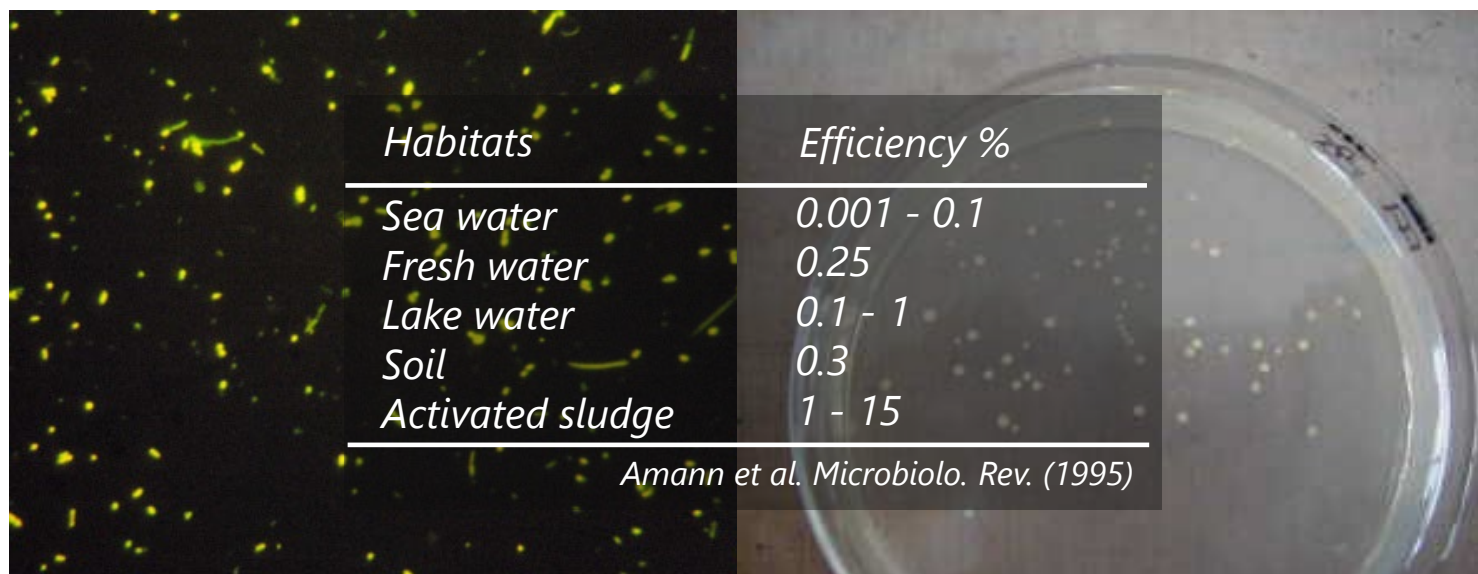


未培養微生物を資源化する革新的培養技術

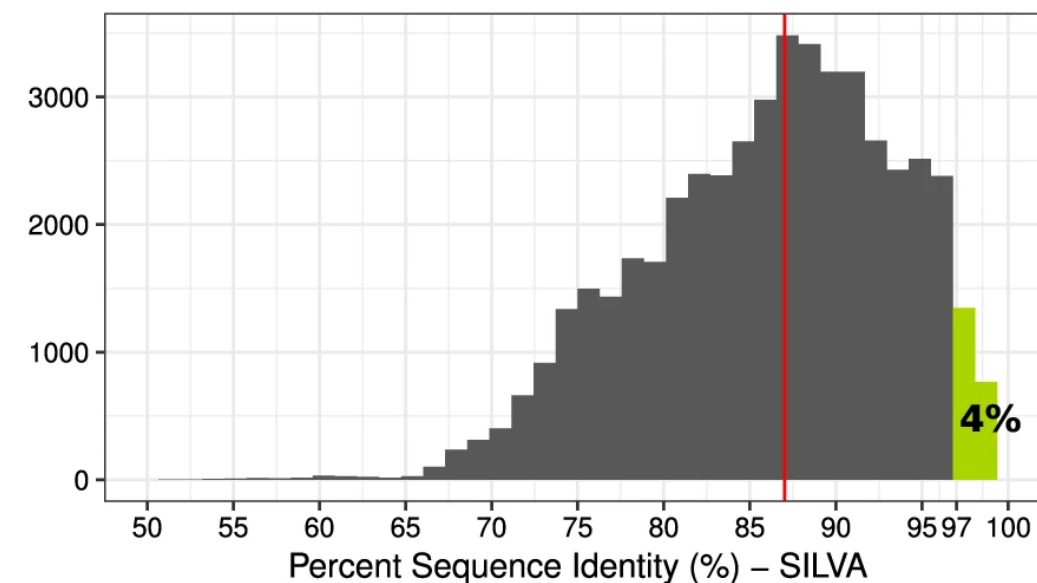
広島大学 大学院統合生命科学研究科
准教授 青井 議輝

2025年10月23日

ほとんどの微生物は未培養・培養困難



Karst et al. 2018 97% OTUs (Cross-environment, PCR-free, n=48,836)



