



National Institute of Technology (KOSEN), Kure college
Bio-conversion Laboratory (Kimura Lab.)

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

菌をこちらの都合に合わせる。 新たな微生物分離戦略

呉工業高等専門学校 環境都市工学分野
准教授 木村善一郎 (z-kimura@kure-nct.ac.jp)

2021年7月6日 於JST新技術説明会（オンライン）

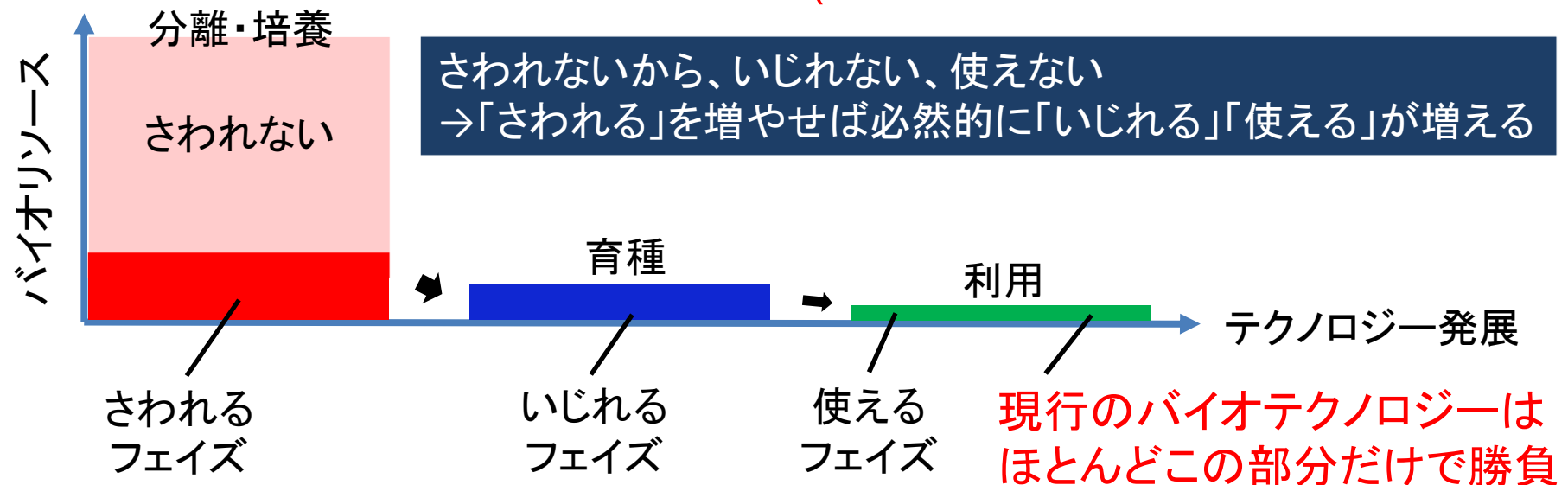


環境バイオテクノロジーのリソースを拡大したい

環境バイオテクノロジーの主役は微生物
にもかかわらず潜在的リソースと現状の乖離は激しい



ほとんどの微生物は生きているが分離・培養出来ない
Viable but Non-Culturable (VBNC) の状態にある



「さわれる/さわれない」の比は1000倍を優に超える
逆に言えば1000倍の巨大な伸びしろがあるということ



なぜさわれないのか？

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

3

複数の要素が単独あるいは複合した結果として生じるもの
下記に4つの要素を図示

A: 微生物群集内の
存在比が小さい

B: 従来の培地では
増殖困難

$A \cup B \cup C \cup D - (C + D)$

