

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656497

研究課題名(和文) 微小重力培養を活用した新規微生物スクリーニング法の開発とその有用性の評価

研究課題名(英文) Application of low-shear modeled microgravity culture for screening of new microbes and it's evaluation

研究代表者

青柳 秀紀 (AOYAGI, Hideki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00251025

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：模擬微小重力培養が環境サンプルの微生物叢に及ぼす影響を解析し、新規微生物のスクリーニング法としての有用性を評価した。種々検討した結果、模擬微小重力培養では、通常重力培養と比較して微生物叢の増殖や基質消費が顕著に促進され、最終菌体濃度も増大した。また、模擬微小重力培養に対する微生物の応答性の違いに基づき、3種類のタイプに分類できた。模擬微小重力培養で増殖が促進する微生物の中には、新規微生物の存在が示唆され、本法の有用性が示された。

研究成果の概要(英文)：The effects of low-shear modeled microgravity (LSMMG) on a microbial community were investigated, and the potential application of LSMMG culture in the screening of new microorganisms was evaluated. The cell growth and sugar consumption rates, and final cell concentrations in LSMMG culture were higher than those of normal-gravity culture. Three groups of microorganisms were observed: a) the growth was promoted by LSMMG; b) the growth was suppressed by LSMMG; and c) the growth was not affected by LSMMG. The microorganisms whose growth were promoted by LSMMG showed that some had high similarity with microorganisms that have not yet been isolated. The LSMMG culture is useful for screening of new microorganisms.

研究分野：生物化学工学、細胞機能開発工学

科研費の分科・細目：生物機能・バイオプロセス

キーワード：模擬微小重力培養 微生物 細菌 スクリーニング VBNC ultramicrobacteria バイオリクター

## 1. 研究開始当初の背景

約 100 年前に Louis Pasteur や Robert Koch により確立された近代微生物学の基本手法である微生物純粋培養技術により、これまで数多くの有用微生物が自然界から単離、獲得され、医薬品、食品、化成品、有用酵素等の製造に活用されることで微生物関連産業は大きく発展した<sup>1)</sup>。しかしながら、近年、純粋培養技術を基礎とした従来の微生物スクリーニング法では、自然界から新規な有用微生物が獲得され難くなっている。その結果、微生物純粋培養法を基盤技術として発展してきた微生物関連産業は現在、閉塞状態に陥っている。一方、遺伝子情報をベースにした分子生態学的手法を用いた環境中の微生物群集の解析結果によれば、従来の純粋培養技術で取り扱うことができる微生物は自然界に存在する微生物の 1% 以下であることが指摘されている<sup>2-4)</sup>。自然界には未利用(未培養)な微生物資源が依然として数多く残されており、今後、自然界に存在する 99% の未培養微生物の活用は、微生物関連産業界にとって極めて重要な課題である。未培養微生物を利用する手法の一つとして、従来の培養法に代わる新たな培養法の開発が期待されている。

この現状を踏まえ本研究者は、新たな培養法として模擬微小重力培養 (Low shear modeled microgravity culture) に注目した。模擬微小重力培養装置は培地成分等の物質の優れた拡散と低せん断力環境を主な特徴としており、宇宙空間における微生物の表現型や増殖の変化やせん断力が微生物に与える影響評価のモデルとして使用されている<sup>5)</sup>。また、再生医療分野でも注目され、骨や腎臓の培養が行われている<sup>6, 7)</sup>。さらに、模擬微小重力培養は微生物の生理活性に様々な影響を及ぼすことが報告されている。しかしながら、これまで模擬微小重力培養が複数の微生物叢に及ぼす影響の解析や、新規微生物のスクリーニングに活用した研究はなく、いずれも未解明な分野であった。

1) ひらく、ひらく「バイオの世界」14 際からの生物学入門、日本生物工学会編、化学同人、(2012)。

2) R. I. Amann, W. Ludwig, K. H. Schleifer: Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169 (1995).

