

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14696

研究課題名(和文)革新的手法で導く未培養重要微生物の世界初の分離培養

研究課題名(英文) Innovative cultivation methods targeting environmentally key but uncultivated microbial types

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では革新的な新規分離培養手法を確立すること、および多くの研究者が獲得に失敗し続けた、重要かつ未培養微生物を培養化することを目的にする。本研究では特に環境科学・工学的に重要な未培養微生物である嫌気性アンモニア酸化細菌(Anammox)およびポリリン酸蓄積細菌(Accumulibacter phosphatis)(PAO)をターゲットして培養化に向けた検討を行った。アナモックス微生物については、集積培養・セルソーターを用いた選択的分離・段階的スケールアップ培養を通じて、培養化への道筋を確立できた。PAOに関しては、集積培養および嫌気・好気条件を交互に実現する新規培養法の確立を行った

研究成果の概要(英文)：Objective of the study is to develop innovative cultivation method and trying to cultivate uncultivated microbial types, which are key microbial species in the field of environmental science and engineering. In this study, two uncultivated microbial types were selected as a target for cultivation, those are Anaerobic ammonia oxidizing (ANAMMOX) bacteria, and Accumilibacter phosphatis, which has never been succeeded for isolation since their discovery. For ANAMMOX, following methods were used in combination; 1) enrichment cultivation, 2) selective isolation of Anammox cells by using cell sorting system, 4) automatic isolation method (microbial trap) and 4) multi-stage and successive scaling up cultivation. Although, keeping the culture in alive were failed, some of the method brought success in cultivation of Anammox. For PAO, in addition to above methods, new methods were developed and applied for providing alternating condition of anaerobic / aerobic conditions.

研究分野：微生物生態学

キーワード：分離培養 アナモックス ポリリン酸蓄積細菌 難培養 未培養

1. 研究開始当初の背景

地球上には、ありとあらゆる環境中に膨大な数・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%以上は未だ培養できないことが知られている。細菌の生態や機能を理解・制御・利用することは幅広い分野(農林水産・環境・医薬)における重要課題の一つであると言える。環境科学的・工学的に重要な役割を担っている微生物もその例外ではない。このため、環境微生物の正しい理解に基づく「制御」やプラネットスケールでの環境変動の予測などは幅広い分野における重要課題であるにも関わらず、「鍵」となる微生物が培養できないがために、その前進に大きな制限がかけられているといっても過言ではない。

Annamox 微生物は地球全体の窒素循環において全 N_2 生成の24-67%に寄与している。また同微生物を用いた窒素除去は次世代型の超効率のプロセスとして実用的な発展が期待されている。ポリリン酸蓄積細菌(*Accumulibacter phosphatis*)を用いた排水処理プロセスは、排水から「リン」を除去しつつ枯渇資源のリンを効率的に回収可能なため、その幅広い応用が期待されている。

しかし両者ともに、環境科学的重要性に比較してその性質には不明な点が多く、工学的応用の進展に制限がかかっているのも事実である。両者の基本的な性質や生態は分子生物学的手法の積極的な適用によって解明されつつあるが、さらに本質的な理解を得るためには、純菌株を取得して詳細な解析を行うことが理想的である。しかし、両者ともそれらの発見以来、分離培養が成功した例は一つもなく、難培養性であることが判明している。したがって、分離株が存在すれば培養非依存的な解析からは得られない立体的な情報を取得でき、そこから得られる本質的な理解に基づいて、それぞれの微生物を人為的に制御する技術へと発展させることが見込まれる。

また、本申請課題で対象とする微生物はメタゲノム解析から個々のゲノム配列が判明しているが、申請者が精査したところ対象微生物が培養できない理由はゲノム情報からは見出されない。一方で、Annamox 微生物は増殖に一定以上の菌体密度を要求することが示唆されている(Strous et al, Nature

1999)。またポリリン酸蓄積細菌(*Accumulibacter*)は二つの培養条件を交互に繰り返す環境で増殖するなど、両者ともに従来法では原理的に分離困難な性質を持つことに申請者は着目した。申請者らはこれまでに、従来の方法論とは大きく異なる新しい複数の分離培養手法を独自に開発した。そこで、本申請案では申請者独自の革新的な培養方法、を戦略的に組み合わせることで、多くの研究者がチャレンジしたものの、未だ獲得に至っていない未培養かつ重要な微生物を分離培養に導くことができると着想した

2. 研究の目的

本研究では革新的な新規分離培養手法を用いることで、多くの研究者が獲得に失敗し続けた、重要かつ未培養微生物を世界で初めて分離培養に導くことを目的とする。新しいコンセプトに基づく新規分離培養手法を戦略的に用い、「未培養かつ重要微生物の分離・培養」を行う。特に環境科学・工学的に重要な未培養微生物である嫌気性アンモニア酸化細菌(Annamox)およびポリリン酸蓄積細菌(*A. phosphatis*)の世界初の分離培養に導くことを目標にする。

