

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15091

研究課題名(和文) エマルジョンドロップレットを用いた環境難培養性微生物の培養システム開発

研究課題名(英文) Development of new culture system using emulsion drop for the environmental BNC microbiome

研究代表者

田代 康介 (TASHIRO, Kosuke)

九州大学・農学研究院・准教授

研究者番号：00192170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：環境微生物培養システムとしてエマルジョンドロップ培養システムの応用可能性を検討した。まず、エマルジョンドロップの作成条件を確立後、大腸菌や酵母などの培養が可能であること示した。次に、エマルジョンドロップにおいて培養した土壌環境微生物叢をメタゲノム解析した結果、環境難培養微生物叢の増殖が確認された。すなわち、エマルジョンドロップ培養システムは環境微生物解析の新領域を拓く技術であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：We examined the application possibility of emulsion drop culture system for environmental BNC (viable but non-culturable) microbiome. First, we established the method to produce the emulsion drop stably and then showed the growth of *E. coli* and yeast in emulsion drop. Next, when the microbiome flora in the emulsion drop in which the environmental soil microbiome were enclosed were analyzed by 16S rDNA NGS analysis, the growth of environmental BNC (viable but non-culturable) microbiome were detected. This indicated the emulsion drop system is new technology for analyzing the environmental microbiome.

研究分野：分子生物学

キーワード：エマルジョンドロップレット 微小培養 環境微生物 難培養性微生物 ミリオンスケール

1. 研究開始当初の背景

地球上の環境や生態系を実質的に支えているのは微生物である。それゆえ、微生物の多様性や機能を解析することは重要な課題であるが、人工的に培養して生態系や動態を解析できる微生物は環境微生物の1%以下と推定され、ほとんどは難培養性微生物である。次世代シーケンス手法(NGS)の応用によるメタゲノム解析によってゲノムDNAシーケンスレベルでは難培養性微生物の存在が同定されるようになってきたが、タンパク質レベルやメタボライトレベルでの解析は未だ不可能である。単なるDNAシーケンスとして存在する微生物ではなく、生存し、活動する微生物の本質を解明するには、難培養性微生物の培養・解析システムが必須である。

最近、微生物が生息する環境中に存在する環境成分の添加によって環境中の難培養性微生物が培養できることが報告されている(Nature, 517: 442 (2015))。しかし、環境から採取できる環境成分は極微量であり、実験室での利用はほぼ不可能である。近年、分子生物学分野において、オイル溶液中に調製したエマルジョンドロップを1分子DNA鋳型としたPCRの反応などに利用する手法が開発され、さらに、極微量溶液から任意のサイズのエマルジョンドロップの作成が可能な装置(On-chip 社)も開発された。これを、環境中から採取できる微量環境水を用いた培養系に利用することで難培養性微生物の培養が可能になるのでは、という発想が本申請の着想の基盤である。

2. 研究の目的

(1) 微生物培養を可能にするエマルジョンドロップ調製手法の確立: 微量な水溶液からwater in oil型のエマルジョンドロップを作成する手法は開発されているが、これに微生物を封入し、微生物の培養を可能にするプロトコルは確立されていない。そこで、微生物培養が可能なエマルジョンドロップの作成手法を確立する。

(2) 環境(土壌)微生物調製手法と環境成分などを用いた環境難培養性微生物培養手法の確立: 土壌微生物の調製手法は様々行われている。ここでは、安定的に採取し、また、微生物を含まない環境成分の調製手法を確立する。

(3) エマルジョンドロップにおいて培養できる微生物集団をメタゲノム手法によって同定し、培養可能となった新規環境微生物を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 培養用エマルジョンドロップ作成

On-chip 社 Droplet Generator を用いて、エマルジョンドロップを作成する。封入する溶液は、LB 培地、GYP 培地を用い、また、

オイルとしては、ミネラルオイルベース及びフッ素化オイルベースを使用した。

検討項目は、エマルジョンドロップのサイズ、エマルジョンドロップの密度、添加オイル量、培養容器形状(表面処理)、培地組成(主に、グルコース量)である。

(2) 環境微生物の単離と環境微量成分を含む溶液の調製

大学敷地内土壌を材料として、10g 土壌を10ml PBS や用いる培地に懸濁後、10 分間放置後の上澄みやメンブレンを用いたフィルトレーションによって得られる溶液を環境微生物調製溶液とした。調製した微生物数は、顕微鏡観察及び DAPI 染色として計測した。