植菌細胞数 >>>> コロニーの数

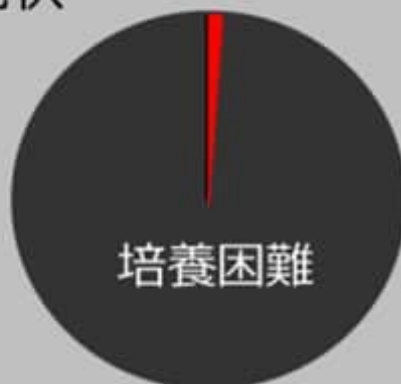
Great Plate Count Anomaly

Staley JT, Konopka A, Annu Rev Microbiol (1985)

Winterberg H. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten (1898)

1. Karst, S., Dueholm, M., McIlroy, S. et al. Retrieval of a million high-quality, full-length microbial 16S and 18S rRNA gene sequences without primer bias. *Nat Biotechnol* 36, 190–195 (2018).
2. Torsvik, V., J. Goksoyr, and F. L. Daae. 1990. High diversity of DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:782–787.

現状



機能未知・未利用

ほとんどの微生物は培養困難

わずか1%以下の培養可能な微生物から、これまでに人類が得てきた恩恵を考慮すると・・・

- ・革新的な分離培養戦略の提案
- ・培養できない理由の解明（未知増殖メカニズム）

効果



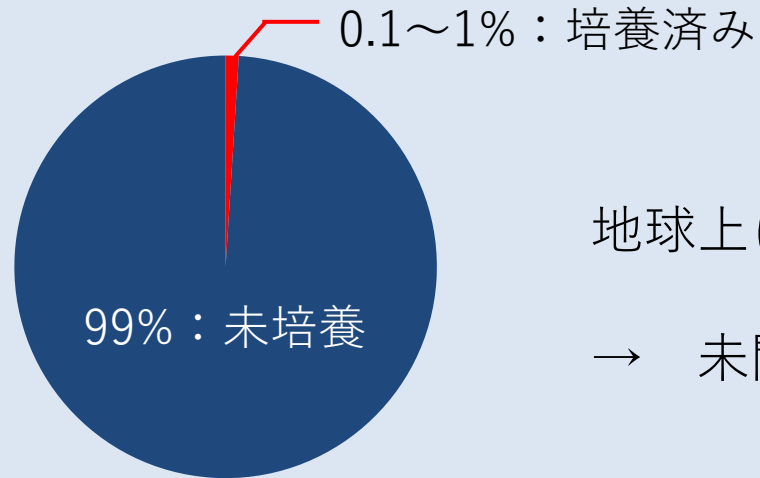
機能解明・利用拡大

- 次世代の分離培養手法として確立
- 分離培養可能な微生物の大幅拡大
- 環境中の微生物に対する新たな制御方法

▶▶ 産業および学術的な波及効果は極めて大きい

バイオ資源の再開拓（創薬・新規素材）、環境工学、健康科学、感染症予防・治療、食品科学、地球環境科

未培養微生物の資源化におけるボトルネック



地球上には膨大な種類の微生物が存在する、しかしその99%は未培養
→ 未開拓のバイオリソースが膨大に存在

未培養微生物からの資源開拓には2つの大きなボトルネックが存在

ボトルネック①

多くの微生物は培養困難（微生物学上の重要課題）

ボトルネック②

目的の活性を持つ微生物の割合は極めて低い

2つのボトルネックを同時に解消することは極めてチャレンジング

⇒ 実現できれば大きなブレークスルー

目的: GMD培養技術により、2つのボトルネックを同時に解消する

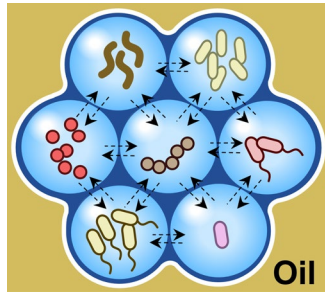
ボトルネック①

多くの微生物は培養困難（微生物学上の重要課題）

GMD凝集培養による可培養化

植菌数の50%の微生物を可培養化
(⇔寒天平板：1%未満)

