

振盪フラスコ培養中の気相と液相の CO_2 と O_2
の挙動解析と新規な微生物スクリーニング法の
開発

2017年1月
高橋 将人

振盪フラスコ培養中の気相と液相の CO_2 と O_2
の挙動解析と新規な微生物スクリーニング法の
開発

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（生物工学）学位論文

高橋 将人

論文の要約

ヒトは古くから微生物を利用しており、1940年代ごろまで伝統的な醸造産業のような嫌気培養が主流であった。その後、時代背景に基づきペニシリンの大量生産が渴望され、抗生物質やアミノ酸発酵などのような好氣的培養による物質生産を促す発酵産業が展開した。発酵産業に用いられる大型のバイオリアクター（生物反応装置）の起源は、化学産業で用いられていたリアクターであり、生物工学は化学工学的な側面（培養機の開発などの培養環境の作製）と生物学的な側面（微生物の生理活性など）を有する。微生物培養工学は主に好氣的培養および産業と密接に関係をもちながら発展してきた。微生物を対象とする研究の主な目的は、(1) 人体や自然などの生態系フローラの理解、と(2) 有用な微生物や化合物および遺伝子の探索と獲得、を基盤とした(3) 実用的価値の創出（物質生産や環境浄化など）である。現在、微生物研究に様々な学問が参入し多様な広がりを見せており、近年では、シーケンシング技術やゲノム編集技術また情報 (IT)・人工知能 (AI) 技術を積極的に活用した研究が実施されている。また、未だに自然環境中の微生物は約 1%しか単離、培養されていない現状 (Torsvik, *et al.*, 1996) から、培養を介さないメタゲノム解析による環境中の遺伝子をスクリーニングする方法 (Uchiyama, *et al.*, 2009)、従来の培養法とは全く異なる手法 (Aoi, *et al.*, 2009; Nichols, *et al.*, 2010; Imachi, *et al.*, 2011; Fujitani, *et al.*, 2013) や特殊な環境試料を用いて新規微生物の集積や単離する方法が盛んに試みられている。今後、新たに遺伝子導入された微生物や単離した微生物は増加すると考えられる。

それらの微生物は、2次代謝産物や最適培養条件のスクリーニングといった初期のバイオプロセスの検討から、スケールアップなどの構築を経て有用物質を生産し、微生物関連産業で利用することが期待される。その際、微生物資源を活用するための根幹でもある培養環境を設定する技術が律速であってはならない。そこで私は、1933年に Kluver and Perquin により、ペニシリンの大量生産時に十分な植菌量を確保するた

めに開発され、現在では様々な細胞で用いられている振盪フラスコ培養法に回帰し、そこに新たな培養環境因子を付与することで、新たな培養環境を提案、設定できるのではないかと考えた。

第 1 章では、本研究の背景と目的について述べた。

第 2 章では、振盪フラスコ培養や自然環境からの微生物の単離、メタゲノム解析の現状と問題点について、既往の研究を概説し、本研究の背景と意義を明らかにした。

第 3 章では、私が発見した新奇な現象について述べた。振盪フラスコ培養法を用いて土壌試料を YPD 培地で 50°C による集積培養した際に、短時間で間歇的なフラスコの培養栓の開封により、集積される培養微生物群集構造が大きく変化する新奇な現象を見出した。また、培養栓の開封を伴わない集積培養では得られなかった微生物の存在が示唆された。培養栓の異なる開封条件、異なる培地を用いた場合、前処理した土壌や海水の試料を用いた場合など、いずれも短時間で間欠的な培養栓の開封による培養微生物群集構造の変化が認められ、新奇な現象の普遍性が示唆された。土壌試料を用いた 30°C の培養結果は、コントロールとほぼ同じ DGGE のバンドパターンを示すか、もしくはコントロールよりも多様性が消失した。一方、海水試料を用いた 27°C の培養では微生物の多様性が維持できたことから、培養温度以外にも多様性を減少させる因子があり、気相部のガス組成に敏感な培養条件があることが示唆された。一例として、気相部以外に重要な培養環境因子として飽和溶存酸素濃度が挙げられ、溶解度が低い培養条件で現象が顕著に認められる傾向が示唆された。なお、新奇な現象は環境試料そのものの微生物種の構成にも依存すると考えられる。既存の機器を使用し、従来のフラスコ振盪培養法に些細な操作（間歇的な培養栓の開封）を設けることで培養微生物群集構造は変化し、新規微生物を獲得できることが示唆された。また、見出した新奇な現象は、従来の振盪フラスコ培養法にはブラックボックスが依然として存在していることを示唆しており、現象の実態に迫るためには、A) 培養栓の開封という手作

業の煩雑さを解消し、現象を模倣できるシステム、B) 気相部の引き金となっている培養因子を計測できるシステム、が必要であることが示唆された。

第4章では、上述のA) に焦点をあて、フラスコ気相部の制御が新規微生物の集積に有効であると考え、Automatic Aeration Flask System (AAFS) を開発した。AAFSは、無菌的かつ間歇的通気が可能であり、通気するガスの種類や通気量を設定できる。AAFSを用いた環境試料の培養では、間歇的な培養栓の開封と同様に新奇な現象が認められた。これにより、既存の三角フラスコを用いた振盪フラスコ培養法では得られなかった微生物を得られる可能性が示唆され、AAFSの有用性が示された。また、放線菌のスクリーニングでは培養前期に間歇的な通気を行うと多様性は減少し、中期または後期に行うと多様性を維持でき、さらに従来法では集積しなかったバンドが認められた。気相部に着目した間歇的な通気による培養微生物群集構造の変化は、pHとは関連性が低く、pHとは異なる培養液中の培養因子の変化によるものだと考えられ、AAFSを用いた微生物スクリーニング法は新規微生物の獲得に効果的である可能性が示唆された。培養栓の開封と同様に新奇な現象が認められたAAFSを用いた本実験結果は、微生物群集構造の培養という生物評価から従来の振盪フラスコ培養法のブラックボックス部分を指摘したのもでもある。好氣的培養における培養器の気相部が培養液中の微生物に及ぼす影響は未解明な点が多い。

