cell-SELEX 法は Yilmaz らの方法³⁾に準拠して以下のような手順で行った。まず活性汚泥をリアクターから採取し、Binding buffer を用いて 2 回洗浄後、400 μ L の Binding buffer に再懸濁した。次に 100 pM のランダム配列の aptamer (Random pool: RP) 10 μ L と混合し、15 分間、回転させながら反応させることで活性汚泥中の微生物にアプタマーを結合させた。その後、生物と結合しなかったアプタマーを除去するために活性汚泥と RP の混合液を遠心分離し、上澄み液を除去した。さらに残留物を PBS で洗浄し、遠心分離を行った後、上澄み液を回収した。上澄み液に 20 mM NaOH 溶液を加えて 75°C で 10 分間反応させ、標的に結合した RP を剥がした。その後、6N の塩酸で pH を調整し、フィルターを用いてアプタマーを分取した。回収したアプタマーは次の cell-SELEX ラウンドに使用するために 5'末端がリン酸化されたプライマーを用いて PCR により増幅した。PCR はプラトーに達する前に停止する必要があるため 8 サイクルとした。さらに増幅したアプタマーに磁性ビーズ混合液を加え、リン酸化したアプタマーのみを回収した。磁性ビーズを加えた溶液を磁気プレート上に静置し、付着し

たアプタマーを引き寄せることで分離し、上澄みを除去後、付着した磁性ビーズからアプタマーから剥がした。その後、混合液を磁気プレート上で静置し上澄み液に溶解する目的とするアプタマーを回収した。以上の工程を繰り返し行うことでアプタマーと標的活性汚泥の親和性を高めた。追加条件として、2 ラウンド目以降の実験ではサンプルとして用いる汚泥の濃度をラウンドごとに 1/10 にした。合成したアプタマーの収量を確認するために NanoDrop2000 (ThermoFisher Scientific, USA) を用いて一本鎖 DNA の濃度を測定した。

3. 結果および考察

Cell-SELEX 法を用いて活性汚泥を標的微生物群としたアプタマーの合成を行った。本報告では検討の初期段階であり、cell-SELEX 法は 2 ラウンドしか行っていない。アプタマーはデュープリケートで選抜し、アプタマー①、②とした。また、陰性対照としてランダム配列のアプタマーを入れない系をアプタマー③とした。各実験において NanoDrop で得られた波形データを図 1 に示す。アプタマー①のサンプル濃度は、2.95 ng/μL となり、アプタマー②のサンプル濃度は、2.65 ng/μL であった。陰性対象であるアプタマー③の濃度は 2.65 ng/μL となった。結果、今回得られた二つのサンプル濃度と陰性対象としてのサンプルの濃度に差異は見られなかった。この結果は、以下の二つの要因によるものと考えられる。まず、PCR のサイクル数が不足しており、アプタマーの増殖を確認できるだけの収量に達していなかった可能性がある。既報により PCR サイクル数を 8 サイクルとしたが、電気泳動での確認は難しく今回は NanoDrop を利用したが、それでも十分な収量を得られなかったと思われる。次に、陰性対象の PCR でコンタミネーションが起きている可能性が考えられる。両者ともに収量としては少なく差異がないことから、陰性対象も何かしらの DNA が増幅している可能性がある。今後はこの二つの可能性を確認するために PCR を 40 サイクル程度まで増やして行い、両者の差異を確認するとともに、十分に差が確認された系で再度 8 サイクルの PCR を行い次の Cell-SELEX 法に進めていくことを考えている。

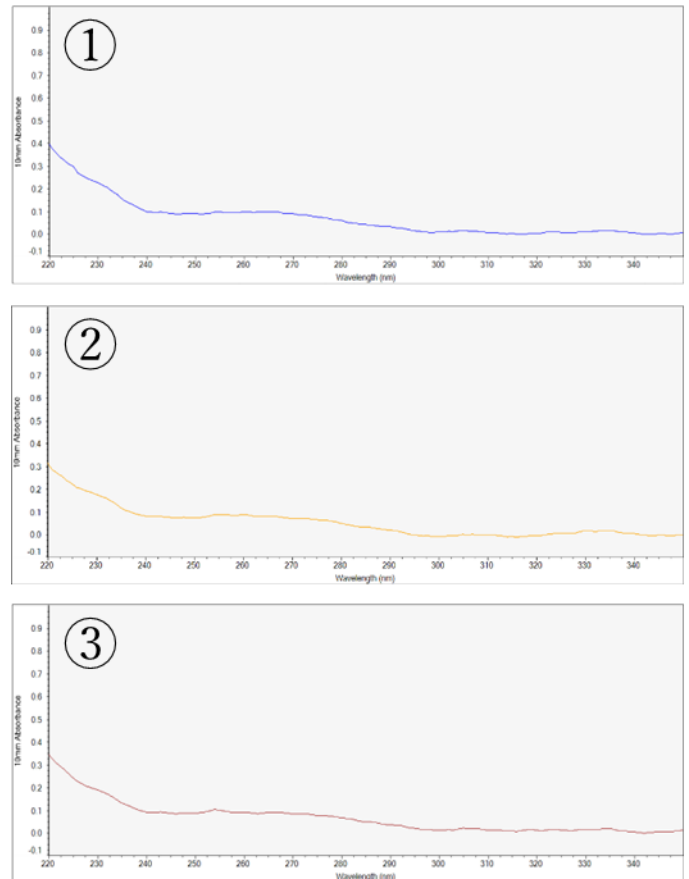


図1.各サンプルにおけるNanoDropの波形データ

参考文献

- 1) Ryosuke Nakai *et al.*, Innovations to Culturing the Unseen Microorganisms, *Journal of Environmental Biotechnology*, 2022.
- 2) Namekata Kazuki *et al.*, Development of an aptamer to detect uncultivated microbial population in activated sludge, 2023
- 3) Yilmaz *et al.*, SELEX against whole-cell bacteria resulted in lipopolysaccharide binding aptamer, *Journal of Biotechnology*, 354, 10-20, 2022.