

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19218

研究課題名（和文）寒天平板培養法の問題点を排除した未培養微生物の実用的な単離培養法の開発

研究課題名（英文）Development of isolation and cultivation methods for uncultivable microbes

研究代表者

青柳 秀紀（Aoyagi, Hideki）

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00251025

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：寒天平板培養法の問題点を解消した未培養微生物の実用的な単離培養法（培養基材）を開発した。土壌などの試料を、開発した本培養基材、寒天平板培地で培養後、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法で培養微生物群集を比較解析した結果、本培養基材でのみ得られる微生物の存在が示された。各培養法で得られた微生物叢の多様性を調べた結果、本培養基材は他の培養法よりも高い割合で新規微生物を培養化できることが示された。検討の結果、本培養基材は寒天平板培地と比較して培養微生物群集の多様性が保たれていた。試料の種々の前処理を適切に活用することで、培養化される未培養微生物の多様性を増大できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した培養基材は、寒天などのゲル化剤を使用せず、経済性、素材の品質や均一性、操作の簡便性、実用性に優れ、多くの未培養微生物の単離培養が期待できる。閉塞状態にある微生物関連産業界の活性化への貢献や、国内外の産官学の様々な微生物分野（生物工学、応用微生物学、海洋微生物学、病原微生物学、食品微生物学、環境微生物学、極限環境微生物学、腸内細菌学など）で有用性が高い。また、簡便性も高く、未培養微生物資源が豊富なアジアやアフリカなどの現地でも使用可能である。本培養基材の利用性、応用性は拡がりがある。

研究成果の概要（英文）：A feasible cultivation method for uncultivable microorganisms was developed.

This culture method aimed at solving the limitations of agar plate culture method. After cultivation from environmental samples such as soil by the developed culture method and agar plate culture method, the grown microbial communities were compared by the denaturing agent gradient gel electrophoresis method. Results showed that the uncultivable microbes in the agar plate method could be successfully grown with the developed cultivation method. In contrast to the conventional culture methods, this method was able to cultivate a higher ratio of new microbes. Moreover, the developed cultivation method maintained a more diverse microbial community as compared to the agar plate culture method. Further investigations on the cultivation method and applications of pretreatment of samples, enhance the diversity and growth of microbes.

研究分野：生物化学工学、応用微生物学、培養工学

キーワード：未培養微生物 微生物ダークマター 寒天平板培養法 特殊セルロースシート 培養基材

1. 研究開始当初の背景

約100年前にパスツールやコッホらにより確立された微生物純粋培養法により、多くの有用微生物が自然界からスクリーニング、単離培養され、医薬品、食品、化成品、有用酵素などの製造に用いられることで微生物関連産業は大きく発展してきた。自然界から微生物を単離培養する際、一般的に寒天平板培養法が世界中で使用されている。しかしながら、近年、遺伝子情報をベースにした分子生態学的解析により、“寒天平板培養法では自然界に存在する微生物の1%程度しか単離培養できない”ことが示された。また、微生物関連産業界でも新規有用微生物が獲得されにくくなっていることが大きな問題になっている（現在、従来法を基盤に発展してきた微生物関連産業は閉塞状態にあり、従来法の問題点を排除した新規培養法の開発が求められている）。

残された99%の未培養微生物資源の活用を目指し、次世代シーケンサー等を活用した網羅的な環境ゲノム解析が国内外で盛んに行われているが、塩基配列だけでは分からない未知の微生物機能の解明や実用的利用をおこなう場合、実際に未培養微生物の単離培養が必要になる。このような現状から、現在、従来法の問題点を排除した新たな培養法の実用化が求められている。これまで国内外で種々の培養法が開発されてきたが、実用面などに問題があり、普及していない。

2. 研究の目的

上述の研究の背景と現状を踏まえ、本研究では、寒天平板培養法の問題点を排除した未培養微生物の実用的な単離培養法（培養基材）の開発を試みた。さらに、開発した培養基材を用い、様々な環境試料を対象に、従来法では困難であった未培養微生物の培養化に挑戦した。

3. 研究の方法

寒天平板培養法の問題点を排除した未培養微生物の実用的な単離培養法（培養基材）の開発を目指し、2種類のセルロース素材（特徴：品質が均一でロット差が少なく安価）を用いた、新規有用微生物単離培養基材