C: 細胞が休眠状態

D: たまたままだ分離
されていない

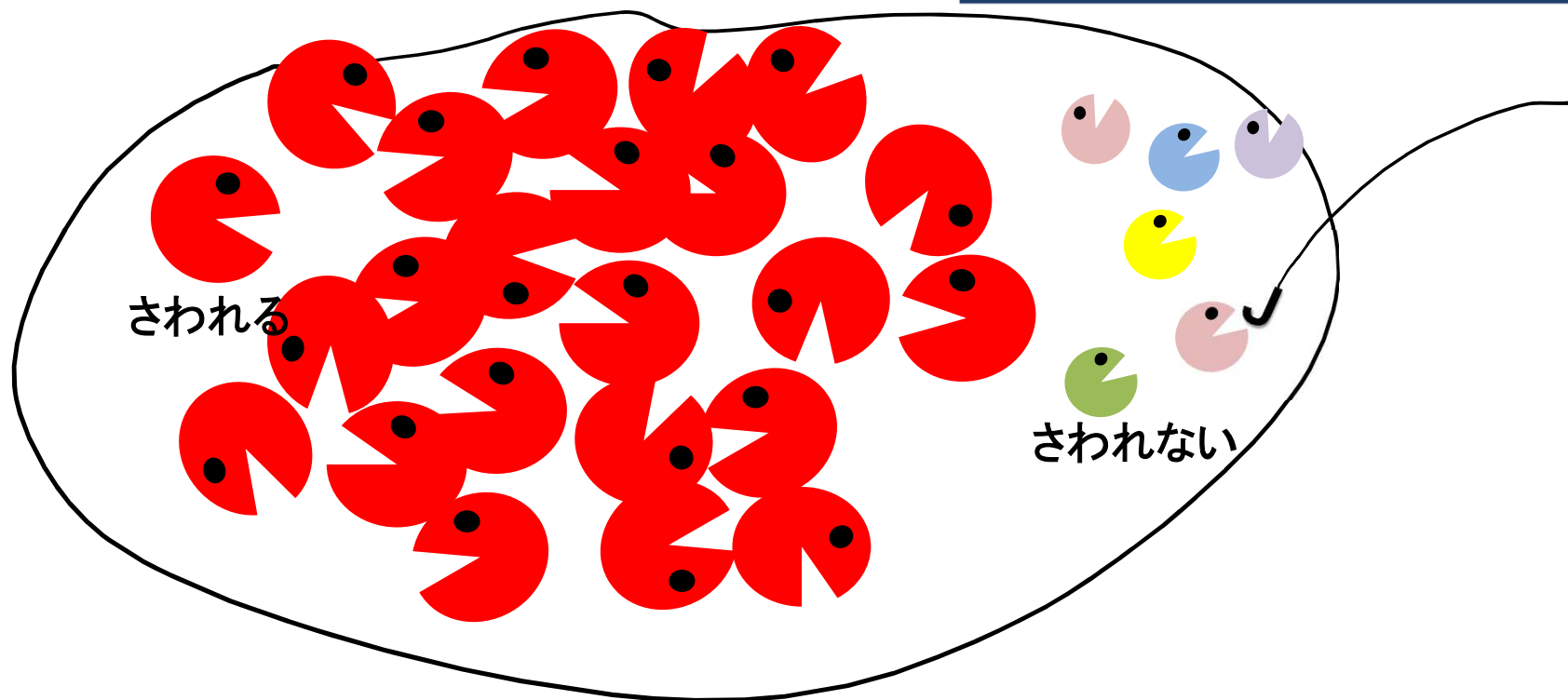
VBNCという概念は $A \cup B \cup C \cup D$ の和集合
要素A/B/C/Dの割合を調べる術は(現状では)存在しない
本研究はA及びD(特にA)の解決に取り組むもの
A領域の微生物圏: レアバイオスフィア



なぜさわれないのか？

「さわれる」菌は種類
が少なく数が多い

「さわれない」菌は種類
が多いが数が少ない、
そして数が少ない菌を
釣ることは単純に難しい



数が少ないがゆえに現状「さわれない」菌を
釣り上げることを本技術は可能とする



集積培養法

- 古典的方法論にして現状でもほぼ唯一のアクセス方法
 - 少ないままでは分離出来ないので「増やす」
 - 生理活性が変数なので系統分類的に「狙って」は培養出来ない

セルソーターとLive-FISHの併用 (Batani et al., Sci. Rep., 2019)

- FISHにより「狙った」系統の微生物を染色しFACSにより分取
 - 「生かしてきっちり染める」ことは困難→少数菌種の分取には不向き

複合系への遺伝子導入(加藤ら、科研費進学術領域ポストコッホで実施中)

- 複合系内の任意微生物に対し分離に有利な遺伝子を導入
 - 導入した遺伝子を「発現」するところで選択圧が生じると考えられる
 - 「狙った菌を取る」技法としては強力だが特殊解的

