

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 24 日現在

機関番号: 82626

研究種目: 挑戦的萌芽研究

研究期間: 2011~2012

課題番号: 23651227

研究課題名(和文) 「未知生育因子/1細胞探索システム」の構築と未培養微生物の安定培養の実現

研究課題名(英文) Development of a novel single cell culture device via unidentified growth factor for culturing the uncultured microorganisms

研究代表者

菅野 学(MANABU KANNO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号: 10462847

研究成果の概要(和文):

新規デバイス上で未培養微生物を効率的に培養化することを最終目標に掲げ、本研究では、難培養微生物の細胞濃度をデバイス供試前にあらかじめ高める要素技術の開発を試みた。環境中の微生物群の一握りに可培養菌に限られる原因の1つとして、ある特定の増殖の早い菌が人工培地上に優占化されやすいことが挙げられる。本研究では、DVC法の原理と蛍光色素CFDA-AMによる細胞染色、フィルターを用いたサイズ分画を組み合わせることで、1日以内の操作で、増殖が遅くかつ生物活性を有する微生物細胞を選択的に濃縮する手法の開発に成功した。

研究成果の概要(英文):

In order to improve cultivation efficiency by using a future-developed cultivation device, we tried to establish novel method to enrich slow-growing microbial cells before applying to the device. In this study, a few established methods such as direct viable count (DVC) method, viable cell stain with CFDA-AM, and cell-size fractionation through a 0.8- μ m-pore-size membrane syringe filter, were combined. Consequently, we successfully separated small size (which mean slow-glowing) and also stained microbial cells with esterase dyes (which mean viable) within a day.

交付決定額

(金額単位:円)

交付決定額	直接経費	間接経費	合計
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野: 複合新領域

科研費の分科・細目: 生物分子科学・生物分子科学

キーワード: 生物活性物質の探索、環境微生物

1. 研究開始当初の背景

地球上には膨大かつ多様な微生物が存在することが明らかにされているが、そのほとんど（99%）は従来法では培養の困難ないわゆる未知・未培養微生物であると言われていた。この未探索の膨大な未知微生物フロンティアにアクセスすることは、基礎科学における主要な関心事であり、大きな挑戦的課題とも言える。これまでに様々な培養法の改良を試みた研究が数多く報告されているものの、概して環境中の未培養微生物種が占める割合に変化はないのが現状である。

これら従来の培養法は、偶発的に人工培地で培養できた未培養微生物の生育特性を調べるのが一般的である。しかしこの手法では、培養初代はコロニー形成が認められても、植継ぎした第2世代でコロニー形成が認められなくなる場合が多い。これは、培養初代では生育因子の持ち込みがあるものの、第2世代ではそれが枯渇してしまい、結果的に生育できなくなるためと考えられる。つい最近になって、実環境中で未知微生物を培養する現場培養法が試みられており、実際に、未培養微生物の多くが環境中に存在する何らかの未知生育因子を要求する可能性が示唆されている。以上より、未培養微生物の要求する未知生育因子を一時的に加えるのではなく、その特定に挑まない限り、未培養微生物を安定的に培養することは困難であることが推察される。すなわち、真の意味で未探索の微生物フロンティアにアクセスするためには、未培養微生物の可培養化と未知生育因子の特定を同時に実現する必要がある。

2. 研究の目的

我が国が高い競争力を有するマイクロデバイス技術を環境微生物学の分野に挑戦的

に導入して、未知生育因子を供給可能な新しい微生物培養デバイスを構築し、未培養微生物の可培養化と未知生育因子の特定を同時に実現する革新的培養法を提案することを最終目的に掲げ、本研究では、まずその要素技術の開発を試みた。培養デバイスを利用して効率的に未培養微生物を培養化するには、環境中の微生物群を培養デバイスに供試する前に、難培養とされる微生物の細胞濃度をあらかじめ高めることが望まれるため、その手法開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 環境試料の採取

茨城県つくば市近郊の湖沼や森林、および宮城県登米市の水田から、それぞれ底泥や水、土壌、イネ個体を採取した。これら環境試料は、本研究で未培養微生物を分離培養するソースとして採取した。

(2) イネ個体からの微生物分離

表面を殺菌したイネの根を乳鉢を用いて破碎し、その破碎液を R2A 寒天培地上に塗布した。25℃で1週間後に観察されたコロニーを順次継代し、純粋分離株を獲得した。獲得した分離株の 16S rRNA 遺伝子配列を解読し、分子系統学的新規性の検証を行った。

(3) イネ個体の微生物相の解析

表面を殺菌したイネの根から抽出した環境 DNA から、16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅し、クローニングした増幅断片の配列を解読した。本解析を行うことで、未培養微生物の存在する度合いについて検証を行った。

