

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21279

研究課題名（和文）難培養性の本質に迫る：増殖を開始させる合図とは？固体培地で増殖しない理由とは？

研究課題名（英文）Understanding microbial uncultivability: cue for the growth and incapability of colony formation

研究代表者

青井 議輝（Aoi, Yoshiteru）

広島大学・統合生命科学研究科（先）・准教授

研究者番号：40386636

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）：本研究では休眠と覚醒を制御する増殖制御メカニズムを統合的に明らかにすることを目的としている。難培養性微生物のモデルとしてNitrospiraの純粋菌株を用いて検討した結果以下の成果が得られた。Nitrospiraは増殖に不適な環境では休眠し、同種の個体が産生するシグナル様物質を受け取ることで初めて覚醒・増殖を再開する。しかし実験室で長期間培養することでそのような応答を示さない変異株も出現する。一方で、Nitrospiraには生存に特化したタイプと増殖に有利なタイプの2つが存在し、上記2つのタイプがそれぞれ有利な条件で出現することで幅広い環境で生息することができると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境中のほとんどの微生物は培養困難であることが知られており、環境微生物の理解や利用を大きく妨げているが「培養できない理由」は全く解明されていない。本研究では、従来法では獲得できなかったNitrospiraという難培養性微生物の純粋菌株を用いることで、難培養性微生物の増殖制御機構に迫ることができた。また結果よりNitrospiraが幅広い環境で繁栄するための性質そのものが難培養性と直接関係があるということが示唆された。本研究の成果は、未培養微生物の培養化という課題や環境微生物の増殖制御に対する新しい視点の必要性を提案するものであり、学術的または工学的両方の観点から意義が高いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）： The objective of this study is to comprehensively elucidate the growth control mechanisms regulating dormancy and awakening. The following results were obtained using a pure strain of Nitrospira as a model of an unculturable microorganism: Nitrospira is dormant in an environment unsuitable for growth, and only awakens and restarts to grow when it receives signal-like compounds produced by other Nitrospira cells. However, long-term cultivation in the laboratory condition results in the emergence of mutant strains that do not show such a response. Furthermore, we found that there are two types of Nitrospira, one specialized for survival and the other for proliferation, suggesting that each of the above two types can inhabit a wide range of environments when they emerge under favorable conditions.

研究分野：微生物生態学

キーワード：Nitrospira 休眠・覚醒 凝集株 非凝集株

## 1. 研究開始当初の背景

環境中のほとんどの微生物は培養困難であることが広く知られており、環境微生物の理解や利用の重大な妨げとなっている。なぜ培養困難なのか？もし普遍的な理由が存在し、そのメカニズムを解明できれば、現状では有効技術のない難培養性の未知微生物を培養化するための画期的な新戦略を導き出せる。しかし「培養できない理由」や「難培養性をつかさどるメカニズム」については全く解明されていない。なぜなら、容易に培養できる微生物をそのまま解析しても答えは得られないというジレンマが存在するからである。そこで、我々は、過去に他の多くの研究者がトライしたが誰も分離に成功しなかった本菌株のような難培養性微生物をモデルとして用いることで、初めて難培養性の本質に迫れるものと着想した。さらに、多くの微生物の培養が難しい普遍的な理由として、休眠と覚醒現象に着目した。これまでに、大腸菌などを用いた休眠(覚醒はない)やグラム陽性菌の発芽に関する研究例はあるが、難培養性微生物の「休眠と覚醒」に関する研究はこれまで全くない。

