

ファージディスプレイペプチドリガンドを利用した特定微生物群の新規分離技術の開発と利用

産業技術総合研究所、長岡技術科学大学 (学) ○井口 晃徳、(非) 関口 勇地
広島大学 (正) 大橋 晶良、東北大学 (正) 原田 秀樹、長岡技術科学大学 (正) 山口 隆司

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、特定の化学物質の分解、廃水・廃棄物処理、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。これらの環境中に存在する未培養微生物群を個々に分離し、その詳細な生理学的機能・諸性質を調査することは、自然環境および各種の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非常に重要であると考えられる。

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、標的とする微生物群(特に未培養微生物群)のみを特異的に生きたまま分取するための新規培養支援技術の開発を行った。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 FISH 法による標的微生物の検出、(2) フローサイトメータを利用した検出菌体の選択的回収(この際細胞は完全に死滅している)、(3) 回収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法を適用(検出菌体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、標的菌体を含む環境試料中から生きたまま回収する。

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。また実際の未培養微生物群に対し、本提案技術の適用を試みた。

2. 実験方法

モデル標的菌体には、門レベルの典型的な難培養微生物群 *Gemmatimonadetes* 門に属する *G. aurantiaca* を用いた。FISH 法による *G. aurantiaca* 菌体の検出には、*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') を利用した。*G. aurantiaca* 菌体と特異的に結合するペプチドの選別には 12 アミノ酸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.-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 末端側にリンカー(Gly-Gly-Gly-Cys)とビオチンを付加した。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 10 種 (*Brevundimonas diminuta*, *Rhodospirillum rubrum*, *Pseudomonas straminea*, *Thiothrix disciformis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Rhodococcus equi*, *Microbacterium phosphovorans*, *Deinobacter grandis*, *Bacillus subtilis*) を利用し、そのペプチドとの結合性をチラミッドシグナル増幅法(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結合磁気ビーズ (Dynabeads® M280 Streptavidin, Dynal) を利用した。ペプチド・磁気ビーズ複合体を、標的菌体を含む複合微生物試料と混合した後、磁石によりビーズと結合した菌体を回収した。回収した菌体は NM-1 グランダム培地上で 2 週間の培養を行なった。

キーワード 新規微生物群培養支援技術、ファージディスプレイ、ペプチドリガンド、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
バイオメジャーグループ TEL.029-861-6591 Fax,029-961-6587 E-mail, a.iguchi@aist.go.jp

3. 結果および考察

3.1 FISH 法による *G. aurantiaca* 菌体の検出

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°C、ホルムアミド濃度 30%にて *G. aurantiaca* の特異的検出が可能であることが判明した。

3.2 ファージディスプレイ法による *G. aurantiaca* 菌体特異的ペプチドの選別

12 アミノ酸配列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。*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 24 種類選別された。

3.3 選別ペプチドの特異性確認

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に対して TSA 法を適用した結果、24 種類のペプチドの中でも 2 種類(N6, N20) が *G. aurantiaca* 菌体と特異的に結合することが判明した。

3.4 選別ペプチドを利用した標的菌体の特異的回収と培養

選別ペプチドを被膜した磁気ビーズを利用し、複合微生物試料中からの *G. aurantiaca* の特異的回収を試みた。*G. aurantiaca* 菌体を含む 11 種類の生菌体を等量混合した人工複合微生物試料中から、標的菌体の特異的に回収した。回収した菌体を NM-1 プレート培地にて 2 週間培養しコロニーを形成させ、それらのコロニーに対して FISH 法を適用し、標的菌体の回収培養の判別を行った。結果、N20 ペプチドを結合させた磁気ビーズを利用することで、標的菌体のポピュレーションがおよそ 1%の複合微生物試料中から、標的菌体を優占的に培養することが可能であることが判明した。現在、本提案技術の実サンプルへの適用として、嫌気性廃水処理リアクターに生息する未培養微生物群 (*Deferribacteres*, *Nitrospira*, Candidate phylum WS6, Candidate phylum BA024, Candidate phylum KSB3) に対して本手法を適用し、これらの未知微生物群と特異的に結合するペプチドのスクリーニングを試みている。

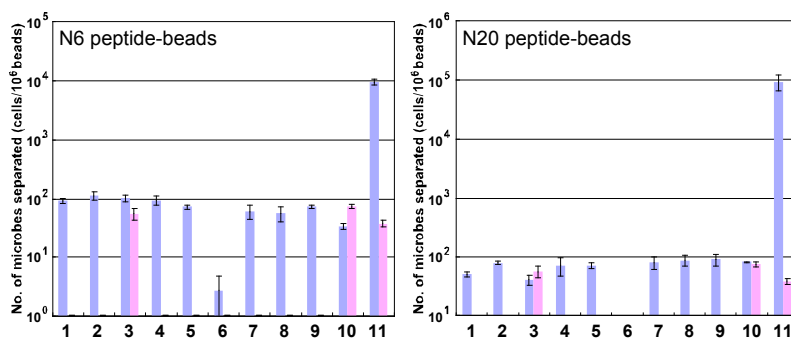


Fig.1 Number of microbial cells recovered using magnetic beads coupled with N6 and N20 peptides (columns in blue), or without peptides (columns in pink).

(1) *B. diminuta*, (2) *S. maltophilia*, (3) *P. staraminea*, (4) *E. coli*, (5) *R. fermentans*, (6) *T. disciformis*, (7) *M. phosphovoros*, (8) *R. equi*, (9) *D. grandis*, (10) *B. subtilis*, (11) *G. aurantiaca*

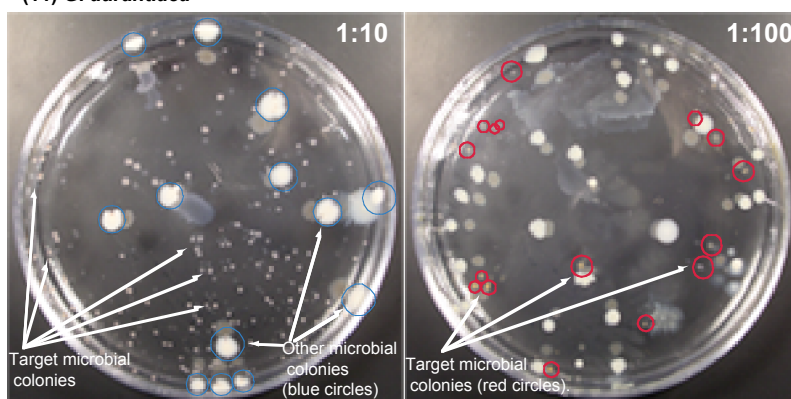


Fig.2 Bacterial growth of samples magnetically separated using N20-peptide conjugated beads (NM-1 gellan-gum plates, 2 weeks of incubation). The initial ratios of target microbial cells (*G. aurantiaca*) to other non-target reference microbial cells (mixture of the ten bacterial species) were 1:10 (left) and 1:100 (right).

4. まとめ

ファージディスプレイ法を利用することにより、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。このペプチドリガンドを利用することにより特定の微生物を検出できるのみならず、磁気ビーズと併用することにより特定の微生物群を選択的に回収し、培養に供することが可能であった。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して利用することが可能となると考えられる。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。