

ファージディスプレイ法を利用した未知微生物群の新規分離手法の開発

水圏土壌環境制御研究室 井口晃徳

指導教官 大橋晶良、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。それらの微生物群は、特定の化学物質の分解、廃棄物・廃水処理などの環境浄化技術にも幅広く利用されている。これらの環境中に存在する微生物を迅速に検出・モニタリングする技術の確立は、自然生態系の維持、環境質の改善、各種人工バイオプロセスの最適化を行うために重要である。また、近年の分子遺伝学的微生物同定・検出技術の発展と、それを利用した様々な解析により、環境中に存在する微生物の99%以上が人為的に培養できないことが明らかになっている。環境中に存在する未知微生物を分離・培養することは、自然生態系や、人工バイオプロセスの物質循環を理解する上で重要な知見が得られるだけでなく、未利用生物・遺伝子資源の獲得にもつながる。そのため既存の分離培養法とは異なる、新規な微生物分離培養法が必要とされている。

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、特定微生物群を迅速に検出・回収するための新規技術の開発・提案を行うことを目的とした。本提案技術は、(1) 16S rRNA 配列を標的とした蛍光標識 DNA プロープによる 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そ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ディスプレイを適用し、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* の回収を行った。

2. 実験方法

(1) 供試菌株

供試菌株には、門レベルの典型的な難培養微生物群 *Gemmatimonadetes* を代表する *G. aurantiaca* を標的微生物として用いた。また、ファージディスプレイにより選別したペプチドの特異性を確認するために、主要な真正細菌門 (phylum) を代表する細菌 (*Brevundimonas. diminuta*, *Stenotrophomonas. maltophilia*, *Rhodoferrax. fermentans*, *Pseudomonas. straminea*, *Escherichia. coli*, *Rhodococcus. equi*, *Deinobacter. grandis*, *Bacillus. subtilis*) を対照菌株として用いた。

(2) FISH 法

FISH 法は Amann らの方法におおむね準拠して行った。*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。

(3) 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

ランダムペプチドライブラリには 7-mer もしくは 12-mer 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。ペプチドのスクリーニングはバイオパンニング法を適用し *G. aurantiaca* 菌体と特異的に結合するペプチドをファージディスプレイペプチドライブラリから選別した。バイオパンニング、ファージの増殖、ファージ DNA の抽出、シーケンシングは Kit 付属のマニュアルに従った。選別したペプチド配列を決定後、*G. aurantiaca* 菌体との特異性が確認できたペプチド配列に関しては外部企業 (Sigma genosys) にペプチド合成を依頼した。合成ペプチドには C 末端にフレキシブルリンカー (GGGC) およびビオチンを標識した。

(4) チラミドシグナル増幅 (TSA) 法

ペプチドの特異性は、*G. aurantiaca* 菌体およびいくつかの門を代表する微生物菌体に対して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ドシグナル増幅法 (TSA) 法によって得た蛍光シグナルとして評価した。TSA 法は TSA™ Fluorescence systems (Perkin Elmer) を利用し、実験方法はキット付属のマニュアルにおおむね従った。

(5) マグネティックセパレーション法による標的菌体の回収

ペプチドと結合した *G. aurantiaca* 菌体を回収するため、ストレプトアビジンが修飾された磁気ビーズ Dynabeads® M280 Streptavidin (Dyna) を利用したマグネティックセパレーション法を適用した。ペプチド・磁気ビーズ複合体と標的菌体を結合させた後、磁石により結合菌体を回収した。

3. 結果および考察

(1) *G. aurantiaca* 菌体の FISH 法による検出

設計したプローブ FGI-I488 を用いて *G. aurantiaca* の検出が可能かを FISH 法にて確認した。はじめに FGI-I488 プローブの最適ホルムアミド濃度の決定を行うために、ハイブリダイゼーションバッファー中に含まれるホルムアミド (FA) 濃度を 0%-50% の範囲で変化させ FISH 法を行った。結果、FA 濃度 35% 以上ではほとんど菌体からの蛍光シグナルが観察されなかったため、本プローブの最適 FA 濃度を 30% と決定した (Fig. 1)。

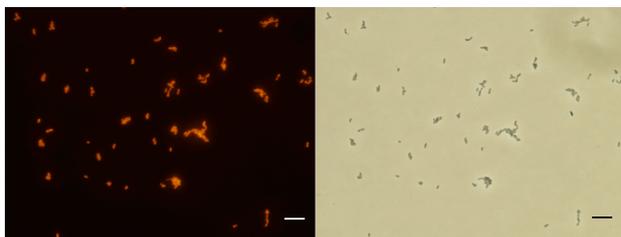


Fig.1 Fluorescence in situ hybridization with FGI-I488 (*G. aurantiaca* specific) probe. The two images show an identical field (left : fluorescence, right : phase contrast, Bars: 20 μ m).

