

分離培養手法の革新： 難培養性微生物の正体と資源としての可能性

青井 議輝

はじめに

微生物学は「感染症の原因を究明する」という人類の生存欲求に基づく課題から派生した学問である。そして感染症の原因が微生物であると完全に証明されたのは実はわずか140年ほど前にすぎない。すなわち、さまざまな紆余曲折を経て最終的にKochのグループが微生物を分離培養する手法を開発し、コッホの4原則を確立したことで、感染症の原因は微生物であるということが初めて真に受け入れられた。そして、それからの微生物学の発展、人類への貢献は言うまでもなく、医学分野に限らず、さまざまな学問分野、産業分野に多大な影響を与えている。このように特定の微生物の機能(病原性や有用機能)を知るためには、単一の微生物を分離して純粋培養するというプロセスが必要不可欠であり、プロセスそのものが現代まで続く微生物学に関わる学問体系の基盤になっている。ところが、今日では微生物のほとんどは培養困難であることが広く知られている。また、いまだ培養された菌株がいっさい存在しない「門」が半数近く存在することが正確に明らかになったことで、それらを宇宙の暗黒物質になぞらえてMicrobial Dark Matter(微生物ダークマター)と魅力的なキーワードで呼称されるようになって¹⁾。

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、未培養微生物が占める広大な未知領域が残されていることが明らかになっている。そして培養非依存的な解析(メタゲノム解析や16S rRNA 遺伝子を基盤とした各種解析法)によって、未培養微生物の多様性や新規な機能に関する重要な発見が相次いでいるが、生理学的性質や活性など本質的に重要な情報は分離株を取得して解析する以外に有効な方法がない。また、機能(菌株)の利用と言う観点においても、分離株を直接取得して利用する方がはるかに効率的である。さらに、環境科学的にきわめて重要な役割を果たしているものの、いまだ純粋菌株が得られていない微生物は少なくない。環境微生物の正しい理解に基づく「制御」やプラネットスケールでの環境変動の予測などは幅広い分野における重要課題であるにも関わらず、「鍵」となる微生物が培養できな

いがために、その前進に大きな制限がかけられている状況である。難培養性微生物とはどのようなものなのか(正体)、なぜ培養困難なのか(理由)、そして、どうしたら培養できるのか(培養手法の革新)、さらに、資源としての可能性はあるのであろうか(有用性)。本稿では上記にあげた課題について以下に解説する。

なぜ培養できないのか

植菌細胞数に比較して寒天平板上でのコロニーの出現数はきわめて低いことは常識であり、それを“Great Plate Count Anomaly”と呼称することもある²⁾。前述したMicrobial Dark Matterとは別に、当初はこの単純な現象だけに基づいて「99%以上の微生物は培養できない」と表現されていた。しかし、これだけで多くの微生物は培養できないと断定することはできない。なぜなら「培養できない多くの微生物はその時に与えられた特定の培養条件に適合しなかっただけ」と説明可能だからである。本来、培地組成、濃度、pH、温度、ゲル化剤、そしてそれらの組合せなど、あげればきりがなほど検討すべき培養条件が考えられるため、植菌した細胞のほんの一部しかコロニーを形成しなかったとしても、実はなんら不思議ではない。そして実際に、寒天培地を作製する際に生成する活性酸素が多くの環境微生物の増殖を阻害(死滅)させることが報告され、それを回避する方法も提案されている³⁻⁴⁾。したがって、培養条件の適合性が微生物の分離培養の効率にもっとも影響を及ぼす因子であることに疑う余地はなく、微生物の難培養性に関する議論はそこをベースに始めるべきである。

しかし一方で、培養できない理由について難培養性微生物自身の性質に起因した普遍的な要因(メカニズム)は存在するのであろうか。多くの微生物において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培養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と考えられる。しかし、「培養できない理由」はほとんど解明されていない。なぜなら、従来法で容易に分離される微生物を解析しても答えにはたどり着かないというジレンマが存在するからである。

休眠と覚醒

多くの微生物が従来法では簡単に分離培養できない理由の一つとして、「生きているが増殖しない, Variable but nonculturable (VBNC)」という状態が培養困難な現象と直接的に関わっている可能性がある。近年では多様な微生物が非増殖状態に移行し得るということが判明している。それぞれの違いについては十分には明らかになっていない。しかし、多くの環境中で観察されるその現象(非増殖状態)は環境中において普遍的な現象であり、さらに微生物の生存戦略の一環であり、結果として多様性を維持することに貢献しているという可能性が示唆されている⁵⁻⁶⁾。

