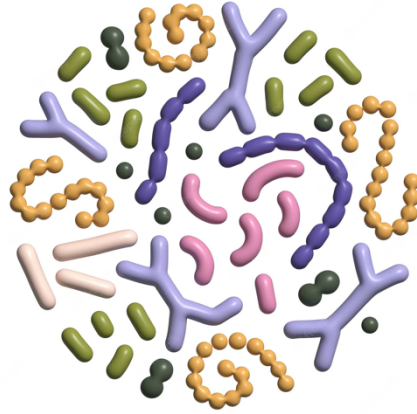


公益財団法人発酵研究所 学会・研究部会助成

公開シンポジウム
「微生物の分離・培養を考える」
要旨集

日時：2023年6月23日（金）10:40-12:50

開催：文部科学省 研究交流センター（オンライン開催）



主催：日本微生物資源学会

共催：新学術領域研究「超地球生命体を解き明かすポストコックホ機能生態学」



「微生物の分離・培養を考える」

概要：

自然環境に生息する微生物の多くがこれまでに培養されていない微生物からなるとされていますが、シーケンス技術や配列情報解析技術の進展により、メタゲノム解析等の培養を介さない研究で自然界の多様な微生物の把握やそれらの機能予測も容易になってきました。しかし、ゲノム情報を超えて研究を発展させるためにも、微生物の本質の理解に迫るためにも、対象となる微生物の分離・培養は極めて重要と考えられます。一方で、培養が難しい微生物種や未だ培養されたものがない系統の微生物を分離・培養することは、高度な培養技術と専門性が必要とされ、また、すぐには成果を得られにくい課題とされ、敬遠されることも多いようです。

そこで本シンポジウムでは、微生物資源分野の中心的課題のひとつである分離・培養について、正面から向き合い、優れた成果を挙げてこられた研究者の方々に、分離・培養について話題提供をいただき、今一度考える場になればと思っております。

日本微生物資源学会第 29 回大会
大会長 大熊盛也

公益財団法人発酵研究所 学会・研究部会助成 公開シンポジウム

「微生物の分離・培養を考える」

プログラム

10:40-10:45

公開シンポジウムを開催するにあたって

大熊盛也（理化学研究所 バイオリソース研究センター 微生物材料開発室）

10:46-11:16

青井議輝（広島大学 大学院統合生命科学研究科）

「多くの微生物が培養困難である理由を探る」

座長：大熊盛也

11:17-11:47

玉木秀幸（産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門）

「未知の微生物を”培養”して新たな生物機能を探る -Cultivation Renaissance in the post metagenomic era-」

座長：坂本光央

11:48-12:18

井町寛之（海洋研究開発機構 超先鋭研究開発部門）

「私たちは微生物の生き方を捉え直す必要があるかもしれない—海底微生物ハンティングから見えてきたこと—」

座長：伊藤 隆

12:19-12:49

橋本 陽（理化学研究所 バイオリソース研究センター 微生物材料開発室）

「真菌類、特に子のう菌門の分離培養とその課題」

座長：矢口貴志

S-1 多くの微生物が培養困難である理由を探る

青井 謙輝

広島大学 大学院統合生命科学研究科

Exploring hidden reasons for microbial uncultivability

Yoshiteru Aoi

Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University

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。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）や利用拡大に制限がかけられている状況でもある。

そこで、多くの微生物は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かもしれない。しかし、難培養性を説明可能な普遍的な理由は全く明らかになっていない。また、通常の培養法で容易に獲得（分離培養）できる微生物を解析しても「なぜ培養できないのか」という問いに対する答えには到達しないというジレンマが存在する。さらに、従来法に替わる画期的な分離培養手法もほとんど登場していない。

なぜ多くの微生物はなぜ培養できないのか？そもそも普遍的な要因が存在するかどうかも定かではない。つまり、常識的には、多くの微生物が培養できない理由は「培地組成など培養条件が適合しない」こと（だけ）が原因ではないかと考えられる傾向にある。しかし我々は、このような「培養条件の不適合性」以外に、まだ十分に検討されていない普遍的な要因があり得ると仮定して、新規分離培養手法を開発してその有効性を実証しつつ、さらにそれらの手法を通じて得られた難培養性微生物を用いて未知なる増殖制御機構の解明に取り組んでいる。