(2) コンビナトリアルペプチドライブラリを利用した *G. aurantiaca* 菌体結合ペプチドの選別

7-mer および 12-mer のペプチド鎖を有するファージディスプレイライブラリから *G. aurantiaca* 菌体と特異的な結合能を有するペプ

チドの選別 (バイオパニング) を行った。バイオパニングは計 4 回行い、*G. aurantiaca* 菌体と特異的に結合可能なペプチドを有するファージが優占的に選別されるよう、1) あらかじめ標的以外の菌体とファージディスプレイライブラリを結合させ、それらと結合しなかったファージを利用してバイオパニングを行うサブトラクション法、2) チューブと非特異的に結合しているファージを除くことを目的に、非特異ファージの洗浄後にチューブを交換する、3) *G. aurantiaca* 菌体結合ファージを溶出後、さらに溶出後の菌体を洗浄して *G. aurantiaca* 菌体結合ファージの回収を行う、といった工程を加えた。バイオパニング終了後 *G. aurantiaca* 菌体から溶出されたファージをクローン化し、各ファージクローンの DNA 配列を解析した。得られたペプチド配列を Table.1 に示す。本実験により、*G. aurantiaca* 菌体に対して強く結合すると思われるペプチドは、7-mer のライブラリから 22 種類、12-mer のライブラリからは 31 種類、合計 53 種選別された。

Table 1
Phage display peptides binding to *G. aurantiaca* microbial cells. (Total 4 experiments.)

Ph.D. 7mer	Peptide sequence	Frequency	Ph.D.12mer	Peptide sequence	Frequency
Panning (4th)	T F A K S A Y	4/20	Panning (4th)	W P H A P W G F S A F S	5/11
	S A P S S K N	12/20		Q S P W L S I W H R A S	5/11
	Q P W P T S I	4/20		Y I T P Y A H L R G G N	1/11
Panning (3rd)	T I A A D R S	15/17	Panning (3rd)	W P H A P W G F S A F S	9/13
	M P S A H S F	2/17		Q T I T S P Q M H P R A	1/13
				S M K Y S H S T A P A L	1/13
				Q H A N H Q A W N N L R	1/13
				G T Y N L P N P P P L	1/13
Panning (2nd)	S I L P Y P Y	3/22	Panning (2nd)	H W D P F S L S A Y F P	1/26
	A S V S P Q Q	1/22		L P Y T A T L S L S I K	3/26
	Q N L V Q H R	3/22		S H P W N A Q R E L S V	1/26
	W T L N V R P	1/22		Y S L P R H L V S L P P	2/26
	V L Q K A T P	3/22		L P S W I P P H L F G G	3/26
	T V H P P P S	2/22		N M T A V T K L P A P W	1/26
	V P F K P I R	1/22		T L P S P L A L L T V H	2/26
	S P Q K L T P	1/22		G M T E P W I G Y S W L	1/26
	W M P V R S T	2/22		T I P R I T T P T S W V	1/26
	T P L G N T W	1/22		L L A D T T H H R P W T	2/26
	S A P F W K S	1/22		G P S I I P G Y L S I T	1/26
	W P Q S P T Q	1/22		L P G E K V W L H F R N	1/26
	L Q T P R P L	1/22		G P P Y W M R L P Q Y P	1/26
	H A I S P R H	1/22		S P H L F H A P L P P R	1/26
				A T W G H P R S S Q G M	1/26
				A T Y S E F P S S R R A	1/26
				L P I M A Q G A N L P W	1/26
				N V N K L T P P R T L T	1/26
				M S P S T P S P I S R P	1/26
Panning (1st)	A R E A P T R	20/22	Panning (1st)	G P L D T W R T L P F S	12/22
	G T P Y H R Q	1/22		A D M L T M F R A P R S	4/22
	I N L E R W R	1/22		N L V Q T F R L L H V P	3/22
				H P L N H W T K S I N R	1/22