多様な未培養系統群も培養可能



ボトルネック 1 の解消

ボトルネック②

目的の活性を持つ微生物の割合は極めて低い

GMD凝集培養： 10^8 スケールの独立した培養系



GMD凝集培養で可培養化した微生物を
全てスクリーニングに供試できないか？

ボトルネック 2 の解消

難培養微生物の可培養化

ドロップレット技術を活用した新規分離培養手法の開発

— GMD凝集培養（微生物間相互作用を促進）

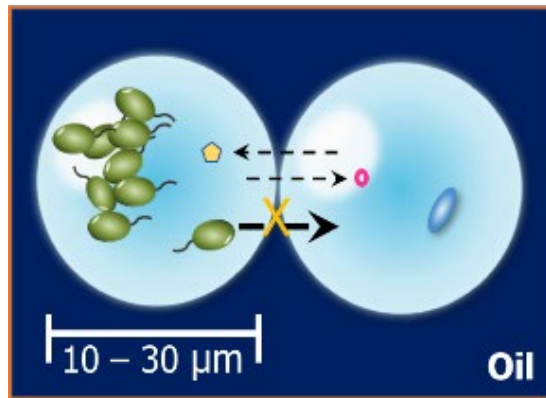
難培養微生物の資源化

ドロップレット技術を活用した新規スクリーニング手法の開発

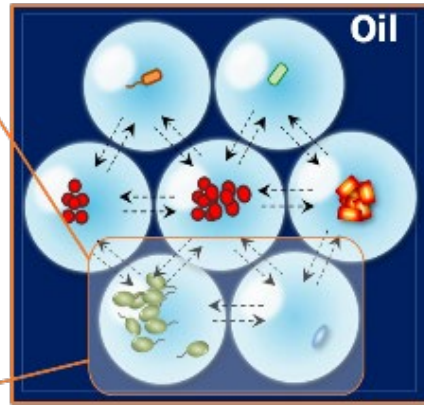
— 難培養微生物の可培養化と機能・活性ベースのスクリーニングを同時に実現

ゲル微粒子(GMD)の凝集培養を用いた未培養・難培養微生物の可培養化

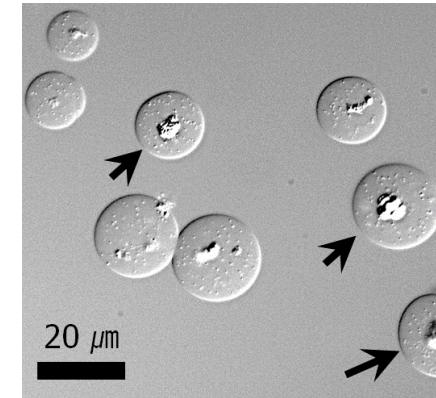
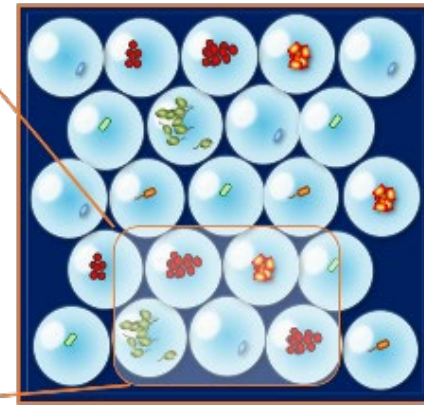
1GMDに1細胞の微生物が
含まれるように調整