【新しい分離培養手法】新規培養手法の一例を以下に挙げる。

- 1) 微生物の罨：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。
- 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）。
- 3) 超高密度植菌法：培養初期の菌体密度を従来の方法の10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。培地条件は同一にもかかわらず従来法の10倍程度高い培養効率（コロニー形成率）を示すことが判明した。
- 4) 自身が産出する代謝物に感受性の高い微生物の選択的獲得：固体培地でコロニーを形成しにくい（またはコロニーを形成しない）微生物を選択的に獲得する手法。
- 5) 形態学的な特徴に基づいてターゲット微生物を分離する手法：マイクロコロニーを形成する微生物を選択的に分離することで *Nitrospira* の分離培養に成功した。

上記の手法を通じて獲得した微生物を解析したところ、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。

性質1) 休眠と覚醒：多くの環境中の微生物は好ましくない条件下では容易に非増殖状態（休眠状態）に移行する。環境状況が好転しても休眠状態からは容易に脱却せず，そこから脱却するためには，シグナル様物質（覚醒因子）が必要である。そしてそれは増殖状態の特定の微生物（異種・同種）から分泌される。

性質2) 多くの難培養性微生物（未培養微生物）は，自身が産出する代謝物（代謝副産物）に増殖を顕著に阻害され，コロニー形成が不可能であるなど従来法では容易に分離できない。また上記の1) および2) の性質を両方併せ持つような微生物種は極めて分離培養が困難である。

本講演では，上記の新規培養手法の開発，そしてそれらの新規手法を用いて分離した未培養微生物の生理学的性質から得られた知見について紹介しつつ，難培養性の本質について議論する。

S-2 未知の微生物を“培養”して新たな生物機能を探る

玉木秀幸

産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門

Cultivation renaissance in the post metagenomic era

Hideyuki Tamaki

AIST Bioproduction Research Institute

奇しくも本年はロベルト・コッホ博士の生誕 180 年にあたる。このコッホ・パスツールらの時代から、微生物を一つ一つ丹念に分離・培養してその機能を探る、というアプローチは微生物学の王道であり、基礎生物学・微生物系統分類学・環境微生物学・微生物生態学はもとより、医療、衛生管理をはじめ食品産業、農業、水産業など多岐にわたる学術・産業分野に貢献してきた。一方で、分子生態学的アプローチの誕生により、環境中の微生物の多くが未だ培養されたことのない未知の生物であることが詳らかとなるとともに、今日に至っては、環境ゲノム情報解析研究が隆盛を極め、環境中に 0.1%でも存在すれば、その微生物のゲノムを高い完成度で再構築し、その未知機能に迫ることができつつある。実際に環境ゲノム情報解析が世界中で盛んに行われ、地球微生物ゲノムアトラスの構築が進められており、系統学的な側面からすれば、環境中の微生物の多くは「未知」の微生物ではなく、ゲノム情報の存在する「未培養」の微生物になりつつあると言っても過言ではない。一方で、大規模環境ゲノム解析により明らかになったもう一つの事実は、機能面でみると、環境中の未培養微生物の多くは、以前として「未知」のままである、ということである。ゲノム情報をどれだけ多く獲得したとしても、系統的に新しい微生物であればあるほど、機能の不明な遺伝子が多く、それ故に未培養微生物が本来もつ深淵な未知機能に迫ることが難しいという側面がある。膨大な未知微生物のゲノム情報の数と、分離培養を経て機能が詳細に調べられ学名が記載された微生物の種の数との隔たりが極めて大きいことがその所以であり、今、改めて、微生物を「培養」して調べることの重要性が世界的にも広まってきている。Cultivation Renaissance の到来である。我々は 20 年以上にわたり、「未知の微生物を“培養”して新たな生命機能を探る」を主題とした取組みを継続実施してきており、未知・未培養・難培養微生物の可培養化技術の開発を進めるとともに、特に深部地下圏環境、植物-微生物共生系、腸内環境等に生息する未知微生物の培養と新生物機能を明らかにしてきている。本講演では、我々の一連の取組みを紹介しながら、改めて未知微生物を活きたまま獲得して研究することに意義を踏まえ、未知微生物遺伝子資源の学術・産業（特にバイオものづくり時代における未利用微生物資源探索等）の両面における可能性について議論したい。

