

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02873

研究課題名(和文) 微生物間相互作用で導く未知微生物の培養化と増殖制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Cultivation of uncultivated microorganisms and clarification of growth controlling mechanisms by focusing on microbial interactions

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) 13,400,000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、また難培養性について普遍的な理由も解明されていない。そこで本研究では、革新的な分離培養法を確立して環境中から難培養微生物を培養化すること、ほとんどの微生物が培養できない理由(未知増殖制御機構)を発見・解明することを目的とした。そこで、まず微小テクノロジーを活用した、微生物間相互作用を高度に再現する新規分離培養手法を確立して、未培養種を網羅的に分離培養した。次に微生物間相互作用が未培養微生物を含む多くの環境微生物未培養微生物の増殖に必要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境中の微生物の99%以上は未だ培養できない。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、また培養できない理由やメカニズムについてもほとんど解明されていない。したがって本研究で明らかになった、新しいコンセプトに基づく新規分離培養手法の有効性や微生物間相互作用の重要性は、「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, and reason why most microorganisms resist cultivation has not been clarified so far. The objective of the study is to establish and apply new cultivation methods based on a new concept, and to discover previously unknown mechanism controlling growth of uncultivated microorganisms. In this study, first, we successfully applied several new cultivation methods to environmental sample for isolating bacteria. Methods are in situ cultivation, a fully automated microbial cultivation method, and Gel-Micro-Droplet (GMD)-aggregate cultivation (a new microbial cultivation platform providing extremely high inoculum cell density). Second, through testing isolates from above methods, it was shown that the microbial interactions clearly affect their growth.

研究分野：微生物生態学

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

1. 研究開始当初の背景

微生物のほとんどは培養困難であることが知られており、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)。近年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。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。

なぜ培養困難なのか?もし普遍的な理由が存在し、多くの微生物が培養困難な普遍的な理由や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」は全く解明されていない。なぜなら、従来法で容易に分離される微生物を解析しても答えにはたどり着かないというジレンマが存在するからである。一方で、分離培養の方法論は150年前からさほど進展していないと言っても過言ではない。新規手法のほとんどが既存の手法をベースにした工夫の範囲に収まるものであり、新しいコンセプトに基づく手法開発は極めて少ない。

2. 研究の目的

本研究では、革新的な分離培養法を確立して環境中から難培養微生物を培養化すること、ほとんどの微生物が培養できない理由(未知増殖制御機構)を発見・解明することを目的とした。

具体的な目標は、1)微小テクノロジーを活用した、微生物間相互作用を高度に再現する新規分離培養手法の確立、2)未培養種の網羅的分離培養(手法の実証)、3)微生物間相互作用を介した未知増殖制御機構(休眠から覚醒を誘導するシグナル因子)の発見と解明である。

3. 研究の方法

本研究では、「革新的分離培養手法の確立・適用」し、新規培養手法を用いた未培養微生物(相互作用を増殖に必要とする)を網羅的獲得した。その後、上記の方法で得られた分離株を用いて微生物間相互作用に基づいた増殖制御メカニズムの解明を試みた。本研究で使用した新規分離培養手法を以下に示す。

1)微生物の罌:ナノメートルオーダーの構造体をデザインすることで、現場に設置するだけで自動的に複数の菌株をサンプリング・分離・培養する全く新しいタイプの分離培養手法。本手法は、人為的に微生物を分離・植菌するのではなく、「微生物自身が能動的に分離し、隔離した状態で増殖する」という点で既存の方法論に対して大きく異なる(Fig.1)

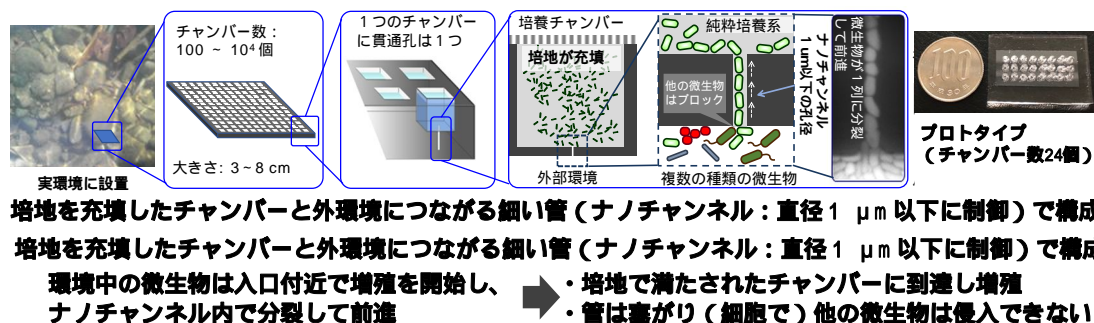


Fig 1. 微生物の罌(全自动分離培養装置)の構造と原理

2) in situ 培養：微生物は通過しない膜を用いた独立した培養チャンバーで構成された培養デバイスを用いた、実環境を模擬する培養手法 (in situ 培養法)(Fig. 2)。

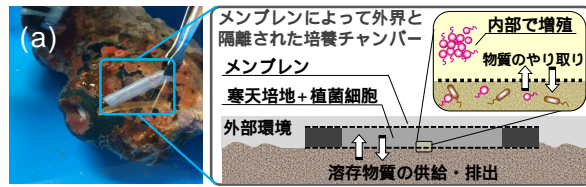


Fig 2. In situ 培養の原理

3) 超高密度植菌法：培養初期の菌体密度を従来の方法の1万倍以上に高めることができ、培養期間中お互いに混在しないで分離した状態で増殖させる方法 (Fig. 3)。