オイル内で凝集



攪拌しながら培養



- 1つのゲル微粒子の中に1細胞ずつ封入
- 油相中でGMDが凝集 ⇒ 高い植菌密度 ($> 10^7 \text{ cell / mL}$) を実現

超高菌体密度：従来法の1万倍以上 (10^8 cell/mL)の植菌密度

1. 水溶性物質は自由に拡散移動 ⇒ 微生物間相互作用(共生/休眠からの覚醒)の促進
2. 微生物細胞はGMD間を移動しない ⇒ 純粋培養系の維持が可能

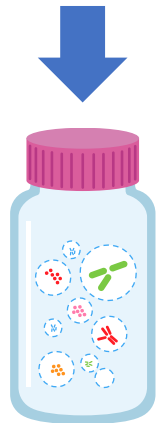
特許第6785465号

Seo and Suzuki et al., submitted

GMD凝集培養の手順

1. GMDへの植菌

Soil sample

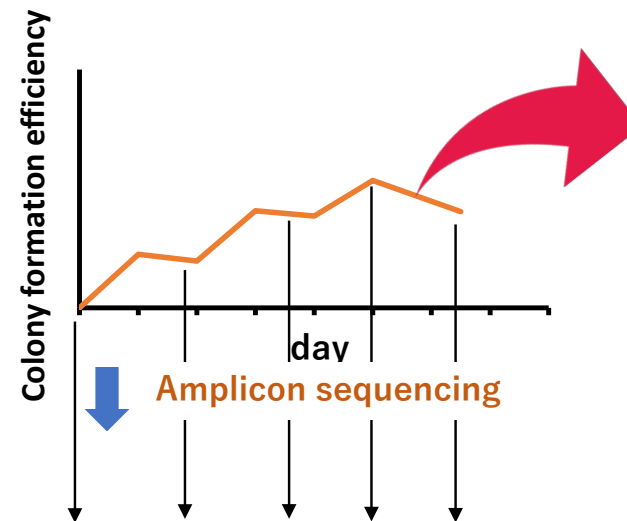


GMD aggregate cultivation

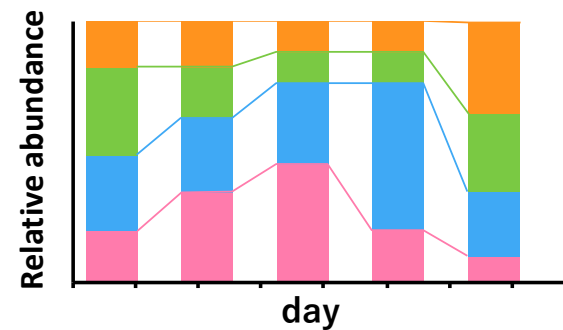
Medium : 10%R2A

2. GMD 凝集培養

2.1 増殖の追跡（可培養化率の測定）

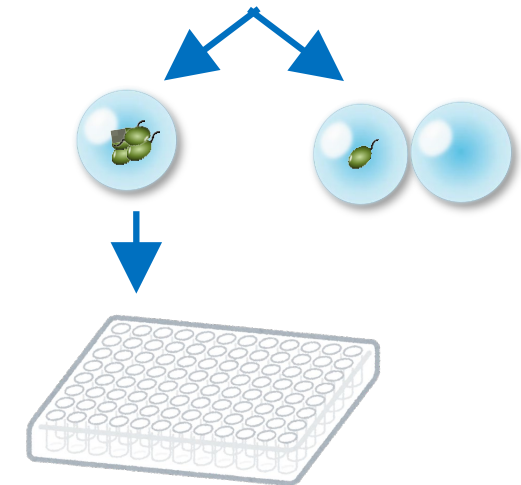


2.2 菌叢解析（増殖した微生物種の同定）

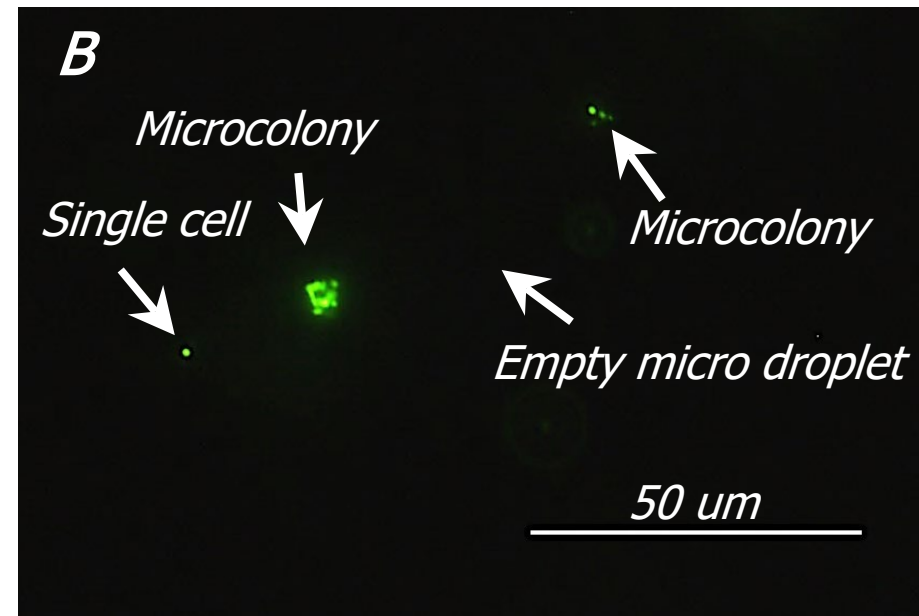
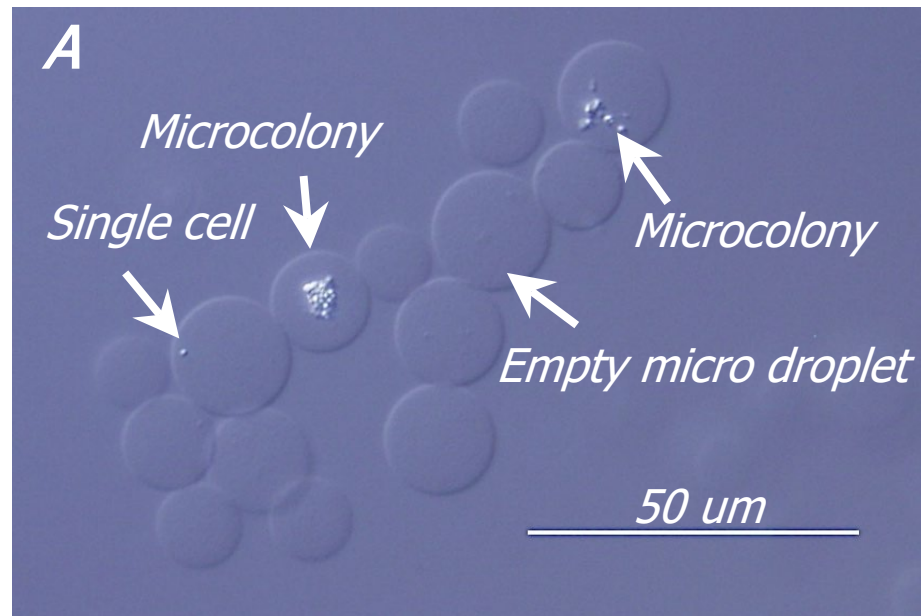