S-3 私たちは微生物の生き方を捉え直す必要があるかもしれない

—海底微生物ハンティングから見えてきたこと—

井町寛之

海洋研究開発機構 超先鋭研究開発部門

We may need to rethink the way microbes live –what I have learned from microbe hunting from deep-sea sediment–

Hiroyuki Imachi

Institute for Extra-cutting-edge Science and Technology Avant-garde Research (X-star),

Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC)

このいる多くの皆さんもこれまで幾度となく、「なぜ微生物を培養する必要があるのですか？」といった質問を受けてきたのではないのでしょうか。その答えとして「微生物は目で直接見ることができず、細胞形態も単純なために顕微鏡を使っても識別することが難しい。また個々の微生物を分離しないと何を食べて、何を出しているのかをハッキリと知ることができない。だから、培養というのは古典的であるものの微生物学において王道かつ重要な方法なのである」というような感じで答えていると思います。実は約10年前に自分の雇用継続がかかった審査でも同じ質問をされ、上記のように答えました。審査委員長の理事は生物学者ではあったものの、私の答えに納得していない感じがあり、審査もスッキリしない感じで終わりました。その頃からぼんやりとですが、この答えは説得力に欠けているのかもしれないと思うようになりました。最近の私は、真核生物の起源に関するアーキアの研究¹が中心となっていて、気づけば「真核生物の起源」という生物学の中心命題について研究を行っています。このような研究を行っているので、聴衆が大型生物を扱う生物学者ばかりのときも多々あります。そのような場では微生物を培養する意義について説明が必要なきががあります。そのときに私は「目で見える生物、つまり真核生物は肉眼で観察でき、私たちと進化的に類似点も多いため、行動や食事の様子などから生き方を理解しやすい。一方で、私たちと進化的に遠い原核生物は肉眼で見えないため観察しづらく、生き方を理解することは難しい。だから微生物を培養して1種類にすると生き方を理解しやすい」と説明しています。つまり、微生物は小さいがゆえに大きい生物と比較して調べることが非常に難しいということを微生物研究者はもっと声高に主張した方がいいのではないかと私は考えています。

さて、前置きが長くなりましたが、本発表では、私が取り組んできた海底堆積物からの未培養微生物の培養について紹介します。いずれの自然環境にも未培養微生物は存在しますが、海底堆積物は未培養微生物のホットスポットとして捉えられています。その理由は現場に優占化している微生物のほぼすべてがほぼ全てが分類学上の高階位（例えば門、綱や目など）で培養がなされたことがない微生物であるためです。このような背景から、海底堆積物から微生物の培養の試みは多くされてきましたが、現場の優占種や機能

的に重要と思われる微生物が培養された例はほとんどありません。私は従来の培養方法の限界を克服し、海底堆積物に生息する微生物を実験室で飼いならすために、下降流懸垂型スポンジ (Down-flow Hanging Sponge: DHS) リアクターを用いた連続培養による微生物の集積・活性化・馴致化と、その後の選択的バッチ培養という 2 段階で構成される培養アプローチを採用しています²⁾。本発表では、海底堆積物の優占微生物群の 1 つであり、真核生物の起源と関連するとされているアスガルド類アーキアの最初の代表である *Promethearchaeum syntrophicum* MK-D1 株の分離・培養を例にしながら、DHS リアクターを用いた海底堆積物からの未培養微生物の培養方法を紹介します。そして、17 年間に渡る海底微生物の培養研究を通じて私が今考えていること – 「微生物の生き方」について捉え直しが必要だろう – についても述べる予定です。

参考文献

- 1) Imachi H and Nobu MK *et al.*, 2020. Isolation of an archaeon at the prokaryote-eukaryote interface. *Nature*, 577: 519–525.
- 2) Imachi H, Nobu MK and Miyazaki M *et al.*, 2022. Cultivation of previously uncultured microorganisms with a continuous-flow down-flow hanging sponge (DHS) bioreactor, using a syntrophic archaeon culture obtained from deep marine sediment as a case study. *Nature Protocols*, 17: 2784–2814.

