

微生物の固体培養法の限界とその打破を目指して

誌名	土と微生物
ISSN	09122184
著者名	鎌形, 洋一
発行元	土壌微生物研究会
巻/号	71巻1号
巻号補足	
掲載ページ	p. 2-5
発行年月	2017年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



シンポジウム

微生物の固体培養法の限界とその打破を目指して

鎌形 洋一^{1,2*}

¹ 産業技術総合研究所, 〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第 6-10

² 北海道大学大学院農学院連携大学院, 〒060-8589 札幌市北区北 9 西 9

How to overcome the limitation of conventional cultivation of organisms

Yoichi Kamagata^{1,2*}

¹ National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 6-10, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

² Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan

Abstract: Modern microbiology has been developed based upon cultivation of organisms in pure culture. Cultivation of organisms on solidified media brought about a revolution in microbiology in 1890's but it did not take long to find a clear limitation of this strategy, which is often referred to as "great plate count anomaly", a disparity between total cell counts and culturable cells counts on plates in environmental samples. Recent massive DNA sequencing technology allows to construct genomes of yet-to-be cultured organisms *in silico*, thus microbiologists can circumvent time-consuming and laborious isolation works. Nonetheless, what genome sequencing tells us is always speculative, and it never shows us the entity and the way of living in a vital way without having pure culture and cultivation-dependent studies. Here I overview the limitation of culturing organisms and issues behind it. I am also emphasizing that gelling agents and the way of medium preparation are crucial factors affecting the culturability of microorganisms.

Key words: uncultured organisms, great plate count anomaly, gelling agents, reactive oxygen species, metagenomics

1. 現代微生物学の源流となった固体培地による「純粋分離と培養」

実験室で「純粋に分離・培養された菌」が近代微生物学における生理学・生化学・遺伝学の発展をもたらした。多くの学問領域が長い歴史を持つ中で、現代微生物学のそれはただか 150 年程度でしかない。その源流は 19 世紀の後半「病原性微生物を純粋に分離・培養し、その微生物が病原性を持つことを証明する」ための研究に遡ることができる。驚くべきことに、当時はまだ「自然発生説」を唱える学者すら闊歩する混沌とした時代だった (天児, 2005)。一方で、感染症の真の原因を明らかにする微生物学の機は熟しつつあった。この時代、多数の微生物培養基剤の開発が試みられ、古典微生物学は現代微生物学へと変貌しつつあった。この潮流における最大の発明はペトリ皿を用いた寒天培地による固体培養法である (天児, 2005)。この方法はそれまでのほとんどすべての固体培養法を駆逐し、現代微生物学のもっとも基盤技術となり、今なお実験室において最も汎用される培養法となっている。もし、寒天培養法が編み出されなかったら、今日の微生物学はまったく存在していなかったかもしれない。

2. 固体培地による純粋分離がもたらした限界

寒天培養による微生物の培養は「一つの細胞を寒天培地の上に置いたとき、そこから倍々で増えてくる微生物の遺伝形質は均質 (クローン) である」ことを大前提としている。今日の最新研究では一つのクローン集団における遺伝的形質や表現形質が必ずしも均質でないという結果も得られつつあるが、基本的にはクローンとして見なすことに何ら問題はなく、このことによって再現性の高い研究が可能となった。こうして「純粋分離」が近代微生物学の根幹を形作り、今日の遺伝学や分子生物学の礎を作った。大腸菌が微生物学のモデルとなったのは、いともたやすく寒天培地でコロニーを再現良く形成する微生物だったからである。

微生物は環境中で生きており、増殖している以上、一細胞を取り出して適切な固体培地に接種すれば増殖を開始しコロニーを形成するはずである。少なくとも寒天培養法はそうした期待を抱かせるに十分なものだった。しかし純粋培養を基本とする微生物学に新たな限界が立ちはだかるまでにさほど時間はかからなかった。微生物学者の多くは早い段階から寒天培養では生育しない微生物が多数いることを経験的に見抜いていた。実際の環境場や環境試料に存在する細胞数とそれらを寒天培地上で培養したときに出現するコロニーの数との大きな差は 1985 年になって "great plate count anomaly" と表現され、次第に人々の注目を集め始めた (Staley and Konopka,

