

## 環境微生物の 新たな解析技術の開発を目指して

独立行政法人産業技術総合研究所

環境管理技術研究部門

グループ長

鳥村

政基



1 はじめに  
環境分析技術の分野においては、種々の高精度分析技術が開発され、環境中に放出された化学物質を精度良く測ることが可能になってきた。一方で、環境の主役として存在する微生物の分析に目を向けてみると、残念ながらその技術はまだ未熟であると言わざるを得ない。「近年の分子生物学的手法の発展でその問題は解決されているのでは？」と思う方々も多いかも知れない。名前がついた既知の微生物についての分析では、こうした分子生物学的手法も威力を発揮する。このことは抗原抗体反応を利用した種々の分析方法にも当てはまる。しかし、近年認知されている「環境中に実際存在する微生物種のほとんど（99%以上）が培養困難な微生物」から考えるに、本当の意味での

環境微生物解析の技術開発はこれからとも言える。

環境微生物の解析とは、わかりやすく表現するならば「どんな微生物が何匹いるか？」を知ることである。生活環境（食品を含む）や医療の現場では、有害無害有用を問わず微生物の検査手法の必要性が高い。検査と言っても、微生物の場合、複数の他の微生物と複合系を構築して存在している場合が多い。また、医療の現場における有害菌の場合にはその微生物は（遺伝子が残っていても）死んでいれば問題ないが、食品生産における主役を担う微生物では生きてもらわなければならない。すなわち、その診断には「どんな微生物が何匹いて、それは死んでいるのか生きているのか？」までを提示できる能力が要求される。

これまででも、また現在も微生物計測技術として培養法が利用されている。これは、培養できる菌がそもそも1%以下しか存在しないことから

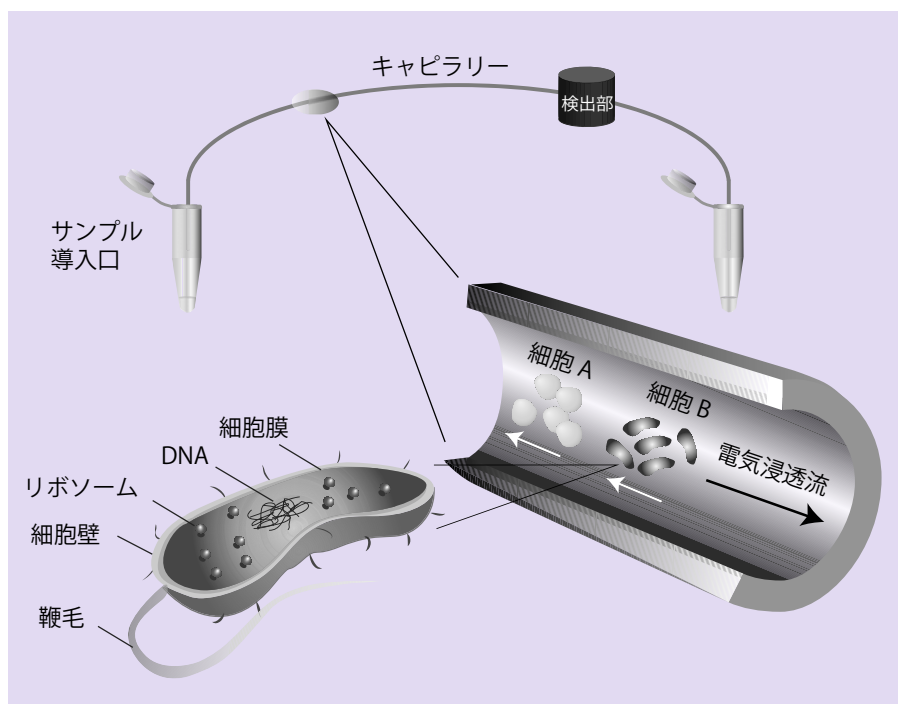


図1 キャピラリー電気泳動を用いた微生物分離の概念図

### 著者略歴

- 1999年 京都大学大学院農学研究科博士課程修了(博士(農学))
- 1999年 工業技術院生命工学工業技術研究所 NEDO産業技術研究員
- 2001年 独立行政法人産業技術総合研究所 環境管理研究部門 研究員
- 2006年 独立行政法人産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門 主任研究員
- 2010年 独立行政法人産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門 グループ長