一方で、Buergerらはマイクロプレートの培地の入った各ウェルに1細胞ずつ環境微生物を植菌して、増殖を示したウェルを定期的に記録し続けたところ、①1年以上経過しても新たな増殖が確認されること、②増殖に長期間を要した菌株だからといって新規性の高い微生物とは限らないこと(増殖の検出時期と新規性には相関性がない)、③短期間で(たとえば1週間など)増殖した菌株と長期間(たとえば1年後)の培養後に増殖が確認された菌株を比較すると、増殖に要する時間がまったく異なるにも関わらず同じ種類が獲得されることなどを明らかにした⁷⁾。この観察結果は、つまり、各々の微生物種に対する培養条件の適合性だけではなく、「植菌された細胞が増殖を開始するか否か」が最終的に培養の効率に重要な影響を与えることを示唆している。さらに、多くの環境微生物は休眠状態に陥っていること、そしてそれらはランダムに覚醒するということを示唆している。またEpsteinは上記の事象と合わせて、「休眠状態の微生物はランダムに覚醒し、覚醒した微生物は他の微生物の覚醒を促す」というScout仮説を提唱している⁸⁾。

一方で、微生物が通過できない孔径の膜によって構成されているデバイスを用いることで、実環境中で微生物を培養する手法(*in situ*培養)は、未培養微生物の獲得手法として有効であることが数多くの研究から実証されている⁹⁻¹¹⁾。人工的な培養環境には存在しない未知なる増殖促進物質の供給が環境中から供給されるため、未培養微生物の獲得が可能になるのではいかと考えられているが、そのメカニズムはまったく明らかにされていない。

そこで、筆者らは上記のScout仮説を拡張して以下のような仮説を立ててみた。

- 1) 環境中の微生物(難培養性微生物)は好ましくない条件下(エネルギー源や栄養源の枯渇など)では容

易に非増殖状態(休眠状態)に移行する。

- 2) 環境状況が好転しても、それだけでは休眠状態からは容易に脱却しない。
- 3) 休眠状態から覚醒するためには、シグナル(覚醒因子)が必要である。そしてそれは増殖状態の特定の種類の微生物(異種・同種)から分泌される。

そして上記の仮説に基づいて*in situ*培養において未培養微生物が獲得されるメカニズム解明を試みた。まず、海洋性カイメン由来の微生物を用いて*in situ*培養を行ったところ、新規性の高い分離株の獲得効率は従来法のそれに対して著しく高いことが判明した。次に、得られた分離株を用いて、飢餓状態からの回復に対するカイメン抽出液の添加の効果を測定したところ、多くの分離株で抽出液を添加した場合に回復率(コロニー形成率)の著しい向上が見られた。一方で、従来法を通じて得られた微生物に対してはその効果はまったく見られなかった。さらに、カイメン抽出液の添加は、比増殖速度および最高到達菌体密度(Saturated Cell Density)にはまったく影響を及ぼさないことを別に確認した。これらのことから、カイメン抽出液には、*in situ*培養から得られた分離株のコロニー形成率を向上させる効果のある物質が含まれていることが判明した。しかし、それらは栄養供給などによる増殖の活性化のような「増殖促進」とは完全にことなり、「増殖開始の誘導」であることが示唆された。すなわち*in situ*培養の効果とは、環境中に存在する未知なる増殖開始因子により、休眠状態の微生物が覚醒し増殖することによるものだと判明した(Jung *et al.*, 投稿中)。



図1. *In situ*培養において未培養微生物が培養可能になることについて、想定されるメカニズム

以上の結果より, 少なくとも一部の環境微生物は, 非増殖状態であり, 増殖を開始するためには栄養源の供給だけでなく, 未知なる覚醒因子の供給が必要であること, そして, その性質が従来法で獲得困難(未培養)な理由になり得るということを示唆している。また覚醒因子は同種・異種の微生物が生産している可能性が高い(図1)。そして冒頭で述べた“Great plate count anomaly(植菌細胞数とコロニー形成数のギャップ)”という微生物学上の謎は, 決して取るにたらない事象(個々の微生物の培養条件の適合性の問題)ではなく, 普遍性のある理由によっても引き起こされている可能性が高い。

資源としての可能性

世界保健機構(WHO)による「複数の抗生物質に耐性を持つ多剤耐性菌の増大に対して新薬の開発が追いつかない現状」に関するレポート(2017年9月)によると, 多剤耐性菌に対抗可能な臨床開発段階の治療薬を調査したところ, 画期的と定義できる新薬の候補は8種類しかないと言う¹²⁾。すなわち深刻な状況は当分続くということの意味している。伝統的には多くの抗菌薬は天然物(微生物)から発見されてきている。それは環境中の微生物が生存戦略として, 生態学的, 進化的合理性を伴って保持している武器を人間が利用するというきわめて合理的な策であるが, 天然物から抗菌薬などの生理活性物質の候補物質を探索するというアプローチは, 非効率で前時代的ではないかと感じられるかもしれない。しかし, 実は本質的なボトルネックは「新規な微生物を獲得できない」という現状にこそあるかもしれない。つまり, 従来法で容易に分離培養可能な微生物は概ね獲り尽くしたと言い換えることができるのではないだろうか。そこで, もし新規性の高い微生物(未培養微生物)を効率的に獲得可能であれば, 候補物質のヒット効率は格段に高くなるはずである。実際に, その多くが難培養性で知られている *Verrucomicrobia* 門, *Acidobacteria* 門に属する微生物には生理活性物質を生産する生合成遺伝子クラスターを放線菌に匹敵するレベルで保持することが近年判明している¹³⁾。また, 耐性菌が原理的には出現しないという画期的な抗菌薬の候補物質「Teixobactin」が数年前に報告されたが¹⁴⁾, これは新規分離培養手法(上述の *in situ* 培養)を通じて分離した新しい微生物から発見されたものである。Teixobactinを産生する菌株 *Eleftheria terrae* が従来法では分離培養困難であったのかどうかは定かではないが, 上記の成果は新規分離培養手法の開発が新たな未利用資源の再開拓につながり, 産業的に有用な基盤技術と成り得ることを示している。

