

活性汚泥中の未培養微生物を検出する Aptamer の開発

長岡工業高等専門学校 非会員 ○渡邊啓太, 正会員 川上周司

1. 背景と目的

生物学的排水処理の基幹技術である活性汚泥法は、世界中の下水処理施設で広く採用されている。しかしながら、汚泥のバルキングや余剰汚泥の発生といった運転上の課題が存在し、その一因として未培養微生物群が原因と考えられている。地球上に存在する微生物の 99% 以上は、未培養または難培養の微生物であるとされており、それらが環境中で重要な役割を果たしていると考えられているが、従来の培養法ではその大部分が検出できず、活性汚泥の処理効率の向上や未培養微生物が原因と考えられている問題は解決されていない。

我々の研究グループでは、ドロップレット法と Aptamer に着目し研究を進めている。Aptamer とは特定の分子と特異的に結合する一本鎖の DNA または RNA であり、Cell-SELEX 法やカウンターSELEX を行うことで標的に対して親和性や特異性を高めることができる。通常では Aptamer は単一微生物に結合させる用途で用いられるが、本研究では活性汚泥という複合系微生物群を対象として Aptamer の選抜を行う。本研究では、ドロップレット法による未培養微生物の分取、培養を最終目標とする。未培養微生物を対象とする場合、大量の未培養微生物を用意する必要があったが、既知微生物を対象とすることで、Aptamer が結合しなかった微生物を分取することで未培養微生物の検出を目指す。活性汚泥を標的として Cell-SELEX 法、カウンターSELEX を行い主要な既知微生物に結合する Aptamer を選抜し、選抜された Aptamer を標的となる活性汚泥と結合させ、Aptamer と結合していない微生物をドロップレット法により分取することで未培養微生物の検出、培養を目指す。本研究では、まず活性汚泥を標的として Cell-SELEX 法、カウンターSELEX を用いて Aptamer の選抜を行い、親和性と特異性の評価を試みた。

2. 実験方法

2.1 Cell-SELEX 法

Cell-SELEX 法は、細胞表面に存在する標的分子に対して特異的に結合する Aptamer を選抜するための技術で、本研究では活性汚泥を標的として行った。まず、ランダムプールの Aptamer を使用し、活性汚泥に対して結合させる。そして、結合した Aptamer を回収し、PCR を行うことで増幅し、次のラウンドで使用される。Cell-SELEX 法は以下の手順で行った。活性汚泥をリアクターから採取し Binding buffer を用いて 2 回洗浄したのちに 390 μ L の Binding buffer に再懸濁した。10 μ L の 200nM のランダム配列の Aptamer (Random pool : RP) と混合し、反応後に RP の混合液を 5000rpm で 5 分間遠心分離した後上澄み液を除去した。残留物に PBS を加え遠心分離を行った後上澄み液を捨てた。これをもう一度行い残留物を洗浄した。20nM NaOH 溶液を 400 μ L 加えて 75°C で 10 分間反応させた後、6N の塩酸で pH を調整し遠心分離した後上澄み液を回収した。回収した上澄み液をフィルター付きチューブに入れ、14000rpm で 30 分間遠心分離し、RNase フリー水をフィルターに加えて 14000rpm で 15 分間遠心分離することで不純物を取り除いた。フィルター内の Aptamer を浮かせるため RNase フリー水を加え静置後、フィルターを上下逆さにして 5000rpm で 3 分間遠心分離し上澄み液を回収した。回収した上澄み液を 95°C で 3 分間加熱し、その後 1 分間冷却させる。回収した aptamer を PCR により増幅させた。その後、硝化バッファーと λ エキソヌクレアーゼ酵素を加えて 37°C で 50 分間加熱させることでリン酸化したプライマーを分解し、1 本鎖 DNA に変性させた。その後サンプルを 65°C で 15 分間加熱し、内部の酵素を失活させた。サンプルに磁性ビーズ混合液を加え時期プレート上に静置し上澄み液を除去した後、磁気プレート上でエタノ

ールを加え洗浄した。付着した磁性ビーズから aptamer を剥がし混合液を磁気プレート上で静置し上澄み液を回収した。この工程を1ラウンドとして任意の回数ラウンドを行い Aptamer の精度を高めた。