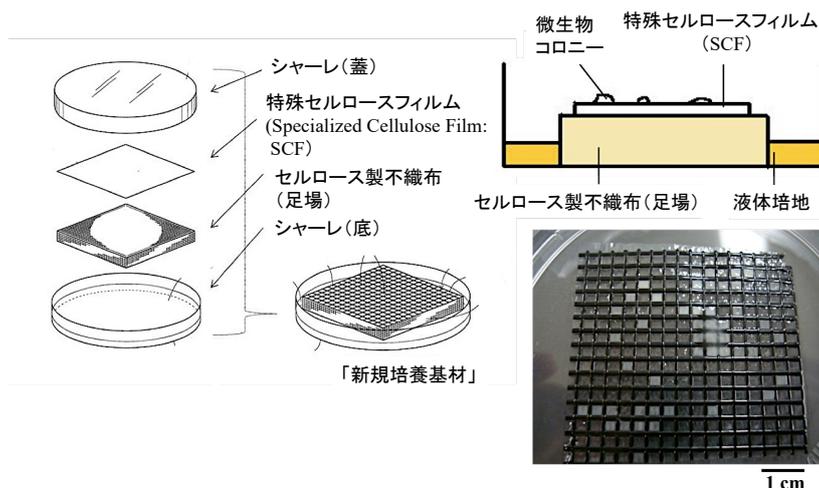


図1. 新規培養基材（Specialized Cellulose Film [SCF] 法）の概念図。

（図1）を考案、開発した。種々の微生物の培養実験を通じて特殊セルロースシートを活用した培養基材の諸条件の最適化について検討をおこなうとともに、各種の比較培養実験をおこない、本培養基材の有効性を評価した。

4. 研究成果

土壌の試料を、開発した本培養基材（図1）や、寒天平板培地で適宜、培養後、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法で培養微生物群集を比較解析した結果、本培養基材でのみ得られる培養微生物の存在が示された（図2）。また、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法で検出されたバンドの塩基配列を解析し、各培養法で得られた微生物叢の多様性を調べた結果、本培養基材は他の培養法よりも高い割合で新規微生物を培養化できることが示された。海水や植物などの試料についても同様に検討をおこなった結果、本培養基材でのみ得られる培養微生物の存在が示され、本培養基材の幅広い試料への適用性や有効性が示された。

土壌試料中の微生物群集とその培養により得られた培養微生物群集を次世代シーケンサーにより比較解析した結果、本培養基材は寒天平板培地と比較して培養微生物群集の多様性が保たれていた。また、環境試料に種々の前処理を適切に適用することで、培養化される未培養微生物の多様性を増大できることが示唆された。

寒天平板培地は酸性条件下では使用が困難であるという問題点に着目した。はじめに、寒天ゲルの弾性値を指標として、大腸菌を用い、コロニーの形状を保持できる寒天平板培地の強度の限界を測定した。種々検討した結果、限界弾性値として、27.8 kPa が設定された。種々の pH の寒天平板培地を調製し、弾性の経時変化を測定した結果、pH 1 の寒天平板培地を使用できる期間は3日以内であることが示された。この問題の解消法として本培養基材の特長（強酸性条件下でも長期間の使用可能）を活かした好酸性微生物や耐酸性微生物の高効率なスクリーニング系を構築し、効率的に好酸性微生物や耐酸性微生物を取得することができた。

以上の検討の結果、本培養基材は新規微生物単離培養法として有効であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計8件）

- ① Chikara Takano, Hideki Aoyagi, Screening and isolation of acid-tolerant bacteria using a novel pH shift culture method. *J. Biosci. Bioeng.*, **134**, 521-527 (2022).
- ② Hideki Aoyagi, Ryo Saitoh, Kouichi Murayama, Development of culturing and isolating device for microbes using cellulose film. *J. Microbiol. Methods*, 195, 106450 (2022).
- ③ Kazuki Kobayashi, Hideki Aoyagi, Microbial community structure analysis in *Acer palmatum* bark and isolation of novel bacteria IAD-21 of the phylum *Abditibacteriota* (former candidate division FBP). *PeerJ* DOI 10.7717/peerj.7876 (2019).
- ④ Masato Takahashi, Hideki Aoyagi, Monitoring of CO₂ and O₂ concentrations in the headspace of Sakaguchi flasks during liquid culture of microorganism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 査読有、102, 2018, 6637-6645.
- ⑤ 高橋将人, 青柳秀紀, 従来の微生物培養法の生物化学工学的解析とその利用、日本放線菌学会誌、査読無、32, 2018, 25-26

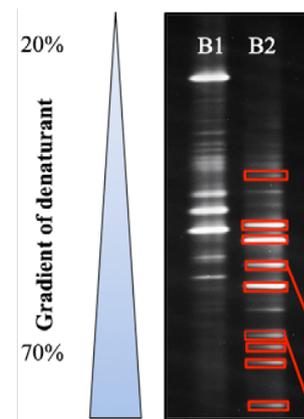


図2. 土壌の試料を寒天平板培地 (B1) と本培養基材 (B2) で培養して得られた培養細菌叢の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (PCR-DGGE法) 解析による比較。赤枠は本培養基材でのみ検出された培養微生物のバンド。