新しいコンセプトに基づく分離培養手法を効果的に組み合わせる革新的な培養戦略を確立し、多くの研究者が獲得に失敗し続けた、環境科学・工学的に重要かつ未培養微生物を世界で初めて分離培養に導くことを目的とする。具体的には、1)ナノ・マイクロメートルレベルの極小空間の制御、生きたまま物理的に選択的に分離する手法などオリジナルな新規分離手法を確立・実践的に応用する。2)そしてAnnamox 微生物やポリリン酸蓄積細菌を主な分離ターゲットとして、上記の新しいコンセプトに基づく複数の分離培養手法を組み合わせることで純粋培養株の獲得、またはそれを実現するために必要な条件を見出すことを目指す。

3. 研究の方法

3.1 Annamox 微生物集積培養

分離培養を行うための植菌源として、容積1000mLのカラムを用いてAnnamox 微生物を集積培養した。 NH_4^+ 、 NO_2^- 濃度を各100-150mg-N・L⁻¹で添加し、HRT1.8h、37℃の条件で連続運転した(図1)。

3.2 ハイスループット分離培養手法

新規ハイスループット分離培養手法を確立してアナモックス細菌に適用した。本手法は、1細胞ではなく数百細胞から成るマイクロコロニーを1つの増殖の基本単位(Growth unit)とする新しいコンセプトに基づいた手法である。セルソーターを用いることでアナモックス細菌のみを選択的かつ高効率に分離・植菌する方法とアナモックス活性のハイスループットスクリーニング手法を組み合わせる方法論を構築して適用した。

本手法では、植菌、培養、スクリーニングの3つのステップをハイスループットを行うことで、大量のサンプルを同時並行的に培養し、アナモックス細菌のスクリーニングを行った。図2に上記3つのステップの概略図を示す。

