



pH-gradient ion-exchange microbial cell chromatography as a simple method for microbial separation

新規な微生物細胞分離法である pH 勾配イオン交換
微生物細胞クロマトグラフィーの開発

(JBB, Vol. 123, No. 4, 431–436, 2017)

青井 議輝^{1*}・金子 裕司^{2a}・常田 聡²

環境中には膨大な未知微生物が存在するが、それらの機能の解明や資源として開拓することは、多様な分野における重要課題である。しかし、多くの微生物は難培養性であるために、それらの利用や機能解明には技術的に多大な困難が伴う。そこで、分離ターゲットとなる微生物を選択的に分離・濃縮する新しい方法論を確立することができれば、さまざまな難培養性微生物の培養化に寄与するという着想が、本研究のモチベーションとなっている。

一方で、多種多様な微生物細胞が混在するサンプルから特定の微生物細胞だけを選択的に分離・濃縮することは微生物学分野の研究や発酵工学分野においても普遍的に重要なプロセスであるが、通常は微生物の増殖（培養操作）に依存することが多く、培養操作に依存しない簡便・迅速・高精度に達成する方法論は十分に確立されていない。さらに、化合物の分離と同様にクロマトグラフィーに立脚した各種微生物分離方法を確立することで、上記の課題の解決につながると見込まれるが、幅広い不特定の微生物種に適用可能な手法はほとんど開発されておらず、分離性能などについても十分に評価されていない。

そこで本研究では、微生物細胞の種類ごとに異なる表面電荷の差異を利用して特定の微生物細胞を生きたまま分離する、pH勾配型のイオン交換クロマトグラフィー（pH-gradient ion-exchange microbial cell chromatography: PIE-MCC）を開発した。さらに、同手法の分離性能や環境微生物を含めた幅広い微生物種への適用性を評価した。

PIE-MCCを用いた微生物細胞の分離では、微生物細胞と担体の脱着をランニングバッファー中のpHの変化により制御することで行う。さらに微生物細胞の種類によって細胞表面の特性（ゼータ電位など）が異なると想定されるため¹⁻³、複数の微生物種が混在するサンプルから特定の微生物を分離することが可能となる。

具体的な操作手順は以下のステップで構成されている。1) 低pH条件下での担体（ガラスビーズ）が充填されたカラムへの微生物懸濁液の流入（吸着）。2) 分離液のpHの連続的な上昇（脱離）とフラクションコレクターを用いた溶出サンプルの回収。3) 各フラクションにおけるカラム流出液の吸光度の測定（全微生物濃度）と、FISH法を用いた目的微生物の優占率変化の定量的解析である。

筆者らは、①モデル微生物（純粋菌株）数種類を用いた分離特性の評価、②異なる数種の微生物がさまざまな比率で混合されているサンプル（混合系）からの特定微生物の分離、および③活性汚泥中（環境サンプル）からのいまだ純粋菌株が得られていないポリリン酸蓄積細菌（*Accumulibacter phosphatis*）の分離・濃縮を試みた。

それらの結果、表面特性に応じてモデル微生物は種類ごとに異なったクロマトグラフを示し、混合系サンプルでは各微生物を高度に分離可能であることが確認された（混合比によってはほぼ純化できることが示唆された）。また、環境サンプルを用いた場合でも目的微生物の選択的な濃縮を達成した。これらの結果から、PIE-MCCは目的微生物を選択的に濃縮する手法としてきわめて有効であると考えられた。

以上の成果より、多様な微生物細胞をクロマトグラフィーにより分離することが可能であることが示唆されたため、今後、複数の分離原理に基づくクロマトグラフィーの開発とそれらを組み合わせることで、手法の有効性はさらに高まると期待される。

- 1) Hermansson, M.: *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **14**, 105 (1999).
- 2) Rijnaarts, H. H. M. et al.: *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **4**, 191 (1995).
- 3) Hayashi, H. et al.: *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **22**, 149 (2001).

*著者紹介 広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻（准教授） E-mail: yoshiteruaoi@hiroshima-u.ac.jp

¹広島大学大学院先端物質科学研究科、²早稲田大学大学院先進理工学研究科、^a現、キリンビール株式会社
生物工学 第97巻 第2号（2019）