2.2 カウンターSELEX

上記の Cell-SELEX 法に加え、Aptamer の活性汚泥に対する特異性を高めるために、カウンターSELEX を用いた。本研究では、2.1 で行った Cell-SELEX 法で用いた活性汚泥とは全く生態系の異なる嫌気性汚泥を標的として Aptamer を結合させ、結合しなかった Aptamer を回収することで特異性を高めた。

2.3 親和性評価と特異性評価

Cell-SELEX 法、カウンターSELEX を重ねていく過程で、親和性評価と特異性評価を行った。親和性は選抜された Aptamer が標的である活性汚泥に対してどれくらい強く結合するか、特異性は選抜された Aptamer が標的となる活性汚泥に対してどれくらい正確に結合するかといったことを確認する指標である。まず、評価を行う Aptamer を 30 サイクルの PCR を行い増幅させた。次に PCR 産物の Aptamer を一本鎖にし、NaNodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) で濃度を測定した。標的汚泥 40 μ L に対して、結合させる Aptamer 量を 40 μ L から開始し、二つ目のサンプルからは 1/2 ずつ減らしていき、6 つのサンプルを作成した。親和性評価は活性汚泥を、特異性評価は嫌気性汚泥を用いて行った。次に、あらかじめ DNA の量が分かっている Aptamer と結合させたサンプルを用意した。その後、結合させた Aptamer をサンプルとしてリアルタイム PCR を行い、検量線と結合させた Aptamer の量を求めた。横軸をインキュベート前の Aptamer の濃度[nM]、縦軸を標的に結合させた後の Aptamer の濃度としてグラフを作成し、 K_d 値を算出した。

2.4 磁性ビーズの量に対する Aptamer の回収量の検討

先行研究より、投入するプライマーの量を 2 倍にすることで PCR による Aptamer の増幅が認められたが、2 本鎖の場合と 1 本鎖での濃度に差異が認められ、磁性ビーズによって収集可能な量に限界があると思われた。そのため、磁性ビーズの量による Aptamer の回収できる量を計測した。ランダムプールの Aptamer に対し 30 サイクルの PCR を行い、1 本鎖にする過程で磁性ビーズの量をサンプル 1 μ L 当たり 1.0 μ L, 1.8 μ L (従来法), 3.0 μ L, 3.8 μ L と変更し 4 つのサンプルを作成し、回収したそれぞれの 1 本鎖 DNA を、NaNodrop™2000 を用いて濃度を測定した。

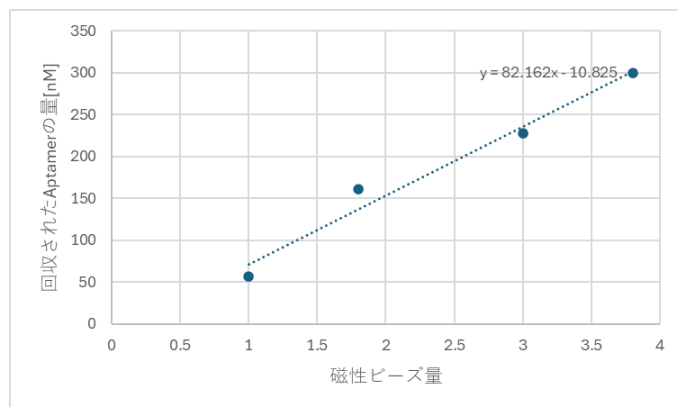


図1 磁性ビーズの量に対する Aptamer の回収量

3. 結果および考察

2.4 で行った実験結果を図1に示す。磁性ビーズの量を増加させると、1本鎖として回収できる Aptamer の量が増加することが分かった。この結果を用いて、今後の実験において PCR 産物である Aptamer を磁性ビーズ法で回収する際には、チューブに入る最大量であるサンプル 1 μ L 当たり 3.8 μ L とした。また、本報告では Cell-SELEX 法は2ラウンドしか行えておらず、親和性評価、特異性評価を行っている状態である。今後は、Cell-SELEX 法、カウンターSELEX を親和性、特異性評価をしながら評価値が低下するまでラウンドを重ね、選抜した Aptamer を活性汚泥に結合させ、結合しなかった微生物を未培養微生物としてドロップレット法によって分取、培養を目指す。また、Aptamer を使用せずにドロップレットを行った系との比較を行い、差異を求めることでこの研究の有効性を示す。

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.