

見えるなら，育ててみせよう，微生物

中道 優介

地球上に存在する細菌などの微生物の多くは，既存のプロトコルでは培養することができない，いわゆる難培養性微生物であり，細菌におけるその割合は全体の99%以上を占めると言われる．難培養性微生物の存在は，顕微鏡で確認できる生きた微生物に対して寒天培地上に形成されるコロニーの数が少ないことから認識された．このように，「生きているけれども培養できない」状態の微生物はVBNC (Viable But Non-Culturable) と呼ばれる．培養を必要としないメタゲノム解析 (環境サンプルから直接回収されたゲノムDNAを解析する手法) によって，自然環境には膨大な種類の微生物が存在することが明らかになった．それらの微生物を培養することは，遺伝子とタンパク質の生理的役割や，生態系および宿主に与える影響の解明につながる．加えて，培養方法を模索することによる培養技術の向上や，新奇な微生物由来の天然化合物ならびに抗生物質の取得なども期待できる．

難培養性微生物の培養が困難であるおもな原因は，その微生物の生育に必要なパラメーターが不明なことである．微生物の生育に関わる要素は，炭素源，窒素源，ミネラル，浸透圧，pH，温度，通気，および培養時間など多岐にわたる．しかし，実際にこれらの要素をすべて検討して培養条件を決定することは合理的ではなく，時間的にも不可能である．これまで，培養したい微生物に必要な添加物を予測して作製した合成培地を用いて，多くの微生物が培養されてきた．一方で，近年開発された新しい培養技術により，培養可能な微生物種は飛躍的に増加した．

Kaeberleinらは，拡散チャンバーを用いて海洋由来の難培養性微生物を培養する方法を開発した¹⁾．まず，栄養や生育因子は通すが細胞は通さない大きさの細孔をもつ半透膜を用いたチャンバーに，採取した試料 (海底堆積物など) に由来する複数種の微生物を含んだ寒天を封入する．その後，その微生物の生息していた環境 (海水など) が入った水槽へチャンバーを入れ，寒天上にコロニーが形成されるまで培養する．この方法は，従来の方法では生育しなかった多くの微生物の単離培養を可能にし，高濃度の硝酸，放射性核種，および重金属を含む汚染された酸性環境からも微生物単離培養することに成功した²⁾．難培養性微生物の数は膨大であることから，ハイスループットな単離・培養系の開発も重要である．同グループは，拡散チャンバーを応用した isolation chip

(ichip) を開発した³⁾．ichipは，数百個の微小な拡散チャンバーを用いて，各チップ内に一度に多種の微生物を培養する技術である．彼らはichipを用いることにより，さらに多数の新奇微生物の単離培養に成功している．

単離培養しにくい細菌には，その細菌の生育を助ける別の細菌 (ヘルパー細菌) に依存するものも存在する．D'Onofrioらは，潮間帯に生息する細菌である *Maribacter* が，固体培地上でヘルパー細菌の周辺においてのみ良好に生育すること発見した³⁾．この細菌は，扱いやすくゲノムが解読されている大腸菌をヘルパー細菌として利用することも可能であった．そのため，*Maribacter* の生育に関わる遺伝子が大腸菌にて同定され，生育因子は不溶性の三価鉄を可溶化するシデロフォアであることが分かった．その結果，可溶化している二価鉄を添加することにより *Maribacter* を培養することができた．このようなヘルパー細菌に依存する細菌は，自らの生育に必要な要素を他者に供給してもらうことで，無駄なエネルギーを使わずに済むように進化したと推察されている．

伝統的に用いられている培養方法が，微生物の生育を妨げることもある．寒天は安価で操作しやすく，固体培地の作製に広く利用されている．しかし，寒天を用いた培地上では生育しない微生物も存在し，代わりにジェランガムを用いることで良好な生育を示す例も報告されている⁴⁾．Haraらは，寒天中に含まれるフランカルボン酸が細菌の遊走や生育を阻害することを見いだした⁵⁾．これらの研究から，難培養性微生物の培養には，新たな培養方法の開発とともに，従来のプロトコルの見直しを行うことも重要だと言える．

ここで紹介したものはほんの一例であるが，これまで難培養性微生物とされてきた微生物種が少しずつ培養されるようになり，それらの微生物種の解析が進められている．とはいえ，研究室で培養できない微生物はまだまだ数えきれないほど存在する．それらの微生物の培養を可能にするためには，これまで以上に画期的な培養技術の開発が必要であろう．

- 1) Kaeberlein, T. et al.: *Science*, **296**, 1127 (2002).
- 2) Nichols, D. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 2445 (2010).
- 3) D'Onofrio, A. et al.: *Chem. Biol.*, **17**, 254 (2010).
- 4) Tamaki, H. et al.: *Environ. Microbiol.*, **11**, 1827 (2009).
- 5) Hara, S. et al.: *PLoS One*, **7**, e41142 (2012).