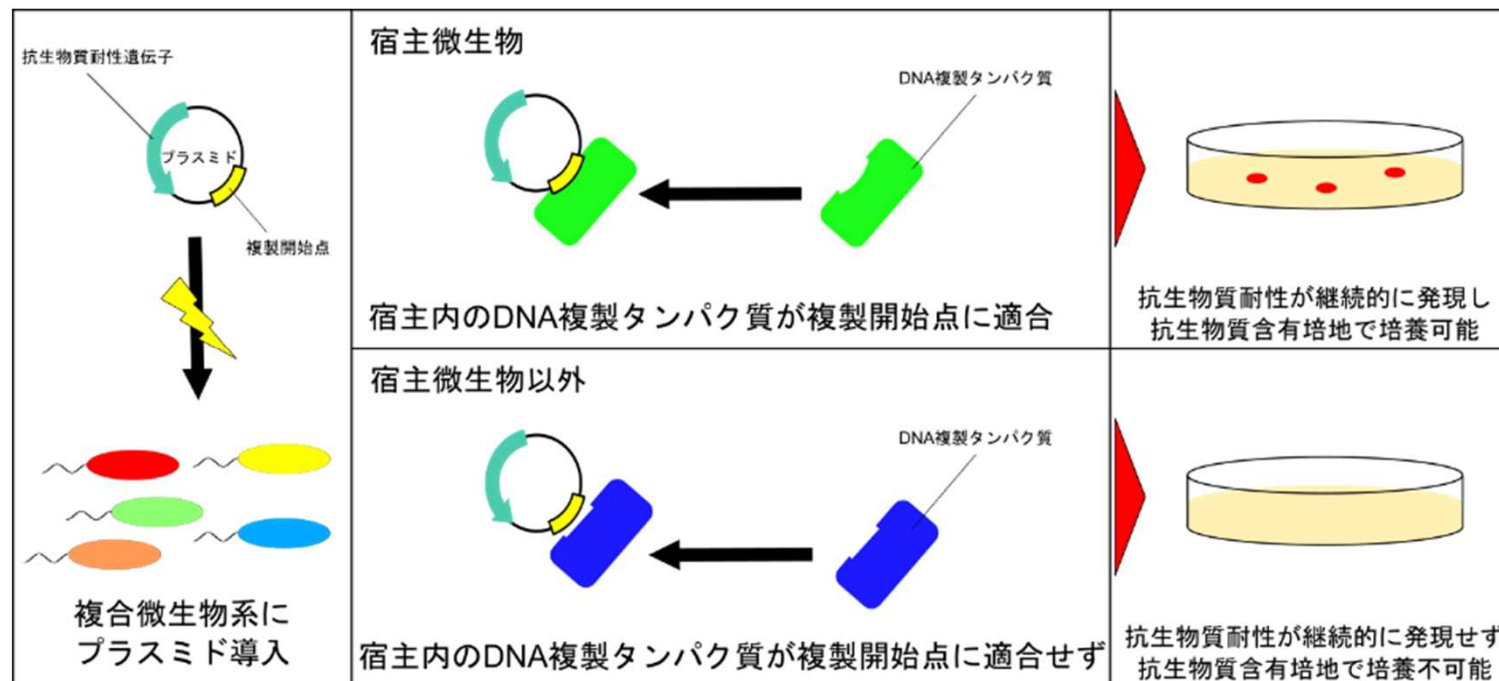


ではどうしたら一般解たりうるか？

もしある一種の抗生物質耐性微生物が試料中に 10^3 個存在していたとする。
それ以外のすべての微生物がその抗生物質に感受性ならば、その一種は
たやすく分離することが出来るであろう（鎌形, 科学と生物, 2008）

