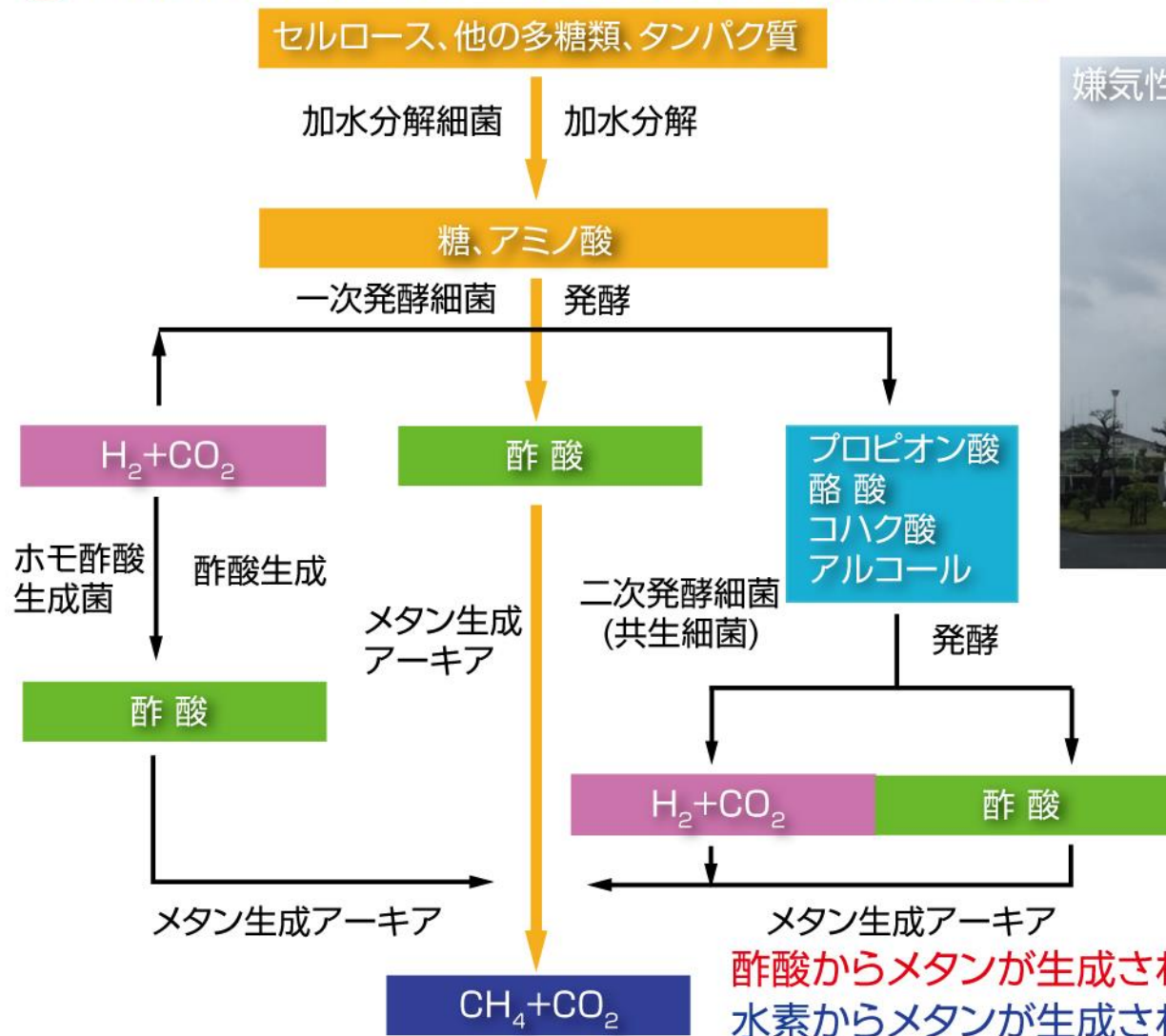


酢酸資化メタン生成菌の簡易計測法とプロセス管理 への応用

豊橋技術科学大学 大学院工学研究科
応用化学・生命工学専攻
准教授 山田 剛史

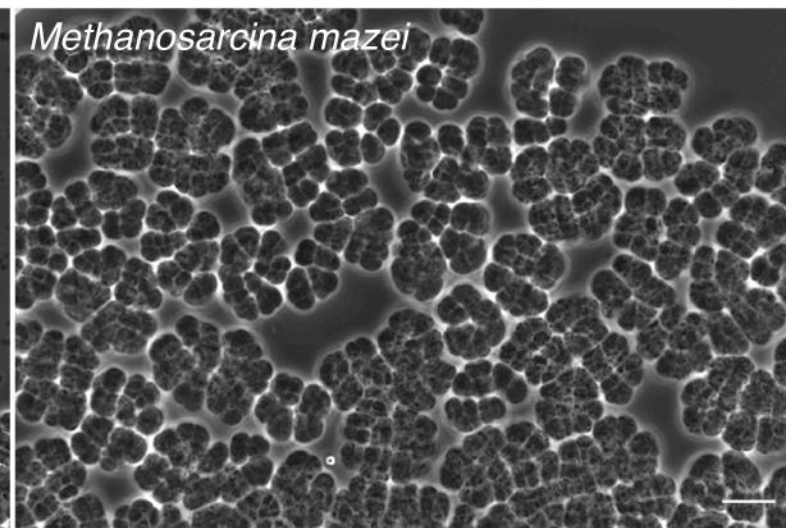
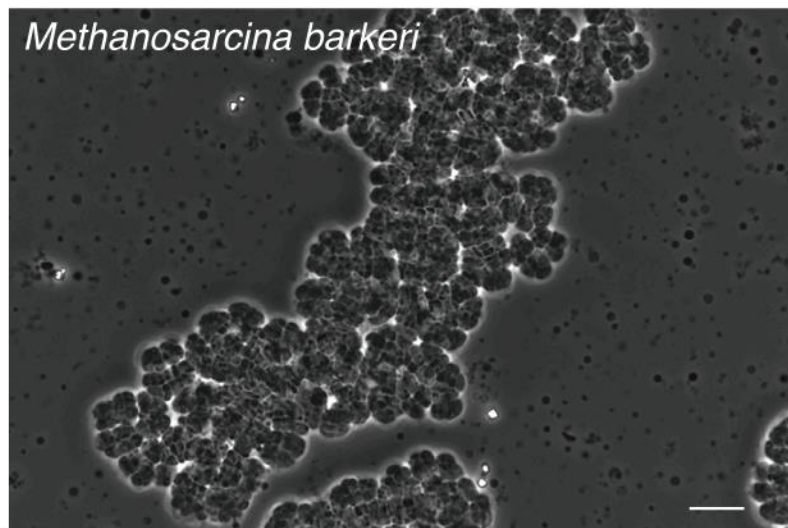