第5章では、前述のB) に焦点をあて、検討を行った。具体的には、振盪フラスコ培養中の気相部への何らかの変化が培地中に影響を及ぼし、培養微生物群集構造に影響を及ぼしたと考え、好気性微生物の呼吸で必要とする O_2 とその代謝産物である CO_2 のガスに着目した。24 wells plateと CO_2 吸着剤用いた振盪培養でも新奇な現象が生じたことから、振盪培養中に同一のフラスコ内の気相部と液相部（培養液中）の両方の CO_2 と O_2 濃度をモニタリングできるシステム（Circulation Direct Monitoring and Sampling System : CDMSS）を開発した（Takahashi *et al.*, 2017）。CDMSSは、気液を循

環させたシステムであり測定機器を振盪することなく測定でき、振盪を中断することなくフラスコ内のガスと培養液のサンプリングができる。CDMSS を用い、従来の三角フラスコにおける *E. coli* および *S. cerevisiae* の振盪培養の CO₂ と O₂ の経過を解析した結果、(a) 振盪フラスコ培養中に酸素律速になりうる環境（溶存酸素濃度がゼロ）が生じる、(b) 気相部の CO₂ のモニタリングは対数増殖期の開始と終了のタイミングを予測できる、可能性を示唆した。さらに、従来のフラスコを用いた振盪培養では、CO₂ が気相部に高濃度に充満し、培養液中に高濃度に蓄積することが明らかになった。

実際に、新奇な現象を見出した初期の培養条件で CDMSS と AAFS を併用し、土壌試料の振盪フラスコ培養中に間歇的な通気を行った結果、純粋培養と同様に CO₂ が気相部に高濃度に充満し、培養液中に高濃度に蓄積することが明らかとなった。また、間歇的な通気により気相部の CO₂ 濃度の低下とそれに伴う培養液中の CO₂ 濃度の低下が認められ、通気後の気液の CO₂ や O₂ の挙動は、間歇的な通気が無い培養系とは大きく異なり、形成した培養微生物群集構造も従来とは異なることが明らかとなった。この結果、新奇な現象（振盪フラスコ培養中の気相部への間歇的な操作が培養微生物群集構造に及ぼす影響）は、気相部への間歇的な変化により気相部の CO₂ が喚起されるのに伴い培地中の CO₂ 濃度が低下し、培養微生物群集構造に影響を及ぼしたことが明らかとなった。さらに、振盪フラスコ培養中の気相部への間歇的な操作が、気相部の CO₂ 濃度を減少させ培養液中の CO₂ 濃度の低下をもたらすことで新奇な現象が生じることを示した。

今後、本研究で得られた知見やシステム（AAFSS と CDMSS）を活用し、振盪フラスコ培養法を用いるラボスケールの微生物探索や二次代謝産物、初期段階のバイオプロセス開発（培養条件の選定に関する生産的な条件検討）のスクリーニングの根幹である培養環境を設定する技術開発および微生物利用の拡大への貢献が期待される。

本研究は、振盪フラスコ培養法に新たな培養条件を付与することで、多様な細胞の

集合体である培養微生物群集構造の機能を開発できることを示唆した生物化学工学的な研究である。

Masato Takahashi, Yoshisuke Sawada, Hideki Aoyagi: Development of a circulation direct sampling and monitoring system for O₂ and CO₂ concentrations in the gas-liquid phases of shake-flask systems during microbial cell culture. *AMB express*, **7**, 163 (2017).

引用文献

Aoi, Y., Kinoshita, T., Hata, T., Ohta, H., Obokata, H., and Tsuneda, S.: Hollow-fiber membrane chamber as a device for in situ environmental cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3826-3833 (2009).

Fujitani, H., Ushiki, N., Tsuneda, S., and Aoi, Y.: Isolation of sublineage I *Nitrospira* by a novel cultivation strategy. *Environ. Microbiol.*, **16**, 3030-3040 (2013).

Imachi, H., Aoi, K., Tasumi, E., Saito, Y., Yamanaka, Y., Saito, Y., Yamaguchi, T., Tamaru, H., Takeuchi, R., Morono, Y., Inagaki, F., and Takai, K.: Cultivation of methanogenic community from subseafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. *The ISME Journal*, **5**, 1913-1925 (2011).

Kluyver, A. J. and Perquin, L. H. C.: Zur Methodik der Schimmel-stoffwechseluntersuchung. *Biochem. Z.*, **266**, 68-81 (1933).

Nichols, D., Cahoon, N., Trakhtenberg, E. M., Pham, L., Mehta, A., Belanger, A., Kanigan, T., Lewis, K., and Epstein, S. S.: Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 2445-2450 (2010).

Torsvik, V., Sørheim, R., and Goksøyr, J.: Total bacterial diversity in soil and sediment communities - A review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 170-178 (1996).

Uchiyama, T. and Miyazaki, K.: Functional metagenomics for enzyme discovery: challenges to efficient screening. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **20**, 616-622 (2009).