が、そのような都合の良いシチュエーションは存在することはごく稀
では後付けで作り出すことは出来ないか？それも全生物を対象にしよう一般性で。

普遍的なアクセス戦術(i.e. 一般解)を作りたいということで、





実施例-1 手順1

- ①種類の純粋分離されている細菌を濁度(O.D. 600)が等しくなるように菌液を調整。培養した菌株は*Bacillus subtilis* subs. *subtilis* NBRC13719株、*Corynebacterium striatum* NBRC15291株、*Staphylococcus epidermidis* NBRC100911株、*Comamonas terrigena* NBRC13299株これらの細菌は全てLB培地で培養可
- ②空の1.5mlチューブに濁度調整した*Bacillus subtilis* subs. *subtilis* NBRC13719株、*Corynebacterium striatum* NBRC15291株、*Staphylococcus epidermidis* NBRC100911株、*Comamonas terrigena* NBRC13299株を300μlずつ加え混合。
- ③上記②の菌液に濁度調整した*Escherichia coli* DH5α株を1μl加え、これを複合微生物系モデルとした。このモデルのE.coli DH5α存在比率は0.1%。
- ④E.coli DH5αのみが発現可能なプラスミドベクター:pUC19(Amp^r)を用意。

pUC19-sequence

```
GGGCCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATATGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCAC
TCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGATGCCT
GCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCAGTGCCGCTGCTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAACCCCTGGCGTTACCCAACCTTAATCGCCTTGACGCATACCCGCTT
TCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCAGCATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCGTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTAATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTAATTTACAC
ACCGCATATGGTGCAGCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGATAGTTAAGCCAGCCCGCAGCACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGCTGCTCCCGGCATCCGCTTACA
GACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGACAGGTTTTCACCGTCATACCCGAAACCGCGAGAGCAAAAGGGGCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTGATGATAATAA
TGGTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGGGGAACCCCTATTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGATTCGGCTCATGAGACAATAACCGTGATAAATGCTTC
AATAATATTGAAAAGGAAGAGATGAGTATTCAACATTTCCGCTGTGCGCCCTTATCCGCTTTTTCGCGGCTTTTGCCCTTCTGCTTTTGTCTCACCCAGAAACCGTGGTGAAGTAAAAGATG
CTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCCGAAGAACGTTTCCAATGATGAGCAGCTTTTAAAGTCTGCTAT
GTGGCGCGGTATTATCCGCTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGCTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGA
CAGTAAGAGAATTATGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACAGTGCAGGCAAGTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTCGACAACATGGGGGATCATG
TAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAACAGCAGGAGCTGACACCCAGTACGCTGTAGCAATGGCAACACGTTGCGCAAACTATTAACGCGCACTACTTA
CTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGACAGGACACTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTG
GGTCTCGCGGTATCATTTGACGACCTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGAGCGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTG
CCTCACTGATTAAAGCATTTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACCTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA
CCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGCTAGAAAAGATCAAGGATCTCTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCAC
CGCTACCGAGCGGTGGTTTGTGTTGCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTTCTTAGTGATAGCCGTAGTTAGGCCACC
ACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTGCTGAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA
AGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGACACAGCCGAGCTTGAGGCGAAGCAGCTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCCGAAGGGA
GAAAGCGGACAGGTATCCGCTAAGCGGAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGAGAGTCCAGGGGGGAAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCAGCTGTGACTTGAGG
GTCGATTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAANAACGCGCAGCAACCGCGGCTTTTACGGTTCCTGGGCTTTTGTGCGGCTTTTGTCTCATGTGTTCTTCTGCGTTATCCC
CTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCGAAGCAGCGAGCGCAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGA
```

- :pUC origin of replication sequence
- :Ampicillin resistance gene sequence



- ⑤ソルビトールバッファを複合微生物系に200 μ l加え、エレクトロコンピテントセル化
- ⑥エレクトロコンピテントセルに対し0.5 μ gのpUC19を加え、エレクトロポレーション法によるプラスミド導入。（エレクトロポレーション法の条件は1.25kV/cm、25 μ F、200 Ω で実施）
- ⑦アンピシリン含有LB培地に塗布し、24時間培養。
- ⑧培養後に形成されたコロニーを16SrRNA遺伝子系統解析を行い、種を同定。

strain	最類縁種	相同性(%)	strain	最類縁種	相同性(%)
No.1	Escherichia coli	99.7	No.9	Escherichia coli	99.4
No.2	Escherichia coli	99.4	No.10	Escherichia coli	99.5
No.3	Escherichia coli	99.5	No.11	Escherichia coli	99.2
No.4	Escherichia coli	100	No.12	Escherichia coli	99.5
No.5	Escherichia coli	100	No.13	Escherichia coli	99.3
No.6	Escherichia coli	99.3	No.14	Escherichia coli	99.3
No.7	Escherichia coli	99.5	No.15	Escherichia coli	99.4
No.8	Escherichia coli	99.5			

