

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月5日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26709063

研究課題名(和文) 極小空間のデザインで実現する未培養微生物獲得手法の革新

研究課題名(英文) Miniscule designing: innovation for microbial cultivation

研究代表者

青井 議輝 (Aoi, Yoshiteru)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：40386636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：環境中には膨大な未培養微生物が未知・未利用のまま存在していることが知られているが、いまだ従来法に替わる画期的な分離培養手法は開発されていない。そこで、本研究では微小空間をデザインするという新しいコンセプトを導入して2種類の革新的な分離培養手法を開発することを目的とした。まず、1)「実環境中に設置するだけで自動的に分離・培養し、純粋培養株を得る」という今までにないコンセプトを実現するデバイスを開発し、実際に環境中から分離株を得られることを実証した。さらに2)微小ゲル微粒子の油相中での培養手法(ピコリットル培養)の開発においては、油相中で凝集させることで著しく培養効率が上昇することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上には、膨大な数・種類の微生物が存在しているが、それら環境中の微生物の99%以上は未だ培養できないことが知られている。このため、環境微生物の正しい理解に基づく「制御」や「バイオリソースとしての開拓」は、幅広い分野における重要課題であるにも関わらず、そのほとんどが未解明・未利用のまま残されている。一方で、従来法に替わる分離培養手法はほとんど登場していない。したがって、本研究の成果である、新しいコンセプトに基づく新規分離培養手法の開発(分離培養法の革新)は、「環境微生物から得られる情報の質、量」、さらに「バイオリソースとしての可能性」を飛躍的に向上させるブレークスルーになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Over 99% of microorganisms in environment remain uncultured. However, very few attempts have been carried out for development of new microbial cultivation technology so far. The objective of the study is development of new cultivation methods based on a new concept as “designing miniscule space”. First, a fully automated microbial cultivation method for isolating pure bacterial cultures “a microbial trap” was developed. This new approach can automatically isolate individual bacterial species from heterogeneous populations. In this study, we successfully applied “microbial trap” to environmental sample for isolating bacteria. Second, we established a new microbial cultivation platform providing extremely high inoculum cell density. Hydro-gel particles (10 - 30 μm in diameter) entrapping single cells with medium softly aggregated in oil is the key structure. This method significantly increases the cultivation efficiencies compared with the conventional method.

研究分野：環境微生物学、微生物生態学、応用微生物学

キーワード：ナノ・マイクロ成型技術 微小ゲル粒子 マイクロカプセル 微生物間相互作用 分離・培養 難培養 未培養微生物

1. 研究開始当初の背景

地球上には、極限環境から人の体内にまで膨大な数・種類の微生物(細菌・古細菌)が存在しているが、それら環境中の微生物の99%以上は未だ培養されていない、すなわち未説明・未利用のまま広大なフロンティアが残されている(Rinke et al. Nature 2013)。また、圧倒的多数の環境微生物が従来法では培養できないことが一般的に認識されている。実際に、土壌、海洋、淡水など様々な環境から得られたサンプルにおいて、顕微鏡で直接計数して得られた細胞数に比較して寒天平板上でのコロニーの出現数は極めて少ないことは広く知られており、それを「Great Plate Count Anomaly」と呼称する。

一方で、近年は培養を必要としない分子生物学的解析手法の進展が著しい。これらの培養非依存的な網羅的解析手法の著しい進展により広大な未知領域の存在が明らかになったが、「鍵」となる微生物が培養できないため本質的な理解(因果関係など)や利用に制限がかけられている状況でもある。つまり抽出した遺伝子情報に基づく方法論だけでは本当に知りたい情報については「推測」や「仮説」に留まることが多く、「利用」という観点においても多くの制限が存在している。このため、環境微生物の正しい理解に基づく「制御」や「バイオリソースとしての開拓」は、幅広い分野における重要課題であるにも関わらず、純粋培養を伴う解析は多大な困難を伴うのが実情であり、そのほとんどが未説明・未利用のまま残されている。したがって、「培養を基盤とした方法」を拡充することで、微生物から得られる情報の質、量、を拡充する可能性は飛躍的に向上すると見込まれる。

