

バクテリオファージの新規宿主域決定技術の開発

水圏土壌環境制御研究室 岡野弘典

指導教員 大橋晶良

1. はじめに

地球上には約 10^{31} 個ものウイルス状粒子が存在していると推定されており、その大部分は原核生物に感染するウイルスであるバクテリオファージ (以下ファージと表記) であると考えられている。その膨大な存在量は、ファージが生態系全体に大きな影響を与えていることを容易に想像させるものである。このような生態系におけるファージの役割を理解していく上で重要な課題の 1 つは、ファージがどの微生物に感染するか、すなわちファージの宿主域を正確に評価する方法論の確立が挙げられると考えられる。

ファージの宿主域評価に用いられる一般的な手法は、1 世紀もの間使い続けてきた古典的なプラークテスト法である。しかしながら、この手法は純粋培養されている微生物にのみ適用可能であり、環境中に存在している未だ純粋培養されていない残り 99%の微生物は無視されていること、また溶菌を伴わない感染に対しては適用が困難である等の欠点を持っている。このため、従来法では宿主域を実際より狭く評価してしまっている可能性が極めて高い。そこで我々はプラークテスト法を含めた従来法を補う手法として、ファージの蛍光標識技術、FISH (fluorescence in situ hybridization) 法や FACS (fluorescence activated cell sorting) 技術等を併用した以下に示す新規なファージの宿主域決定技術を提案し、開発を進めている。(1) 蛍光標識したファージを複合微生物系内に投入し、宿主となる微生物を光らせる。(2) FACS を用いて、ファージに感染した光った微生物細胞を選択的に回収する。(3) 回収された微生物細胞から DNA を抽出して、16S rRNA 遺伝子を決定し、宿主微生物の種の推定を行う。(4) そのクロスチェック

として、回収されてきた微生物細胞の 16S rRNA に特異的な DNA プローブをデザインし、先の (1) の蛍光標識ファージによる微生物の検出技術と FISH 法による 2 重染色を行う。その結果、2 重染色された微生物がそのファージの宿主である事が証明される。

本提案技術を開発するために T4 ファージと大腸菌をモデルとして本手法を開発した結果および実際に複合微生物系に対して本手法を適用した結果について報告する。

2. 実験方法

手法開発にあたりモデルとして T4 ファージを用いた。最初に、ファージの標識方法の検討 (核酸染色法および GFP 提示法) を行った。核酸染色 T4 ファージによる大腸菌検出法は野上の方法に [1]、GFP (green fluorescence protein) が頭殻に提示される T4 ファージ (T4e-/GFP) を用いた大腸菌検出は Tanji らの方法に準じた [2]。FISH 法には細菌に特異的な EUB338 プローブを用いた。デスオキシコレート培地は寒天を除いた組成で用いた。

3. 実験結果および考察

3.1. 核酸染色法の検討

まず、手順 (1) に必要となる核酸染色した T4 ファージによる大腸菌の検出条件の検討を行った。その結果、 10^7 cell/mL の大腸菌培養液中に SYBR Gold で核酸染色した T4 ファージを 5×10^{10} PFU/mL となるように投入し、37 で 10 - 20 分程度感染させると、ほぼ全ての大腸菌細胞から T4 ファージ感染由来の蛍光が感度良く検出できることが明らかとなった。続いて、手順 (4) で必要となるファージの核酸標識と FISH 法による 2 重染色の確認を行った。核酸染色された T4 ファージに感染した大腸菌細胞を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定した後、FISH 法を適用した。しかしながら、T4

ファージ感染後の細胞に対する FISH 法が適用可能であることが明らかになったものの、FISH 法のハイブリダイゼーションの過程で SYBR Gold で染色されていた大腸菌細胞からすべての蛍光が失われてしまい、2 重染色できないという問題が発生した (核酸染色剤を DAPI に変更しても同じような結果が得られた)。この蛍光の褪色の原因を調査したところ FISH 用バッファー中に含まれる NaCl などが主な原因であることが明らかになった。この褪色問題の改善をいろいろと試みたが、うまく進めることができなかった。そこで、核酸染色剤によるファージの標識をあきらめ、GFP を頭殻に提示する T4 ファージ (T4e-/GFP) の本手法への適用を検討することにした。