解析した全菌株が*Escherichia coli*
存在比率0.1%未満の希少微生物を選択的に培養可能



実施例-2 手順1

複合微生物系からの未培養微生物の選択的培養 →実環境資料への実装

- ① 活性汚泥サンプルを貧栄養培地 (1/10R2A培地) に塗抹
- ② 7日間培養後コロニーを全て獲得し滅菌生理食塩水に懸濁
→複合微生物系サンプル
- ③ 複合微生物サンプルを洗浄後、25mMのCaCl₂と
10%のPEG8000混合溶液100μlに懸濁
- ④ にEscherichia coliを宿主とするプラスミド: pgRNA (Str^r) (前述した
pUC19を元とした改変プラスミド、アンピシリン耐性ではなく
ストレプトマイシン耐性をコード) を懸濁液に添加しケミカル法で形質転換
- ⑤ ストレプトマイシン含有1/10R2A培地 で培養
- ⑥ 培養後に形成されたコロニーを16SrRNA遺伝子系統解析、種同定



実施例-2 結果-1

プラスミドの宿主特異性による系統選択的形質付与が一般解となると着想

Host Specific Plasmid induced Screening (HosPiS)と命名

いくつかの環境微生物が分離されつつあります。

strain	transformation	Enrichment with streptomycin	closest relative	accession No.	similarity (%)
HOS①-3	Y	Y	Enterobacter kobei	AJ508301	97.6
HOS①-4	Y	Y	Enterobacter kobei	AJ508301	99.3
HOS①-5	Y	Y	Enterobacter kobei	AJ508301	99.3
HOS①-6	Y	Y	Enterobacter kobei	AJ508301	99.1
HOS①-7	Y	Y	Enterobacter kobei	AJ508301	98.9
HOS①-8	Y	Y	Enterobacter kobei	AJ508301	99.3

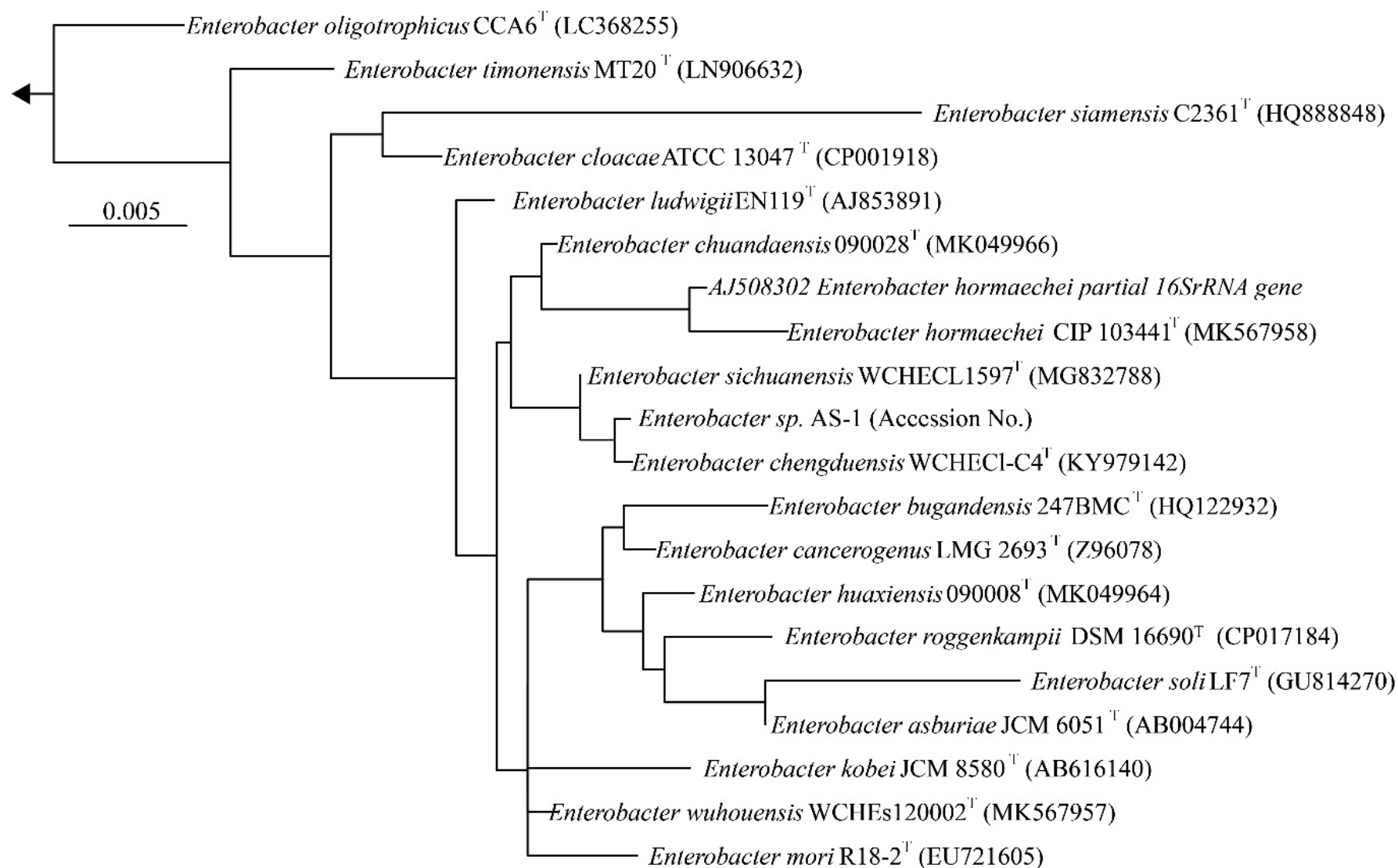
活性汚泥中から低存在比率の
*Enterobacter*属細菌を分離
することに成功