(4) DVC 法、蛍光染色法

環境試料の懸濁液を TSB 培地もしくは R2A 培

地に添加して 30°C で振とう培養 (150rpm) した。約 6 時間後に、フィルター滅菌した細胞分裂阻害剤溶液 (ナリジクス酸、ピペミジン酸、ピロミジン酸を含む) を適量添加して、さらに約 9~15 時間培養を行った。細胞サイズの伸長の程度を顕微鏡観察により確認し、必要ならば超音波処理とシリンジフィルターを用いたサイズ分画を行った。適当な濃度に微生物の濃縮を行った後に、あらかじめフィルター滅菌した CFDA-AM 溶液を適量添加して、生細胞のみを染色した。緑色蛍光を発する細胞を蛍光顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) 環境試料の選定

まず初年度に湖沼底泥や沼水、森林土壌試料の採取を行った。これら環境は、膨大かつ多様な微生物が存在し、そのほとんどが難培養な未知微生物であることが広く知られている。さらに、水田で栽培されたイネ個体を採取し、その根内に存在する微生物群を対象に 16S rRNA 遺伝子ライブラリー法を行い、イネ根内に共生する微生物の多くが未知微生物群と示唆されることを確認した。一方で、一般的な平板培地を用いて同試料から微生物の獲得を試みた結果、系統的に類似する既知の分離株ばかりが採られた (*Firmicutes* 門 *Paenibacillus* 属細菌、*Cohnella* 属細菌) ため、従来の培養法では未知微生物群を獲得することが困難であると推察された。

(2) 易培養微生物の標識技術の開発

環境中の多様な微生物種の一握りのみに可培養菌に限られる原因の 1 つとして、ある特定の生育速度の早い菌が人工培地上で優占して選抜されやすいことが挙げられる。そこで、DVC 法の原理と蛍光色素 CFDA-AM による細胞染色を組み合わせることで、任意の人

工培養環境 (栄養条件、温度、pH など) で増殖の早い易培養な微生物と増殖の遅い難培養な微生物を見分ける手法の検討を行った。まず初年度は、大腸菌に本手法を適用することで、増殖可能な培養条件においては蛍光染色された伸長細胞として観察されることを確認した。次に、湖沼底泥試料と沼水試料中の微生物群を対象に本手法を適用したところ、特定の微生物群が蛍光の伸長細胞として観察された。本手法の適用前後の微生物群をそれぞれ DAPI 染色後に観察して分布パターンを調べたところ、通常サイズ 1~3 μm のサイズで分裂していた細胞が 5 μm 以上にシフトしたと考えられた。これら伸長細胞は、難培養微生物の分離を困難とする一因である易培養微生物と考えられ、本手法の適用により 12 時間程度でその特徴化に成功した。



図 1 伸長した細胞群

(3) 難培養微生物の標識、濃縮技術の開発

最終年度には、上記の操作に続けてシリンジフィルターを用いた分画を行うことで細胞サイズの大きい易培養微生物の排除を試みた。しかし、サイズ 1 μm 以下で存在する難培養微生物細胞の大半が伸長して凝集した易培養微生物に捕集されて分離が困難であること、環境中の孢子が排除されずに難培養微生物と一緒に分画されることから、難培養微生物のみを選別することは困難であっ

た。そこで、細胞構造に最も影響が少なく、かつ凝集体を解消する最適な超音波処理の強度を大腸菌で検討した。各環境試料の微生物群を対象に、DVC 法、超音波処理、フィルター分画、CFDA-AM 染色を順に行うことで、 $0.8\mu\text{m}$ のフィルターサイズを通過する蛍光の非伸長細胞が観察された。これら非伸長細胞は、任意の人工培養環境では培養できない、もしくは生育速度の遅い難培養微生物と考えられ、本手法の適用により 1 日以内の操作でその標識、濃縮に成功した。

今後、蛍光標識した難培養微生物の細胞群をセルソーターで 1 細胞ずつ培養デバイス上へ分取し、効率的に分離培養する方法の確立を目指す。

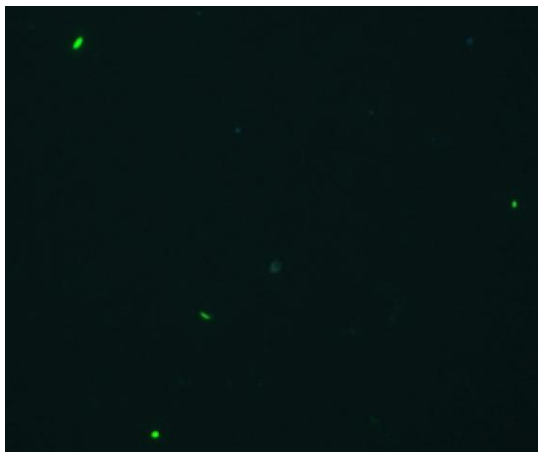


図 2 標識、濃縮された難培養微生物候補の細胞

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅野 学 (MANABU KANNO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：10462847

(2) 連携研究者

鎌形 洋一 (YOICHI KAMAGATA)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究部門長

研究者番号：70356814

玉木 秀幸 (HIDEYUKI TAMAKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：00421842