

ファージディスプレイ法を利用した特定微生物群の分離手法の開発

産業技術総合研究所、長岡技術科学大学（学） ○井口 晃徳、関口 勇地、鎌形 洋一、中村 和憲
長岡技術科学大学（正） 大橋 晶良、（正） 原田 秀樹

1. はじめに

自然環境中には多様な微生物が数多く存在しており、地球上での物質循環、および生態系の維持において重要な役割を果たしている。これらの多様な微生物群は、廃水処理、汚染土壌浄化等の環境浄化技術にも幅広く活用されている。近年の分子遺伝学的微生物同定技術の発展とそれを利用した解析により、環境中に存在する微生物のほとんど（多くの場合 99%以上）が人為的に培養できず、従ってその機能も不明な微生物群であることがはっきりしてきた。これらの未培養微生物群を分離し、その詳細な機能を調査することは、自然環境および人工バイオプロセスにおける物質循環・分解等を理解する上で重要であると考えられる。

そこで本研究では、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法とファージディスプレイ法を組み合わせ、特定微生物群（特に未培養系統微生物群）を分離するための新規技術の開発を行うことを目的とした。本提案技術は、具体的に以下の 4 つのステップにより遂行される。(1) 16S rRNA 配列を標的とした蛍光標識 DNA プローブによる FISH 法により標的微生物を蛍光標識し、(2) フローサイトメータ等での標識菌体を選択的に回収し（この際細胞は完全に死滅している）、(3) その後、回収された菌体表面に対し多様なペプチドライブラリを提示したファージによるファージディスプレイ技術を適用し、標的菌体に特異的に結合するペプチド配列を選別、(4) 選別したペプチドを標的菌体に対する“釣り針”として利用し、複合微生物試料中から標的微生物を生きのまま回収する。

本研究では、上記手法の実現可能性を検証するため、*Gemmatimonas aurantiaca* をモデル微生物として用い、本提案技術による *G. aurantiaca* 菌体の回収を行った。

2. 実験方法

供試菌株には、門レベルの典型的な難培養微生物群 *Gemmatimonadetes* に属する *G. aurantiaca* を標的微生物として用いた。*G. aurantiaca* 菌体の FISH 法による検出には、*G. aurantiaca* の 16S rRNA を特異的に検出する蛍光標識プローブ FGI-I488 (5'-CGGTGCTTCCTCACCCGG-3') を設計、利用した。*G. aurantiaca* 菌体と特異的に結合するペプチドのスクリーニングには、7 残基もしくは 12 残基のランダムペプチド配列を提示する M13 ファージライブラリ Ph.D.-7 or -12™ Phage Display Peptide Library Kit (BioLabs) を用いた。選別したペプチド配列を決定した後、*G. aurantiaca* 菌体との特異的な結合が確認できたペプチド配列は人工的にそのペプチドを合成した。合成ペプチドには C 末端側にフレキシブルリンカー (GGGC) およびビオチンを標識した。ペプチドの特異性は、*G. aurantiaca* 菌体およびいくつかの門・綱を代表する微生物菌体を利用し、そのペプチドとの結合性をチラミドシグナル増幅法 (TSA) 法を利用した蛍光シグナルとして評価した。ペプチドと結合した *G. aurantiaca* 菌体の回収には、ストレプトアビジンが修飾された磁気ビーズ (Dynabeads® M280 Streptavidin, Dynal) を利用した。ペプチド・磁気ビーズ複合体を標的菌体と結合させた後、磁石により結合菌体を回収した。回収した菌体は NM-1 寒天培地、もしくは NM-1 グランガム培地上で培養を行った (30℃)。

キーワード ファージディスプレイ、新規微生物群分離技術、未培養微生物群

連絡先 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6-10 (独) 産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門 生物資源情報基盤研究グループ TEL.029-861-6591 Fax.029-961-6587 E-mail, a.iguchi@aist.go.jp

3. 結果および考察

G. aurantiaca を検出するプローブ FGI-I488 を用いて *G. aurantiaca* 菌体に FISH 法を適用した。結果、ハイブリダイゼーションバッファー温度 46℃、ホルムアミド濃度 30%にて *G. aurantiaca* の特異的検出が可能であった。