1985)。土壌、海洋、湖水といったごくありふれた環境中の微生物ほどその大部分が分離培養できない（コロニーを形成しない）のは自明のこととして認識されるに至った（Amann *et al.*, 1995）。この事実が決定的になったのは、1990年代以降の分子遺伝学的手法の急速な発展に依るところが大きい。微生物を培養することなく、環境試料中から直接全DNA/RNAを抽出して標的配列をPCRによって増幅、クローン化して遺伝子配列を決定することができるようになり、その証拠は決定的なものとなった。現在では大規模シーケンシングが常識となり、膨大な配列データが短時間で産出されるに至っている。

地球上にどれだけの種類の微生物がいるかについてはこれまでに多くの議論が重ねられてきた。一方、種概念が原核微生物に限っては旧来的な博物学や分類学の概念では統一的に捉えられないことが自明となり、基本的には特定の遺伝子（主に16S rRNA遺伝子）の類似度で語られるのが普通である。そうした中、推定値として述べられる微生物の種数は数千万あるいはそれ以上の数である。現在までに正式に命名登録されている種数はたかだか1万種強であるから、原核生物に限って言えば、ほんの一握りしか分類同定されていないことになる。

一方、日々急速に蓄積されつつある微生物の遺伝子情報とゲノム情報はそのほとんどが分離・培養を経ていないものである。寒天による分離・培養手法は、今も昔も変わらず使われている一方、そうした古典的方法によって新種記載される微生物の数と、培養を経ないで得られる遺伝子情報（メタゲノム情報）や推定される種数の情報は桁違いに開いていくばかり、というのが今日の状況である（玉木・鎌形, 2012）。

3. なぜ多くの微生物は分離・培養が困難なのか

あらためてこの問いについて考えてみよう。正解は当然のことながら無い。もちろん多くの推定がなされている（Puspita *et al.*, 2012）。代表的なものは次のようなものである。1) 既存の固体培地や液体培地に何らかの決定的な欠点や限界がある。2) 大腸菌の増殖速度に慣れてしまっている研究者から見ると、大部分の微生物の生育は大腸菌よりも遅く、さらにその中の多くが私達の予想を超えて遙かに遅い。したがって多くの研究者がこうした微生物を見逃しがちである。筆者らが分離培養に成功した微生物の中には平均世代時間が3週間を超えるものもあり、大腸菌と同じように培養しようすれば3ヶ月程度を要する。環境中に存在する微生物は実験室におけるバッチ培養のような典型的な増殖曲線に従って生育してはいない（と考えるのが自然である）。環境中において微生物は常に高速で増殖する必然性もないし、何らかの栄養律速の状態にある可能性が高い。そうしたことを考えると、倍加時間もともと極めて長い微生物が存在することは全く驚くに値しない。3) 微生物の多くが他の生物（微生物、植物、動物）と密接な相互関係、共生関係にあり、単独で取り出すことそのものに本質的な限界がある。実際の環境中には膨大な数と種類の微生物がいる。それは複雑系の世界であり、そこには必ず競合・共存・共生といった相互作用があり、それ

を支える物質の受け渡しが行われていても何ら不思議ではない。純粋培養とはこうした関係性を「遮断する」ことに他ならず、極言すれば純粋状態で生育する微生物のほうが一時的に例外的（あるいは不自然？）である。