しかし、培養を伴わない方法論(分子生態解析など)の近年の著しい進展に比べると、培養に関する方法論は150年前から大幅に進展したとは言い難い。事実、今日に至るまで平板培養法が主要な手法であり続けている。一方で、既存の方法論を基盤にしつつ様々な有効な工夫がなされてきたのもまた事実である。培地・基質組成・ゲル化剤、培養条件、シグナル物質の添加、培養時間などの工夫を通じて、これまでに難培養性と認識されていた微生物の分離培養に成功した例も数少なくない。しかし、工夫の域を超えた「新しいコンセプトに基づいた分離培養手法」の登場はきわめて限定的であり、より新しい培養手法の開発は現在の閉塞した状況を劇的に変える可能性を秘めているとも言える。

そこで、新しいコンセプトに基づく新規分離培養手法の開発(分離培養法の革新)は、「環境微生物から得られる情報の質、量」、さらに「バイオリソースとしての可能性」を飛躍的に向上させるブレークスルーになると考える。

2. 研究の目的

本研究の目的は、極小空間を制御することにより、以下に挙げる革新的な2種類の微生物分離培養手法を開発することである。これにより未培養微生物の培養化そして、全く新しい培養手法としての確立、他分野への波及効果が期待できる(図1)

1) 環境中に設置するだけで「自動的に分離・培養を行う」(微生物を捕える罠)という究極的な分離培養手法の開発

2) ピコリットルスケールでの初期培養(培養初期から超高菌体密度を実現する)ことで、微生物間相互作用を促進し、従来法に比べて「高効率に未培養微生物を獲得する新規手法」の開発を行う。

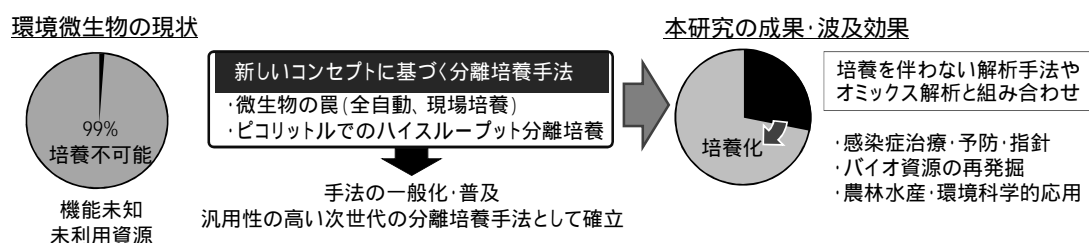


図1 研究全体の構想および波及効果

3. 研究の方法

3.1 環境中に設置するだけで「自動的に分離・培養を行う」(微生物を捕える罠)

実環境中に設置するだけで複数菌株を(選択的、または非選択的に)その場で分離・純粋培養操作を行うことが可能という、新しいコンセプトに基づく手法の開発、実証、汎用的使用を目指した検討を行った。本研究では、ナノ成型技術とマイクロ成型技術を併用して上記コンセプトを実現するデバイスを作成し、実証試験では環境サンプルから微生物の分離を試みた。さらに新規手法で得られる分離株の新規性・多様性について、従来法と比較解析して手法の有効性を実証した。

デバイスは、培地が充填されているチャンバーとそこから外環境に繋がる細い管(ナノチャンネル:内径 600-900nm に精密に制御、電子線リソグラフィーと PDMS を用いた従来のマイクロ流路作成技術を組み合わせる)によって構成されている(図2)。

環境中の微生物は入口付近で増殖を始め、培養容器に向かってナノチャンネル内を1列に分裂を繰り返しながら進み、最終的に培養容器内で検出可能レベルまで増殖する。1つの細胞が管内で増殖を開始すると管(ナノチャンネル)は塞がり他の微生物は侵入できないため、純粋菌株が得られる(図2)。

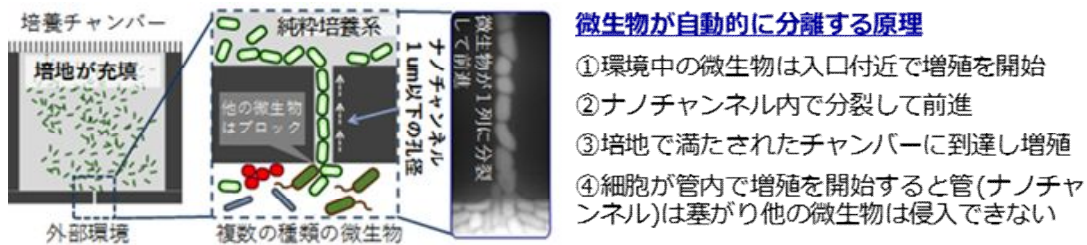


図2. 微生物を捕える罠(自動的に獲得・分離・培養するデバイス)