### 主な学会活動

- 日本分析化学会 電気泳動分析研究懇親会(委員)
- 日本ポーラログラフ学会 (評議員)

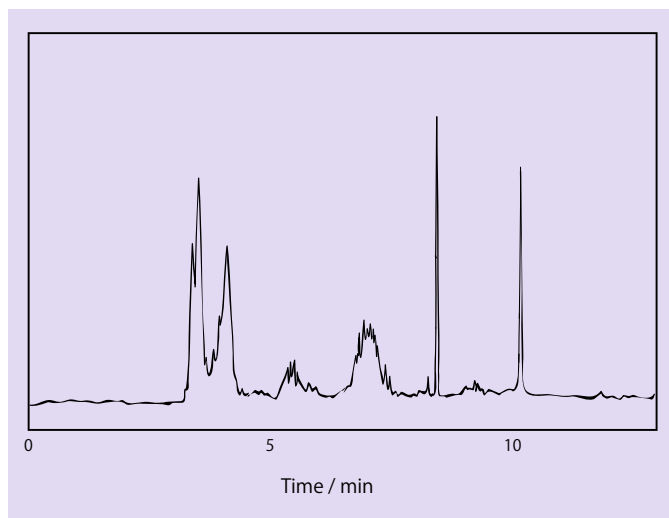


図2 10種類のモデル微生物サンプルの分離エレクトロフェログラム

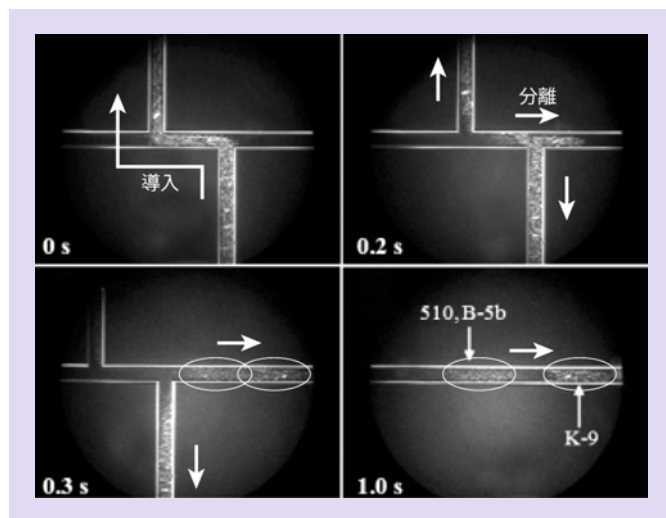


図3 マイクロチップ電気泳動による乳酸菌と酵母の分離の様子

考えれば、残り 99%以上の微生物は本法での計測対象になり得ない。また、分子生物学的手法として微生物の持つ特定遺伝子配列を測定する方法では、前出の培養法とセットで行われるケースも多いが、その場合には測定結果に2つの大きなバイアスがかかる。一つは培養であり、ひとは遺伝子増幅反応である。前者は生死判別の根拠にはなるが、生死の割合の議論ができない。後者は増幅反応の設計図の書き方にも依存するが、共存物質の影響も生じるバイアスの大きさを左右する。また、微生物の細胞表面層を抗原として、抗原抗体反応に基礎を置く測定方法が各種開発されている。

これらの技術はすでにいろいろな場面で活躍しているが、未知微生物の解析にまで踏み込んだ手法とはなり得ない。我々はこれまで、こうした手法とは異なる原理に基づく解析法の構築を目指してきた。微生物を分離する技術、そして同定する技術、さらにそれらを組み合わせた方法について検討してきたことの一部をここで紹介したい。

## 2 微生物細胞の分離技術

微生物の表面には各種糖タンパク質ポリマーが存在しており、生理的環境下においてはマイナスの電荷を帯びている。キャピラリー電気泳動(CE: Capillary Electrophoresis)が持つイオン化学種に対する高効率分離技術をそのまま微生物細胞のような生きた荷電粒子に適用してみてもどうだろう(図1)。最初の我々の試みは分離効率という意味ではあまり芳しくなく、実験モデルの大腸菌と他のモデル微生物を分離するには至らなかったが、キャピラリー内部で電場の中を泳動する微生物細胞の生命活動を同時に観察することに成功した<sup>1)</sup>。