嫌気環境下における有機物分解と嫌気性処理



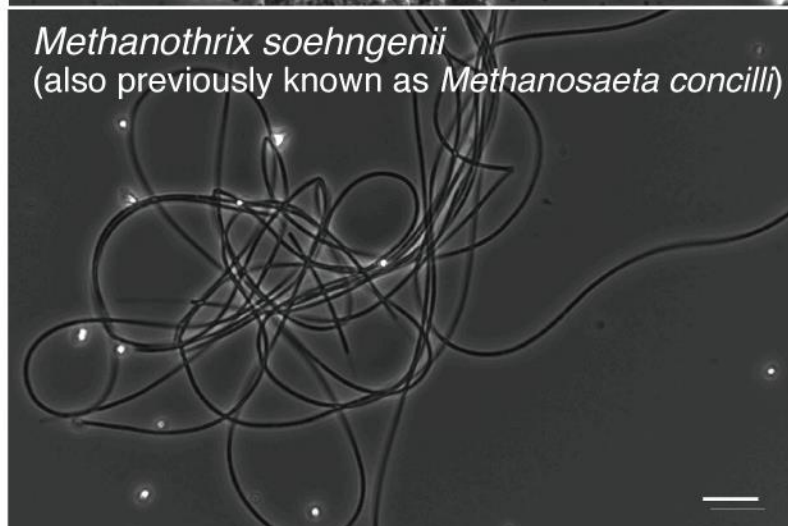
嫌気性消化リアクター
 蒲都市下水道浄化センターに設置

酢酸からメタンが生成される割合：72 %
 水素からメタンが生成される割合：28 %

嫌気性廃水処理および嫌気性消化リアクター内に生息する酢酸資化メタン菌



(bar : 10 μ m)