4. 固体培地に用いるゲル化剤の影響

こうした種々の問題が微生物の分離・培養に大きな足かせとなっていることは容易に想像しうが、とりわけ最初に掲げた固体培地の限界について以下に詳述したい。なぜならば、固体培地、とりわけ寒天培地は現代微生物学の礎を築いてきた方法であり、今なお微生物の培養の王道だからである。筆者らはこれまでに多様な新規微生物の培養を手がけてきたが、ある時からゲル化剤としての寒天が環境中からの微生物の単離に際して一定のバイアスをかけていることを経験的に感じ始めた。中でも10年以上前に分離した *Gemmatimonas aurantiaca* という新門提案（Zhang *et al.*, 2003）に至った微生物が寒天ではコロニーを作らず、gellan gumによって良好にコロニーを形成することを見いだしたのが最大の契機である（Tamaki *et al.*, 2009）（図1）。寒天はテングサなどの紅藻類が作る多糖類であり、主要構成糖はD-glucoseと3,6-anhydro-L-galactoseである。一方gellan gumは1982年に米国の企業研究開発グループによって *Pseudomonas* の菌体外多糖として見いだされたもので、主要構成糖はL-glucose, D-glucuronic acidとrhamnoseである（Kang *et al.*, 1982）。熱耐性が高く、ゲル

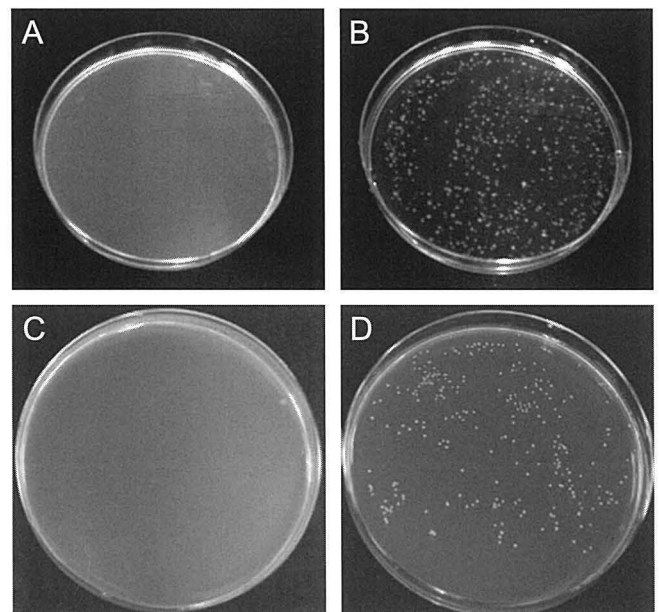


図1 *Gemmatimonas aurantiaca* を寒天培地ならびに gellan gum でコロニー形成させたもの。上段 (A) (B) 2009年に寒天培地と gellan gum 培地でコロニーの様子を比較したもの。(A) は寒天培地で14日間培養したもの。コロニー形成は認められない。(B) は gellan gum で7日間培養したもの。ゲル化剤以外の培地組成は変わらない (Tamaki *et al.*, 2009)。下段 (C) (D) は2014年になって寒天で培養した際、(C) リン酸を寒天やその他の培地成分とまとめてオートクレーブした培地で培養したもの、(D) リン酸を別滅菌した寒天培地で培養したもの。(D) において顕著なコロニー形成が認められる (Tanaka *et al.*, 2014)。

の透明性が高いなどの利点もあり、植物の組織培養や高熱性微生物の培養で多用されている。筆者らは *G. aurantiaca* が寒天上で極めて生育が悪く、わずかなコロニーしか形成しなかったことから、gellan gum での培養を試みたところ顕著なコロニー形成を認めた。また、湖沼試料を用いて、寒天培地と gellan gum 培地の比較試験を行ったところ、出現する微生物種に大きな差が認められた (Tamaki *et al.*, 2005)。また、これまでに培養されている微生物との類似度を解析したところ、gellan gum 上でコロニーとして出現した微生物の方が、より類似度が低い、つまり新規性が高い微生物であることが明らかとなった (Tamaki *et al.*, 2009) (図 2)。