3. 二次培養

セルソーター
or
Droplet selector

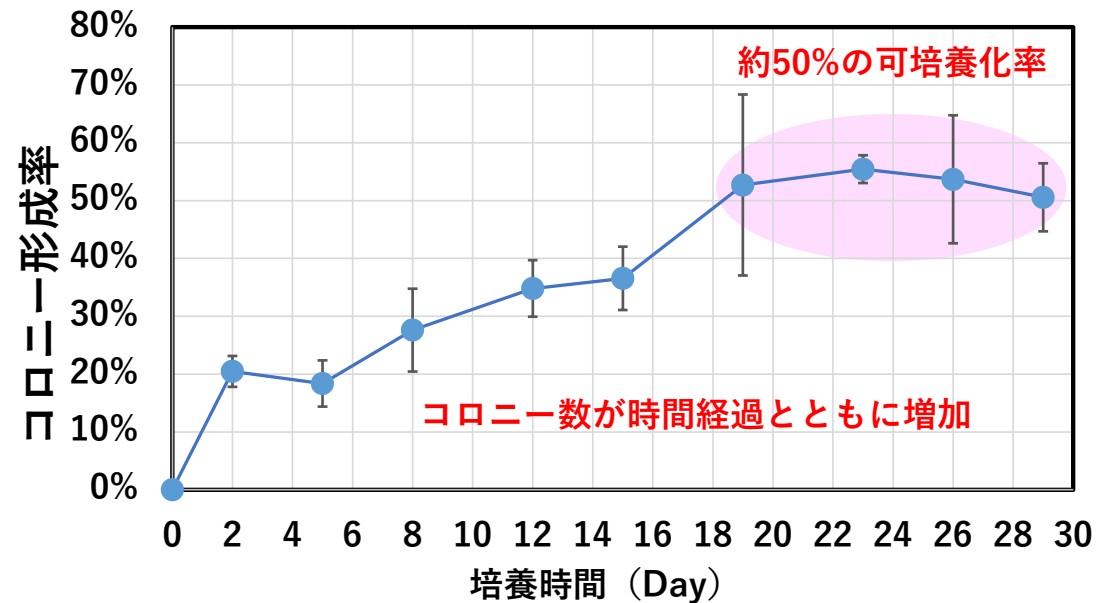


A Micro-colony in GMDs

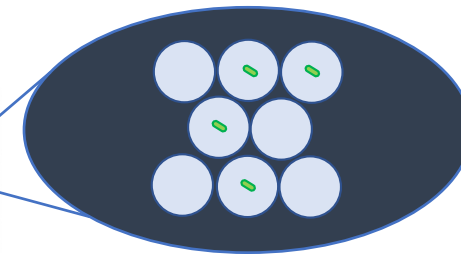


GMD培養中における増殖の追跡: 可培養化率 (Cultivability)