3) G. W. Tyson, J. F. Banfield: Cultivating the uncultivated: a community genomics perspective. *Trends Microbiol.* **13**, 411-415 (2005).

4) A. Hayashi, H. Aoyagi, T. Yoshimura, H. Tanaka: Development of novel method for screening microorganisms using symbiotic association between insect (*Coptotermes formosanus* Shiraki) and intestinal microorganisms. *J. Biosci. Bioeng.* **103**, 358-367 (2007).

5) C. Nyquist-Battie, L. Freeman, K. Leckband, S. Martinez, A. Ansley, D. Lund, D. V. Lim:

Antibody-based Detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium grown in low-shear modeled microgravity. *Microgravity Sci. Technol.* **20**, 23-28 (2008).

6) Q. Qiu, P. Ducheyne, P. S. Ayyaswamy: 3D bone tissue engineered with bioactive microspheres in simulated microgravity. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Animal.* **37**, 157-165 (2001).

7) E. A. Botchwey, S. R. Pollack, E. M. Levine, C. T. Laurencin: Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system. *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 242-253 (2001).

## 2. 研究の目的

前述の様に、従来の微生物培養法で単離培養できる微生物は自然界に存在する微生物の 1% 前後であり、従来法の問題点を排除した新規培養法が求められている。この現状を踏まえ、本研究では模擬微小重力培養を活用した新規微生物スクリーニング法の開発を試みた(模擬微小重力培養を微生物のスクリーニングに応用した研究は国内外を通じてはじめてである)。具体的には、(A) 模擬微小重力培養が微生物叢に及ぼす影響の解析、(B) 模擬微小重力培養に対する微生物の感受性の解析と感受性を指標にした微生物の分類、(C) 模擬微小重力培養を活用した新規微生物のスクリーニング(単離)と獲得した微生物の諸特性の解析、などを行い、本法の有用性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 模擬微小重力培養が微生物叢に及ぼす影響の解析: 各種の環境サンプルを対象に、様々な培地を用いて、模擬微小重力培養と通常重力培養条件で集積培養を行い、模擬微小重力培養が微生物叢に及ぼす影響を経時的、定量的に解析し、全体像を把握する。具体的には、増殖経過、栄養源消費経過、代謝産物の挙動、微生物叢解析と微生物種の推定を実施した。

(2) 模擬微小重力培養に対する感受性を指標にした微生物の分類と感受性が異なるメカニズムの解析: 模擬微小重力培養に対する感受性を指標に微生物を、(a) 模擬微小重力培養で特異的に増殖(あるいは増殖促進)するタイプ、(b) 模擬微小重力培養で増殖が抑制(あるいは阻害)されるタイプ、(c) 模擬微小重力培養の影響を受けにくいタイプ、の種類に分類した。また、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  のフィルターで環境サンプルを濾過した後、模擬微小重力培養を行い、模擬微小重力培養が ultramicrobacteria 叢に及ぼす影響についても検討を試みた。

## 4. 研究成果

本申請者は、模擬微小重力培養を活用した新規微生物のスクリーニング法の開発を目指し、種々検討を行った。模擬微小重力状態

を簡便に再現できる High-Aspect-ratio Rotating wall Vessel bioreactor (HARV) は NASA (USA) で開発された。HARV は、円形の Vessel (培養器) を水平軸で回転させることで重力を分散させ、細胞を培養液に浮遊させることで模擬微小重力培養が、Vessel を垂直軸で回転させることで通常重力培養ができる (図 1)。

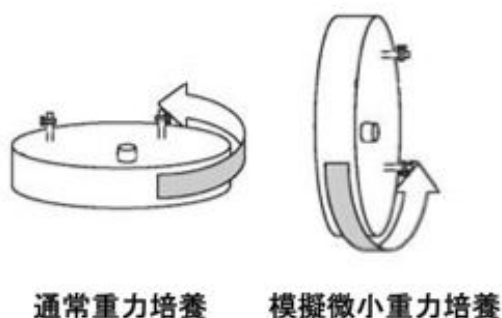


図 1. 通常重力培養と模擬微小重力培養の Vessel の回転方向

HARV は培地成分などの物質の優れた拡散と低せん断力環境を特徴としており、宇宙空間における微生物の表現型や増殖の変化や、せん断力が微生物に与える影響評価のモデルとして使用されている。