strain	transformation	Enrichment with streptomycin	closest relative	accession No.	similarity (%)
HOS③-2	Y	N	Bacillus cereus	AE016877	99.9
HOS③-3	Y	N	Bacillus cereus	AE016877	99.9
HOS③-4	Y	N	Bacillus cereus	AE016877	99.9
HOS③-5	Y	N	Bacillus cereus	AE016877	99.5
HOS③-6	Y	N	Bacillus toyonensis	AJ310100	99.7
HOS③-7	Y	N	Bacillus cereus	AE016880	99.9
HOS③-9	Y	N	Enterobacter kobei	AJ508301	99.2
HOS③-10	Y	N	Bacillus toyonensis	AJ310100	99.6
HOS③-11	Y	N	Bacillus toyonensis	AJ310100	99.4
HOS③-14	Y	N	Bacillus cereus	AE016880	99.5
HOS③-15	Y	N	Bacillus cereus	AE016880	99.4
HOS③-16	Y	N	Bacillus toyonensis	AJ310101	100.0
HOS③-17	Y	N	Enterobacter kobei	AJ508301	99.2
HOS③-19	Y	N	Bacillus toyonensis	AJ310101	99.1
HOS③-21	Y	N	Bacillus toyonensis	AJ310101	99.9
HOS③-22	Y	N	Bacillus toyonensis	AJ310101	99.9
HOS③-23	Y	N	Bacillus cereus	AE016881	99.1
HOS③-24	Y	N	Bacillus cereus	AE016881	99.5

strain	transformation	Enrichment with streptomycin	closest relative	accession No.	similarity (%)
HOS④-4	N	N	Bacillus toyonensis	AJ310101	98.5
HOS④-8	N	N	Bacillus toyonensis	AJ310101	100.0
HOS④-10	N	N	Bacillus toyonensis	AJ310101	99.7
HOS④-11	N	N	Bacillus cereus	AE016881	99.3
HOS④-12	N	N	Bacillus toyonensis	AJ310101	99.3
HOS④-14	N	N	Bacillus cereus	AE016881	99.9
HOS④-15	N	N	Bacillus toyonensis	AJ310101	99.9
HOS④-16	N	N	Bacillus toyonensis	AJ310101	99.9
HOS④-23	N	N	Bacillus cereus	AE016881	99.6
HOS④-24	N	N	Bacillus cereus	AE016881	99.6