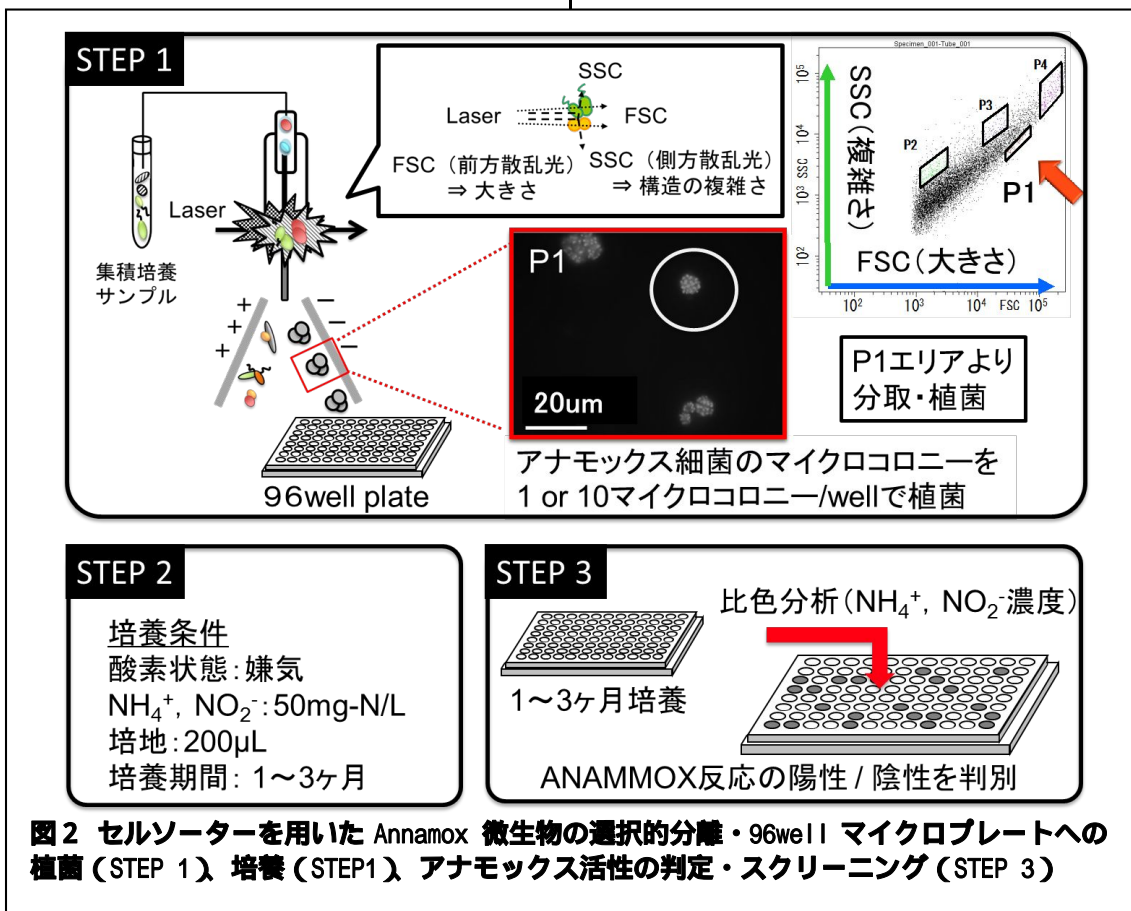
STEP1 Annamox 微生物の分離・植菌

セルソーター (FACS aria, BD) を活用することで、集積培養系からアナモックス細菌の選択的分離を行った。セルソーティングのパラメータとして、粒子の大きさを反映する前方散乱光 (FSC) と、粒子の複雑さを反映する側方散乱光 (SSC) を用いた。集積培養



図1 アナモックス集積培養リアクター

系中においてアナモックス細菌は、強固な球体状のマイクロコロニーを形成する性質を持つため、目的とするアナモックス細菌のみで形成されるマイクロコロニーは、高いFSC値と低いSSC値を示すグループに属すると



判断し、図中 P1 エリアをソートした。分離したマイクロコロニーは同時に 96well microtiter plate に 1well あたり 1 個もしくは 10 個ずつ植菌した。

STEP2 培養

植菌したサンプルは、一定期間（3 カ月）嫌気条件下で培養を行った。文献値を参考に 1 菌体当たりの反応速度を 4 - 20 fmol/cell/day、倍加速度を 3 - 11 day と仮定し、培地中の基質濃度を、NH₄⁺、NO₂⁻ 両濃度とも 50 mg-N/L と設定した。本条件ではアナモックスが増殖した場合、理論的には 1-3 ヶ月後に培地中の基質が完全に消費する。

STEP3 スクリーニング及び検出

一定期間の培養後、比色分析により各 well で培養しているサンプル中の NH₄⁺、NO₂⁻ 濃度を測定した。培地中の NH₄⁺、NO₂⁻ 濃度の著しい減少が確認された場合、アナモックス反応が起きていると仮定した。

3.3 自動分離培養装置（微生物の罫）を用いたアナモックス微生物の分離培養

環境中に設置するだけで自動的に分離株を獲得可能な全自動分離培養装置（微生物の罫）(Tandogan et al PLOS ONE 2014) を用いたアナモックスの分離を試みた。集積培養リアクターのバイオマスをすりつぶした状態のサンプルを植菌し、亜硝酸とアンモニアを主体とした培地を用いて、1 か月程度培養を行った。

3.4 ポリリン酸蓄積細菌の培養

ポリリン酸蓄積細菌 (*A. phosphatis*) の集積培養リアクターを立ち上げ、下水処理場の活性汚泥を種菌として数十パーセント以上になるように集積を行った。次に、好気（無機）・嫌気（有機物あり）の条件を交互に繰り返しながら培養することを可能にする方法を確立して応用した。

4. 研究成果

4.1 セルソーターを用いた Annamox 微生物の分離

集積培養サンプルをセルソーターに供試・分析した結果、直径 10-20 μm 前後であるアナモックス細菌のみで形成されたマイクロコロニーが、図中 P1 エリア(図 2 STEP 1) に存在することが確認された。さらにマイクロコロニーのみを選択的に分取した結果、得られた微生物細胞の 99% 以上はアナモックス細菌であることから、対象（アナモックス細菌）のみ選択的に分離できていること

が示唆された。

4.2 アナモックス活性を基準としたスクリーニング

マイクロコロニーを選択的に植菌後 1-3 ヶ月培養した、各ウエルのアンモニアおよび亜硝酸濃度の減少を測定したところ一部についてアナモックス反応が確認されていることから、アナモックス細菌の増殖が示唆された。培養した全マイクロプレート（合計 768well）中、アナモックス反応が確認されたのは、84well（10.9%）であったが、1つのマイクロコロニーを各ウエルに植菌した系だけに注目すると、3 ヶ月後のサンプルにおいて 4.4% がアナモックス反応を示した。

Annamox 微生物だけを選択的に分離し、確実に 1 つずつ植菌し 3 ヶ月という長期間の培養を行った本手法においても、4.4% という低い割合でしかアナモックス反応を確認できなかった。植菌した Annamox 微生物のほとんどは 3 ヶ月という期間では十分に活性化していないと考えられることから、無限希釈法などの従来法では Annamox 微生物を分離培養することは現実的には不可能に近いと考えられる。逆に、超効率的な分離培養を可能にする本手法の高い有効性が示された。

