

微生物の純粋培養操作の自動化を可能とする革新的分離培養手法の開発

広島大学 非会員 ○植田雄人
Northeastern 大学 非会員 Tandgan N
Northeastern 大学 非会員 Goluch E
広島大学 正会員 金田一智規
広島大学 正会員 大橋晶良
広島大学 非会員 青井議輝

1. はじめに

地球上には膨大な数・種類の微生物が存在している。人類はそうした微生物を様々な場面で活用し、多大な恩恵を享受している。それら微生物の機能や存在意義を知るためには、単一の微生物を分離して純粋培養するプロセスが必要不可欠である。しかし近年進歩した分子生態解析により、全体の 99%の環境微生物が従来の方法では培養できないことが判明した。このため環境微生物の正しい理解に基づく制御やバイオリソースとしての開拓は幅広い分野における重要課題であるにも関わらず、そのほとんどが未説明・未利用のまま残されている。一方で、分離培養の方法論は 150 年前からさほど進展しておらず、未培養微生物に効率的にアクセスする手段は限られている。

2. 研究目的

本研究では、環境微生物を自動的に分離し、純粋培養操作を可能にするという全く新しいコンセプトに基づく分離培養デバイスを用いて、未培養微生物を獲得する新規手法を開発すること、及び実環境サンプルをデバイスに適応し、コンセプト通り純粋培養が可能かどうかを実証することを目的とする。

3. 分離培養コンセプトと原理

本デバイスは物質の出入りが可能な空間に設置された培地に誘われ微生物が侵入した後、入り口を閉じ、一細胞を増殖（純粋培養）させるというコンセプトに基づいている。原理的には培地が充填されているチャンバーと外環境つながる細い管（ナノチャンネル）によって構成されており、環境中の微生物は入り口付近で増殖を始め、培養容器に向かってナノチャンネル内を一列に分裂を繰り返しながら進み、最終的に培養容器内で検出可能レベルまで増殖する。一つの細胞が増殖を開始すると管がふさがり他の微生物が侵入できないため、純粋菌株が得られるという原理である (Fig. 1)。