実施例-2 結果-2



Multilocus Sequence Typingにより *Enterobacter chengduensis* の基準株と最類縁であることが判明

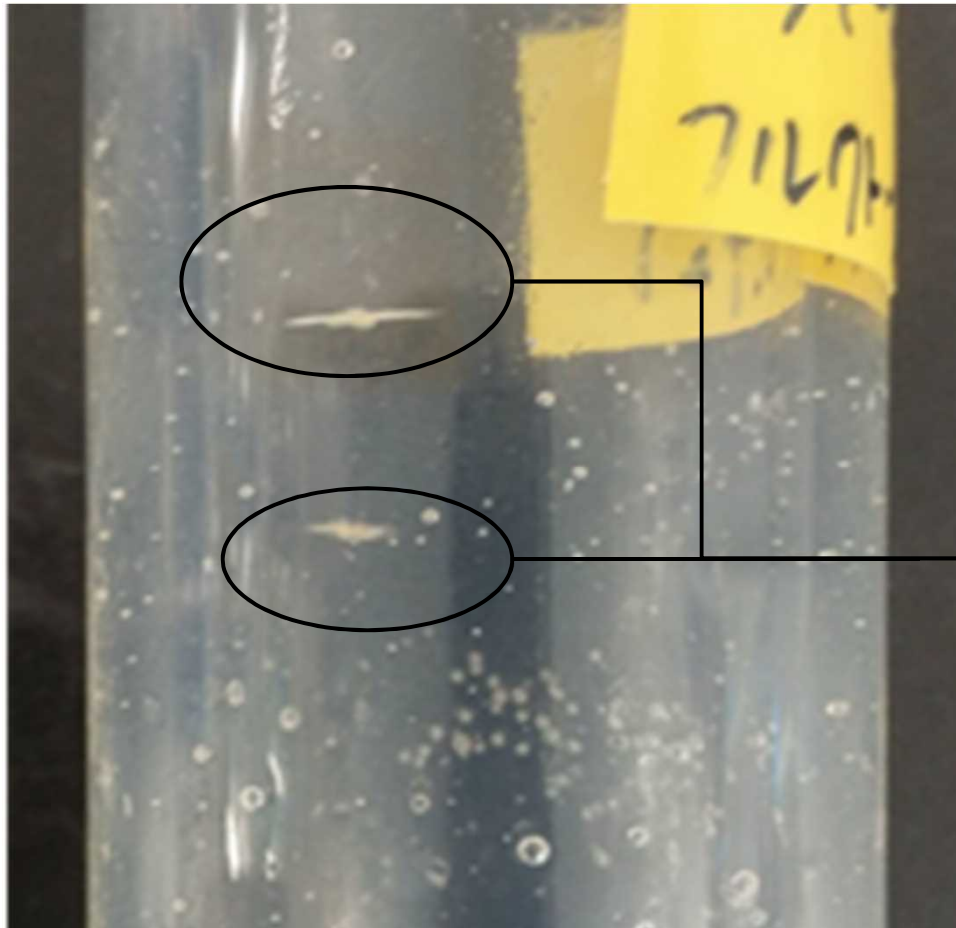
Genus	Species (Subspecies)	ANI (%)
Enterobacter	"ologotoropha"	86.807
	aerogenes	79.150
	asburiae	92.695
	bugandensis	90.188
	cancerogenus	85.951
	chengduensis	94.783
	cloacae ssp. cloacae	87.691
	hormaechei ssp. hormaechei	86.860
	hormaechei ssp. oharae	87.094
	hormaechei ssp. steigerwaltii	86.968
	kobei	79.606
	ludwigii	87.460
	mori	88.347
	muelleri	92.505
	roggenkampii	92.063
	sichanensis	90.205
	solis	85.319
	tabaci	88.633
	xiangfangensis	86.917

最類縁種である*Enterobacter chengduensis*との
 Average Nucleotide Identity (ANI) valueの値が<96%
 新種であることが判明→新種分離に使用可能



