

公益財団法人 立松財団 御中

様式 2021A1,A2,B

2021年 7月 2日

所属：豊橋技術科学大学

氏名：山田 剛史



2018年度助成

研究経過・終了報告書

※ゴシック文字で記入下さい。

研究テーマ	廃水処理プロセスにおける機能性微生物指標の導入に向けたオンサイト微生物計測技術の開発
研究の結果	<p>本研究では、獲得した DNA アプタマーの最適結合条件と検出可能なアンモニア酸化細菌 (AOB) 種類を明らかにするため、既存の AOB および NOB と非標的微生物 (<i>Escherichia coli</i> や <i>Bacillus subtilis</i> など) を用いて蛍光 DNA アプタマーを用いて、AOB との結合性の違いを蛍光測定プレートリーダーと蛍光顕微鏡で評価した。蛍光測定プレートリーダーでは、蛍光 DNA アプタマーを微生物に結合させた場合の蛍光値と微生物が持つ自家蛍光との差を評価した。また、蛍光 DNA アプタマーが標的微生物に結合しているかを蛍光顕微鏡で観察した。その結果、選別した DNA アプタマーは、結合性が低いことが判明した。Cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) 法の問題を検証するため、細胞構造に特徴があるメタノサルシナ属アーキアを対象とした選別を行った。その結果、先行研究で採用した Cell-SELEX 法を行っても、メタノサルシナ属アーキアを識別できる様々な結合強度を示す DNA アプタマーを獲得することに成功した。このことは、メタノサルシナ属アーキアと比較して、AOB は細胞構造に顕著な違いが見られないため、その特異性の担保には、AOB と類似の細胞構造を持つ微生物を用いたカウンターセレクションの回数を上げる必要が示唆された。</p> <p>そこで本研究では、カウンターセレクションの回数を 2 倍にした Cell-SELEX 法を実施することによって、AOB および NOB に特異的かつ結合度の高い DNA アプタマーの獲得を試みた。<i>in silico</i> によって DNA アプタマー最終候補の二次構造解析を行ったところ、全て DNA アプタマーは、最適反応条件下においてステムループを持つことがわかった。マイクロプレートリーダーを用いて、それぞれの DNA アプタマーを標的微生物と非標的微生物に結合させた際の蛍光値を測定した結果、標的微生物の蛍光値は、非標的微生物よりも高くなる DNA アプタマーが獲得できていることが分かった。選別した DNA アプタマーを用いて蛍光顕微鏡でも観察を行ったところ、標的細胞にのみ結合する DNA アプタマー由来の蛍光を観察することに成功した。</p>
研究発表 (実績)	<p>(1) 萩原達也, 川上周司, 大門裕之, 山田剛史, 機能性核酸分子によるアンモニア酸化細菌のオンサイト検出技術の開発, 第 53 回日本水環境学会, 2019 年 3 月 7 日</p> <p>(2) HER PHONESACHANN, 萩原達也, 大門裕之, 山田剛史, 亜硝酸酸化細菌を識別する DNA アプタマーの選別と特異性評価, 平成 30 年度土木学会中部支部研究発表会, 2019 年 3 月 1 日</p> <p>(3) 萩原達也, 川上周司, 大門裕之, 山田剛史, DNA アプタマーを用いた微生物識別によるアンモニア酸化細菌の簡易計測技術の開発, 第 55 回環境工学研究フォーラム, 2018 年 12 月 17 日</p> <p>(4) HER PHONESACHANN, 萩原達也, 山田剛史, 廃水処理系指標微生物の簡便な特異的検出法の開発, 東三河生態系ネットワークフォーラム 2018, 2018 年 11 月 17 日</p> <p>(5) 萩原達也, 川上周司, 大門裕之, 山田剛史, アンモニア酸化細菌を識別する DNA アプタマーの選別と特異性評価, 平成 30 年度日本水環境学会中部支部研究発表会, 2018 年 11 月 5 日</p> <p>(6) Tatsuya Hagihara, Shuji Kawakami, Hiroyuki Daimon, Takeshi Yamada, Cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Cell-SELEX) for screening DNA aptamers binding to cell surface proteins of <i>Nitrosomonas europaea</i>, Irago conference 2018, 2018 年 11 月 1 日</p>

提出期限：研究期間終了後、すみやかに助成金の「必要経費使途明細書」「領収書」と合わせて提出下さい。
年度をまたぐ場合は毎年3月末日までに、途中経過をご記入の上、報告願います。