

好気性脱窒菌の nap 酵素の阻害方法の確立

長岡工業高等専門学校 非会員 ○小熊こころ 非会員 上村光輝 正会員 川上周司
香川高等専門学校 正会員 荒木信夫

1. 背景と目的

アンモニア態窒素の生物学的窒素除去には硝化と脱窒の二工程で行われていると考えられていた。前者は好気性条件下で、後者は嫌気性条件下で制御され、一般的には二つの反応槽を必要としていた。しかし、中国の研究グループを中心に硝化と好気性脱窒を同時に行う好気性脱窒細菌が発見され、その利用が期待されている。この好気性脱窒細菌を用いた窒素除去を用いれば一つの反応槽で硝化脱窒を行うことが可能である。また、好気性脱窒細菌の多くは、好気条件では好気性脱窒を行うが嫌気条件下でも通常の脱窒反応を行うことが知られている。したがって、既存の A20 法や好気槽内の微小な嫌気領域など、嫌気と好気環境が複雑に移行する環境では嫌氣的な脱窒と好氣的な脱窒が頻繁に入れ替わっていることが予想される。これまで嫌気性の脱窒のみが脱窒に関与してきたと考え、好気性脱窒の寄与を無視しており脱窒活性を過小評価してきた可能性が考えられる。我々は脱窒反応における好気性脱窒の寄与率を推定する技術の開発を目的に研究を進めている。

これまでに嫌氣的な脱窒反応に関わる各酵素を標的とした阻害物質が発見されており、それらを利用した脱窒の反応経路や脱窒活性の測定が行われている。一方、好気性脱窒反応は未解明な部分も多く、また好気性脱窒のみを阻害する物質も見つかっていない。もし好気性脱窒反応のみを特異的に阻害することができれば、環境中における好気性脱窒の寄与率を推定することが可能になると思われる。そこで本研究ではこれまでに好気性脱窒反応に関わりが強いとされているペリプラズム硝酸還元酵素 (Nap 酵素) に注目し、Nap 酵素を特異的に阻害する物質の開発を目的とする。具体的には、Nap 酵素がペリプラズムの外側に位置することを利用して、Nap 酵素に特異的に結合する aptamer の開発を試みた。

2. 実験方法

2.1-1 好気性脱窒細菌の分離培養

培養に用いた汚泥は、新潟県刈羽村にある農業集落排水処理施設 (回分式活性汚泥法) の活性汚泥を用いた。50 ml の汚泥にコハク酸を炭素源とする DM 培地 50 ml 加え、24 時間振盪機を用いて混合した。その後、培養液中の汚泥を沈殿させて上澄み液を除去し、新たに液体 DM 培地を 50 ml 加え、再度 24 時間振盪機を用いて混合した。培養液を 1/10000 に希釈したものを DM 培地を寒天で固化した寒天培地に植菌し、30°C で 24 時間培養したところ、寒天培地上にコロニーが形成されたため、そのコロニーを釣菌し、液体 DM 培地で 30°C で 96 時間培養した。

2.2-1 cell-SELEX 法

Cell-SELEX 法は Yilmaz らの方法¹⁾に準拠して以下のような手順で行った。分離培養した好気性脱窒菌を Binding buffer を用いて 2 回洗浄し、390 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) 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、微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 によって増幅させた。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。

2.2-2 カウンターSELEX

Cell-SELEX 法の手順に加え、アプタマーの活性汚泥に対する親和性を高めるためのカウンターSELEX を行った。カウンターSELEX では嫌気性の脱窒反応を起こしている好気性脱窒細菌を使用し、その細菌に結合しなかったアプタマーを回収した。本研究では、nap 酵素に対する親和性の高いアプタマーを作成するため、cell-SELEX 法及びカウンターSELEX を繰り返し複数回行った。

2.2-3 アプタマーの標的との親和性の評価

作成したアプタマーと Nap 酵素との親和性を確かめるために蛍光物質が標識されたプライマーを用いてアプタマーを合成し、アプタマーが Nap 酵素を発現していると思われる汚泥にどの程度結合しているかを Song らの方法²⁾に準拠して確認した。まず上述の手順で作成したアプタマーの濃度を測定し、5 nM から 80 nM の段階希釈を行った。次にこの希釈されたアプタマーを好気性脱窒が確認された細菌群に結合させ、PBS で洗浄後、Nanodrop3300 により蛍光強度を測定した。高い蛍光強度が得られた場合、アプタマーが標的活性汚泥に高い親和性を持って結合したと判断した。

3. 結果および考察

前実験により得られた汚泥を寒天培地に植菌し、30°C で 24 時間培養したが寒天培地上に目視できるコロニーが形成されなかった (データ非表示)。この原因として、植菌した汚泥の濃度が低かったためだと考えた。そのため、希釈しない汚泥、1/100、1/1000 に希釈した汚泥を使用し、再び培養を行ったが寒天培地にはコロニーは形成されなかった。これらのことから、使用した汚泥は冷蔵庫で長期保存されていたため、細菌が死滅していたと考えた。そのため、活性汚泥を大量に培養するリアクターから採取した汚泥に同量の液体 DM 培地を加え、24 時間振盪機を用いて培養した汚泥を用いて寒天培養を行った結果、24 時間後に培地は pH 指示薬である BTB によって薄黄緑色から青と脱窒反応により変色し、目視できるコロニーの形成が確認できたため、好気性脱窒菌が培養されたと判断した (Fig.1)。

今後は、今回培養された好気性脱窒菌の細菌種の特定を行う。また、cell-SELEX 法によって分離培養した好気性脱窒菌に対応したアプタマーを作成する。その後、カウンターSELEX によって作成したアプタマーを嫌気性脱窒菌に結合させ、結合しなかった nap 酵素に対応すると考えられるアプタマーのみを回収し、cell-SELEX 法およびカウンターSELEX 繰り返し行うことで、nap 酵素に対する親和性の高いアプタマーを作成する予定である。

参考文献

- 1) Yilmaz *et al.*, SELEX against whole-cell bacteria resulted in lipopolysaccharide binding aptamer, *Journal of Biotechnology*, 354, 10-20, 2022.
- 2) Song *et al.*, Broadly reactive aptamers targeting bacteria belonging to different genera using a sequential toggle cell-SELEX, *Scientific Reports*, 7, 43641, 2017.



Fig.1 培養 24 時間後培地の様子。全体が青色に変化し、pH の上昇が確認できた。