## 2. 研究の目的

本研究では、門レベルで難培養性を示す *Nitrospira* の純粋菌株を難培養性微生物のモデルとして用いて、未知増殖制御メカニズムを発見し解明することを目的にした。具体的には、未知覚醒因子など休眠と覚醒を制御する増殖制御メカニズムを統合的に明らかにすることを目的としている。*Nitrospira* は独立栄養性の亜硝酸酸化細菌であり、本研究で用いる純粋菌株 (*Nitrospira* sp. ND1 株) は申請者が新規分離培養手法を開発して世界で初めて獲得した難培養性微生物である。申請者は事前の検討によって、*Nitrospira* は、飢餓環境において休眠状態に陥り、自身の培養上清の添加によって覚醒することおよび液体培養でしか増殖しないことを部分的に見出していた。そこで本研究では以下の作業仮説に基づいて研究を進めた。1) 環境中の微生物(難培養性微生物)は好ましくない条件下(エネルギー源や栄養源の枯渇など)では容易に非増殖状態(休眠状態)に移行する。環境状況が好転しても、それだけでは休眠状態からは容易に脱却しない。休眠状態から覚醒するためには、シグナル物質(覚醒因子)が必要である。そしてそれは増殖状態の細胞から分泌される。また2) 逆に、*Nitrospira* は自身が出すなんらかの増殖停止物質によって増殖を停止させる。すなわち菌体密度が高くなると増殖停止物質の局所的濃度が高まるためコロニーを形成できない。本研究では、上記の仮説を証明すべく、休眠状態から覚醒状態(増殖状態)に移行させる微生物間相互作用(覚醒因子)の発見と制御機構の解明を解明することを最終目標とした。また本研究を進める過程において、休眠しない菌株の出現が確認され、高密度の凝集体を形成する株としない株の2種類の変異株を獲得することに成功したことから、両者の生理学的・形態学的な相違と、休眠状態とはどのような状態なのかということについて詳細な解析を行うことも目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3.1 *Nitrospira* の覚醒(増殖)を検出するハイスループットアッセイ方法

セルソーターを用いて植菌、培養、検出をハイスループットに行い、休眠から覚醒した割合、覚醒効率(増殖が見られた well / 全 well)を正確かつ簡易に測定する方法を構築した。また、セルソーターを用いずに限界希釈をベースとした方法で植菌、アッセイする方法も確立した。

セルソーターを用いて休眠状態の *Nitrospira* を所望の細胞数ずつ培地で満たされている 96well plate の各 well に植菌した (Single Cell Sorting)。その後、培養を行った。限界希釈に基づいて植菌する場合、10 倍ずつ希釈系列を作成して、培養を行った (アッセイでは希釈系列ごとにコントロールと比較評価することが可能である)。増殖の有無は基質である亜硝酸の消費をザルツマン法(比色分析)で検出して判別した。

### 3.2 *Nitrospira* の生存・活性を測定する方法

初めに亜硝酸含有培地で培養する。一定期間(1週間程度)経つと亜硝酸が枯渇するため、飢餓状態に移行する。飢餓期間中、一定の頻度でサンプリングし、DAPI 染色後顕微鏡下で直接細胞数を計数、細胞密度を測定する。またサンプリングした細胞を CTC 染色して計数し、全菌数に対する CTC 陽性の細胞数の割合を算出する。また高密度凝集株と低密度凝集株についてそれぞれ亜硝酸酸化活性を測定し比較した。

## 4. 研究成果

### 4.1 *Nitrospira* の休眠および覚醒

休眠状態の *Nitrospira* を覚醒因子あり/なしの二つの条件で培養した結果、覚醒因子(培養上

清)を添加した方が、明らかに休眠から回復したwellの割合(覚醒、増殖して亜硝酸を消費したwellの割合)が高いという結果が得られた(図1A)。以上の結果は、培養上清(覚醒因子)を添加した系では、飢餓期間後も亜硝酸酸化活性の回復が確認されることから、1)飢餓期間によって、*Nitrospira*が休眠すること(死滅しない)、2)自身の培養上清には自身の覚醒を促す因子が含まれることを示唆している。以上の結果は、一度休眠すると、基質が豊富にある条件下(増殖には理想的な条件)でも、覚醒因子が存在しなければ容易には覚醒して増殖を開始しないことを示している。しかし、一方で、同様の条件で実験を行っても、覚醒因子(培養上清)を添加した場合としない場合において休眠状態からの回復率に差がでないパターンも頻繁に見られた(図1B)。以上のことから、以前まで安定して確認できていた*Nitrospira*の休眠状態から培養上清の添加に応答して覚醒するという現象が不安定化していると考えられる。その原因として、長期間継代培養を繰り返したことによって変異株(上清に反応しない株)が出現し優占したためではないかと考えられる。