こうした結果は微生物に固体培地上でコロニーを作らせるにあたって用いるゲル化剤が非常に重要な要素であることを示すものだった。筆者らはこの時点新規微生物あるいは培養困難な微生物を培養するにあたってゲル化剤としては寒天よりも gellan gum の方が優れているという結論を出した (Tamaki *et al.*, 2005; 2009)。この結論はごく限られた自然界試料をもとに導出されたものであるが、その他のデータも踏まえおおよそ正しいものと判断していた。

5. 思いがけなかった寒天培地の問題

こうした結論を得て 5 年ほどが経過した後、思いがけない出来事と巡り会った。上述の *G. aurantiaca* が寒天上でも極めて良好な生育を示すことを見いだしたのである。この微生物は我々の中で、「gellan を好み寒天を好まない代表的なもの」として位置づけられ、その原因を明らかにするための格好の材料として扱っていた。しかし、この検討過程で、*G. aurantiaca* を培養するための培地のうちリン酸塩だけを別滅菌するだけでコロニー形成率が飛躍的に高まることを見いだした (Tanaka *et al.*, 2014)。この結果は極めて再現性が高く、リン酸塩を含めた培地全体を滅菌したときと、リン酸塩を別滅菌したのち、固化直前に混ぜた培地では顕著なコロニー形成率に差が見られた (図 1)。古くから環境試料中の微生物を寒天培地上で培養する際、catalase や pyruvate を添加するとコロニー形成率が上がることが知られていた。これは生体反応で生成する活性酸素 (reactive oxygen species : ROS) を消去するためだと考えられてきた。そこでリン酸塩を同時滅菌した寒天培地を化学分析した結果、活性酸素の代表種である過酸化水素が顕著に生成していることが明らかとなった (Tanaka *et al.*, 2014)。過酸化水素の生成はリン酸塩を別滅菌したときにはほとんど生成しなかった。過酸化水素の生成はリン酸塩濃度依存的に増加した (図 3)。Gellan gum の培地でも同様に過酸化水素の生成は認められたが、生成量は寒天の場合に比べ低かった。これらの結果から、*G. aurantiaca* は過酸化水素ストレスに感受性が高く、コロニー形成率の差はゲル化剤の種類によるのではなく、培地の調製方法が大きな原因であることが明らかになった。

寒天培地に含まれるリン酸塩の量は培地により様々であるが、リン源としてのみでなく、緩衝効果を期待して 40 mM ものリン酸塩を添加しているものまで存在している。*G.*

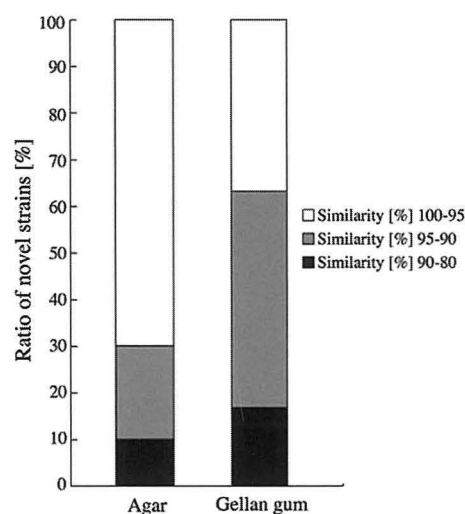


図 2 湖沼底泥試料を用いて寒天と gellan gum を用いて分離培養を行い、得られた菌株 (100 菌株以上) の 16S rRNA の既知微生物との相同性をランクごとに示したものの。白い帯は既知微生物との相同性が高い微生物の割合を、黒い帯は相同性の極めて低い (新規性の高い) 微生物の割合を、灰色はその中間的相同性を示す菌株の割合を示したものである (Tamaki *et al.*, 2009)。