その後、微生物細胞の分離効率を向上させるために種々検討したところ、泳動液に微量の陰イオンポリマーを添加することにより飛躍的に分離効率を高めることができることを見出した<sup>2)</sup>。ただし、これらのポリマーの添加効果も万能とは言えず、効果が認められる微生物とそうでない微生物がある。図2に実験室で準備した10種類のモデル微生物を混合したサンプルを分離した例を示す。こ

のエレクトロフェログラムからわかるように、ピーク形状がシャープなものもあれば、非常にブロードでポリマー添加前と比べて変化のないものもある。この条件では、10種類の微生物のうち6種類くらいは分離できているが、残りの4種類程度はピークが完全に重なっているものと考えられる。

小さなガラス板などに溝をつかってこれを電気泳動の分離場として用いるマイクロチップ電気泳動の技術も、多くのアプリケーションが蓄積されてきている。我々もマイクロチップでの微生物の迅速分離を試みた<sup>3)</sup>。マイクロチップでは注入エリアに導入された微生物の混合物が分離されるプロセスを顕微鏡下で観察することができるが、ここではわずか1秒間で、乳酸菌(*Streptococcus thermophilus* 510, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-5b)と酵母細胞(清酒酵母 K-9)が完全分離されることが確認できた(図3)。このように、分離条件を最適化することで目的微生物の迅速分離を達成できる。一方、おそらく表面構造が似て

いる乳酸菌同士の分離はなかなか困難であり、これらを分離するためには細胞表層の電荷だけでなく他の特徴を利用した分離技術の導入が必要となる。

### 3 微生物細胞の同定技術

このように何らかの形で分離できた微生物細胞が、どんな微生物なのかをできる限り簡便に知ることはできないだろうか。顕微鏡での形態学的観察からは、その微生物を完全特定することはまず不可能である。その微生物を特徴づけるものとして、あらゆる微生物がその細胞内に大量

に保有するリボソームタンパク質が着目されている。これらのタンパク質は細胞を破碎すれば細胞外に取り出すことができる4~20kDaの塩基性タンパク質である。株間でも保存性の高いタンパク質と変異があるタンパク質の混合物として、サブユニットを形成しタンパク質工場として機能している。これらのタンパク質をマトリックス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型質量分析法(MALDI-TOFMS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry)で分析することで、

高い精度で微生物を同定することができる。

MALDI-TOFMSで得られるスペクトルのピークパターンは、既知微生物から予め取得して蓄積したスペクトルライブラリーのスペクトル群と比較して、類似度の高いパターンを探すことにより同定する方法が主流である。現在市販されているMALDI-TOFMSを用いた微生物同定システムもこの方法が採用されている。既知微生物の解析においては、迅速かつ簡便な技術である(図4)。

