



Effect of intermittent opening of breathable culture plugs and aeration of headspace on the structure of microbial communities in shake-flask culture

振盪培養中の間欠的な培養栓の開封やフラスコ気相部への通気が
培養微生物群集構造に及ぼす影響

(JBB, Vol. 126, No. 1, 96–101, 2018)

高橋 将人・青柳 秀紀*

特定の微生物を集積させる“集積培養”の概念は、19世紀に Winogradsky らにより提唱された。振盪フラスコ培養法は、1933年、ドイツでの *Aspergillus* 属の報告¹⁾から始まり、現在では多種多様な細胞に用いられている。

筆者（高橋）は、卒研生として、筑波大学細胞機能開発工学研究室（青柳研）に所属して間もない頃、三角フラスコを用いた振盪培養法で好熱菌の集積に取り組んでいた。微生物学実験のイロハを学びながら、土壌試料の振盪培養の経過に伴い、どのようにして微生物群集構造が変化するのか知りたく、経時的に培養液をサンプリングしていた。その際、同じ土壌試料（あらかじめ均一に懸濁させ凍結保存していた）を同じように接種し、同一の条件（培養器、培養栓、培地、培地量、pH、温度、振幅、振盪数、培養時間）で振盪培養しているにも関わらず、隣の三角フラスコ内の培養懸濁液の色と違うことに気づいた。そこで、サンプリングしていた同一フラスコだけでなく、隣の三角フラスコ（こちらのフラスコは経時的にサンプリングしていなかった）内の培養懸濁液も、16S rDNA（細菌の系統分類で用いられている）の一部（V3領域）を用いた菌叢解析に供した結果、集積した微生物群集構造が異なることが判明した。

そこで、筆者はこの新奇な現象に着目し“サンプリング操作の有無によって培養微生物群集構造が変化する”という仮説をたてた。この仮説を検証するためのさまざまな実験を積み重ね、サンプリング操作過程のクリーンベンチでおこなわれる培養栓の短時間（30 sec）の開封が一因だと突き止めた。しかし、振盪の中断が培養に及ぼす影響（微生物が含まれる培養液への酸素供給が一時的に中断されてしまい酸欠状態になりやすい）を含め、手技に依存した不確定な要素が多かった。そこで、サンプリング過程の手作業での培養栓の開封による換気を、独自に開発した Automatic Aeration Flask System (AAFS) を用いて、振盪を中断することなくフラスコ気相部への間欠的な強制通気をおこなうことで代替し、培養栓の開封により生じる新奇な現象を再現した。

また、培養経過に伴う微生物群集構造の変化を分析す

るのにおいて、従来のサンプリング方法（無菌的に培養栓を開封し懸濁液を採取する）では、サンプリング自体が振盪培養中の微生物群集構造へ及ぼす影響を無視できない。そこで、振盪の中断や培養栓の開封をすることなくサンプリングができ、フラスコ気相部や培養液中の CO₂ や O₂ 濃度をモニタリングできるデバイス Circulation Direct Monitoring and Sampling System (CDMSS) を開発した^{2,3)}。本受賞論文では、AAFS と CDMSS を併用することで初めて新奇な現象が生じる機構の一部を解明できた。具体的には、振盪培養中は、微生物の呼吸によって培養液中の溶存 CO₂ が高く、それに伴いフラスコ気相部にも CO₂ が充満している。この際、AAFS による気相部への間欠的な通気により気相部の CO₂ 濃度が一時的に減少し、ヘンリーの法則に従い、溶存 CO₂ 濃度も低下し、3 h 以内に培養微生物群集構造に影響を及ぼすことが明らかとなった。

振盪フラスコ培養法の深い理解は、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ろう。また近年、従来法で培養できる微生物は、自然界に存在する 1% 程度であることが示唆され⁴⁾、残された 99% の未培養微生物の活用も求められている⁵⁾。本学会でも 2016 年より未培養微生物（微生物ダークマター）資源工学研究部会が活動中である。実際に、振盪フラスコ培養中の間欠的かつ無菌的な培養栓の開封条件で集積した微生物群集の中には、従来の培地の変更だけでは集積しなかった特異的な微生物の存在を認めている。今後、実験中に見いだした予期しない現象を通じて得た知見や開発したシステム（AAFS や CDMSS）を利活用することで、未培養微生物の培養化に貢献してゆきたい。

- 1) Kluyver, A. J. and Perquin, L. H. C.: *Biochem. Z*, **266**, 68 (1932).
- 2) Takahashi, M. *et al.*: *AMB Express*, **7**, 163 (2017).
- 3) Takahashi, M. and Aoyagi, H.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **102**, 4279 (2018).
- 4) Amann, R. I. *et al.*: *Microbiol. Rev.*, **59**, 143 (1995).
- 5) Ling, L. L. *et al.*: *Nature*, **517**, 455 (2015).

*著者紹介 筑波大学 生命環境系（教授） E-mail: aoyagi.hideki.ge@u.tsukuba.ac.jp