(3) 選別ファージの特異性の確認 (TSA 法)

選別したペプチド配列が実際に標的の *G. aurantiaca* 菌体と特異的に結合可能か確認するため、TSA 法を利用し、選別ファージの *G. aurantiaca* に対する結合特異性を蛍光シグナルとして評価した。まず、TSA 法の実験条件を至適化するために添加するファージ濃度および

ペプチド濃度を決定した。さらに結合バッファ中に界面活性剤 (Tween20) を添加し特異性を向上させるといった試みを行った。これらの実験条件の検討の後、4 回のパンニングで得られた全53種のファージクローンの *G. aurantiaca* 菌体への特異性確認実験を行った。その結果、7-2 (WPVRST), 7-10 (TPLGNTW), 12-1 (WPHAPWGFSAFS), 12-6 (NMTAVTKLPAPW) のペプチドを提示するファージにおいて *G. aurantiaca* 菌体と特異的に結合することが示唆された。次に上記の4種のペプチドを合成し、それら合成ペプチドと *G. aurantiaca* 菌体の結合を TSA 法により再度確認した。その結果、配列 WPHAPWGFSAFS ペプチドが最も *G. aurantiaca* 菌体と特異的に結合することが判明した (Fig.2)。

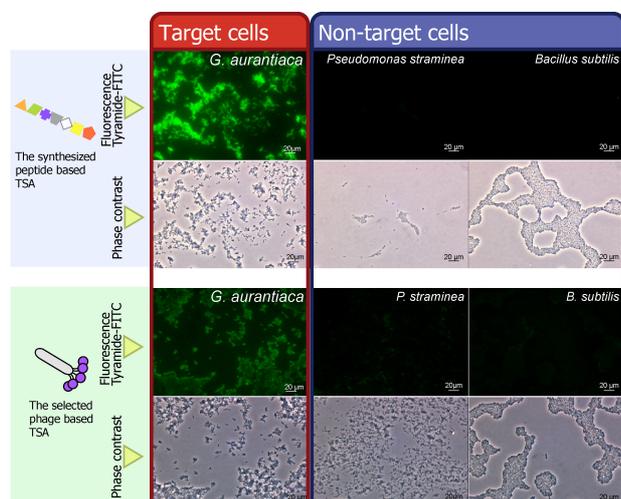


Fig.2 Tyramide signal amplification of WPHAPWGFSAFS-peptides or -phages binding to microbial cells. The two images for each organism show an identical field (upper: fluorescence, lower: phase contrast)

(4) 選別ペプチドを利用した標的菌体の回収

ペプチドと結合した菌体を回収するため、ストレプトアビジンが修飾されている磁気ビーズを利用したマグネティックセパレーション法により *G. aurantiaca* の特異的回収を試みた。はじめにペプチドを用いたマグネティックセパレーション法の実験条件を最適化するため、ビーズに結合させるペプチド濃度および実験に添加する菌体量の最適化を行った。条件検討を行い、磁気ビーズと結合するペプチド濃度を $50\mu\text{M}$ 、添加する菌体量を 10^7 cells と決定した。さらに非標的菌体の非特異的な回収を防ぐために、ビーズとペプチドを結合させた後、BSA (5mg/ml

in PBS) によるブロッキングを行った。これらの条件を設定し、マグネティックセパレーション法により *G. aurantiaca* 菌体および非標的菌体の回収を行った。その後回収した菌体 (ビーズと結合している菌体) を DAPI で染色し各菌体の回収結果を確認した。その結果、定めた実験条件下において *G. aurantiaca* 菌体が他の菌体よりも優占的に回収されていることが確認された (Fig. 3)。さらに、回収された菌体の菌数計測を行った結果、*G. aurantiaca* 菌体は、他の非標的菌体よりも 1 オーダー以上高い回収率で菌体が回収されていることが明らかとなった (Fig.4)。