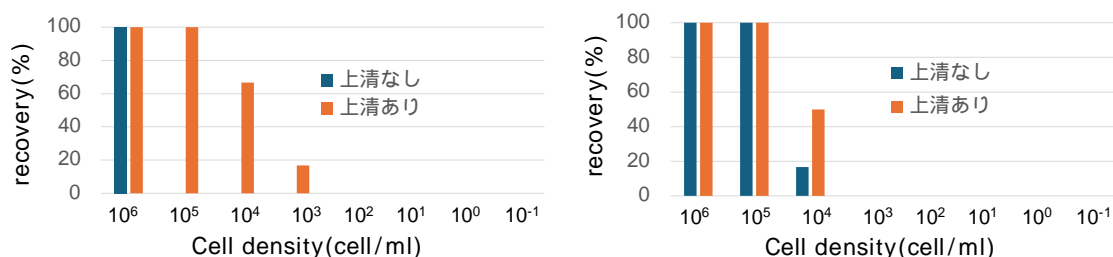


図1.休眠状態からの回復率、(A)培養上清を添加した場合に低い菌体密度まで回復が確認されたケース(B)培養上清を添加した場合としない場合に回復率に大きな差がみられないケース

#### 4.2 培養方法の違いに基づく高密度凝集株と低密度凝集株の出現と生存率、回復率の比較

基質である亜硝酸を高頻度に添加することで、低密度な凝集体を形成する変異株の出現が確認できた。高密度凝集株と低密度凝集株について飢餓状態時の菌数推移を評価した。その結果、低密度凝集株が短時間に菌数が減少したのに対して、高密度凝集株は菌数の減少速度が緩やかであった(図2)。さらに、高密度凝集株は低密度凝集株より亜硝酸酸化速度が低いことが判明した(図3)。このことから、*Nitrospira*は高密度に凝集することで飢餓時の長期生存に特化していることが示唆された。これは凝集することにより周囲の死菌を栄養源として利用できるためだと考えられる。また長期飢餓期間後においても半分以上の細胞がいずれの株においてもCTCによって染色されたことから、少なくとも半分以上の細胞は呼吸活性を維持したまま生存していることが示唆された。

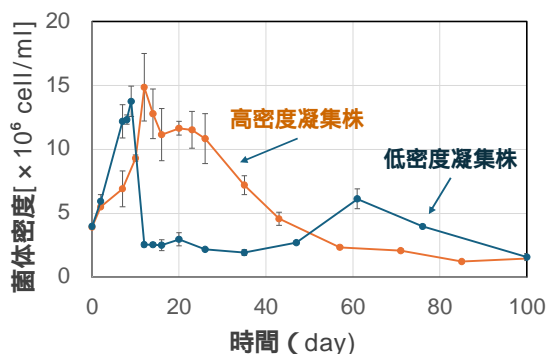


図2.高密度凝集株および低密度凝集株の増殖後、飢餓期間中の菌体数推移

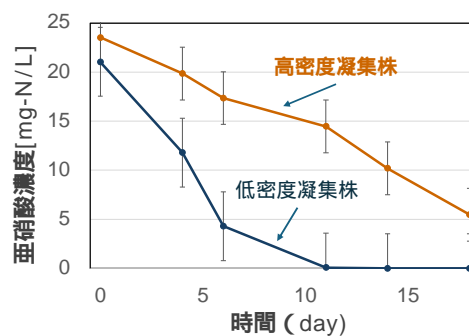


図3.高密度凝集株および低密度凝集株の亜硝酸酸化活性の比較

#### 4.3 まとめ

*Nitrospira*は増殖に不適な環境(飢餓など)では休眠して死滅を回避し、環境条件が好転したことを、同種の個体が算出する覚醒因子をシグナルとして受け取ることで初めて覚醒・増殖を開始する。ただし実験室の条件ではそのような応答を示さない変異株が出現する。

