

従来の振盪フラスコ培養法の解析と利用

高橋 将人¹・青柳 秀紀^{2*}

はじめに

微生物に関わる科学者や技術者は、微生物が関与する生態系の理解だけでなく、ヒト社会の持続可能な発展に役立つ有用物質の生産や環境浄化などさまざまな役割を期待し、微生物の探索、分離、単離、培養、評価、保存、利用などに取り組んでいる。この一連の過程で、選定する培養器の種類やスケールは多岐にわたり、培地成分や温度、pHなどを含めると培養条件は非常に多様であるように見える。ところが、我々が培養できる微生物は自然界に存在する1%程度であるとされている¹⁾。また、培養のスケールが異なると培養物(培養経過に伴う菌体の諸特性や代謝産物)の再現性が得られにくい場合もある。これらの培養のギャップの問題の解消は、微生物が関連する学術、産業界における共通かつ重要な課題である。筆者は、未培養微生物の培養化を行うための1つの戦略として、これまで微生物学を支えてきた基本的な考え方や手法を見直すことで、新たな考え方や手法を提案できるのではないかと考え研究を進めている。本稿では、微生物の液体培養において国内外で幅広く普及し、根幹的な手法である振盪フラスコ培養法に焦点をあて、筆者の研究を中心に、振盪フラスコ培養法の特長解析と利用について概説する。

振盪フラスコ培養法とは

振盪フラスコ培養法 振盪フラスコ培養の初めての報告は1933年²⁾の三角フラスコを用いた旋回振盪とされている。日本でも1950年に坂口フラスコを用いた往復振盪が報告された³⁾。当初は、表面培養によって生じる菌体の不均一性、培養液量当たりの低い収量を打破するために、*Aspergillus*属の効率的な培養を目的として開発された。現在、振盪フラスコ培養法は、*Aspergillus*属に限らずラボスケールのさまざまな細胞で用いられるグローバルスタンダードにまで成長している。ただ、“1%程度しか培養できない”という点で見直すと、これまで我々が容易に培養、利用してきた微生物種は、振盪フラスコ培養法に適合した微生物種であったのかもしれない。

酸素供給の課題 好気性微生物や動物細胞への酸素供給の原理は『生物工学会誌』の「続・生物学基礎講座バイオよもや話」⁴⁾に詳しく記載されている。表面培

養が主流であった時代、大気と直に接することができた微生物は豊富な酸素を獲得できたが、液内培養である振盪フラスコ培養法は、酸素の溶解度が低いため、酸素が不足しやすい。そのため酸素供給に関して古くからさまざまな工夫(フラスコ内への邪魔版⁵⁾、バッフル⁶⁾、コイル⁷⁾の付与)がなされてきた。当時の実験者が薄々感じ始めていた酸素供給の限界が指摘された1991年⁸⁾以降も振盪フラスコ培養法の改良は続けられ、近年では、音響共振を取り入れた特異な振盪模様と専用の培養栓を用いることで大幅に改善できる手法も提案されている⁹⁾。三角フラスコを用いた旋回振盪では、振盪数を増やすことで酸素移動容量係数($k_L a$)は増加するが、坂口フラスコを用いた往復振盪では、肩付き部分に効率よく培養液を打ち付ける振盪数(および振幅)と培地量のバランスを崩してしまうと $k_L a$ の増加は見込めない¹⁰⁾。また、培養液の飽和溶存酸素濃度は、分圧や培養温度だけでなく、塩分濃度など培地成分にも大きく依存するため、培養条件を設定するには留意する必要がある。

二酸化炭素¹¹⁻¹⁴⁾ 酸素と表裏一体の関係にあるように見える二酸化炭素の挙動は、振盪培養中の培養液とフラスコ気相部の両方において未知な点が多い。

筆者が二酸化炭素に注目するようになったきっかけは、培養実験中に見出した予期しない現象に由来する。同じ環境試料を、同じ培養条件で、同様に振盪フラスコ培養をしているのにもかかわらず、培養中の培養液のサンプリングの有無によって、形成される培養微生物群集構造が異なるという現象に直面した。筆者は、対照実験を繰り返し実施し、この現象を生じさせる主な要因が、培養期間中のわずかな時間(30 sec)の培養栓の開封操作であることを明らかにした(図1)。