この環境微生物溶液を 0.22 ミクロンフィルターにてろ過した溶液を環境微量成分を含む溶液とした。

(3) エマルジョンドロップにおける微生物培養

エマルジョンドロップに封入した微生物は、大腸菌、酵母、乳酸菌などの場合は、30 において聖地培養した。また、土壌環境微生物の場合は、25 にて静置培養とした。エマルジョンドロップ内での微生物は位相差顕微鏡によって観察した。

(4) エマルジョンドロップにおいて増殖した微生物の DNA による菌叢解析

エマルジョンドロップからの微生物 DNA は、PowerSoil DNA extraction Kit (Quiagen) を用いて提供プロトコルに従って実施した。また、菌叢解析は 16SrRNA の V3 V4 領域を PCR によって増幅後、Illumina Miseq を用い 1300bp X 2 のシーケンスリードを得た後、RPD による解析を行った。

土壌を培養液や緩衝液中で破碎し、夾雑物を除いた微生物分画

土壌を適当な培養液に懸濁後、数日間の培養によって得られる微生物分画の作成条件を確立する。本装置は、2 つの流路から水溶液を供給して 2 種類の溶液を混合したエマルジョンドロップ作成が可能である。様々な培養条件に対応したエマルジョンドロップの作成を可能とするために、2 つの流路の流速を調製し、50 ~ 200µm サイズのドロップ調製条件や 2 つの溶液の混合比率を変化させる条件を確立する。

4. 研究成果

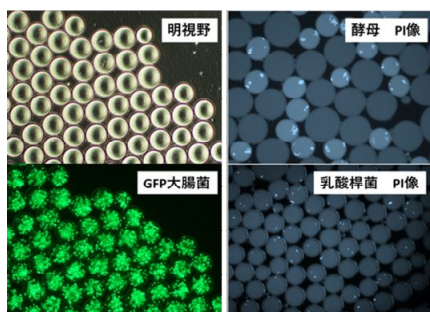
(1) エマルジョンドロップ作成手法の確立
まず、ミネラルオイルベース及びフッ素化オイルベースの 2 種類のオイルを用いたエマルジョンドロップに関して、流速など作成条件を詳細に検討した。その結果、両オイル共に、直径 10 ~ 100 ミクロン程度のエマルジョンドロップの作成に成功し、作成条件

を確立した。

続いて、作成したエマルジョンドロップの安定性などに関して微生物培養を想定した温度条件で検討した。その結果、ミネラルオイルベースのエマルジョンドロップは、7日間は安定であるがその後急速に不安定になるのに対して、フッ素オイルベースは1ヶ月以上安定に保持されることなどが明らかとなった。これにより、長期間の培養を想定している環境微生物培養においては、フッ素化オイルベースが最適であると判断した。

(2) エマルジョンオイルドロップにおける微生物培養

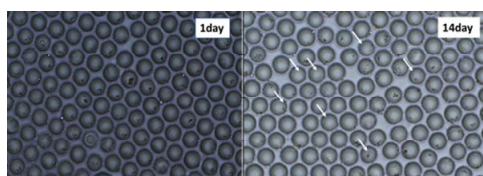
エマルジョンドロップを用いて、大腸菌、酵母、乳酸菌、放線菌などを封入し、培養の可能性を検討した。結果を下図に示したが、GFP発現大腸菌、PI染色乳酸菌、PI染色乳酸桿菌など、検討したすべての実験室株菌の増殖が確認され、エマルジョンドロップによる微生物培養が可能であることが判明した。



この成功は、エマルジョンドロップの培養システムがミリオンスケールの培養システムであることから、これまでにない大規模なスクリーニングシステムの構築が可能であることを示している。

(3) エマルジョンドロップを用いた土壌環境微生物培養

土壌から微生物培養プロトコルを検討し、ろ紙及びフィルターを用いたろ過法によって再現性の高い調製手法を確立した。これによって調製した土壌微生物を DAPI 染色によって微生物数を測定後、エマルジョンドロップの1ドロップあたり数個の微生物が封入される濃度でエマルジョンドロップを作成し、25℃において培養を行った、その結果の位相差顕微鏡像の例を以下に示した。