3.2 超高密度植菌培養法: GMD aggregates-in-oil 培養法(図3)

増殖を開始するためには一定以上の細胞密度を必要とする微生物が多く存在するが、それらは原理的に分離困難である。それに対し微生物細胞を含有したゲル微粒子の W/O エマルジョンの凝集状態を意図的に作り出し、「分離状態を保ちながら従来法の1万倍以上の初期菌体密度を実現する」新規手法を適用する。この条件では従来法に比べて微生物間相互作用が活発に起きるため、微生物間相互作用を休眠からの覚醒に必要な微生物が増殖を開始することが期待される。

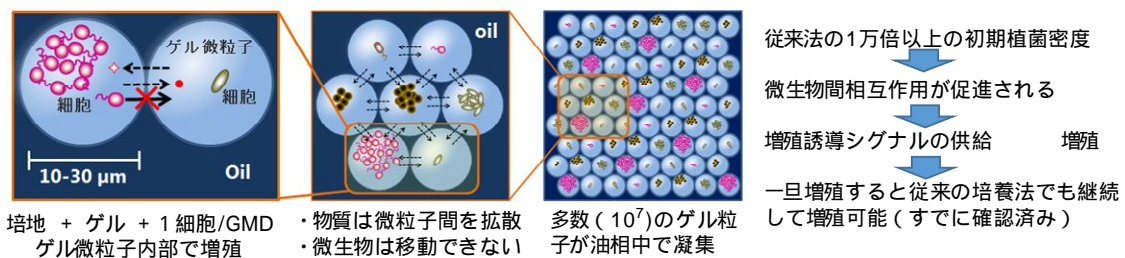


図3. 超高密度に植菌する分離培養法: 微生物間相互作用を促進して増殖を開始させる

4. 研究成果

4.1 環境中に設置するだけで「自動的に分離・培養を行う」(微生物を捕える罠)

本デバイスの入り口部位に土壌由来の環境サンプルを注入し、適宜顕微鏡を用いてフードチャンバー部位での微生物の増殖の可否を直接確認した。微生物が増殖していた場合、チャンバーから菌体を直接採取し、平板培養、液体培養法を用いて2次培養を行った。2次培養で菌体の増殖を確認した後、菌体を分離し、RFLP法によりチャンバーごとに菌体が単一種、あるいは

複数種存在しているかを判断した。その後 16S rRNA 遺伝子の DNA シーケンス解析を行った。顕微鏡を用いて本デバイス内部を観察したところ、ナノチャンネル入口付近で集合する菌体、ナノチャンネル内部で分裂する菌体、及びフードチャンバー内での菌体の増殖を確認した。また、土壌および活性汚泥中をサンプルとして、ナノチャンネルを介することで、獲得する分離株を 2-3 種類に限定して分離培養可能であることを示された(図4)。さらに平板法との 16S rRNA 遺伝子に基づく比較解析において、平板上で出現した菌体と異なる種の獲得、並びに多様性の高い菌体を獲得した。新規手法を用いて土壌サンプルの分離培養に成功し、他の環境サンプルを本デバイスで獲得可能であることが示唆された。よって、本手法は従来の方法論に代わる新たな分離培養手法として確立できる高い潜在性があると言える。