植菌した微生物（土壌微生物）のうち増殖した微生物の割合

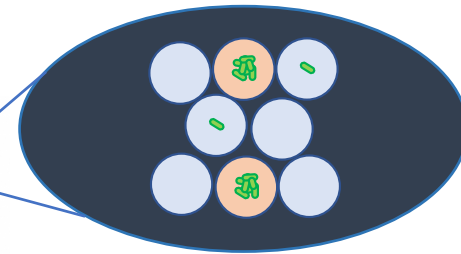


培養開始時



0-1細胞/GMD

一定期間後



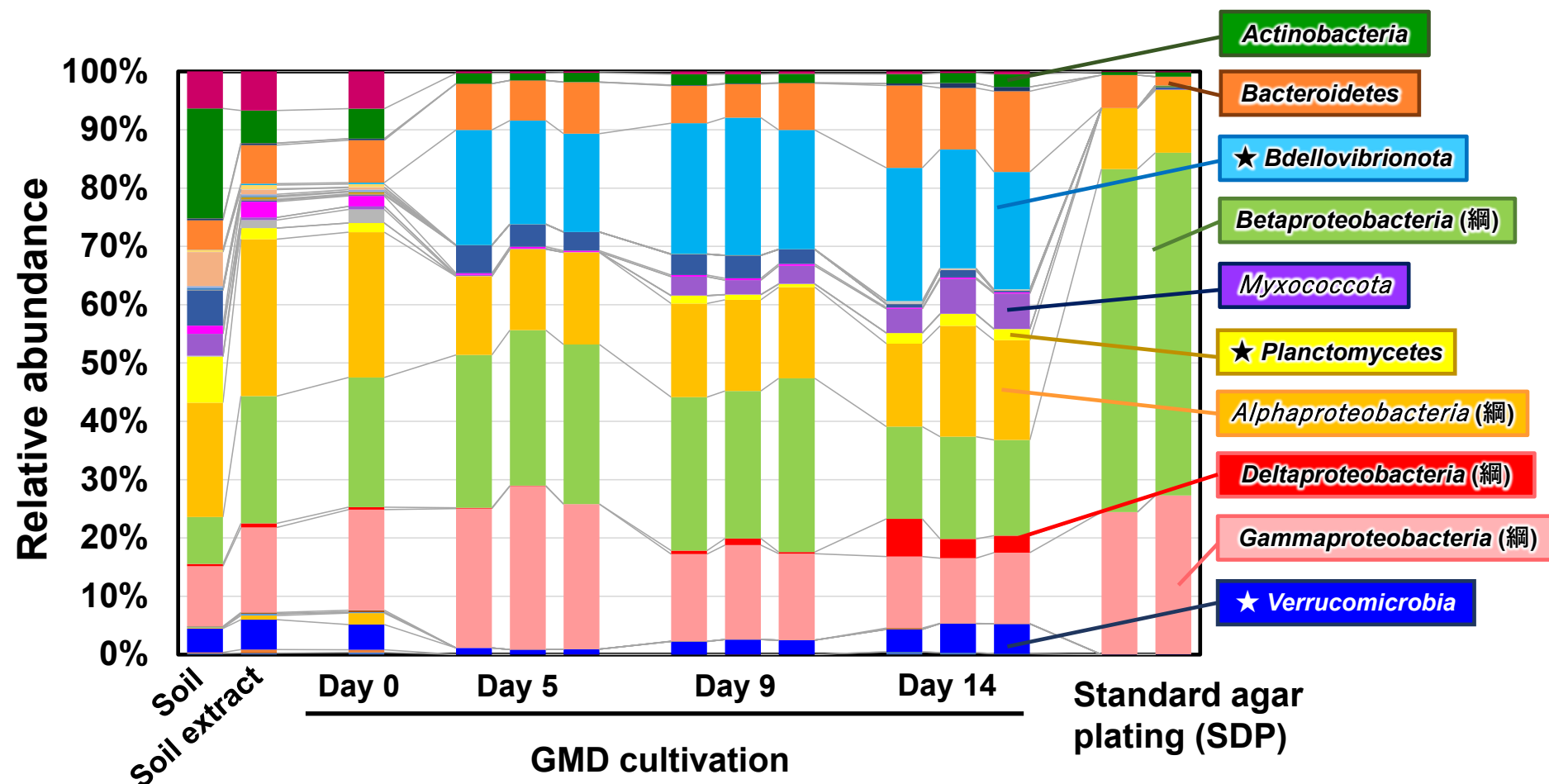
コロニー形成率
 $2/4 = 50\%$

50%以上の微生物が増殖！！：従来の常識（1%未満）を大きく覆す成果

比較系 1：標準寒天培養法 コロニー形成率: 0.5-2%（培養期間 1 ヶ月）