実際に、種々の環境サンプルを、HARV を用いて模擬微小重力培養を行ったところ、培養に伴い Vessel のガス交換が生じ、Vessel 内の水分が蒸発し、気泡が発生し、12 h 以上の模擬微小重力培養は困難であった。そこで、適切な湿度制御により、Vessel 内の培養液蒸発と気泡発生を 방지、長期間の模擬微小重力培養を実現した。

環境サンプルのモデルとして、筑波大学構内で採取した池の水を用いた。環境サンプルは任意な孔径を有するフィルターで濾過した後、実験に使用した。環境サンプルを LB 培地に接種して、HARV (容量 10 ml) を用いて模擬微小重力培養と通常重力培養を行い、微生物叢の増殖とグルコース消費の経時変化をモニターした結果、模擬微小重力培養では通常重力培養に比べて微生物叢の増殖速度およびグルコース消費速度が速く、最終菌体濃度も高い値を示した。培養 72 h のグルコース消費量あたりの菌体濃度増殖量は、模擬微小重力培養で 2.65 [U.O.D.<sub>400</sub>/g-glucose]、通常重力培養で 1.46 [U.O.D.<sub>400</sub>/g-glucose] であり、模擬微小重力培養で通常重力培養の 1.8 倍大きな値を示した。

環境サンプルを Schneider's 培地に接種して模擬微小重力培養と通常重力培養を行い、微生物叢の増殖とグルコース消費の経時変化をモニターした結果、LB 培地で培養した場合と同様に、模擬微小重力培養では微生物叢の増殖およびグルコース消費が速く、最終菌体濃度も高い値を示した。培養 48 h のグルコース消費量あたりの菌体濃度増殖量は、模擬

微小重力培養で 1.35 [U.O.D./g-glucose]、通常重力培養で 1.03 [U.O.D./g-glucose] であり、模擬微小重力培養を行うことによりグルコース消費量あたりの菌体濃度増殖量が通常重力培養の 1.3 倍高い値を示した。

模擬微小重力培養による増殖速度やグルコース消費速度の増大は、LB 培地、Schneider's 培地で同様に観察されたことから、培地の違いに依らない、模擬微小重力培養による影響だと考えられた。

LB 培地を用いて模擬微小重力培養と通常重力培養した際に得られた微生物叢を PCR-DGGE 法により解析した (図 2)。

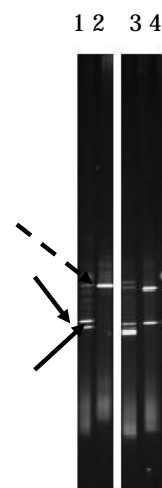


図 2 模擬微小重力培養 (レーン 1) と通常重力培養 (レーン 2) で得られた微生物叢の DGGE の解析結果。レーン 3: レーン 1 のサンプルを寒天平板培養で培養後、得られた微生物叢、レーン 4: レーン 2 のサンプルを寒天平板培養で培養後、得られた微生物叢

LB 培地で模擬微小重力培養をした微生物叢を示すレーン 1 の矢印 (実線) で示したバンドは、LB 培地で通常重力培養をした微生物叢を示すレーン 2 では検出されておらず、模擬微小重力培養に特有なバンドである。矢印 (破線) で示したバンドはすべてのレーンに共通してあらわれているバンドであり、模擬微小重力培養に影響を受けにくいことが予測された。