当初、振盪フラスコ培養中の微生物群集構造に影響を及ぼすもっとも効果的な培養栓の開封のタイミングは不明であり、3hごとに振盪機からクリーンベンチに全条件の三角フラスコを迅速に運び、所定の条件のフラスコの培養栓を無菌的に30 sec開封し、再び振盪機に戻す培養を48h実施することで微生物群集構造の変化が観察された(図1)。その後、培養中期から後期における培養栓の開封が、従来とは異なる培養微生物群集構造の形成に大きく寄与すること、が明らかになったが、そのメカニズムは不明であった。また、振盪フラスコ培養中に実施するクリーンベンチ内の培養栓の開封操作は、無菌性

著者紹介 ¹筑波大学 生命環境系(博士研究員) E-mail: masato.overnight@gmail.com

²筑波大学大学院 生命環境科学研究科(教授) E-mail: aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp
生物学 第97巻 第9号(2019)

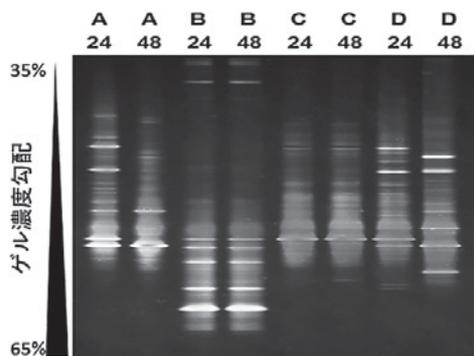


図1. 培養栓の開封が微生物群集構造に及ぼす変化. Aは未開封, B, C, Dは培養期間中にそれぞれ12, 6, 3 hごとに培養栓を30 sec開封した条件, 数字は培養時間 (h) を示す. 培養24, 48 h目の菌体培養液から16S rDNAを抽出し, ユニバーサルプライマーで増幅し, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 解析を実施した.

の確保以外に規定はなく, (i) 手技による個人差が大きい点 (個人差の影響を最小化するために3 hごとに培養栓を開封し続ける培養実験は1人で実施した), (ii) 振盪機とクリーンベンチとの間を移動する時間が生じる点, (iii) 振盪の中断時間が生じる点, など不確定な要素があった.

フラスコ以外の培養器を用いた実験の過程で, 三角フラスコと通気性のある培養栓の代わりに, マイクロプレートとガス通気性があるプレートシールを用いて, 振盪培養中に30 sec無菌的にシールを開封した条件と未開封の条件の培養微生物群集を比較した結果, フラスコを用いた振盪培養と同様に, 異なる培養微生物群集構造の形成が認められた (ただし, 上述のi~iiiの不確定要素も同様に存在していた). また, マイクロプレートの空ウェル (培養液が入った隣のウェル) への二酸化炭素吸着剤の添加の有無によって, 振盪培養で集積する微生物群集構造が異なることも明らかとなった¹⁵⁾.

以上の結果から筆者は, 培養栓の開封によりフラスコ内の二酸化炭素濃度が変動するのではないかと考えに至った. そこで, 短時間の無菌的な培養栓の開封操作によって生じる現象は, 短時間のフラスコ気相部への新鮮空気は無菌的な通気によって再現できるのではないかと考え, Automatic Aeration Flask System (AAFS)¹²⁾を開発した (図2A). AAFSは, 通気性のある培養栓にニードルを貫通させ, ニードル上部にチューブを接続し, チューブの下流にフィルターを, 上流にコンプレッサーやガスシリンダーを接続した通気システムである. 2種類のチューブの組合せとフィルターの配置を工夫することで, 振幅70 mm, 振盪数200 rpmでも長時間にわたりAAFSを稼働できるようになった. 開発したAAFSを用いて, フラスコ気相部に新鮮空気を無菌的に短時間