使用できるプラスミド例

使用プラスミド	分離対象細菌系統	使用プラスミド	分離対象細菌系統
pUC18	Enterobacteriaceae科	pKP1141	Enterobacteriaceae科
pUC19	Enterobacteriaceae科	pSEVA3b67Rb	Bacillus属
pgRNA-bacteria	Enterobacteriaceae科	pDL278	Enterococcus属
pIKM1	Thermoanaerobacteriaceae科	pBSJL1	Veillonella属
pGM190	Streptomyces属	pYUB28b series	Mycrobacterium属
pRAD1	Deinococcus属	pMM1520 serie	Bacillus属
pMM579	Bcteroides属	pRBBm series	Bacillus属
pNBU2	Bcteroides属	pUS116	Mycrobacterium属
pNICKclos1.0	Clostridium属	pHT01 series	Bacillus属
pdCASClos	Clostridium属	pBSG03 series	Bacillus属
pCBEclos-cbei2385-g2-opt	Clostridium属	pAD123 seies	Bacillus属
pWJ1	Clostridium属	pUWL201PW series	Streptomyces属
pNICKclos2.0	Clostridium属	pRMC2	Staphylococcus属
pMo130	Burkholderia属	pJUMP24-1A	Pseudomonas属
pAM-beta-1	Streptococaceae科	pMU131	Thermoanaerobacterium属
pIL series	Streptococaceae科	pMV762 series	Mycobacterium属
pTRK series	Streptococaceae科	pAL5000 series	Rhodococcus属
pIB serie	Streptococaceae科	pMB1 series	Rhodococcus属
pG1AK series	Geobacillus属	pJOE7706.1 series	Corynebacterium属
pL9X series	Streptomyces属		
pMycoFos	Mycobacterium属		
pSUM series	Mycobacterium属		
pMSP3545 series	Enterococcus属		



好熱性 *Clostridia* 綱細菌の
コロニーを獲得

過去プラスミドの発現例の
無い系統の株の獲得に
成功

技術の独創性、新規性・優位性

- 現在の微生物分離戦略は総当たり(→チカラワザ的)かつ菌種毎の「特殊解」的
→本研究はプラスミドの宿主特異性を使用するという「一般解」を与える

- HosPiS法はプラスミドの発現性を選択圧に微生物を釣り上げる技術
→分離成立時点で遺伝子改変可能
→HosPiS法は分離株の遺伝子改変可能性を試行錯誤する必要ない
→最初から遺伝子改変可能な株を環境中から獲得できる
→つまり本技法により拡張された「さわれる」は「いじれる」と同義

学術基盤

アスガルド古細菌群を含めた
高次未分類系統の分離・生理解明

従来

- ・膨大な試行錯誤が必要
→ *Lokiarchaeota* は分離に10余年

本研究の達成

「分離戦略すら立たない」未分離系統
に対し強力な一般解法を提供

培養工学的技術革新との併用で
すべての菌を可培養化

- ・生命進化史の理解を超加速化
- ・微生物生態系構成種の性質を網羅的に理解

微生物生態系の還元論的理解

分類学・生態学の学問的完成へ

産業的応用性

未分離放線菌の獲得による
抗菌・抗ウイルス物質資源の拡大

従来

- ・古典的培養法による分離株獲得
→ 生理活性物質生産性試験で選別

本研究を下敷きとする応用

- ・HoSPis法を抗生物質分離源となる
放線菌門の未培養細菌の分離に応用

新興・再興細菌性感染症に有効な
抗菌剤、抗ウイルス剤の探索源を拡大

- ・上記例に限らず微生物由来の潜在的
バイオリソースを最大限利用出来る時代

環境バイテク新時代へ！

顕在バイオリソースの最大化へ

実用化への壁

未培養系統の複製起点の予測

- ・現状としては既知の複製起点を利用した分離技法
 - ・未培養系統の分離への応用には**メタゲノム情報から分離対象菌種のプラスミド複製起点を高精度に予測する技術が必要**
- 実は現状でもある程度は可能
→高精度化が必要

企業との協働に期待すること

実装にあたってのターゲット選定

- ・環境微生物を分離するにあたって「誰を」標的とすることに商業的価値があるのか？
- ・前述の放線菌門細菌の分離は未だ商業的価値があるのか？
→抗生物質の探索はリスクが大きすぎる？
- ・メタゲノム情報内に存在するoriを高精度に予測する技術が欲しい。現状でもゲノムシーケンスからoriを予想できる。
→これをメタに拡張したい

本技術に関する知的財産権

発明の名称：希少微生物の選択的培養方法, 出願番号：特願2021-045341,
出願人：国立高等専門学校機構, 発明者：木村善一郎

お問い合わせ先：国立高等専門学校機構 本部事務局 研究推進課
TEL 03-4212-6832 e-mail KRA-contact@kosen-k.go.jp