

特殊セルロースシートを用いた未培養微生物の効率的な単離培養法の開発

青柳 秀紀
筑波大学 生命環境系

研究成果

寒天平板培養法の問題点を解消した未培養微生物の実用的な単離培養法（培養基材：CS-SCS）を開発した。土壌などの試料を、CS-SCSや寒天平板培地で培養後、培養微生物群集を比較解析した結果、CS-SCSでのみ得られる微生物の存在が示された。得られた微生物叢の多様性を調べた結果、CS-SCSは寒天平板培地よりも高い割合で新規微生物を培養化できることが示された。

研究の目的

近年、従来の微生物培養法（寒天平板培養法）では、自然界に存在する微生物の1%未満しか培養できないことが明らかとなり¹⁾、その限界が指摘されている（微生物関連産業界でも新規有用微生物が獲得されにくくなっていることが問題になっている）。残された99%の未培養微生物は“Dark matter 微生物”と呼ばれ、学術面、産業面でその利用が期待され^{2,3)}、網羅的な環境ゲノム解析が世界中で行われている（残された99%の微生物を培養化、利用できれば有用性は大きい）。しかしながら、塩基配列だけでは分からない微生物機能の解明や実用的利用を行う場合、実際に未培養微生物（Dark matter 微生物）の単離培養が必須になる。このような背景から、これまで、種々の培養法が開発されてきたが、実用面に問題があり、一般的に普及していない。

この現状を踏まえ、本研究では、従来の寒天平板培養法の問題点を排除した、特殊セルロースシートを活用した実用的な未培養微生物の新規単離培養法（培養基材：CS-SCS）を開発する。さらに、CS-SCSを用い、様々な環境試料を対象に未培養微生物の単離培養をおこない、その有用性を実証する。

方法

土壌、淡水、海水、植物などの種々の環境試料を適宜調製した後、本研究で開発したCS-SCS (Fig. 1)と従来の寒天平板培地を用いて、25°Cで約2週間、培養を行った。CS-SCSや寒天平板培地で得られた培養微生物のDNAを抽出し、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（PCR-DGGE法）を用いて培養微生物叢を解析した。また、適宜、次世代シーケンサーを用いた網羅的な

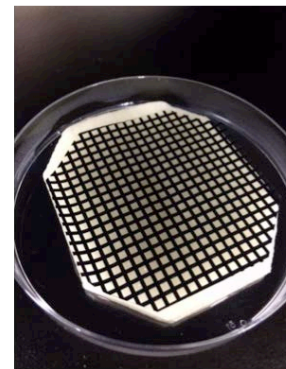


Fig. 1. Photograph of CS-SCS installed in petri dish (DIA : 9 cm).

比較解析も実施した。環境試料を培養して出現したコロニーを無作為に単離したのち、コロニーダイレクト PCR によって 16S rDNA の全長を増幅し、シーケンス解析を行い、単離した微生物種の推定を行った。

また、CS-SCS の有効な利用例の 1 つとして、寒天平板培地の使用が困難な、酸性条件下についても同様な検討をおこなった。

結果

種々の微生物の培養実験をおこない、CS-SCS の規格を最適化した。筑波大学構内で採取した土壌試料を CS-SCS と従来法で寒天平板培地し、得られた培養微生物群集を DGGE 法により比較解析した。その結果、CS-SCS では、寒天平板培地とは異なる培養微生物群集が形成されていた (Fig. 2)。また、解析の結果、新規微生物の存在が示された。淡水、海水などの環境試料を用いた系でも同様な傾向が認められた。また、土壌試料を、R2A 培地を用い CS-SCS と寒天平板培地でそれぞれ培養し、得られた培養微生物群集と土壌試料中の微生物群集を次世代シーケンサにより詳細に解析した。その結果、CS-SCS は従来の寒天平板培地と比較して、土壌試料に近い構成の培養微生物群集が形成された。

種々の植物試料 (ワサビ、ヒノキ等) を CS-SCS と寒天平板培地を用いて培養した結果、両者では得られる培養微生物集団が大きく異なった (得られた培養微生物の種類の類似性の統計解析を行った結果、それらの類似性はいずれも低い値を示した)。また、新規微生物 (未培養微生物) の存在が示された (今回検討した植物試料の中ではヒノキ樹皮の系で新規微生物が多く存在していた)。

CS-SCS の利用例の 1 つとして、寒天平板培地の使用が困難な、酸性条件下についても同様な検討をおこなった (CS-SCS は強酸性条件下でも使用可能)。はじめに、ゲルの弾性値を指標として、大腸菌を用い、コロニーの形状を保持できる寒天平板培地の強度の限界を測定し、種々検討した結果、限界弾性値として、27.8 kPa が設定された。種々の pH の寒天平板培地を調製し、弾性の経時変化を測定した結果、pH 1 の寒天平板培地を使用できる期間は 3 日以内であることが示された。pH 3 の条件で寒天平板培地と CS-SCS を用いて強酸性の環境試料を培養し、得られた培養微生物叢を比較した結果、寒天平板培地と比べて異なる菌叢が得られた (CS-SCS で好酸性微生物の効率的培養が可能であった)。

CS-SCS を用いて、寒天平板培地が使用できない pH 1 の条件で強酸性の環境試料からの微生物単離培養を行った結果、耐酸性の未培養微生物が単離培養できた。

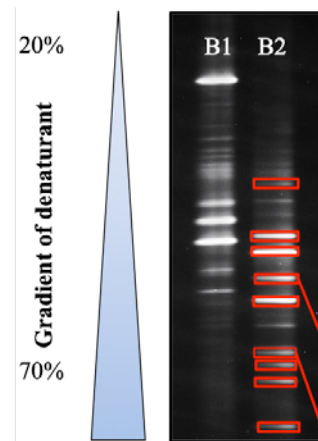


Fig. 2. SYBR Gold-stained DGGE gel. B1: R2A agar plate medium. B2: R2A medium with CS-SCS. The frame indicates microbes cultured only with CS-SCS.

結論

本研究で開発した CS-SCS は寒天平板培地の問題点を解消でき、新規微生物の単離培養に有効である。今後、CS-SCS により、新たな多様な微生物資源の獲得が期待される。

文献

- 1) Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev.* **59**:143-169.
- 2) Ling, L. L. *et al.* (2015) A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature* **517**: 455-459.
- 3) 青柳秀紀、青井義輝 (2019) 特集 未培養微生物（微生物ダークマター）の培養、解析、利用に関する研究開発の最前線と展望. *生物工学会誌* **97**: 546.