- 嫌気性廃水処理および嫌気性消化リアクター内において、酢酸からメタンを生成する主な酢酸資化メタン生成菌は**メタノサルシナ属アーキア**とメタノトリクス属アーキアである。

- メタノサルシナ属アーキア**は、高濃度の酢酸が供給されるリアクターで優占しやすい。

● 新技術の概要

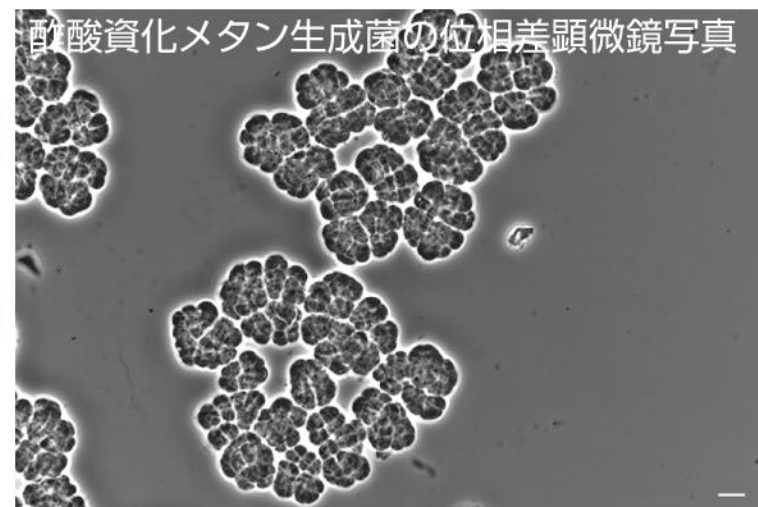
嫌気条件下における有機物分解の最後を担うメタン生成菌は、メタン生成を伴う嫌気性処理にとって重要な微生物群である。とくに、嫌気性処理におけるメタンの7割以上は、**酢酸を基質する微生物によって生成**されるため、嫌気性処理の成否を評価する**指標微生物として利用**できる。メタン生成菌の細胞表層に特異的に結合する核酸分子を利用することによって、嫌気性処理の微生物指標となりえる**酢酸資化メタン生成菌のオンサイト計測**について世界に先駆けて紹介する。

● 新技術の特徴

- ・メタノサルシナ属に属する複数種の酢酸資化メタン生成菌の識別
- ・迅速・簡便な酢酸資化メタン生成菌の検出
- ・オンサイトでの酢酸資化メタン生成菌の検出

● 嫌気性処理におけるメタン生成能力の簡易評価

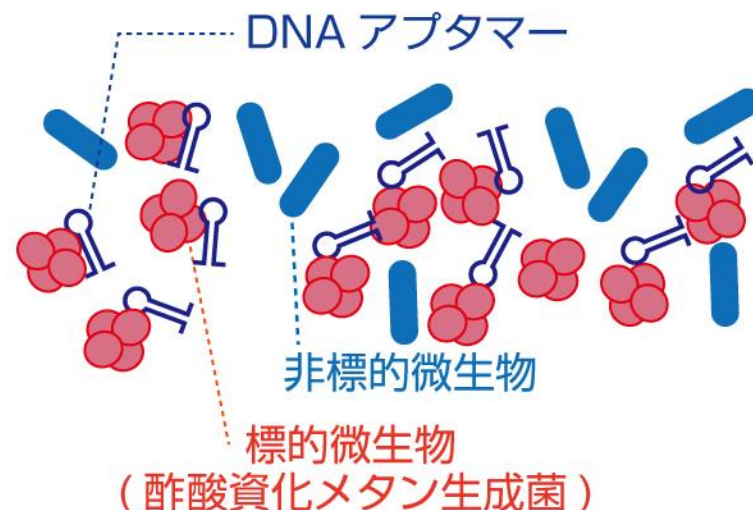
本技術は、**嫌気性処理にとって重要な酢酸資化メタン生成菌の計測に利用できるため**、さまざまな有機性廃水や有機性廃棄物を処理する嫌気性処理プロセスにおける**メタン生成能力（嫌気性処理プロセスの性能）の簡易的に評価**にも利用できる。