我々はこの技術の簡便性を継承しつつ、より高い同定精度と未知微生物

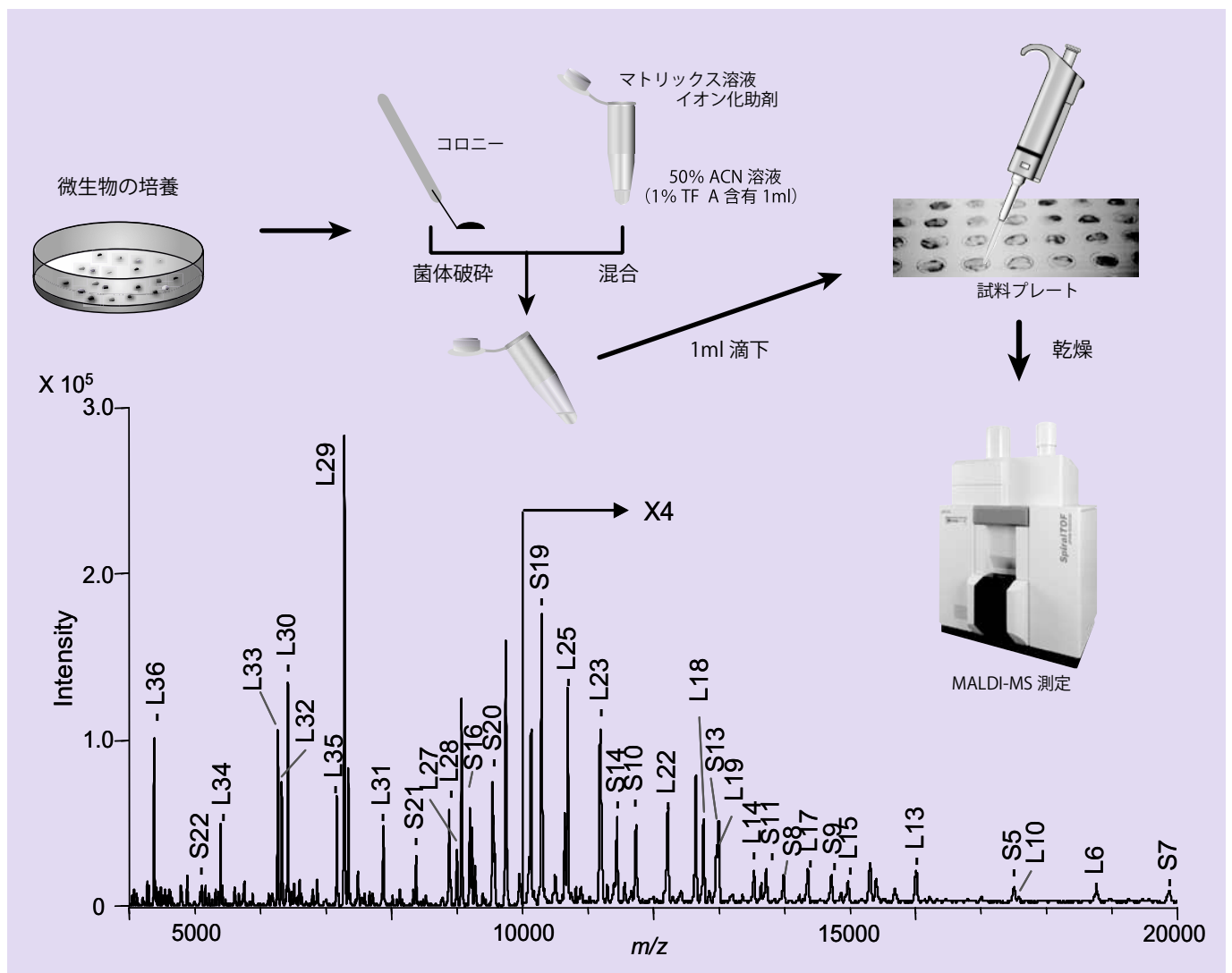


図4 培養微生物のMALDI-TOFMS同定の測定手順と大腸菌のスペクトル

物への適用性を獲得するために、上述のリボソームタンパク質の解析手法にゲノム情報から得られる翻訳タンパク質情報を有効利用する方法を導入した。これにより、破碎した微生物細胞から得られるピークのほとんどがリボソームタンパク質であることを証明した<sup>4)</sup>。このことは、図4の大腸菌の質量ピークにマークしたL36やS22などのリボソームタンパク質の割り当

てからも確認できるが、観察されるほとんどのピークを特定できる。これらのスペクトルパターンから微生物の分類も可能であり、この方法で分類した系統樹はこれまで汎用されている特定領域のDNA配列や特定酵素活性の有無などから得られる結果と高い相関性を示した<sup>5)</sup>。

こうしたポテンシャルは、未知の微生物への適用性を示しており、ゲノム解読されていない微生物の解析だけでなく、培養不可能な微生物を分類するための簡便な方法と期待される。解析に必要な細胞数が現状よりも飛躍的に少なくなることが、この技術の発展において大変重要である。

## 4 分離同定技術へ

微生物のCE分離技術とMALDI-TOFMS同定分類技術は、組み合わせることで両技術の可能性を大きく高めることができる。例えば、分離が不十分な微生物もMALDI-TOFMSにより解析できるようになると期待できる。両技術をつなぎ合