7 残基および 12 残基のペプチド鎖を有するファージライブラリから *G. aurantiaca* 菌体との結合能を有するペプチドの選別を行った。ペプチドの選別にはバイオパンニングを適用し、ペプチドの選別にはバイオパンニングを 4 ラウンド繰り返した。*G. aurantiaca* 菌体に対してファージライブラリのバイオパンニングを適用した結果、*G. aurantiaca* 菌体に対して強く結合すると思われるペプチドが、7 残基のライブラリから 22 種類、12 残基のライブラリからは 32 種類選別された。

選別したペプチドを提示するファージを利用して TSA 法を行い、*G. aurantiaca* に対する特異性を蛍光シグナルとして検出・確認した。標的菌体 (*G. aurantiaca*)、および細菌の門、綱を代表する非標的菌体群 (7 種: *Brevundimonas diminuta*, *Pseudomonas straminea*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Rhodococcus equi*, *Deinobacter grandis*, *Bacillus subtilis*) に対して TSA 法を適用し、上記の選別ペプチドの特異性を評価した結果、12 残基のライブラリから選別された一種類のペプチド (N'-WPHAPWGFSAFS-C') が特に *G. aurantiaca* 菌体と特異的かつ強固に結合することが判明した。

選別ペプチドを被膜した磁気ビーズを利用し、*G. aurantiaca* 細胞の特異的回収を試みた。*G. aurantiaca* 菌体、および各種非標的菌体 (固定菌体: 各菌数 10^7 細胞) に対して特異的回収を行った後、回収した菌体 (ビーズと結合している菌体) を DAPI で染色し、その菌数を計測した。結果、 10^7 個の磁気ビーズ当たりの *G. aurantiaca* 菌体回収量は 10^6 細胞数、各種非標的菌体群は平均して 10^5 細胞のオーダーで回収されていることが判明した (Fig.2)。また、生菌体を利用した回収実験を行ったところ、上記の固定菌体を利用した場合と同じ程度の回収率で生きた標的微生物細胞の回収も可能であった。

4. まとめ

本研究の提案技術を適用することで、標的微生物の菌体表面と特異的に結合するペプチドリガンドを得ることができた。このことは、本手法が特定の微生物群の検出手法として利用可能であることを示していた。また、磁気ビーズとペプチド鎖を利用し、特定の微生物群の回収が可能であった。本提案技術は、特定の微生物群を生きた状態で回収できる。従って、本手法は、特定の未培養微生物群を高純度で生きたまま分離し、その後の培養を容易にするための培養支援技術となり得ると考えられる。今後は、環境中に存在する実際の未培養微生物群に本提案技術を適用し、それらの分離を試みる。

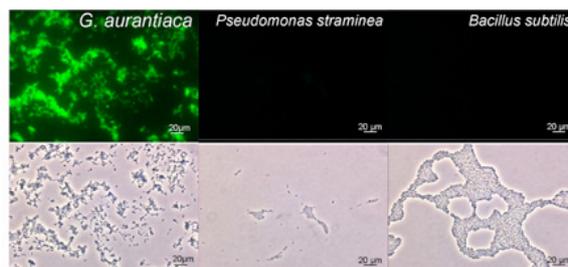


Fig.1 Tyramide signal amplification of WPHAPWGFSAFS-peptides or binding to microbial cells. The two images for each organism show an identical field (upper: fluorescence, lower: phase contrast)

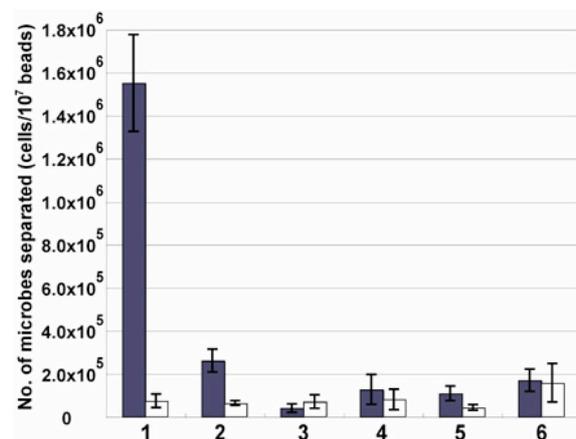


Fig.2 Number of microbial cells separated using magnetic beads coupled with WPHAPWGFSAFS peptides (columns in blue), or without peptides (columns in white). (1) *G. aurantiaca*, (2) *B. diminuta*, (3) *P. straminea*, (4) *E. coli*, (5) *R. equi*, (6) *B. subtilis*.