(bar: 10 μm)

● 酢酸資化メタン生成菌の検出・計測の迅速化

本技術は、酢酸資化メタン生成菌の細胞表層タンパクなどに結合する核酸分子を用いているため、それを利用した計測機器の自動化、迅速化にも応用できる。



酢酸資化メタン生成菌を計測する既存技術と本測定技術の目標

技術項目	Fluorescence in situ hybridization (FISH 法)	リアルタイム定量 PCR 法	測定技術の目標
操作性	煩雑	煩雑	簡便
専門スタッフ	有	有	無
測定環境	クリーン度の高い実験室	クリーン度の高い実験室	オンサイト
測定時間	2 日	2～3 日	4～6 時間

酢酸資化メタン生成菌の検出や計測には、リアルタイム定量 PCR 法や DNA プローブを用いた蛍光染色法が用いられるが、測定操作も煩雑であり長い測定時間を必要とする。細胞表層タンパクなどに特異的に結合する核酸分子 (DNA アプタマー) を用いた方法では、**短時間かつ簡便な操作**によって、**酢酸資化メタン生成菌の検出や計測をオンサイトで達成**できる。また、自動計測や迅速計測機器の検出ツールとしても応用できる可能性がある。

酢酸資化メタン生成菌を網羅的に識別する DNA アプタマーの獲得戦略 — Cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment 法—

使用したアンモニア酸化細菌

Methanosarcina barkeri NBRC 100474^T 株

Methanosarcina mazei NBRC101201 株

ランダム ssDNA ライブラリー Song, M.Y. et al., Sci. Rep., 7: 43641 (2017)

5' -CGT ACG GAA TTC GCT AGC -N₄₀- GGA TCC GAG CTC CAC GTG- 3'

Forward primer Song, M.Y. et al., Sci. Rep., 7: 43641 (2017)

5' -CGT ACG GAA TTC GCT AGC- 3'

Reverse primer Song, M.Y. et al., Sci. Rep., 7: 43641 (2017)

5' -CAC GTG GAG CTC GGA TCC- 3'