比較系 2：GMD分散培養 コロニー形成率: 1%-2%（培養期間 1 ヶ月）

GMD培養の期間中どのようなタイプが増殖しているのか？

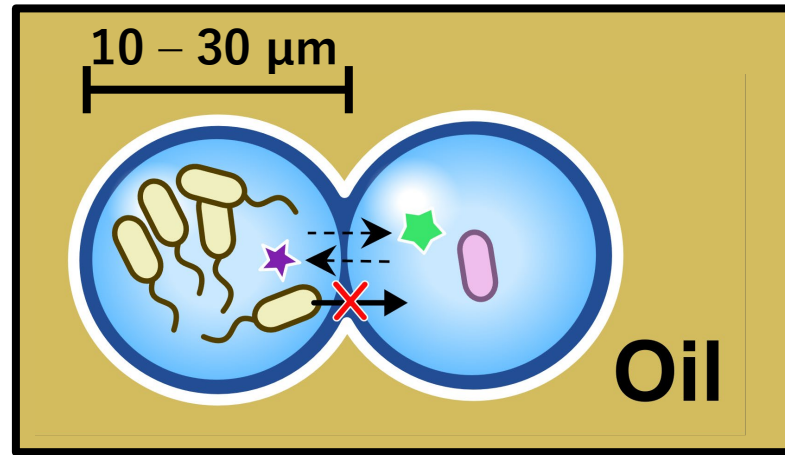


未培養・難培養で知られる系統群が多く増殖している

元の菌叢の約40%のOTUが可培養化

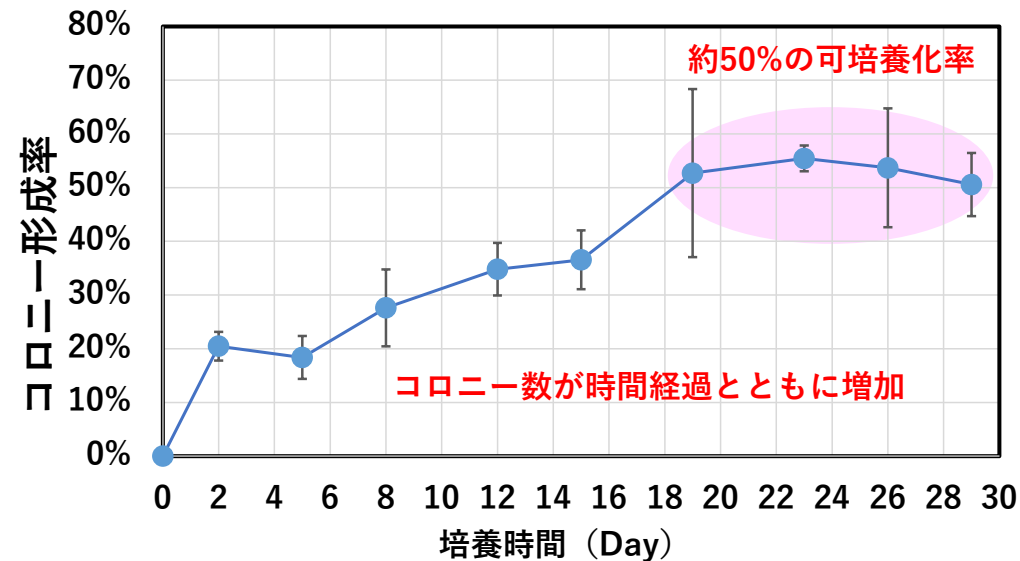
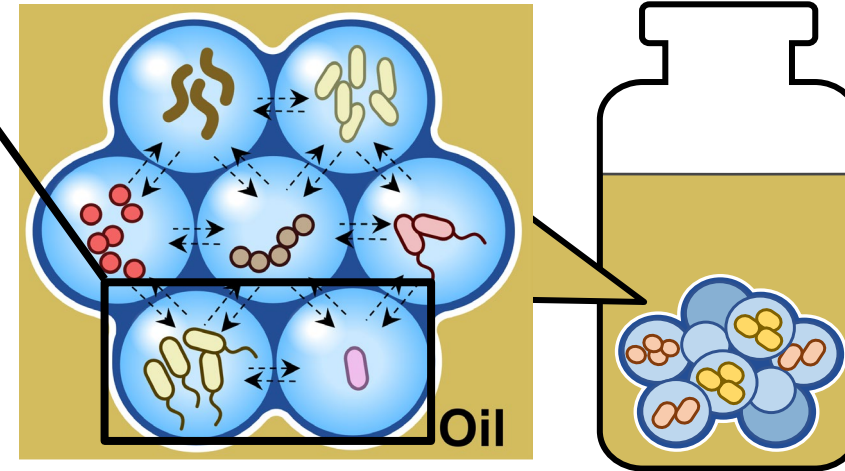
まとめ：GMD凝集培養（微生物間相互作用を促進）の培養性能

