

Nap 酵素結合 aptamer による好気性脱窒反応の抑制効果の検証

長岡工業高等専門学校 非会員 ○ 山崎明 正会員 川上周司
非会員 平井翔梧 小出雫雪

1. はじめに

1.1 背景と目的

水環境の保全や富栄養化防止において、排水中の窒素化合物の除去は極めて重要な課題である。従来の排水処理プロセスでは、窒素除去は好気条件下の硝化反応と嫌気条件下の脱窒反応という二段階の異なる環境下で行われると考えてきた。しかし 1980 年代の研究により、好気条件下で硝化と脱窒を同時に行う好気性脱窒細菌が存在することが確認された¹⁾。その中で、自然環境や実際の処理施設において、好気性脱窒細菌がどの程度の割合で実際の脱窒反応に寄与しているかについては、未だ明確な評価手法が確立されていない。

好気性脱窒細菌は環境の変化に応じて代謝経路を変化させる特性を持つため、好気性脱窒反応に固有の酵素を選択的に阻害することができれば、その反応の寄与率を評価する有効な手段となる。好気性脱窒細菌の初期段階に関わる酵素としては、ペリプラズムに存在する Nap 酵素が知られている²⁾。

本研究では、対象とする好気性脱窒細菌に対して既報の Nap 酵素結合 aptamer³⁾を投与し、酵素機能を直接阻害する。培地中への aptamer 投与の有無及び濃度の違いによる好気性脱窒の抑制効果と菌体への影響を検証する。また、好気性脱窒細菌の脱窒活性に対する選択的な阻害効果を評価することで、自然環境および排水処理施設において脱窒反応にどの程度寄与しているかを明確にするための基礎的な知見を得ることを目的とする。

1.2 コンセプト

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発現する Nap 酵素を介した脱窒反応を行うと考えられている²⁾。本研究では、対象とする好気性脱窒細菌に対して Nap 酵素結合 aptamer を投与し、酵素機能を直接阻害する。

2. 実験方法

2.1 供試菌株の前培養および洗浄

供試菌株である好気性脱窒細菌を、表 1 に組成を示したアンモニウム態窒素と硝酸態窒素を窒素源として含む DM 培地(以下複合窒素源 DM 培地という)に接種し、対数増殖期に達するまで好気条件下で前培養を行った。その後遠心分離により菌体を回収し、リン酸緩衝生理食塩水を用いて 2 回洗浄を行うことで残留する培地成分を除去した。

2.2 菌体増殖に対する阻害

洗浄した菌体を各試験管に分注し、表 2 に組成を示した硝酸態窒素を窒素源として含む DM 培地(以下硝酸塩 DM 培地という)を添加した。さらに核酸添加の影響を検証するため、Nap 酵素結合 aptamer を添加した系(以下 aptamer 添加区という)、硝酸塩 DM 培地を同量添加した系(以下 aptamer 無添加区という)、およびランダム配列核酸を添加した系(以下ランダムプール添加区という)の 3 つの試験区を設定した。各試験管を 30℃にて 30 分間振とう培養した後、分光光度計を用いて菌体濃度を測定した。

表 1 複合窒素源 DM 培地

複合窒素源DM培地	
Sodium succinate	4.7g/L
Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	1.54g/L
KH ₂ PO ₄	1.5g/L
NH ₄ Cl	0.3g/L
KNO ₃	0.6g/L
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1g/L
Trace-element solution	3mL

2.3 好気性脱窒反応に対する阻害

洗浄した菌体を各試験管に分注し、複合窒素源 DM 培地を添加した。その後 2.2 と同様に aptamer 添加区、複合窒素源 DM 培地を同量添加した aptamer 無添加区、およびランダムプール添加区の 3 つの試験区を設定した。本反応系の開始時点を 0 時間目とし、経時的に COD、アンモニウムイオン濃度、および硝酸イオン濃度を測定した。また、aptamer の濃度が違う試験区を設け同様に COD、アンモニウムイオン濃度、および硝酸イオン濃度を測定することで、濃度の違いによる阻害効果も検証した。

3. 結果および考察

先行研究から引き継いだ好気性脱窒細菌および嫌気条件下で保管していた脱窒細菌³⁾を硝酸塩 DM 培地、複合窒素源 DM 培地それぞれで培養を試みたが、菌体量の測定において増殖の傾向が見られなかった。このことから、冷蔵保存の長期化に伴う菌の死滅に起因するものと推察した。

そこで、先行研究^{3),4)}の再実験として活性汚泥を大量に培養するリアクターから汚泥を採取し、同量の複合窒素源 DM 培地を加えて 24 時間振とう機培養を実施した。その後、寒天培地を用いた培養を行った結果、24 時間後に pH 指示薬である BTB の青色の変色とともにコロニーの形成が確認できたため、好気性脱窒細菌の培養に成功したと判断した(図 1)。

今後は、今回培養された好気性脱窒細菌の細菌種の特定を行う。さらに、cell-SELEX 法およびカウンター SELEX 法を用いて当該菌に対する親和性の高い aptamer を作製する予定である。その後、作製した aptamer と再培養した好気性脱窒細菌を用い、菌体増殖および好気性脱窒反応に与える影響を評価するための阻害実験を行う。

表 2 硝酸塩 DM 培地

硝酸塩DM培地	
Sodium acetate	1.913g/L
NaNO ₃	0.245g/L
K ₂ HPO ₄	1g/L
KH ₂ PO ₄	0.5g/L
MgSO ₄ · 12H ₂ O	0.05g/L
KCl	2g/L
NaCl30	g/L
Trace-element solution	3mL

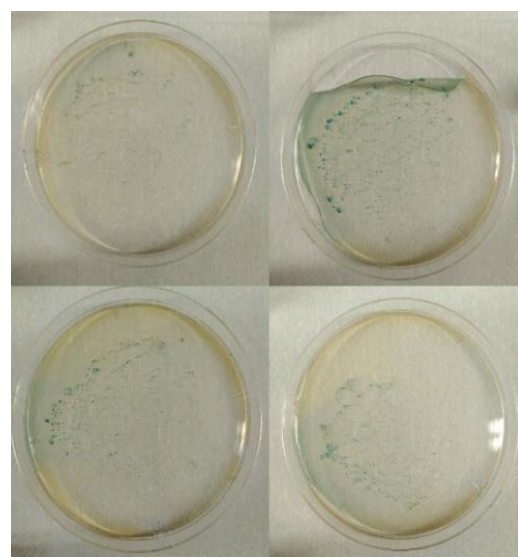


図 1 BTB 寒天培地の変色の様子

参考文献

- 1) Robertson, L. A., van Niel, E. W. J., Torremans, R. A. M., Kuenen, J. G. (1988): Simultaneous Nitrification and Denitrification in Aerobic Chemostat Cultures of Thiosphaera pantotropha, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54, No. 11, pp. 2812-2818.
- 2) Bell, L. C., Richardson, D. J., & Ferguson, S. J. (1990): Periplasmic and membrane-bound nitrate reductases in Thiosphaera pantotropha: the periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification, FEBS Letters, 265(1-2), 85-87.
- 3) 小出雫雪:好気性脱窒細菌の細胞表層に位置する脱窒酵素に結合する aptamer の開発,長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 卒業研究論文,2025.
- 4) 小熊こころ・上村光輝・川上周司・荒木信夫:好気性脱窒菌の nap 酵素の阻害方法の確立,土木学会関東支部新潟会研究発表会講演概要集,7-209,2024.