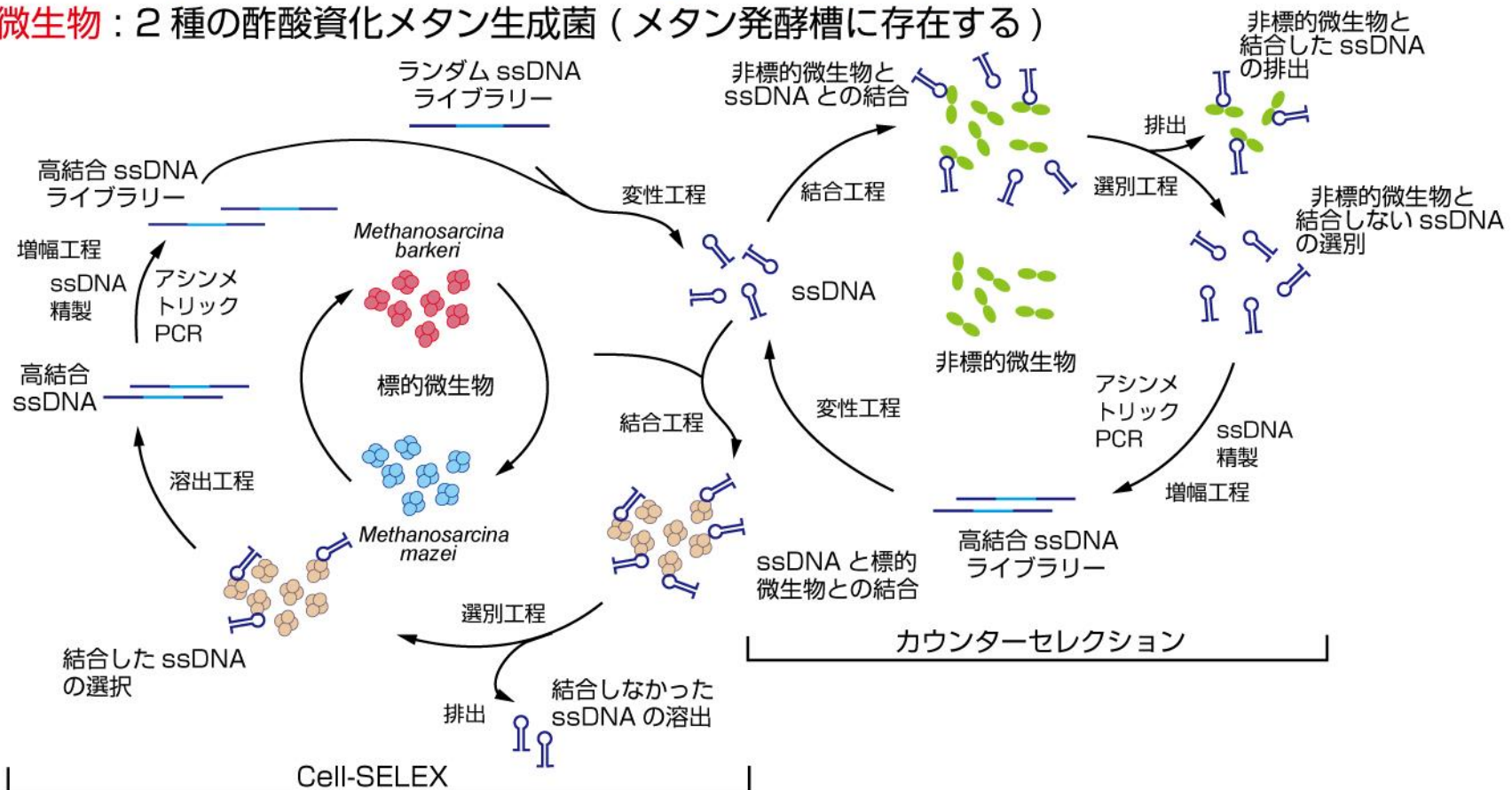
アシンメトリック PCR 条件

Forward primer : 2 μM Reverse primer : 0.06 μM

初期変性 :	95 °C,	5 min	] 8 ~ 12 cycles
変 性 :	95 °C,	30 sec	
アニーリング :	56.3 °C,	30 sec	
伸 長 :	72 °C,	10 sec	