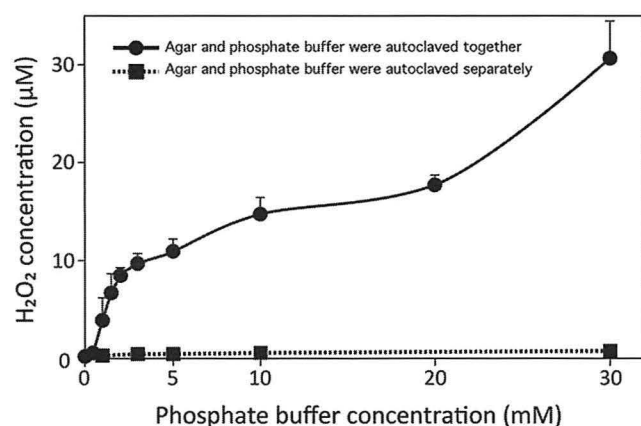


図 3 寒天とリン酸塩の反応によって生成する過酸化水素。リン酸の濃度を変えて過酸化水素の生成濃度を測定している。実線はリン酸塩と寒天を混ぜてオートクレーブして固化させた後、ゲル中の過酸化水素濃度を測ったもの。点線はリン酸塩と寒天を別滅菌して混ぜて固化させたのち測定したもの (Tanaka *et al.*, 2014)。

aurantiaca の培養に用いた寒天培地では 10 mM のリン酸塩を用いていた。このリン酸濃度によって発生する過酸化水素濃度は *G. aurantiaca* の増殖を抑制するに十分な濃度だったと考えられる。

こうした培地調製におけるリン酸と寒天の別滅菌あるいは同時滅菌によって実際の環境試料からの微生物の生育ならびにコロニーとして出現する微生物の種類の詳細について解析した。詳細は筆者らが発表した論文 (Tanaka *et al.*, 2014) を参照されたいが、要点は以下の通りである。1) 河川、底泥、森林土壌のいずれにおいてもリン酸と寒天の同時滅菌により CFU は大幅に減少する傾向が見られた。2) 出現するコロニーの 16S の解析結果から、リン酸と寒天を同時滅菌した場合、もともとの環境試料では非優占種である微生物種が顕著に優占種として出現することが分かった (図 4)。

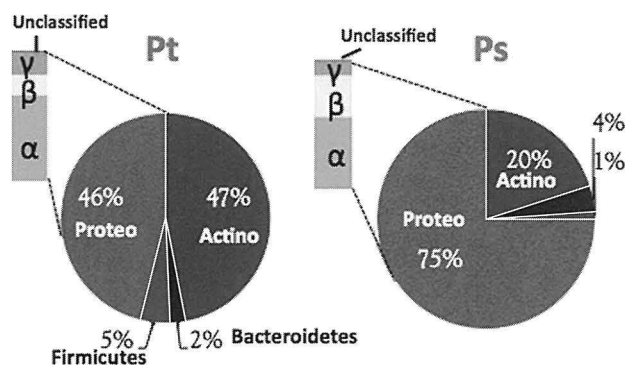


図4 底泥から分離した微生物の門レベルでのグルーピング。Pt：リン酸塩と寒天，その他の有機物を同時滅菌して調製した寒天培地上に出現したコロニーの門レベルで割合を示したもの。Ps：リン酸塩を別滅菌して調製した寒天培地上に出現したコロニーの門レベルで割合を示したもの（Tanaka *et al.*, 2014）。Pt培地で Actinobacteria のコロニーが試料中の菌相割合よりもはるかに高い頻度で検出された。

活性酸素種が生体反応の過程で生成することは微生物から動物に至るまで広く知られている。しかし，今回の実験は培地調製過程でリン酸と寒天をオートクレーブ温度で加熱したときに H_2O_2 が発生することを初めて見いだしたものである。この反応はリン酸と寒天等のゲル化剤との純粋な化学反応であるが，培地調製にあたってこうした現象を考慮した調製法が記されている文献は驚くべきことに皆無である。こうしたわずかな調製法の改良だけで微生物の固体培地における分離培養が飛躍的に向上することは特筆に値する。