- ⑥ Rin Endo, Hideki Aoyagi, Adsorption preference for divalent metal ions by *Lactobacillus casei* JCM1134. Applied Microbiology and Biotechnology, 査読有、 102, 2018, 6155-6162.
- ⑦ Masato Takahashi, Hideki Aoyagi, Effect of intermittent opening of breathable culture plugs and aeration to the headspace of flasks on the cultured microbial community structure during shake-flask culture, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有、 25, 2018, 96-101
- ⑧ Masato Takahashi, Hideki Aoyagi, Practices of shake-flask culture and advances in monitoring CO₂ and O₂. Applied Microbiology and Biotechnology, 査読有、 102, 2018, 4279-4289.

〔学会発表〕（計 17 件）

- ① Hideki Aoyagi, Characteristics of the Conventional Microbial Cell Culture Method: Problems and Solutions, 2022 KSBB Spring Meeting and International Symposium: Advanced Biotechnology for Human Society, 2022.
- ② 大矢裕之、青柳秀紀、林乃君、セルロースメンブレンを用いた植物成長促進細菌の評価と培養法の開発、化学工学会 第 84 回年会 2019.
- ③ 高橋将人、青柳秀紀、従来の微生物培養法の生物化学工学的解析とその利用、日本放線菌学会 学術講演会（招待講演）、2018.
- ④ 松田将典、堀越智、青柳秀紀、マイクロ波（非熱効果）が微生物の生理活性に及ぼす影響の解析、第 70 回日本生物工学会大会、2018
- ⑤ 長谷川智弘、原田玲奈、青柳秀紀、増殖の速い微生物が環境試料からの微生物の培養化に及ぼす影響の解析と利用、第 70 回日本生物工学会大会、2018
- ⑥ 小林和輝、青柳秀紀、植物試料の凍結前処理が培養微生物群集に与える影響の解析、第 70 回日本生物工学会大会、2018
- ⑦ 吉田真梨、青柳秀紀、固定化細胞培養法を活用した生物細胞の選択的取得法の開発、第 70 回日本生物工学会大会、2018
- ⑧ 高野力、村山晃一、青柳秀紀、pH 変動培養法を活用した耐酸性微生物や好酸性微生物の高効率なスクリーニング系の開発、第 70 回日本生物工学会大会、2018
- ⑨ 高橋将人、青柳秀紀、微生物を用いた液体培養におけるフラスコ気相環境の解析、第 70 回日本生物工学会大会、2018
- ⑩ 青柳秀紀、高橋将人、松崎大典、長谷川智弘、発酵微生物のスクリーニングを考える、第 70 回日本生物工学会大会（オーガナイザー）、2018
- ⑪ 青柳秀紀、セシウムが花粉の生理活性に及ぼす影響の解析（第 2 報）、日本花粉学会第 58 回（2017 年）大会、2017
- ⑫ 森峻一、青柳秀紀、固定化培養を活用したシロアリ腸内の未培養微生物の培養化、第 69 回日本生物工学会大会、2017
- ⑬ 中村真由、青柳秀紀、ストロンチウムがツバキ花粉の生理活性に及ぼす影響の解析、第 69 回日本生物工学会大会、2017
- ⑭ 青柳秀紀、高橋将人、斉藤諒、長谷川智弘、小林和輝、高野力、従来の微生物培養法の特徴：問題点と解決策の提案、第 69 回日本生物工学会大会（シンポジスト、オーガナイザー）、2017
- ⑮ 小林和輝、村山晃一、青柳秀紀、物理的な前処理を活用した樹皮試料からの新規微生物の培養化、第 69 回日本生物工学会大会、2017
- ⑯ 高橋将人、青柳秀紀、振盪フラスコ培養中のフラスコ気相部が培養微生物群集に及ぼす影響の解析、第 69 回日本生物工学会大会、2017
- ⑰ 高野力、村山晃一、青柳秀紀、SCF 法を用いた強酸性条件下における未培養微生物の培養化、第 69 回日本生物工学会大会、2017

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 1 件）

特許第 6792770 号（登録日 2020 年 11 月 11 日）「液体培地用足場部材」

出願人 フタムラ化学株式会社、国立大学法人筑波大学、発明者 村山晃一、青柳秀紀

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.u.tsukuba.ac.jp/~aoyagi.hideki.ge/>

6. 研究組織

該当無し