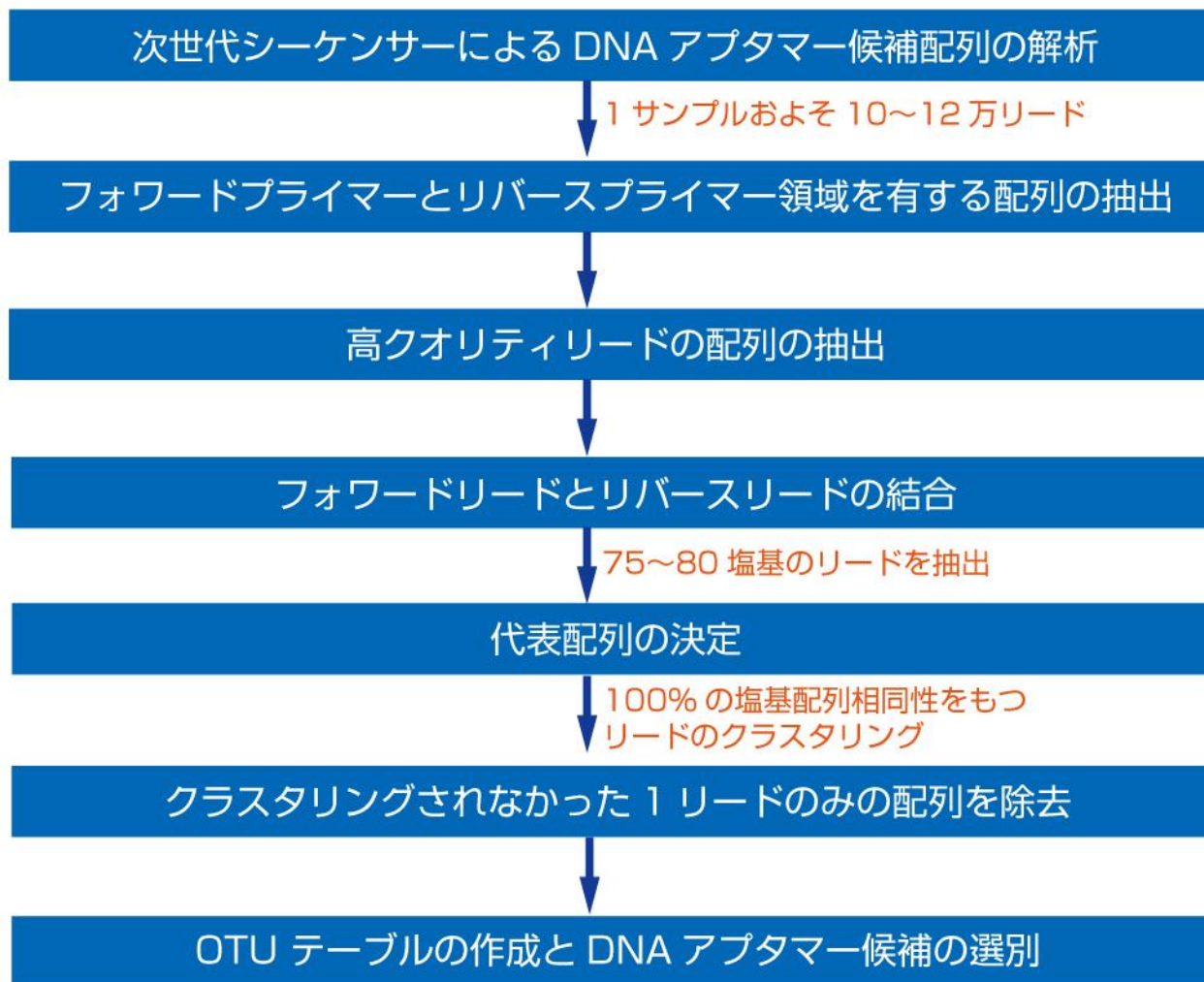
酢酸資化メタン生成菌を網羅的に識別する DNA アプタマーの獲得戦略 — Cell-systematic evolution of ligands by exponential enrichment 法 —

標的微生物：2 種の酢酸資化メタン生成菌（メタン発酵槽に存在する）



- ・ 酢酸資化メタン生成菌に特異的な DNA アプタマーの獲得のため、本サイクルを **15 ラウンド (30 回)** 繰り返した。
- ・ 特異性を高めるため、非標的微生物 による **3 回のカウンターセクション** も実施した。

DNA アプタマー候補の選別までのフロー



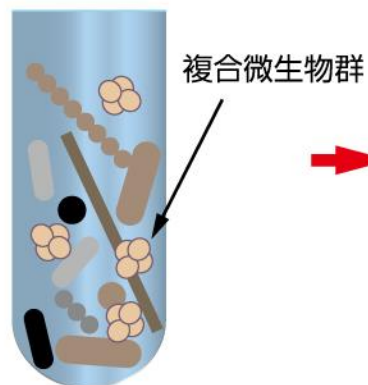
酢酸資化メタン生成菌を網羅的に識別する DNA アプタマー

- ・ 酢酸資化メタン生成菌を標的とした 30 回の Cell-SELEX 法では、**0.5～34.5% のリード占有率を示す 18 種 (MSAap1 – MSAap18) を選別した。**
- ・ 酢酸資化メタン生成菌への結合条件下における選別した **18 種の DNA アプタマー候補の二次構造を予測した。**いずれも**複数のステムループ構造**を有していた。
- ・ 他のメタン生成菌を用いた特異性試験の結果、選別された DNA アプタマーは、**酢酸資化メタン生成菌 (メタノサルシナ属アーキア) を特異的に識別可能であった。**
- ・ 選別された DNA アプタマーの解離定数を測定した結果、選別された DNA アプタマーは、**メタノサルシナ属アーキアに対して高い親和性**を示していた。