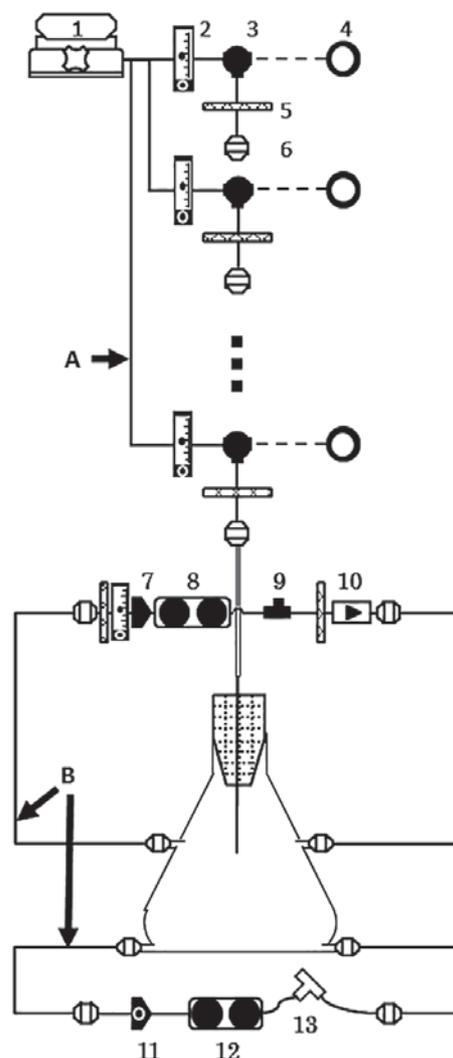


図2. AAFSとCDMSSをフラスコに接続した概念図. 1: コンプレッサー, 2: 流量計, 3: バルブ, 4: 制御システム, 5: フィルター, 6: コネクター, 7: 気相用ポンプ, 8: ガス測定ユニット, 9: 気体サンプリングユニット, 10: 逆止弁, 11: 液相用ポンプ, 12: 溶存ガス測定ユニット, 13: 液体サンプリング.

(30 sec) 通気した結果, 前述の不確定要素を排除しながら同様の現象が認められた.

この現象のメカニズムを解明するためには, 培養栓の開封から着想を得たAAFSはフラスコ気相部に通気するため, フラスコ気相部のガスの挙動を把握する必要があった. さらに, 気相部のガス組成の変化がヘンリーの法則に従い, 溶存ガス濃度を変動させ, 培養液中の微生物群集構造に影響を及ぼしていると仮定すると, 培養液中のガス濃度と微生物群集構造の変化も調べる必要があった.

種々検討を行ったが, 既存の機器では, 振盪の中断や培養栓の開封を行わずに, 高速振盪中の同一フラスコ内のガス (気液二相) と微生物の両方の挙動を十分に解析

できなかった。この問題を解消するために筆者は、フラスコ内から同一のフラスコ内に循環するループ構造を作り、ループ構造内（循環システム内）は高速振盪されない仕組みを考案した（図2B）。さらに、循環システム内に測定機器を内蔵したモニタリングユニットやサンプリングユニットを挿入することで、フラスコ気相部や培養液中の二酸化炭素と酸素の濃度をモニターするだけでなく、振盪を中断せずに（もちろん、培養栓を開封せずに）培養液を採取できる Circulation Direct Monitoring and Sampling System (CDMSS)^{11,12}を開発した（図2B）。

図2のようにAAFSとCDMSSをフラスコに接続し、新奇現象を見いだした最初の培養条件で振盪フラスコ培養を行った結果を図3、4に示した。従来の振盪フラスコ培養法では、培養中期からフラスコ気相部の二酸化炭素濃度が増加し、それに伴い、溶存二酸化炭素濃度も増加した（溶存酸素濃度は予想通りに培養の後半には枯渇状態）。その後、従来法（AAFSによる間欠的な通気がない条件）は、二酸化炭素濃度が一度、ピークを示した後、減少した。AAFSによる通気培養法は、通気直前まで従来法と同様の培養微生物群集構造を形成していたが、通気直後を比較すると、異なる培養微生物群集構造を形成することが明らかとなった（図4）。また、フラスコ気相部への一時的な通気により、二酸化炭素濃度は一時的に減少し、それに伴い、溶存二酸化炭素濃度が減少したことが観察できた。その後、従来とは異なる微生物群集が活性化（増殖）し、気液共に二酸化炭素は従来法と比べ高い濃度を維持した（溶存酸素は枯渇状態）。従来法に二酸化炭素濃度の一時的な変動を加えることで異なる微生物群集が集積することは、好気性微生物の探索時に、二酸化炭素にも留意する必要性を示している。

これまで振盪培養中のフラスコ気相部と培養液中のガスを同時にモニターした報告は少ない。大腸菌や酵母のような純粋培養でもフラスコ気相部に高濃度の二酸化炭素が充満し、培養液の溶存二酸化炭素濃度も高いことがCDMSSを用いることで明らかとなった。この傾向は、微生物の増殖が活発な時期に顕著である。また、図2では、気相部のCDMSSをフラスコ側面に接続しているが、ニードルを介した培養栓に変更し、ニードルの高さやCDMSSの循環速度を種々検討することで、鉛直方向に二酸化炭素濃度勾配が形成されていることを筆者が知る