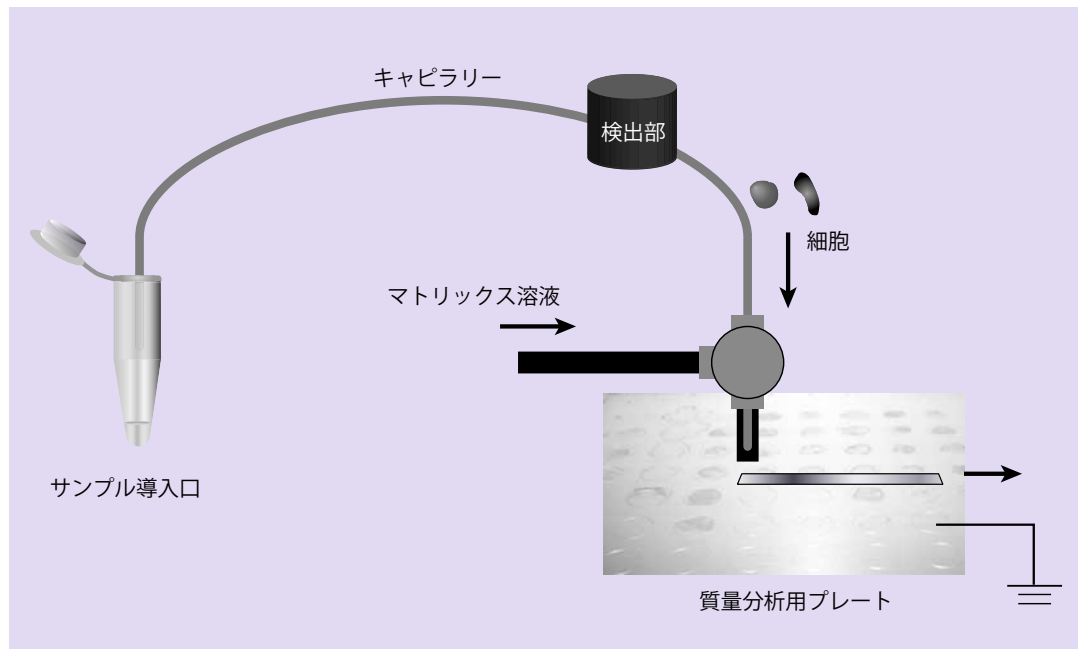


図5 迅速微生物解析用に構築したキャピラリー電気泳動とMALDI-TOFMS

わせる方法論としてはさほど難しくはない。図5に示すように、キャピラリーの出口をアースしたMALDIの基板に置き換え、さらに泳動してくる細胞はマトリックス試薬と混和されるように準備する。マトリックス試薬の溶媒に泳動してきた細胞が接すると、細胞が崩壊して内部のリボソームタンパク質が細胞外に漏出し、同時にプレート上で塗布乾燥される<sup>6)</sup>。

しかし、問題は上記溶剤と混和するだけで細胞を崩壊できるのは、微生物の中でも比較的細胞壁がやわらかいグラム陰性菌などに限られ、グラム陽性菌や酵母などの硬い細胞には適用が難しいことである。硬い微生物にも適用可能な、簡便かつより汎用性の高いインターフェースを構築することが次の課題になっている。

## 5 おわりに

土の中の微生物を一個つり上げてきて、10分後にはその微生物が何であるかを知ることができる。これ

は現時点ではまだ夢の話かも知れない。こうした環境微生物の次世代解析技術は、医療や衛生、産業技術などの幅広い分野における夢のプラットフォーム技術でもある。まだまだ克服すべき課題は山積みであるが、少しでも少ない細胞数で、少しでも短い時間で解析できる技術へ発展させていきたい。

## 文献

- 1) M. Torimura, S. Ito, K. Kano, T. Ikeda, Y. Esaka, T. Ueda, *J. Chromatogr. B*, **712**, 31-37 (1999).
- 2) T. Shintani, K. Yamada, M. Torimura, *FEMS Microbiol. Lett.*, **210**, 245-249 (2002).
- 3) T. Shintani, M. Torimura, H. Sato, H. Tao, T. Manabe, *Anal. Sci.*, **21**, 57-60 (2005).
- 4) K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao, *J. Proteome Res.*, **6**, 3899-3907 (2007).
- 5) K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao, H. Toshikawa, Y. Hotta, A. Hosoda, H. Tamura, *Anal. Chem.*, **79**, 8712-8719 (2007).
- 6) 特開2006-126039「細胞の分離、同定装置及び方法」