

嫌気性廃水処理プロセスに存在する未培養微生物群のペプチドリガンド法による検出・分離

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

1. はじめに

嫌気性廃水処理プロセスは、多様な嫌気性微生物を活用することによって廃水中の有機物を無機化するプロセスである。そのプロセスにおいて形成される微生物群集(汚泥)は、嫌気的有機物分解過程を担う微生物群を含む、アクセスしやすいモデル生態系と位置づけることができる。これらのプロセスに存在する微生物群集を 16S rRNA 遺伝子に基づく分子遺伝学的手法により解析すると、門・亜門レベルといった分類学上位の分類群においても、培養されていない、すなわち機能が不明な系統群が数多く存在することが知られている^{1, 2)}。これらの未培養微生物を分離し、個々の生理学的、遺伝学的性質を理解することは、嫌気性廃水処理プロセスの診断や、処理効率の最適化を行う上で重要な知見をもたらすものと考えられる。

著者らは蛍光 *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併用し、標的微生物を迅速に検出・分離するための新規技術を開発してきた³⁾。具体的には、標的とする未培養微生物菌体を含む複合微生物試料に対して (1) 16S rRNA 配列を標的とした蛍光標識 DNA プローブによる FISH 法を適用し、標的未培養微生物菌体を蛍光標識化する(この際細胞は完全に死滅している)、(2) 標識化した目的の菌体を含む複合微生物試料に、多様なペプチド鎖を提示したファージディスプレイペプチドライブラリを混合し、菌体とペプチドを結合させる、(3) フローサイトメータ等を利用し、標識菌体並びに標識菌体結合ペプチドを選択的に分取する、(4) 分取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検出・回収する、という過程を経て、未培養微生物の選択的な検出および回収を実現するものである。

本研究は、開発した本手法を環境試料に対して適用し、未培養微生物群の検出、および生きたまま回収し培養に供することを目的とした。本研究では特に嫌気性廃水処理プロセスの中でも代表的な上昇流嫌気性スラッジブランケット (UASB) に着目した。UASB 反応槽内のグラニュー汚泥は、(1) 他の自然環境と比較して微生物群集構造が単純である、(2) グラニュー汚泥中の微生物は一般的に高い活性を保持しているため rRNA アプローチを適用しやすい、といった特徴を有しており²⁾、本技術を適用しやすいモデル複合微生物系であると思われる。グラニュー汚泥で比較的高頻度で検出されるいくつかの未培養細菌グループに着目し、本手法を適用した。

2. 実験方法

供試複合微生物試料には、現在稼働中の一般的な食品関連の高濃度有機性廃水を処理するフルスケール UASB プロセス内のグラニュー汚泥を利用した。標的とする微生物群は嫌気性グラニュー汚泥で検出される門・亜門レベルのクロンクラスタに属する未培養微生物群とした。

これら標的菌体の FISH 法による検出は、各種微生物群の 16S rRNA を特異的に検出する蛍光標識プローブを設計、定法に従い行った。

各種標的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、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.-12™ Phage Display Peptide Library Kit (BioLabs) を用いた。

標的菌体および標的菌体結合ペプチドの分取には、蛍光細胞分取機能を有するフローサイトメータ FACS Vantage™ SE Flow cytometry system (Becton Dickinson) を使用した。ペプチドの菌体への結合能は、標的菌体を含む複合微生物試料に対し、選別したペプチドを添加後、そのペプチド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。ペプチドの標的菌体への特異性は、16S rRNA を標的とした FISH 法と TSA 法を組み合わせることで評価した。

キーワード 嫌気性廃水処理システム、未培養微生物群、特定微生物群検出・分離技術

連絡先 〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

国立大学法人 長岡技術科学大学 環境・建設系 水圏土壌環境制御研究室

TEL.0258-47-1611(6646) Fax.0258-47-9630 E-mail, aiguchi@stn.nagaokaut.ac.jp

3. 結果および考察

3.1 標的未培養微生物群の FISH 法による検出・蛍光標識化

実廃水処理 UASB リアクターより採取したグラニューール汚泥に対し、未培養微生物群を特異的に検出するプローブ GSY3-618 (5'-CCGCATGCCCCGGGTAAAG-3'), GSY8-1249LNA (5'-CCLaCTLaAGCTGCCGTCTG-3'), GSY10-998 (5'-CATCTCCGTACCACGTGC-3'), NitC1463 (5'-CCGGCCATACCTTCGAT-G-3'), WS6-517LNA (5'-ATCACCGA-LtGCTLtCTGGC-3') を用いた FISH 法を適用した。その結果、*Deferribacteres*, *Nitrospirae*, Candidate phylum WS6 などの門・亜門レベルの未培養微生物群を検出・蛍光標識することが可能であった。