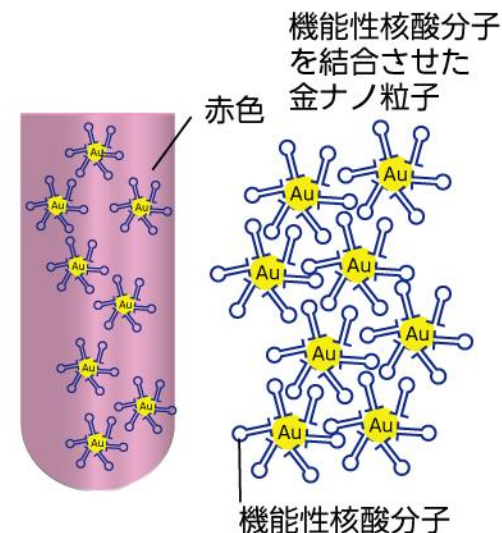
詳細な実験結果については、本学担当部署 (スライド 14 にある連絡先) にご連絡の上ご相談ください。

DNA アプタマー修飾金ナノ粒子による酢酸資化メタン生成菌の簡易計測技術の概略図

① 嫌気性処理プロセスの微生物サンプルを試験管への添加



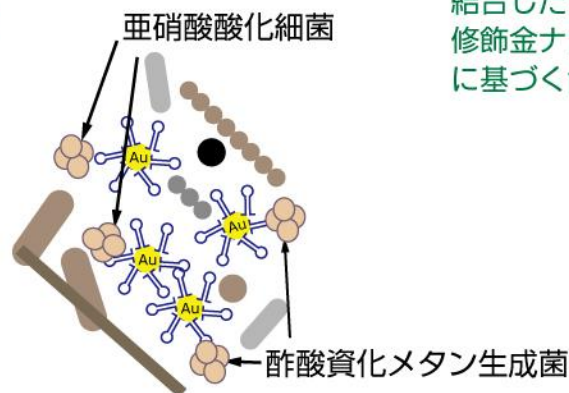
② 酢酸資化メタン生成菌に結合する DNA アプタマーを結合した金ナノ粒子の添加