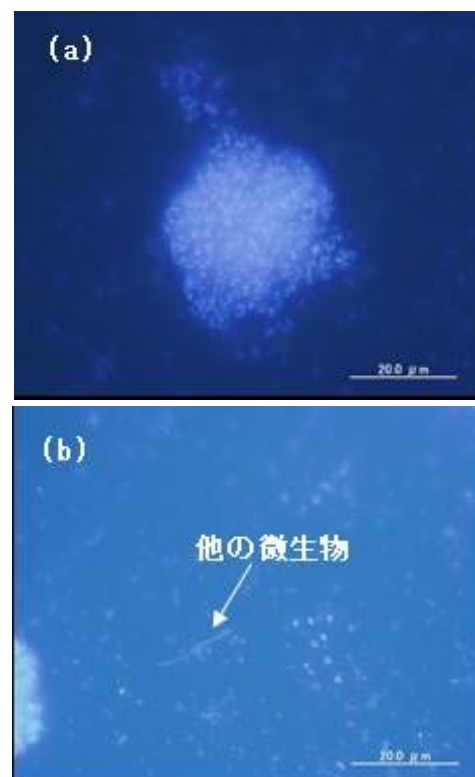


図3 ANAMMOX が増殖した様子(DAPI 染色)
(a), アナモックス以外の微生物の増殖 (DAPI 染色)

アナモックス活性が確認されたサンプルを継体し、段階的にスケールアップを繰り返しながら培養を行ったところ、最終的に 200 mL スケールの培養液において、アナモックス

の増殖が確認できた。最初の植菌時（セルソーターを使用）は一つのマイクロコロニーを植菌したにすぎないことから、培養期間中およびスケールアップを繰り返すことで大幅に菌体が増殖したものと判断した（図3a）。ただし、アナモックス以外の微生物のコンタミネーションも確認できたため（図3b）、純粋菌株の獲得には至らなかった。しかし、本手法により Annamox 微生物が実際に増殖するということが確認できた。

4.3 自動分離培養装置（微生物の属）による Annamox 微生物の分離の試み

自動分離培養装置は培地が充填している複数のチャンバーと外部につながる1本の細い管（直径1 μm 以下に制御）で構成されているデバイスを用いることで、複数の構成種からなるサンプルから単一種のみを分離・純粋培養可能なデバイスである。一定期間培養後、培養チャンバー内部にアナモックス微生物が増殖している様子が観察できたことから、コンセプト通りにナノチャンネルを通過して、培養チャンバー内部で増殖したと考えられる（図4）。

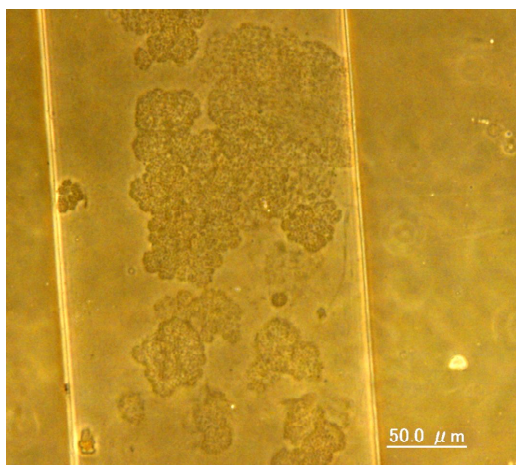


図4 自動分離培養装置の内部（チャンバー部分）で ANAMMOX が増殖した様子。アナモックスのマイクロコロニーが連なってカリフラワーのような状態に見える

4.4 ポリリン酸蓄積細菌の培養

好気（無機）・嫌気（有機物あり）の条件を交互に繰り返しながら培養したところ、DAPI によって黄色に染色される微生物（ポリリン酸顆粒を蓄積する細胞）が多く増加したことを確認した。今後本手法は有効な方法になり得ると考えられる。

4.5 まとめおよび今後の展望

Annamox 微生物およびポリリン酸蓄積細菌ともに、純粋菌株を得るところまでは至らなかったが、本研究で開発・適用した新規分離培養手法によりそれらの微生物が確実に増殖していたことが判明した。未培養重要微生物を増殖させる新規手法の確立に成功し、

増殖する条件を見出すことに成功したため、今後は同手法を用いることで、純粋菌株の獲得が期待できる。

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）

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計5件)

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

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

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- 第28回微生物シンポジウム 2016

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

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

〔その他〕

広島大学 研究者総覧：

<http://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.4589d6839899bfc5520e17560c007669.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青井 議輝 (AOI YOSHITERU)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：40386636

(2) 研究分担者

金田 一智規 (KINDAICHI TOMONORI)

広島大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：10379901