3.2 ファージディスプレイペプチドライブラリを利用した標的菌体結合ペプチドの選別

12 残基のアミノ酸配列から成る多様なペプチド鎖を有するファージディスプレイペプチドライブラリから、標的未培養微生物菌体と特異的に結合するペプチドリガンドの選別を行った。

未培養微生物群を標的とした FISH 法を適用後、その汚泥試料に対してペプチドライブラリを添加し標的菌体と結合させ、フローサイトメータにより FISH 由来の蛍光シグナルを有する菌体と結合ファージ (ペプチド) を分取した。分取菌体に結合したファージを回収、クローン化し、標的菌体と結合能を有すると思われるペプチド鎖を解析した。その結果、各種標的未培養微生物菌体に対して結合すると思われるペプチドが、各微生物群に対し 3-5 種類ずつ選別された (表1)。

表1. ファージディスプレイ法により選別した各種標的未培養微生物菌体に結合すると考えられるペプチド配列

Phylum	Target clone (clone cluster)	Peptide sequence
<i>Deferribacteres</i>	Synergistes group3 (GSY3)	N'- HTSKLLMNLPPD -C'
		N'- IPIPGHRWQNGV -C'
		N'- VSPPSNNATWIP -C'
		N'- YQTSSPAKQSVG -C'
		N'- TTAKSMSGSSWY -C'
	Synergistes group8 (GSY8)	N'- LAEPLNKIDNST -C'
		N'- ASFHLERGVSWK -C'
		N'- LFTTETAQLPSR -C'
	Synergistes group10 (GSY10)	N'- MINVTPLASTVA -C'
		N'- AAFTMQKWPDSH -C'
<i>Nitrospirae</i>	Nitrospira clone (NitC)	N'- HGEVPRFHAVHL -C'
		N'- MLETSQALLLG -C'
		N'- SLNKSSNPTAVP -C'
Candidate phylum WS6 (WS6)		N'- FHPPQVEAATIT -C'
		N'- TLHNRMIYSWPM -C'
		N'- YNKPYPALPRTWF -C'
		N'- TLATPQSEALTL -C'
		N'- APWHLSSQYSRT -C'

3.3 選別ペプチドの特異性確認

選別ペプチドの特異性は、16S rRNA を標的とする FISH 法と、菌体とペプチドの結合を蛍光シグナルとして検出する TSA 法を組み合わせることで評価した。分散処理を施したグラニューール汚泥試料に対し、選別ペプチド WS6-12 (N'-APWHLSSQYSRT-C') による TSA 法と、WS6 を検出するプローブ WS6-517LNA を使用した FISH 法の 2 重染色を行った結果、同一の微生物細胞から両者の蛍光シグナルが検出された (図 1)。このことにより、選別ペプチド WS6-12 は、WS6 に対して特異的に結合することが判明した。



図1. 選別ペプチドを利用したTSA法と16S rRNA標的としたFISH法による2重染色の結果

4. まとめ

本提案技術を利用することで、標的とする未培養微生物群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、本提案技術が特定の微生物群の検出を可能とする新規技術として利用可能であることを示していた。また本手法は特定の微生物を生きた状態で回収できることから、特定の未培養微生物を生きたまま分離し、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、選別されたペプチドを標的菌体に対する“釣り針”として利用することで、複合微生物試料中から標的菌体を生きたまま回収することを試みる。

参考文献

- 1) Sekiguchi et al. 1998 Microbiology, 144, 2655-2665
- 2) Sekiguchi et al. 2006 Microbes and Environments, 21, 1-15
- 3) 井口ら 2007 第62回全国土木学会年次学術講演会要集