S-4 真菌類, 特に子のう菌門の分離培養とその課題

橋本 陽

理化学研究所 バイオリソース研究センター 微生物材料開発室

Challenges associated with isolation and culture of fungi, especially Ascomycota

Akira Hashimoto

Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Research Center

生命の本質を知るためにはその生物の生息環境（ハビタット）を解明することが最重要課題の一つである。加えて、その生物がどのような生物たらしめるのかプロフィールをするためには培養というステップが必要不可欠である。真核生物の最大のグループの一つである真菌類は後方鞭毛型の共通祖先から派生してきたと考えられ、複数回にわたり陸上化の試みの中で複数回にわたり鞭毛を失い、菌糸構造を獲得してきたと考えられる。菌類の興味深い特徴として、常に植物（高等植物・藻類）や動物、バクテリアなどの他者に腐生、共生的もしくは寄生的な関係が挙げられる。菌類は、この関係性によって自然界において炭素や窒素の栄養サイクルにおいて重要な役割を担っている。

真菌類の種多様性を理解するためには、分類学的研究と地域ごとの種の目録（インベントリー作成）が必要であった。そのため、真菌類の研究は長い間、標本に強く根付いて進められてきた。1850年代に Brefeld, O. (1839–1925) がゼラチンを培地に採用した単胞子分離法を確立して以来状況は大きく変わることになる。この純粋培養の培養技術は改善を重ねられ現代へと受け継がれ、培養菌株の重要性もますます重視されるようになった。しかしながら、菌学は 130 年以上も真菌類の培養に挑んできたが、推定種数に対する分離培養成功例はごくわずかである。本発表ではこれまでの真菌類の培養技術の苦勞と、演者の試み、加えてそれらを通して見えてきた課題を議論する。本発表では真菌類の中でも特に重相亜界 (Dikarya) の子のう菌門のチャワソウタケ亜門を話題に焦点を当てる。

1) これまでの菌類培養法の手法と困難：子のう菌類の培養の事始めは環境サンプルの採集から始まる。野外から土や糞、毛などの基質を準備し、基質の性質に合わせて子実体誘導の処理をする。これにより目的の菌が生じた場合はそこから単離作業に移る。一方で、野外で子実体を探索した場合は子実体から直接胞子を掻き取り、胞子懸濁液を作り分離方法などがよく用いられる。いずれの手法においても子実体を誘導できることや胞子が発芽することが前提となる。胞子発芽は貧栄養培地で成功することが多いが、その他の要因が求められる場合も存在する。

2) アイディアと工夫による挑戦：演者はこれまでに培養株が確立されていなかった菌種や未知系統の分離培養株の確立を試してきた。例えば発芽が困難な場合は天然基質の抽出物を加えるか、単胞子ではなく多胞子分離をするか、子実体組織からの培養を試みることがある。同一性の確認や成長が遅いことによる

ハンドリングの問題点が未解決の状態にあるが、新規分離株確立という問題に対してはいくつかの成功事例が得られつつある。

3) 技術的な困難と解決すべき課題：菌株の性状検査と安定した保存技術の課題が急務の課題に挙げられる。基本的に良く扱われるような菌種は 10% グリセロールや 10% DMSO の保存液を使うことで問題なく長期保存が可能であるが、一部の菌種では生残性が著しく落ちるか長期保存の中で緩慢な死を迎えることがある。前者の問題に対しては凍結保存作成前の前培養で用いる培地の種類で改善が見られた事例を紹介する。後者については長期的なモニタリングが求められる。

最後に、ポストゲノム時代の現代においては、培養株がゲノム技術と結びつくことで生命に対する多角的な理解を与えると考えられる。そのためにも、菌株を将来につなげるために新たな微生物資源の開発および日々の管理が求められる。

公益財団法人発酵研究所 学会・研究部会助成

公開シンポジウム

微生物の分離・培養を考える

令和5年6月23日

発行 日本微生物資源学会

〒305-0074 茨城県つくば市高野台3-1-1

国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室

電話：029-836-9565