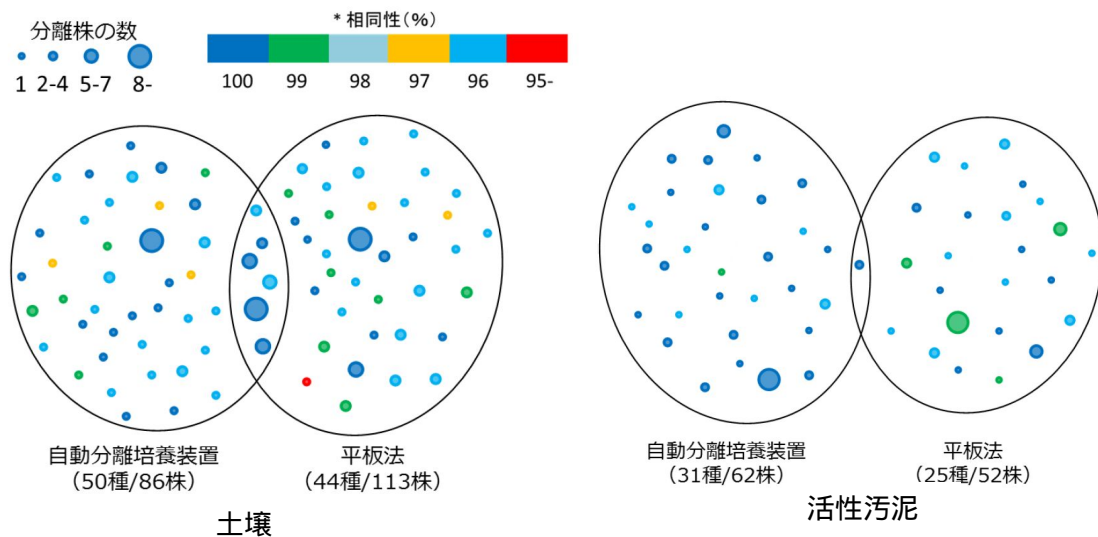


図4 環境サンプルから各手法で得られた分離株の多様性および新規性

4.2 超高密度植菌培養法：GMD aggregates-in-oil 培養法

微小ゲル粒子の作成方法を確立し、モデル微生物および環境微生物を用いて微小ゲル微粒子が油中で凝集した状態でシングルセルから増殖しマイクロコロニーを形成する様子を確認した。

次に、それぞれの粒子が油中で凝集した状態、分散した状態、寒天平板培養、ゲル微粒子に封入してから寒天平板に植菌した場合の各条件における、コロニー形成率を比較したところ、さらに新規手法（微小ゲル粒子が油中で凝集した場合のみ）においてはコロニー形成率の著しい向上が確認された(図5)。なおゲル間での微生物細胞の移動は全くないことを確認済みである。

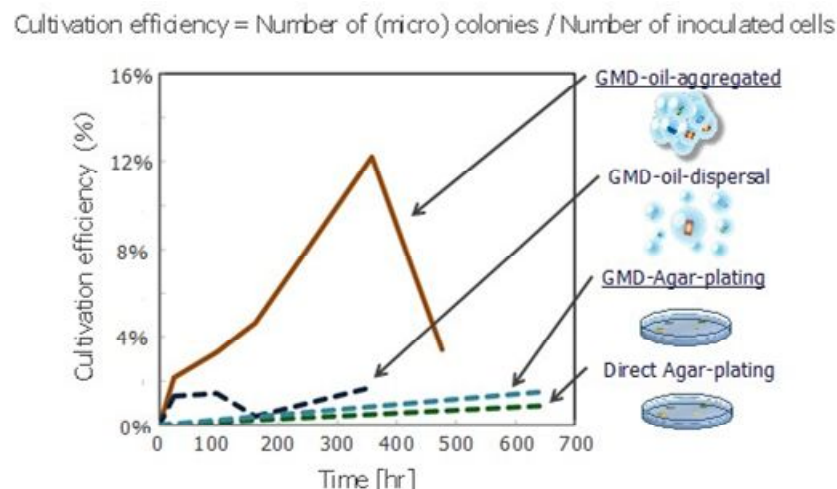


図5 各培養条件におけるコロニー形成の経時変化

さらに環境微生物を網羅的に獲得しさらに、従来法を対照系に加えて、得られる微生物を比較解析した。結果、多種多様な微生物が獲得され、さらにそれぞれの条件下で異なる微生物が得られることが判明した(図6)。またその原因として新規手法では増殖不能状態に陥っている微生物を活性化する働きがあること、さらに増殖不能状態の微生物が活性化して増殖を開始するためには、何らかのトリガーが必要であり、それは異種間・同種間の相互作用によって引き起こされることが示唆された。得られた分離株を用いて増殖特性の評価を行ったところ、異種間・同種間の相互作用により増殖の開始が誘導される現象が確認されたため、自然環境中では、複雑な微生物間相互作用により各々の微生物の増殖が制御されている「増殖制御ネットワーク」が形成されている可能性が示唆された。