培養手法の革新の方向性

培養非依存的な解析手法の近年の著しい発展に比べて, 分離培養の方法論は150年前からさほど進展していないと言っても過言ではない。新規手法のほとんどが既存の手法をベースにした工夫の範囲に収まるものであり, 新しいコンセプトに基づく手法開発(イノベーション)はきわめて少ないと言える。一方で, 近年, マイクロ・ナノ成型技術に代表されるさまざまな微小スケールテクノロジーが発達している。微生物学分野においては, それらの技術を応用することで, シングルセルレベルでの動態解析や各種計測, 極小スケールでの培養などを通じて, 未知なる生理・生態学的新規機能の発見につながることを期待できる。実際に, 一度に数百万スケールという分離培養を1枚のチップで実現できるハイスループット分離培養手法も提案されている¹⁵⁾。

筆者らは同技術を活用し, 上記 *in situ* 培養をさらに拡張したコンセプトに基づいた画期的な分離培養手法を開発している。すなわち, 培養装置を環境中に設置するだけで自動的に分離・培養させるという今までにない新しいコンセプトである。環境中の微生物を動力源なしに分離して培養し, 複数の純粋培養株を自動的に得ることができる。すでにモデル微生物を用いてコンセプトの実証に成功している¹⁶⁾。

微小テクノロジーの一般的な効果の一つは, 「小さくすること」で「数を増やすこと」ができることである。しかし一方で, 数と言う意味での培養スケールの単純かつ大幅な増加だけでは, 未培養性(有用)微生物の獲得効率が期待通りに大幅に上昇すると見込まれるわけではない, ということに注意が必要である。その一つの理由は, 仮に数百万(純粋な培養容器の数という意味)というスケールで培養が可能であったとしても, ダウンストリーム操作も同じスケールでハイスループットでなければ, 結局は, その後のステップがボトルネックになるからである。ダウンストリーム操作とは, 目的微生物のスクリーニング, 微生物の同定, 回収などの操作である。そもそも平板培養は, 細胞分離, 培養そして検出を一度に簡便に行えるという意味において, きわめて画期的である(だからこそ150年以上主要な方法として使われている)。そして, 1枚の培養プレートから100–200株の分離株をきわめて簡便に取得可能という点において, 実は十分に高効率である。もう一つの理由は, 問題の本質が, 未培養微生物が従来の培養法では培養困難であるという点にあるからである。

したがって, 筆者は技術革新の方向性について, 「数

の向上」だけでなく、「質的な変化」をも目指すべきであると考え。つまり、従来法では原理的に分離培養困難な未培養微生物を効率的に培養化すること（手法開発・メカニズム解明）にこそチャレンジを続ける必要があるのではないだろうか。そのためには、難培養性微生物は何か？なぜ培養困難なのかという問いを真摯に投げかけながら、そのメカニズムの解明と手法開発を同時に行う（フィードバックをかけながら）ことが真のイノベーションにつながると考えている。

文 献

- 1) Rinke, C. *et al.*: *Nature*, **499**, 431 (2013).
- 2) Staley, J. T. *et al.*: *Annu. Rev. Microbiol.*, **39**, 321 (1985).
- 3) Tanaka, T. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **80**, 7659 (2014).
- 4) Kato, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, e00807, 7659 (2018).
- 5) Lennon, J. T. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **9**, 119 (2011).
- 6) Pinto, D. *et al.*: *Crit. Rev. Microbiol.*, **41**, 61 (2015).
- 7) Buerger, S. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 3229 (2012).
- 8) Epstein, S. S.: *Nature*, **457**, 1083 (2009).
- 9) Kaeberlein, T. *et al.*: *Science*, **296**, 1127 (2002).
- 10) Berdy, B. *et al.*: *Nat. Protoc.*, **10**, 2232 (2017).
- 11) Aoi, Y. *et al.*: *Manuals of Environmental Microbiology 4th edition* (Yates. M. Y. *et al.* Ed.), P. 2.1.3-1, ASM Press (2016).
- 12) WHO: <https://www.who.int/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms> (2019/9/3).
- 13) Crits-Christoph, A. *et al.*: *Nature*, **558**, 440 (2018).
- 14) Ling, L. L. *et al.*: *Nature*, **517**, 455 (2015).
- 15) Ingham, C. J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18217 (2007).
- 16) Tandogan, N. *et al.*: *Plos ONE*, **9**, e101429 (2014).