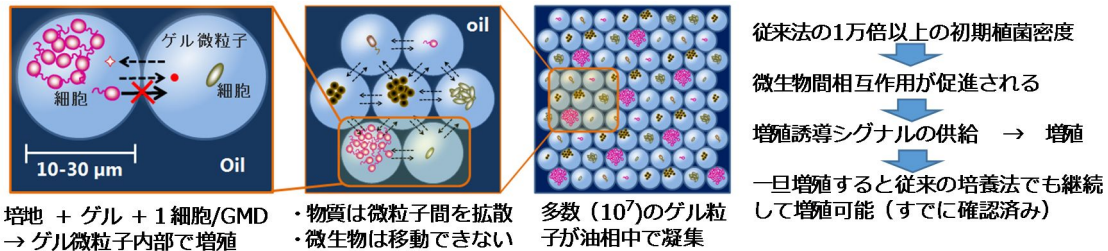


Fig 3. GMD 凝集培養の原理

4. 研究成果

4.1 分離株の新規性 (未培養微生物の獲得)

海洋性カイメン、森林土壌を主なサンプルソースとして、上記手法を用いて網羅的に分離株の獲得を行った。分離株について 16SrRNA 遺伝子解析の結果、特に in situ 培養では新規性の高い菌株を獲得される割合が従来法 (寒天平板培養) に比べて著しく高くなった。他の 2 つの方法においては獲得される種類は従来法と大きく異なるもの新規性という観点においては著しい効果は認められなかった。一方で GMD 凝集培養においては、平板培養に比べて 10 倍以上高いコロニー形成率が得られることが判明した。

4.2 獲得した微生物の性状解析

海洋性カイメンをサンプル源に in situ 培養を通じて獲得した微生物を解析したところ、多くの菌株において、難培養性微生物に共通する以下のような性質を見出すことができた。飢餓状態では容易に非増殖状態 (休眠状態) に移行し、環境状況が好転しても休眠状態からは容易に脱却しない。カイメン抽出液を少量添加した培地で培養すると、抽出液を含まない場合に比べて回復率 (コロニー形成率) が著しく向上する菌株が多い (一方で寒天平板培養を用いて得られた菌株では全く効果がない)。以上のことから、in situ 培養から得られた菌株には休眠し再増殖するためには何らかのシグナル様物質が必要であること、そしてそれは外部環境からもたらされる (おそらく微生物) と考えられた。

4.3 GMD 凝集培養から得られた菌株を用いた解析

上記のことを踏まえて、GMD 凝集培養から得られた菌株を用いて休眠状態から覚醒させる可能性のある異種間の相互作用 (ペア) を探索した。まず飢餓状態に一定期間おいた菌株を GMD に再封入して凝集培養を行う、その際、ペアとなる候補株を別に封入し混合培養を行った。結果、混合培養を行った際に、回復率 (全植菌数に対する増殖を開始した割合) が比較系 (GMD 凝集培養の単独培養、平板培養) と比較して著しく増加する複数のペアが確認された。以上のことから、GMD 凝集培養においてコロニー形成率が著しく高い理由は微生物間相互作用 (異種間の特定のペア) によって増殖が誘導されたからではないかと考えられる。また休眠状態の微生物の増殖を誘導する物質は増殖状態の特定の微生物 (異種・同種) から分泌されるのではないかと考えられる。

4.4 増殖を誘導する物質の同定の試み

一方で、増殖誘導物質を産出すると思われる菌株を大量培養し増殖誘導物質の同定を試みた。が、菌株によっては目的の生理学的性質を示さなくなる、アッセイの途中で目的の活性が見られなくなるなどの現象が見られたため、最終的に物質の同定に至ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

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 鈴木陸太, Eunyoung Seo, 加藤節, 中島田豊, 青井議輝
2. 発表標題 微生物間相互作用の促進は未培養微生物の培養化の鍵となるか？
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 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 下村 有美, 鈴木 陸太, Martinez Joval, 中島田 豊, 加藤 節, 青井 議輝
2. 発表標題 ゲル微粒子の凝集培養を用いた難培養性細菌の単離方法の構築
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 鈴木陸太, Eunyoung Seo, 加藤節, 中島田豊, 青井議輝
2. 発表標題 増殖の開始を制御する微生物間相互作用—環境中の微生物コミュニティが織りなす増殖制御ネットワーク
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青井 謙輝
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 2021年

1. 発表者名 鈴木陸太, Eunyoung Seo, 加藤節, 中島田豊, 青井謙輝
2. 発表標題 増殖の開始を制御する微生物間相互作用：環境中の微生物コミュニティにおける増殖制御ネットワーク
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度 中四国支部大会（第57回講演会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場 啓彰, Jung Dawoon, 加藤 節, 中島田 豊, 青井 謙輝
2. 発表標題 固体培地上でコロニーを形成しない微生物の選択的獲得：未培養微生物への効率的アクセス
3. 学会等名 第71回日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山 周, Eun Young, 鈴木 陸太, 加藤 節, 中島田 豊, 大橋 晶良, 金田一 智規, 青井 謙輝
2. 発表標題 微生物間相互作用の促進は増殖の開始を誘導する：難培養性微生物の獲得に向けた新しいアプローチ
3. 学会等名 第71回日本生物工学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青井 議輝
2. 発表標題 微生物ダークマターへのアクセス：培養手法の革新と未知増殖制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第71回日本生物工学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木陸太、杉山周、Eunyoung Seo、加藤節、中島田豊、青井議輝
2. 発表標題 難培養微生物とは何か？環境中における未知増殖制御ネットワークを解き明かす
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青井 議輝
2. 発表標題 なぜ多くの微生物は培養困難なのか？
3. 学会等名 第65回日本放線菌学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019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	金田一 智規 (kindaichi Tomonori) (10379901)	広島大学・先進理工系科学研究科(工)・准教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	中尾 洋一 (Nakao Yoichi) (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