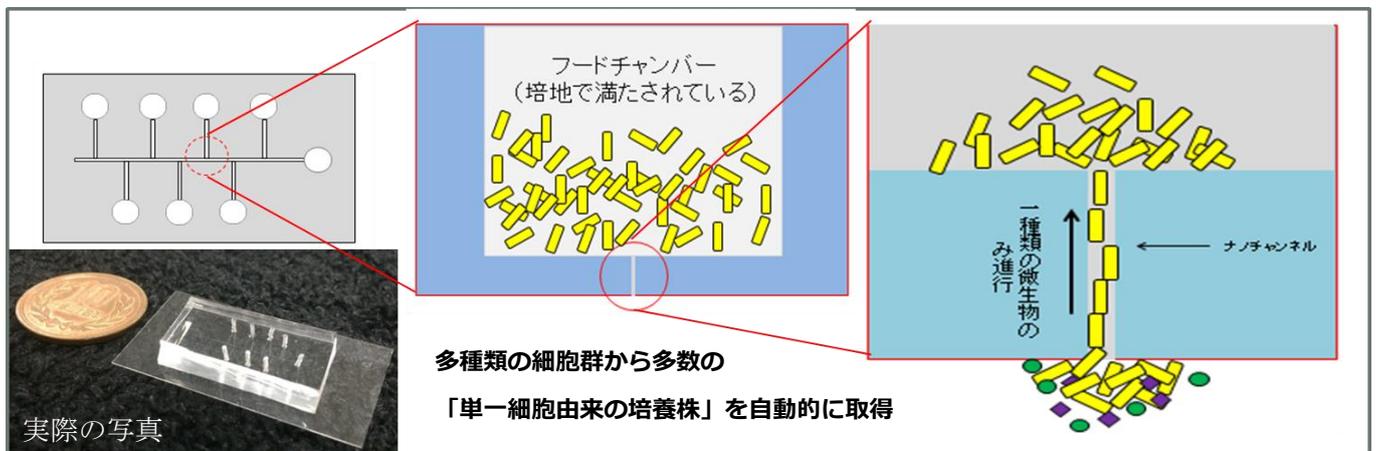


Fig. 1 Principle of device

キーワード 未培養微生物 分離培養 ナノチャンネル

連絡先 〒739-8527 東広島市鏡山 1-4-1 広島大学大学院工学研究科 社会基盤環境工学専攻 事務室

TEL : 082-424-7819・7828

4. 実験内容

まず、本デバイスの入り口部位に土壌由来の環境サンプルを注入した. その後 7 日程度、28°Cの温度環境下で静置し、適宜、顕微鏡を用いて Food Chamber 部位 (Fig. 1) での微生物の増殖の可否を直接確認した. 微生物が増殖していた場合、シリンジでチャンバーから菌体を直接採取し、滅菌水で希釈した後、平板培養、液体培養法を用いて 2 次培養を行った. 2 次培養で菌体の増殖が確認できたサンプルについて 16SrRNA の DNA シーケンス解析を行った.

5. 結果

土壌サンプルから本デバイスを用いて分離できた菌株 (Fig. 2) は、56 トライアル中 55 サンプルであった. その内二次培養において液体培養のみで増殖した菌体は 23 サンプル、平板培養のみで増殖した菌体は 1 サンプル、平板培養と液体培養の両方において増殖が確認された菌体は 25 サンプルであった. その後、PCR により伸長反応を合計 31 サンプルにおいて確認することが出来た. その内相同性解析に提出した 29 サンプルにおいて土壌中の微生物を純粋培養出来たことを確認した.

6. 結論

新規コンセプトを用いて土壌サンプルを純粋培養することに成功した. このことから、土壌由来の菌株のみならず、海洋やその他の環境サンプルを新規コンセプトで獲得可能であることが示唆され、本手法は従来の方法論に代わる新たな分離培養手法として確立できる高い潜在性があると言える.

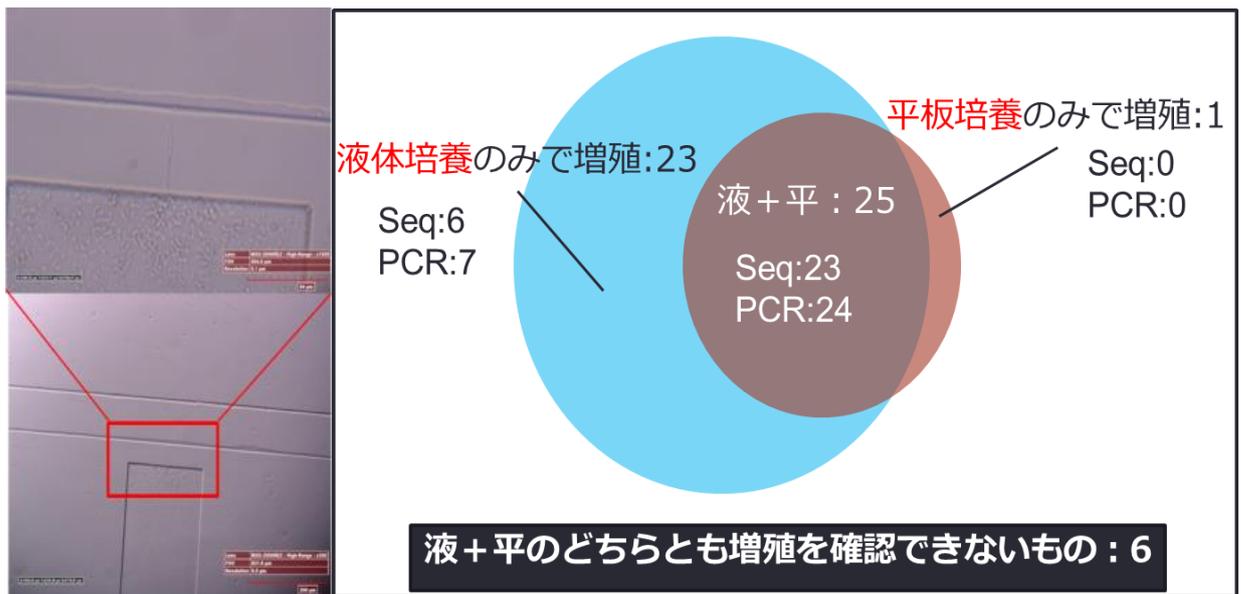


Fig. 2 Bacteria growing inside device (left side),
The result of sub-culture after incubating in device (right side)

7. 参考文献

- Tandogan et al., (2014), *PLoS ONE*, 9, 1-7