一方で、*Nitrospira*には飢餓状態での生存に特化したタイプである高密度凝集株および増殖に有利な低密度凝集株の2タイプが存在し、自然界では上記の2つのタイプがそれぞれ有利な条件で出現、優占することで幅広い環境に生息することを可能にしていると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sun Chaoling, Zhang Chi, Guo Chaobo, Ding Hong, Jung Dawoon, Seo Eun-Young, Aoi Yoshiteru, He Shan, Ding Lijian, Zhang Weiyan	4. 巻 73
2. 論文標題 Muricauda meishanensis sp. nov., a facultative anaerobic bacterium belonging to the family Flavobacteriaceae isolated from marine sediment in the East China Sea	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.006059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 青井議輝
2. 発表標題 多くの微生物が培養困難である理由を探る
3. 学会等名 日本微生物資源学会第29回大会 公益財団法人発酵研究所 学会・研究部会助成 公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青井議輝
2. 発表標題 難培養微生物とは何か？なぜ培養できないのか？
3. 学会等名 第17回細菌学若手コロッセウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青井議輝
2. 発表標題 培養手法の革新：多くの微生物はなぜ培養できないのか？
3. 学会等名 第24回 天然薬物の開発と応用シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 青井 謙輝
2. 発表標題 Are Microbial Interactions a key for cultivation of uncultivated?
3. 学会等名 東京都立大学・国際研究環支援 (Research Workshop_Hamamatsu) Microbial Ecological Theory (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂向 惲乃, 定廣 晋吾, 前野 光平, 加藤 節, 中島田 豊, 青井 謙輝
2. 発表標題 なぜ環境中では繁栄するのか? 難培養微生物Nitrospira の生残戦略としてのVBNCと形態学的な特性
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第36回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Zhiwei Peng, Setsu Kato, Yutaka Nakashimada, Yoshiteru Aoi
2. 発表標題 Effects of Gelling Agents & Toxic Metabolites upon Microbial Colony Formation on Solid Medium.
3. 学会等名 The 13th Asian Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前野 光平, 定廣 晋吾, 加藤 節, 中島田 豊, 青井 謙輝
2. 発表標題 Instability of Awakening from Dormancy in Nitrospira, known for difficult to isolate from environments
3. 学会等名 The 13th Asian Symposium on Microbial Ecology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂向 惲乃, 定廣 晋吾, 彭志偉, 前野 光平, 加藤 節, 中島田 豊, 青井 議輝
2. 発表標題 なぜ群れるのか?硝化微生物の生残戦略としての VBNC と形態学的特性
3. 学会等名 第57回水環境学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 青井 議輝
2. 発表標題 難培養性微生物とは何か?分離培養手法の革新とその可能性
3. 学会等名 第68回トキシシンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青井 議輝
2. 発表標題 分離培養手法の革新・難培養性微生物の可培養化・多くの微生物が培養できない理由の解明を目指して
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第35回大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 定廣 晋吾, 田村 淳, 村上 千穂, 加藤 節, 中島田 豊, 金田一 智規, 大橋 晶良, 青井 議輝
2. 発表標題 生きているのか、死んでいるのか?難培養性微生物NitrospiraのVBNC状態を解き明かす
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上 千穂, 寺地 裕康, 定廣 晋吾, 金田一 智則, 大橋 晶良, 青井 議輝
2. 発表標題 難培養性微生物Nitrospiraの休眠と覚醒
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shingo Sadahiro, Atsushi Tamura, Chiho Murakami, Setsu Kato, Yutaka Nakashimada, Tomonori Kindaichi, Akiyoshi ohashi, Yoshiteru Aoi
2. 発表標題 Linking uncultivability of Nitrospira to their environmental adaptation
3. 学会等名 International Conference on Nitrification 2021 - ICoN7 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青井 議輝, Jung Dawoon, 町田光史, 中尾洋一
2. 発表標題 難培養性微生物とは何か? どうしたら培養できるのか?
3. 学会等名 日本生物工学会第73回大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 定廣 晋吾, 田村 淳, 村上 千穂, 加藤 節, 中島田 豊, 金田一 智規, 大橋 晶良, 青井 議輝
2. 発表標題 亜硝酸酸化細菌Nitrospiraの環境適応戦略から難培養性の本質に迫る
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第34回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 定廣 晋吾, 田村 淳, 村上 千穂, 加藤 節, 中島田 豊, 金田一 智規, 大橋 晶良, 青井 議輝
2. 発表標題 Nitrospiraの生残戦略から難培養性の本質を紐解く
3. 学会等名 第24回日本水環境学会シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 定廣 晋吾, 田村 淳, 村上 千穂, 加藤 節, 中島田 豊, 金田一 智規, 大橋 晶良, 青井 議輝
2. 発表標題 なぜ培養困難なのか? Nitrospiraの生存戦略と難培養性の関係性を解き明かす
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 定廣 晋吾, 田村 淳, 村上 千穂, 加藤 節, 中島田 豊, 金田一 智規, 大橋 晶良, 青井 議輝
2. 発表標題 なぜ培養困難なのか? 難培養性微生物Nitrospiraの未知増殖制御機構に迫る
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 青井 議輝
2. 発表標題 分離培養手法の革新に向けて: さみしがり屋だけど人込みは嫌い
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	村上 千穂  (Murakami Chiho)  (50649077)	安田女子大学・薬学部・助教   (35408)	
研究 分担者	中尾 洋一  (Yoichi Nakao)  (60282696)	早稲田大学・理工学術院・教授   (32689)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------