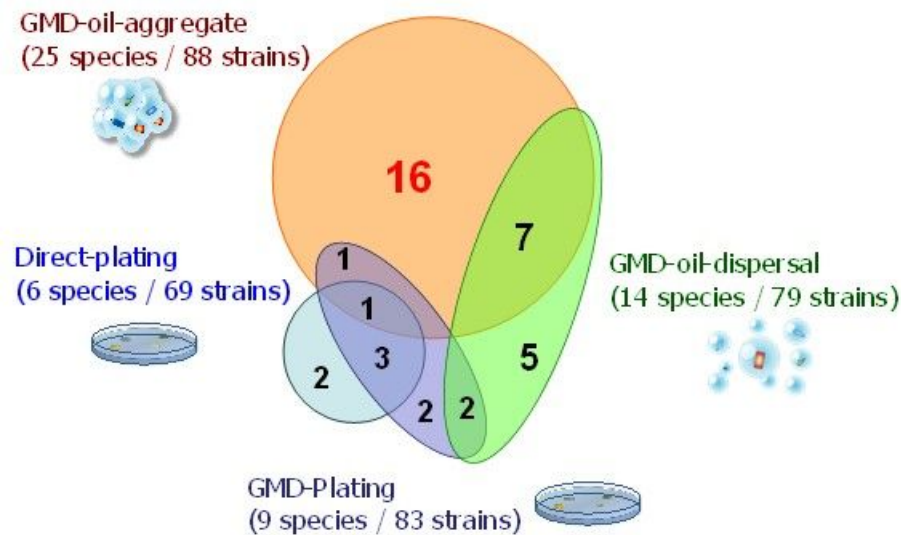


図6 各手法で得られた微生物種 (OUT) の多様性および重複

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計14件)

1. Dawoon Jung, Yoshiteru Aoi, Fully automated microbial cultivation technique by Nano-constriction, The 3rd International Symposium on Biomedical Engineering, 2018.
2. 青井議輝, なぜ多くの微生物は培養困難なのか? 休眠・覚醒現象から迫るバイオインダストリー協会”未来へのバイオ技術”勉強会, 2018.
3. Eun young Seo, Yuki Takagi, Tomonori Kindaichi, Akiyoshi Ohashi, Yoshiteru Aoi, Illuminating microbial growth controlling network in nature, ISME17 17th International Symposium on Microbial Ecology, 2018.
4. Yoshiteru Aoi, Miniscule space designing for microbial cultivation, 日本微生物生態学会第32回大会/10th ASME, 2018.
5. 植田雄人, Tandogan N, Goluch E, 金田一智規, 大橋晶良, 青井議輝, 環境中の微生物を自動的に“捕え”て“分離”する革新的分離培養手法の開発, 第52回日本水環境学会年会, 2018.
6. 青井議輝, 培養手法の革新: 難培養性微生物の正体と資源としての可能性, 第69回日本生物工学会大会, 2017.
7. 青井議輝, 難培養性微生物とは何か? どうしたら培養できるのか?, 日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会, 2017.
8. 青井議輝, 分離培養手法の革新-難培養性微生物の正体と可能性-, 28回微生物シンポジウム, 2016.
9. 青井議輝, 培養できない微生物の正体と培養手法の革新, 環境バイオテクノロジー学会2016年度大会/年会シンポジウム, 2016.
10. 植田雄人, Tandogan N, Goluch E, 金田一智規, 大橋晶良, 青井議輝, 微生物の純粋培養操作の自動化を可能とする革新的分離培養手法の開発, 第68回土木学会中国支部研究発表会, 2016.
11. Yuto Ueda, Nil Tandogan, Edger D Goluch, Tomonori Kindaichi, Akiyoshi Ohashi, Yoshiteru Aoi, An innovative cultivation method that enable isolating pure culture automatically, 16th International

Symposium on Microbial Ecology, 2016.

12. 植田雄人, Dawoon Jung, Nil Tandogan, Edger D Goluch, 金田一智規, 大橋晶良, 青井議輝, 微生物を自動的に“捕え”て“分離”する革新的分離培養手法, 第 31 回日本微生物生態学会, 2016.
13. 青井議輝, 培養困難な微生物の獲得とその意義, 第 17 回日本水環境学会シンポジウム, 2015
14. Yuki Takag, Tomonori Kindaichi, Akiyoshi Ohashi, Yoshiteru Aoi, Letting microorganisms escape from loneliness and grow, 2015 日本微生物生態学会第 30 回大会, 2015.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称：微生物の分離培養方法及び凝集体含有溶液

発明者：青井議輝、高木雄貴、大橋晶良

権利者：青井議輝、高木雄貴、大橋晶良

種類：特許

番号：特開 2015-196882

出願年：2015

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：Ed Goluch

ローマ字氏名：Ed Goluch

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。