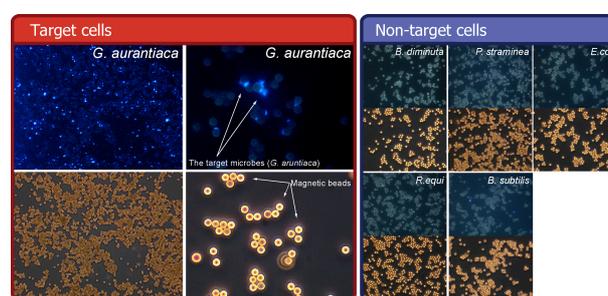


Fig.3 Magnetic separation of microbial cells with 12-1 peptide (WPHAPWGFSAFS)-conjugated beads. Microbial cells are stained with DAPI. The two images for each organism show an identical field (upper : fluorescence, lower : phase contrast). Bead diameter: 2.8 μm .

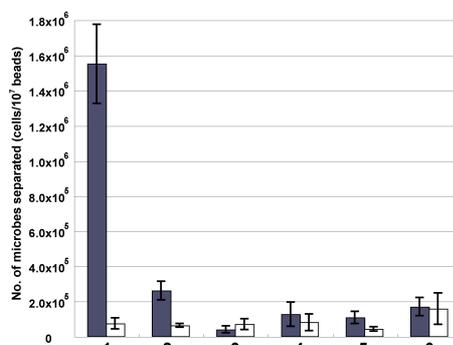


Fig.4 Number of microbial cells separated using magnetic beads coupled with 12-1 peptides (columns in blue), or without peptides (columns in white). (1) *G. aurantiaca*, (2) *B. diminuta*, (3) *P. straminea*, (4) *E. coli*, (5) *R. equi*, (6) *B. subtilis*.

(5) 回収した菌体の培養

実際に回収した菌体を培養し、*G. aurantiaca* 菌体が優占的に培養可能かを検証した。*G. aurantiaca* 菌体のみ回収を行った系、および *G. aurantiaca* 菌体と非標的菌体を 1:9, 1:99 の割合で混合したモデル複合微生物系からマグネティ

ックセパレーション法により菌体を回収した。回収したビーズ菌体複合体を希釈し、そのまま NM-1 寒天培地もしくは同ゲランガム培地にて培養を行った。ここでは、*G. aurantiaca* 菌体が回収中に死滅することを防ぐため、1) 使用するバッファーを PBS に変える、2) 界面活性剤の影響を考慮し、回収中に含まれる Tween20 の濃度を変化させて回収を試みる、3) 界面活性剤の種類を変えて実験を行う (Triton X100, NP-40)、4) 細胞に対して保護作用があると思われる物質を加えて回収を試みる、5) Tween20 を含むバッファー中で一度ペプチドを懸濁し、その後 Tween20 を含まないバッファー中で菌体の回収を試みる、といった条件検討も行った。しかしながら *G. aurantiaca* 菌体を優占的に培養することは出来なかった。回収段階においては *G. aurantiaca* 菌体は他の菌体よりも優占的に回収されているため、その後の何らかの原因によって *G. aurantiaca* 菌体が培養できないことが考えられる。また *G. aurantiaca* は低濃度 (0.05%) の Tween20 存在下でも著しく CFU が低下することが判明しており、これも *G. aurantiaca* を優占的に培養できない原因として挙げられる。さらに *G. aurantiaca* 菌体は生菌数とコロニー復帰率が相関を示さないといった現象も確認されており、必ずしも回収が行えれば即座に培養が行えるというものではないことが示唆された。

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を可能とする手法として利用可能であることを示していた。また、磁気ビーズと特異的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。本研究では標的の菌体を優占的に培養することは出来なかったが、標的とする未培養微生物が複合微生物試料中にごくわずかにしか存在しない場合などにおいては、本手法を用いて標的の未培養微生物を高純度で分離すれば、通常の培養法よりも遙かに高い確率で分離培養が行えると思われる。

[参考文献]

- Smith, GP**, Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface., *Science*, 228, 4705, 1985
- Smith, Petrenko**, Phage Display., *Chem Rev*, 97, 2, 1997
- Stratmann, J, Strommenger, B, Stevenson, K, Gerlach, GF**, Development of a peptide-mediated capture PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk., *J Clin Microbiol*, 40, 11, 2002