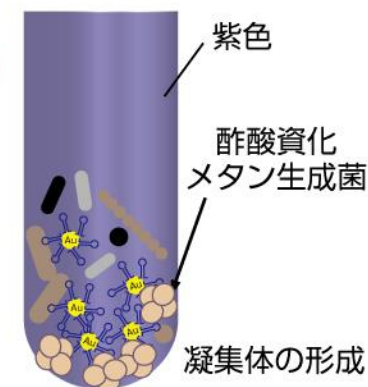
③ DNA アプタマー修飾金ナノ粒子の酢酸資化メタン生成菌への結合

常温・常圧
での反応

約 1 時間



④ 酢酸資化メタン生成菌に結合した DNA アプタマー修飾金ナノ粒子の凝集作用に基づく色調変化による定量

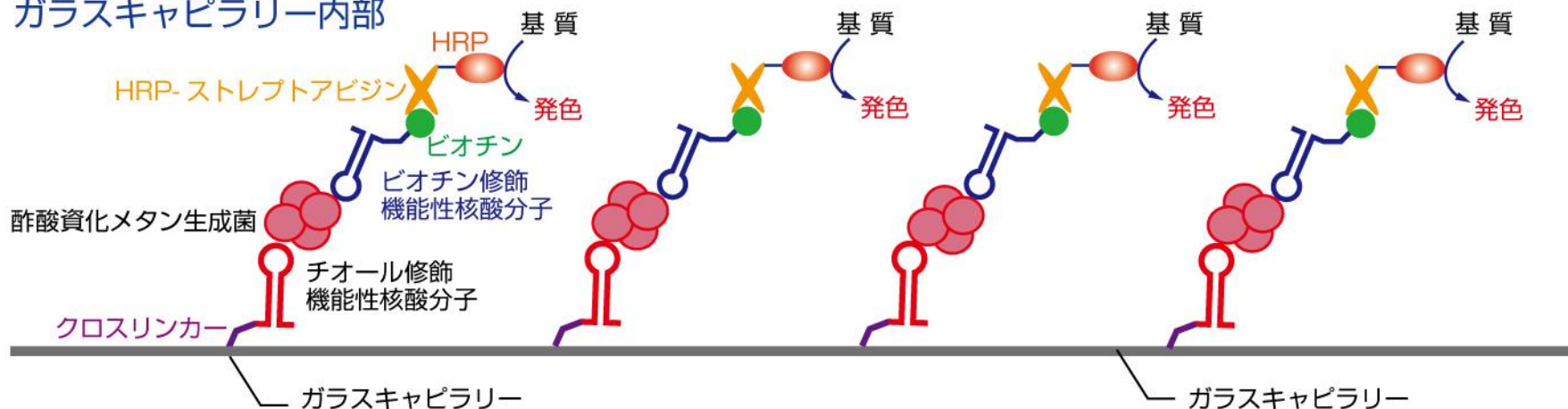


測定サンプル中の酢酸生成メタン生成菌の数を色調変化によって定量する。

酢酸資化メタン生成菌の簡易計測技術の概略図

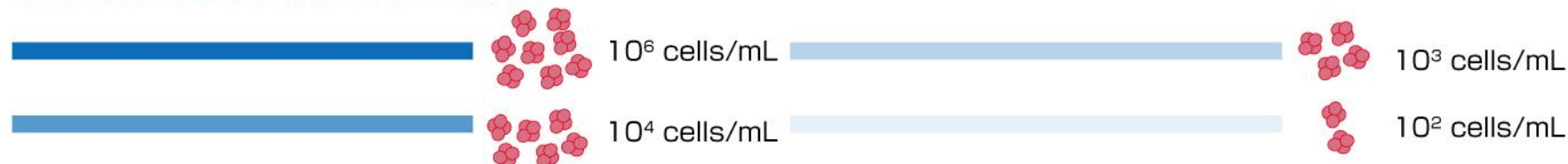
機能性核酸分子を用いたサンドイッチ型検出法の原理

ガラスキャピラリー内部



基質 テトラメチルベンジジン → 青色
 o- フェニレンジアミン二塩酸塩 → 橙色

本比色定量法で予想される色調変化



測定サンプル中の酢酸資化メタン生成菌の数を色調変化によって定量する。

- ・嫌気処理プロセスでは、酢酸資化メタン生成菌はブラックボックスとして扱われており、指標微生物として管理されていません。酢酸資化メタン生成菌を直接計測できる本計測技術は、嫌気処理プロセスの安定的な稼働を評価するツールとして、嫌気処理プロセスの随時監視に利用する「**リトマス試験紙**」のような活用が期待できます。そのため、pH や温度など物理化学な管理指標に基づく現在の**管理技術の精度を高める**ことに繋がります。
- ・しかしながら、本キットはまだ開発途上にあることから、**実用化に向けて協働で行える意欲ある企業（水処理業や試薬製造業など）を希望**します。
- ・本技術は、微生物を利用するさまざまな産業で利用される**有用微生物の計測に応用**することも可能です。微生物の計測における新たな事業展開を模索している企業との共同研究やコンサルティングにも応じる用意があります。

発明の名称：メタン生成菌に結合する核酸分子並びに核酸分子を用いたメタン生成菌の検出方法及び検出試薬

出願番号：特願 2019-228705

出願人：国立大学法人 豊橋技術科学大学

発明者：山田剛史、大門裕之、萩原達也、坪井重太郎

お問合せ先：国立大学法人 豊橋技術科学大学
研究推進アドミニストレーションセンター (RAC)

Phone：0532 - 44 - 6975

FAX：0532 - 44 - 6980

E.mail：tut-sangaku@rac.tut.ac.jp

担当：白川正知

- ・ 2010 年 JST A-STEP FS 探索タイプ事業に採択
- ・ 2012－2013 年 JST 第 2 回 A-STEP FS 探索タイプ事業に採択
- ・ 2016－2017 年 JST マッチングプランナー第 2 回探索試験に採択
- ・ 2016 年－ 水処理メーカー A 社との共同研究実施
- ・ 2018 年－ 化学メーカー B 社との共同研究実施
- ・ 2019 年－ 水処理メーカー C 社との共同研究実施