また、レーン 3、4 はレーン 1、2 の培養液を、LB 寒天平板培地に播種し 37 °C で一晩培養した微生物を集め、Plate-Wash PCR-DGGE 法により解析した結果である。その結果、模擬微小重力培養を行った時 (レーン 1) のみに見られた微生物の中には、寒天平板培地でも培養できる微生物が存在することが明らかとなった。寒天平板培地で培養ができるということは、微生物の単離培養が可能であることを示しており、今後、微生物の解析や利用を行う上で重要である。

種々検討を行った結果、模擬微小重力培養に対して、3 種類のタイプの微生物の存在が存在することが明らかとなった (a. 模擬微小

重力培養で特異的に増殖 [あるいは増殖促進] する微生物、b. 模擬微小重力培養で増殖が抑制 [あるいは阻害] される微生物、c. 模擬微小重力培養の影響を受けにくい微生物)。模擬微小重力培養を行った後、寒天平板培地を用いて培養を行い、得られた微生物叢の遺伝子解析を行った結果、複数の未培養微生物が培養できることが示唆された。

以上の結果は、模擬微小重力培養が、従来法では培養が困難であった微生物の新規スクリーニングに応用できる可能性を示唆している。現在、微生物関連産業界では、“純粋培養法を基礎とした従来の微生物スクリーニング法では、自然界から新規な有用微生物を獲得することが困難になりつつある”ということが問題となり、この現状を打破できる新規な微生物スクリーニング法の必要性が叫ばれて、様々な研究が取り組まれている。

このような現状を踏まえ、本研究者は、模擬微小重力培養に対する微生物の応答性の違いに着目し、スクリーニングに応用することを考案し、種々検討を行い、模擬微小重力培養を活用することで、通常重力培養とは異なる微生物が獲得できる可能性を示唆した (孔径 0.2 μm のフィルターで環境サンプルを濾過した後、模擬微小重力培養を行った結果、ultramicrobacteria 叢の獲得にも有効である可能性が得られた)。

本研究成果は、模擬微小重力培養をスクリーニングに応用し、その有効性の可能性を示した初めての報告である。模擬微小重力培養は微生物純粋培養技術に代わる新しい培養法としてポテンシャルは高く、今後、本法を用いることにより新規有用微生物を獲得し、生物関連産業の活性化に大きく貢献することが期待される。

## 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3件)

青柳秀紀、黒田晶葉、模擬微小重力培養が孔径 0.2-μm のフィルターで濾過した微生物叢に及ぼす影響の解析と新規微生物スクリーニングへの応用、生物工学会誌、査読有、92、2014、72

青柳秀紀、微生物の新規培養法の開発と利用-模擬微小重力培養を活用した微生物の新規スクリーニング法の開発-、ケミカルエンジニアリング、査読無、57、2012、889-893

Hideki Aoyagi, Akiha Kuroda, Effects of low-shear modeled microgravity on a microbial community filtered through a 0.2-μm filter and its potential application in screening for novel microorganisms. Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, 114, 2012, 73-79, doi:10.1016/j.jbiosc.2012.02021

[学会発表](計4件)

Hideki Aoyagi, Effect of low-shear modeled microgravity on a microbial community and its potential application. XIV<sup>th</sup> International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2014年7月29日, Montreal, Quebec, Canada (accepted: 2014年4月20日).

瀬藤智也、青柳秀紀、カタラーゼとピルビン酸が孔径 0.2 μm のフィルターで濾過した環境サンプル中の微生物叢に及ぼす影響の解析と利用、第65回日本生物工学会大会、2013年9月18日、広島国際会議場

Tomoya Kouketsu, Hideki Aoyagi, Effect of low-shear modeled microgravity on microbial community and its application in screening for novel microorganisms. University of the Philippines Los Banos, 2013年3月6日, University of the Philippines Los Banos, Philippine

黒田晶葉、瀬藤智也、青柳秀紀、模擬微小重力培養を活用した微生物の新規スクリーニング法の開発、第64回日本生物工学会大会、2012年10月26日、神戸国際会議場

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青柳 秀紀 (AOYAGI, Hideki)

筑波大学・生命環境系・教授

研究者番号：00251025