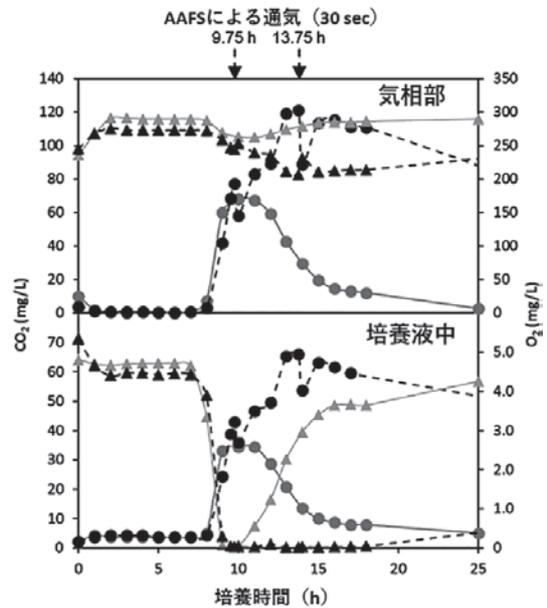


図3. 気相部への短時間通気がガス濃度に及ぼす影響。灰色は従来法（図2のAに該当）、黒色はAAFSを用いた培養法（図2のBに該当）。△はO₂、○はCO₂濃度を示す。

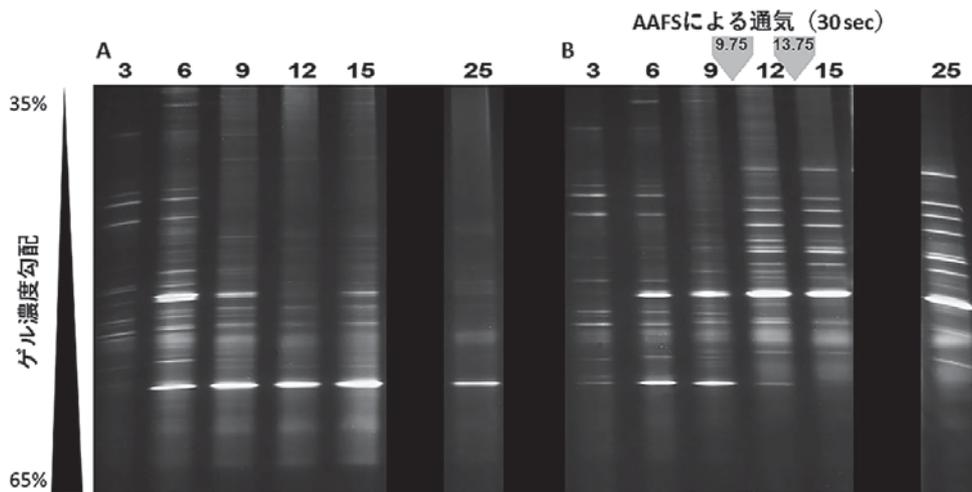


図4. フラスコ気相部への短時間通気が振盪培養中の微生物群集構造に及ぼす変化。Aは強制通気のない従来の振盪フラスコ培養、Bは9.75、13.75 h目にAAFSを用いた間欠通気をした振盪フラスコ培養。数字は培養時間（h）を示す。CDMSSを用いて経時的にサンプリングした菌体培養液から16S rDNAを抽出し、ユニバーサルプライマーで増幅し、DGGE解析を実施した。

限り、初めて実証できた¹⁴⁾。また、CDMSSの気相のバイパス部分はフィルターで区切られており、二酸化炭素吸着剤(マイクロプレートの振盪培養実験で用いていた)を充てんしたカラムを挿入することができる。その結果、従来の微生物の振盪フラスコ培養で生じる二酸化炭素の気相部への充満および培養液への蓄積を抑制した培養を実施できるようになった。そこで、従来の振盪フラスコ培養法と比較実験した結果、CDMSS内のモニタリング部分よりも下流に二酸化炭素吸着剤を挿入した振盪フラスコ培養では、フラスコ内の二酸化炭素の分圧を低く維持することができ、従来法と比べて集積する培養微生物群集構造も異なった¹⁶⁾。

