

好気性脱窒反応を抑制する aptamer の開発

長岡工業高等専門学校 非会員 小出零雪 正会員 川上修司
香川高等専門学校 正会員 荒木信夫

1. はじめに

1.1 背景と目的

下水処理場では水質保全や富栄養化防止ために窒素除去が施される。窒素除去は好気条件下での硝化反応と嫌気条件下での脱窒反応の二段階反応により行われていると考えられていた。しかし、近年好気条件下で硝化反応と脱窒反応を同時に行う好気性脱窒菌が発見された。これにより、従来二つの条件で行われると考えられていた窒素除去は、好気性環境下のみでも可能であることが提唱された。この好気性脱窒細菌を活性化させた新たな排水処理技術が提案されているが、従来の硝化脱窒システムにおいても好気性脱窒反応が寄与していることが想像される。また自然界の窒素サイクルにおいてもその一端を担っていると思われる。しかし、好気性脱窒菌が自然環境や従来記述、下水処理場等においてどの程度脱窒反応に寄与しているかは明らかになっていない。

好気性脱窒細菌は通常嫌気性の脱窒細菌である場合が多く、環境の変化に応じて好気性脱窒であったり嫌気性脱窒であったりと代謝経路を変えていると予想されている。したがって好気性脱窒反応時のみ発現される酵素があれば、その酵素を追跡することで原位置でどちらの代謝を行っているかを知る目印になる可能性がある。好気性脱窒反応に関わる酵素類としてはいくつかの予測がされているが特に好気性脱窒細菌のペリプラズムに存在する Nap 酵素が好気性脱窒に関わっていることが知られている。

本研究では好気性脱窒細菌が好気性脱窒反応時に発現している酵素に特異的に結合する aptamer を作成することで、好気性脱窒反応を抑制することを目的とした。aptamer は一本鎖の DNA または RNA であり、配列に依存して安定した立体構造を形成することで特定の分子に特異的に結合する性質を持つ。この aptamer を用いて好気性脱窒反応を阻害することで、最終的に脱窒反応における好気性脱窒反応の寄与率を調べる技術の開発を目指す。

1.2 本研究のコンセプト

図 1 に本研究のコンセプトを示す。好気性脱窒細菌は好気条件下においてペリプラズム近傍に何かしらの脱窒酵素を発現すると思われる。そこで純粋菌株の好気性脱窒細菌を準備し、好気性脱窒反応を確認した培養条件の菌体を標的に Cell-SELEX 法を用いて好気性脱窒細菌に結合する aptamer を取得する。次に同様の菌株を嫌氣的に培養した際の菌体を標的にカウンター SELEX 法を行い、好気性脱窒酵素以外に結合する aptamer を排除する。この工程を繰り返すことで結果的に好気性脱窒反応に関与する細胞ペリプラズムに存在する酵素のみに結合する aptamer が取得できると考える。

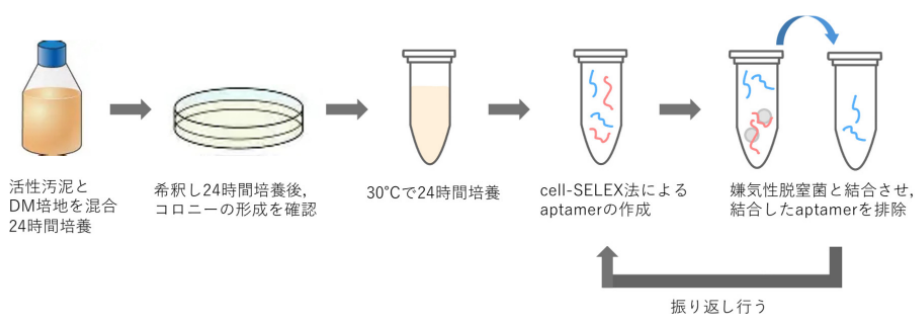


図 1 本研究のコンセプト

2. 実験方法

2.1 好気性脱窒菌の分離培養

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。汚泥に DM 培地を加え曝気装置で 24 時間培養後、培養液を 1/10000 に希釈したものを DM 培地を寒天で固定した寒天培地に植菌し、30℃で 24 時間培養した。寒天培地上にコロニーが形成されるため、そのコロニーを釣菌し、液体 DM 培地で 30℃で 24 時間培養した。その後、液体培地で培養したコロニーを用いて PCR を行い、rRNA 遺伝子を増幅後、TaKaRa bio 社のプレミックスシーケンス解析により塩基配列を決定した。決定した塩基配列を基に細菌種の特定制を行い、脱窒細菌であることを確認した。

2.2 Cell-SELEX 法

Cell-SELEX 法は以下の手順で行った。分離培養した好気性脱窒菌を採取し Binding buffer を用いて 2 回洗浄したのちに 390μL の Binding buffer に再懸濁した。10μL 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 μL 加えて 75℃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℃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 エクソヌクレアーゼ酵素を加えて 37℃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℃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。付着した磁製ビーズから 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。

2.3 カウンターSELEX

アプタマーの親和性を高めるためにカウンターSELEX を用いた。カウンターSELEX では嫌気性の脱窒汚泥を使用し、その汚泥内部にある嫌気性脱窒菌と cell-SELEX 法で作成した aptamer を結合させ、結合しなかった aptamer のみを回収した。好気性脱窒菌の酵素に対する親和性の高い aptamer 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。



Fig.1 24 時間培養した寒天培地

3. 結果および考察

今回の実験では汚泥に DM 培地を加え曝気装置で 24 時間培養し、培養液を 1/1000 に希釈したものを寒天培地に植菌し、24 時間培養した。その結果、寒天培地は pH 指示薬の BTB によって薄黄緑から青へと変色し、目視でコロニーの形成が確認できた。このことから好気性脱窒菌が培養されたと判断した。

今後は培養された好気性脱窒菌の細菌種の特定制を行う。その後、cell-SELEX 法及びカウンターSELEX を用いて好気性脱窒菌の脱窒酵素に結合する親和性の高い aptamer を作成する。