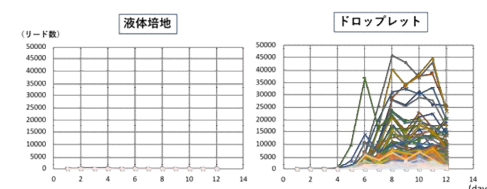
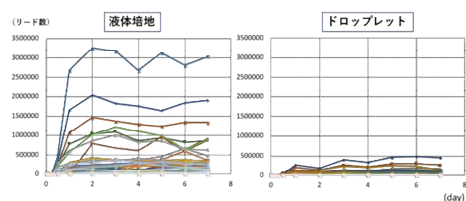
右図矢印で示したように、明らかに微生物の増殖が認められる微生物の増殖像が検出され、エマルジョンドロップ中で土壌微生物の増殖できる可能性を示された。また、続き

て、様々な微生物用培地を用いた培養実験を実施した結果、培地によって増殖が検出されるドロップの顕微鏡像が異なることから、培地による選択性も起きることも明らかとなった。さらに、抽出した環境成分を添加した培地でも増殖特性も大きく変化することが判明した。

(4) エマルジョンドロップ培養において増殖する微生物叢解析

顕微鏡観察によってエマルジョンドロップ内での微生物の増殖が確認されたため、次に、増殖した微生物叢を 16S rDNA メタ解析によって、同定し、増殖微生物の特性を解明した。

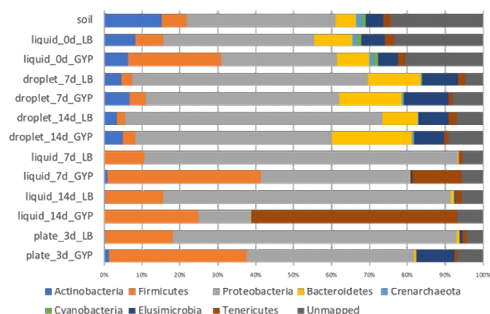
エマルジョンドロップからの微生物ゲノム DNA 抽出は、土壌微生物 DNA 抽出用のプロトコルである Quiagen 社の PowerSoil 1 DNA Extraction Kit によって最も効率的に実施できる。エマルジョンドロップから直接上記キットを用いて DNA 抽出した後、16SrDNA V3-V4 領域 (460bp) を PCR 増幅後、次世代シーケンサー (Miseq, Illumina) によって解析し、さらに、RDP を用いた菌叢解析を行った。



その結果、同じ土壌微生物を用いて通常の振盪培養を実施した系 (上図左上) では、検出される多くの菌が 1~2 日で非常に高い存在量を示すのに対して、ドロップ培養 (左上) では、それらの存在量は低く抑えられていることからドロップ内の限られた空間に限定して増殖していることを示している。一方、ドロップにおいてのみ検出される菌種 (右下) も多く存在し、それらの増殖は 6~8 日目以降に検出されることから、従来の振盪において増殖ができない増殖速度が遅い菌がドロップによって増殖の早い菌種から隔離され、増殖が可能になったことを示している。これまで、増殖が遅く検出されなかった難培養性の菌種の培養が可能であることを示すものである。

次に、液体振盪培養、寒天培養、エマルジョンドロップ培養において増殖する菌叢を門レベルで解析した結果を下図に示した。振盪培養及び寒天培養では、調製した土壌微生物中に検出された Actinobacteria,

Bacteroidetes, Crearchaeota, Cyanobacteria Elusimicrobia は、振盪培養及び寒天培養では、減少するのに対して、エマルジヨンドロップ中では、維持されていることが明らかとなった。



以上の結果から、環境中の難培養性微生物の培養を可能にする系として提案したエマルジヨンドロップ微生物培養系は、期待以上にこれまで培養不可能であった微生物の培養を可能にする系であることが判明し、期待を上回る成果を得たと判断している。

今後、本システムを応用して、ミリオンレベルのスクリーニングシステムの構築、難培養微生物の培養システムの完成、環境微生物の動態と新規微生物の同定、などを進める段階にあると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計4件)

村井 雄大、森田 直樹、土居 克実、久原 哲、田代 康介、エマルジヨンドロップレットを用いた微生物培養法、日本農芸化学会2018年度大会、2018年

村井 雄大、森田 直樹、土居 克実、久原 哲、田代 康介、エマルジヨンドロップレットを用いた微生物培養法、第40回日本分子生物学会年会、2017年

村井 雄大、森田 直樹、土居 克実、久原 哲、田代 康介、エマルジヨンドロップレットを用いた微生物培養法、第69回日本生物工学会大会、2017年

村井 雄大、森田 直樹、土居 克実、久原 哲、田代 康介、エマルジヨンドロップレットを用いた微生物培養法、第54回化学関連支部合同九州大会、2017年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.kyushu-u.ac.jp/lab/mogt/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 康介 (TASHIRO, Kosuke)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：00192170