6. あらためて固体培地における純粋培養とは

19世紀末に固体培養が登場し，微生物をコロニーの形で分離することが可能になった。今では当たり前のこの方法はすべての微生物学研究者が日常的に使っている。その一方でコロニーを作らない微生物が多数いることはすでに広く知られている。メタゲノムの時代を迎え，多くの研究者は純粋培養の煩雑な操作を回避し，直接環境ゲノムを扱うようになった。現在では次世代・次々世代の大量シーケンシングによるデータ産出とパイプラインが未知未培養の微生物のゲノムの完全長を描くことを可能にしている。20年前には誰もが予想もできなかったことである。このような時代のなか，なおも純粋培養に拘泥する意味があるのかをしばしば問われることがある。私見を述べれば，分離・培養とゲノム解析は相補的であって，どちらが欠けても真実は得られない。未培養微生物のゲノム情報が得られれば，培養できるヒントを得られるかもしれない。また，純粋な微生物株があればこそできる生理学・生化学・分子生物学そしてそれを元にした応用研究がある。このことは決して忘れてはならないことであると筆者は信じている。

要 旨

現代微生物学は微生物を「純粋に分離・培養する」ことか

ら始まった。固体培地でコロニーを形成させるという今日誰もがやっている方法は1890年代に出来上がったものである。一方，環境微生物の多くは寒天培地でコロニーを形成しないことは古くから知られている事実である。しかし，なぜ「多くの微生物が寒天培地でコロニーを形成しないのか」については十分な検討が行われているわけではない。次世代シーケンシング技術の台頭によって培養せずとも未知微生物のゲノムが解き明かされる時代を迎えたが，微生物を培養することの重要性はいささかも揺らぐことはない。本総説では固体培地に用いるゲル化剤の種類や培地の調製法といった極めて根源的なところに潜む問題点を概説する。

謝 辞

本総説で紹介した筆者らの研究を遂行するにあたり，北海道大学大学院農学研究院の先生方，学生諸君，産業技術総合研究所の研究員の皆様に厚く御礼を申し上げます。公益財団法人発酵研究所には多大なるご支援を頂いたことにあらためて感謝の意を表します。

引用文献

- 1) 天児和暢 (2005) Bulloch W 著，天児和暢訳「細菌学の歴史」，医学書院，東京
- 2) Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**, 143–169.
- 3) Kang KS, Veeder, GT, Mirrasoul, PJ, Kaneko, T, Cottrell W (1982) Agar-like polysaccharide produced by a *Pseudomonas* species: production and basic properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 1086–1091
- 4) Puspita ID, Kamagata Y, Tanaka M, Asano K, Nakatsu CH (2012) Are uncultivated bacteria really uncultivable? *Microb. Environ.*, **27**, 356–336
- 5) Staley JT, Konopka A (1985) Measurement of in situ activities of non-photosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.*, **39**, 321–346
- 6) Tamaki H, Hanada S, Sekiguchi S, Tanaka Y and Kamagata Y (2009) Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environ. Microbiol.*, **11**, 1827–1834
- 7) 玉木秀幸・鎌形洋一 (2012) 環境ゲノム情報時代の未知微生物探索研究，化学と生物，**50**, 730–741
- 8) Tamaki H, Sekiguchi Y, Hanada S, Nakamura K, Nomura N, Matsumura M, Kamagata Y (2005) Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake as revealed by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2162–2169
- 9) Tanaka T, Kawasaki K, Daimon S, Kitagawa W, Yamamoto K, Tamaki H, Tanaka M, Nakatsu, CH, Kamagata Y (2014) *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 7659–7666
- 10) Zhang H, Sekiguchi Y, Hanada S, Hugenholtz P, Kim H, Kamagata Y and Nakamura K (2003) *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representation of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1155–1163