3.2. GFP 提示法の検討

Tanji らの方法に従って、T4e-/GFP ファージを対数増殖期初期の大腸菌培養液中に MOI (multiplicity of infection) = 10 程度となるように投入し、25°C で 100 分程度感染させた。その結果、ほぼ全ての大腸菌細胞から T4e-/GFP 感染由来の蛍光が確認された。続いて、この T4e-/GFP ファージに感染した大腸菌細胞に FISH 法を適用したところ、T4e-/GFP 感染由来の蛍光を褪色させることなく FISH 法が適用可能であることが分かった。これらの結果は、GFP を頭殻に提示するファージを用いれば本提案手法の手順 (1) と (4) を行うことができることを示していた。次に、手順 (2) の FACS によるファージに感染した細胞の分取を検討するために、T4e-/GFP が感染した大腸菌細胞と非感染細胞をフローサイトメーターで解析した。その結果、両者の間に明らかな蛍光強度の差が確認された。このことは FACS を用いて宿主微生物細胞のみを特異的に分取できる可能性が高いことを示唆していた。

3.3. 複合微生物系への手法適用

手順 (1) と (4) の完成、そして手順 (2) が遂行可能だと考え、T4e-/GFP ファージを複合微生物系に適用することで、本提案手法の完成を目指した。複合微生物系として、T4 ファ

ージの宿主微生物である *Escherichia* 属や *Shigella* 属細菌が比較的多く存在していると考えられた海水 (東京湾)、池 (称名寺・横浜市)、河川水 (鷹取川・横須賀市) および下水 (長岡市) の 4 種類のサンプルを準備し、これら環境サンプルを 25°C に加温後、そのままの温度で T4e-/GFP を投入した。しかしながら、T4e-/GFP 由来と思われる蛍光を持つ微生物細胞は観察されなかった。そこで、Lysogeny Broth 培地や大腸菌群を選択的に培養できると言われているデスオキシコレート培地を用いて、環境サンプルを前培養し、その後、T4e-/GFP ファージを投入した。その結果、下水をデスオキシコレート培地で培養した液中に、T4e-/GFP ファージに感染した細胞が全細胞中の 1% 程度の割合で検出された (Fig. 1)。

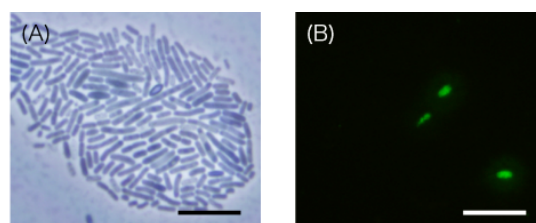


Fig. 1 Photomicrographs a enrichment culture inoculated a sewage using phase contrast (A) and fluorescent microscopy (B) indicating the infected cells by the T4e-/GFP phage for an identical field. Scale bars represent 10 μ m.

この T4e-/GFP ファージに感染し、光った細胞の分取を FACS (Becton Dickinson FACS Aria) を用いて行ったところ、宿主微生物と思われる微生物群を選択的に分取できた。さらに分取した細胞から DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子を解析した。その後、得られた情報から Blast search による相同性検索を行った。その結果、既知の宿主である大腸菌に近縁な微生物群は高濃度に回収されていることが分かった。しかしながら、既知の宿主とは離れた系統に属する微生物群も高濃度に回収されていた。以上の結果は本手法がファージの宿主域評価において非常に有用であることを示していた。

参考文献

- [1] 野上, 2000, 食品工業, 43 (14), 52-57.
- [2] Tanji Y. et al., 2004. J. Biotechnol. 114, 11-20.