微生物に限らず、さまざまな細胞において二酸化炭素は非常に重要な培養因子¹⁷⁾でもあるにも関わらず、従来の振盪フラスコ培養法では見落とされがちであった。振盪フラスコ培養法が考案された歴史的背景やモニタリング技術の制限などさまざまな理由が潜んでいたのかもしれない。今後、酸素供給に限らず、二酸化炭素など異なる視点に基づいた振盪フラスコ培養のより深い理解は、微生物の液体培養の改善や再現性の高い培養の実現につながるだけでなく、新規微生物の集積手段としての利用も期待できる。

現在、CDMSSとAAFSをPID制御で接続し、従来の培養栓を用いながら、フラスコ気相部の二酸化炭素濃度を制御する方法の開発を進めている¹⁸⁾。

おわりに

前述したように筆者は、未培養微生物の培養化を行うための1つの考えとして、これまで微生物学を支えてきた基本的な考え方や手法を見直すことで、新たな考え方や手法を提案できるのではないかと考え、本稿では、国内外で広く微生物培養に使用されているフラスコ振盪培養の特性の解析と提案について紹介したが、フラスコ培養以外でも同様な視点が重要であると考えている。これまで微生物学を支えてきた基本的な考え方や手法については生物工学会誌特別号に記載されている¹⁹⁾。

研究を進めていくと、(I) 振盪フラスコ培養法は、現在に至るまであまり進歩していないのではないかと、(II) 振盪フラスコ培養の詳細は十分に明らかにされているとも言えない(たとえば、サンプリング操作がフラスコ内の環境や微生物及ぼす影響は?)、(III) 三角フラスコと坂口フラスコの特性の違いは?など、多くの問いが残されていることを感じた。本稿が振盪フラスコ培養法はどのような特性を有しているのか理解の一助になれば幸いである。

微生物学実験における根幹的な手法である振盪フラス

コ培養法は実験室単位でプロトコルが少々異なる場合が見受けられる(場合によっては、同じ研究室内でも異なるかもしれない)。筆者は、ルーティーンな手法であり、見落とされがちな操作の差異の中に未知因子が潜在しており、この点を踏まえたうえで、従来の概念にとらわれない培養因子の意欲的な探索や利用は、未培養微生物(微生物ダークマター)の培養化にも有効であると考えている。現在、根幹的な培養手法への深い理解を通じ、微生物培養の特性を再構築することで、従来よりも有効な培養条件の設定やシステム開発を実現できると考え、日々研究に精進している。

謝 辞

本稿は、日本学術振興会科学研究費助成事業、公益財団法人住友電工グループ社会貢献基金、公益財団法人野田産業科学研究所の助成により実施された内容を含むものです。また、澤田宜介(いわしやバイオサイエンス)に協力いただきました。この場をお借りして、深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Amann, R. I. *et al.*: *Microbiol. Rev.*, **59**, 143 (1995).
- 2) Kluyver, A. J. and Perquin, L. H. C.: *Biochemische zeitschrift*, **266**, 68 (1933).
- 3) 鹽田日出夫, 坂口謹一郎: 日本農芸化学会誌, **23**, 426 (1950).
- 4) 黒澤 尋: 生物工学, **91**, 646 (2013).
- 5) Corman, J. *et al.*: *Appl. Microbiol.*, **5**, 313 (1957).
- 6) Gaden, E. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **4**, 99 (1962).
- 7) Jensen, A. L. and Schultz, J. S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 539 (1966).
- 8) Henzler, H. J. and Schedel, M.: *Bioprocess Eng.*, **7**, 123 (1991).
- 9) Reynoso-Cereceda, G. I. *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **105**, 379 (2016).
- 10) 加藤 勲: 筑波大学博士(農学)学位論文(1998).
- 11) Takahashi, M. *et al.*: *AMB express*, **7**, 163 (2017).
- 12) Takahashi, M. and Aoyagi, H.: *J. Biosci. Bioeng.*, **126**, 96 (2018).
- 13) Takahashi, M. and Aoyagi, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 4279 (2018).
- 14) Takahashi, M. and Aoyagi, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 6637 (2018).
- 15) 高橋将人, 青柳秀紀: 日本農芸化学大会講演要旨集, 2C25P14 (2015).
- 16) 青柳秀紀ら: 日本生物工学大会講演要旨集, p. 240 (2018).
- 17) Blombach, B. and Takors, R.: *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **3**, 108 (2015).
- 18) 高橋将人, 青柳秀紀: 日本生物工学会大会講演要旨集, p. 115 (2019).
- 19) 日本生物工学会: 生物工学会誌 特別号 発酵工学20世紀のあゆみーバイオテクノロジーの源流を辿る一, (2000).