微生物を1細胞ずつGMDに植菌
(GMD：直径10 – 30 μm のゲル粒子)



オイル内でGMDを凝集

オイル内で
攪拌しながら培養



細胞数あたり**50%以上**の微生物が増殖！！

元の菌叢の約**40%のOTU**が可培養化

一旦、可培養化されると、**単独で増殖可能な**微生物の割合も高い（50%程度）

GMD培養技術により、2つのボトルネックを同時に解消する

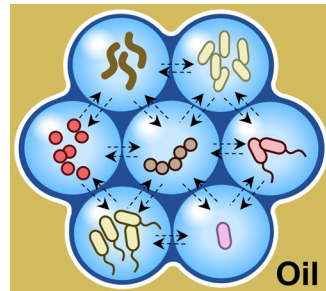
ボトルネック①

多くの微生物は培養困難（微生物学上の重要課題）

GMD凝集培養による可培養化

植菌数の50%の微生物を可培養化
(⇔寒天平板：1%未満)

多様な未培養系統群も培養可能



ボトルネック 1 は解消

ボトルネック②

目的の活性を持つ微生物の割合は極めて低い

GMD凝集培養： 10^8 スケールの独立した培養系



GMD凝集培養で可培養化した微生物を
全てスクリーニングに供試できないか？

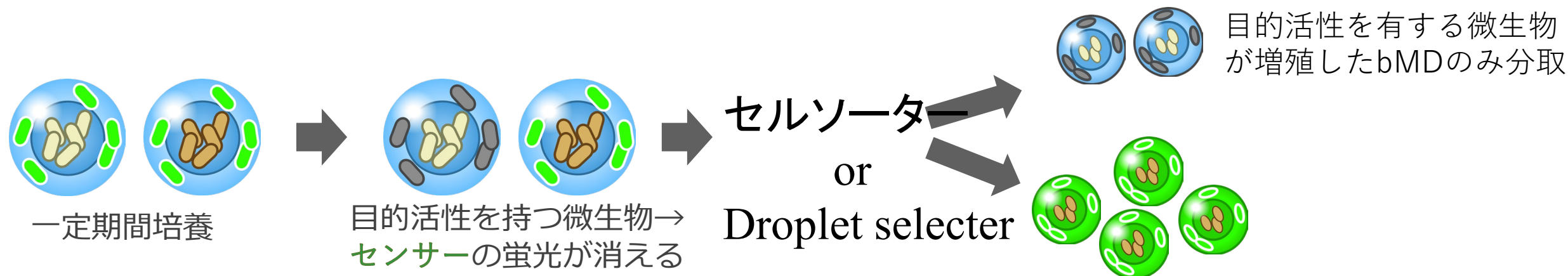
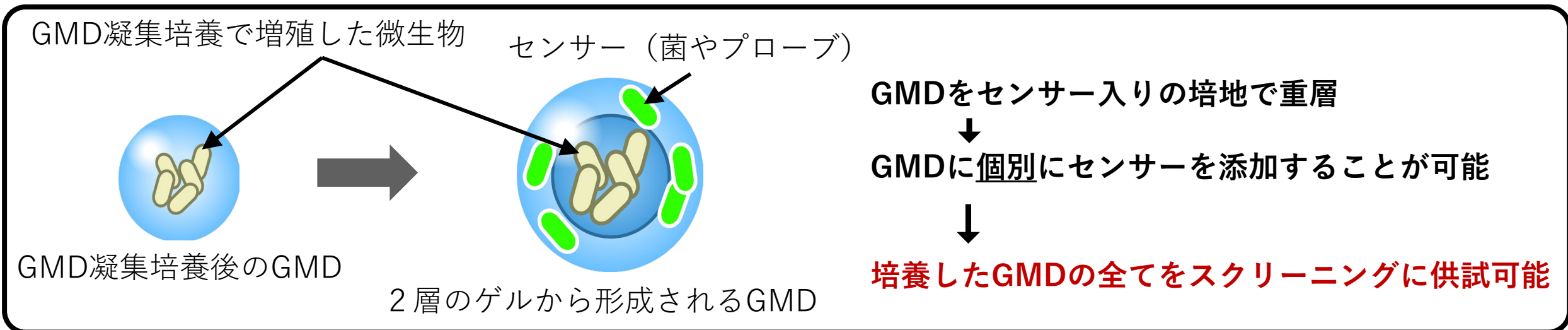
ボトルネック 2 を解消

10⁸個のGMD全てを供試可能な超ハイスループットスクリーニング手法の開発

革新的なハイスループットスクリーニング手法の開発

目的： 10^8 個のGMD全てを供試可能な超ハイスループットスクリーニング手法の開発

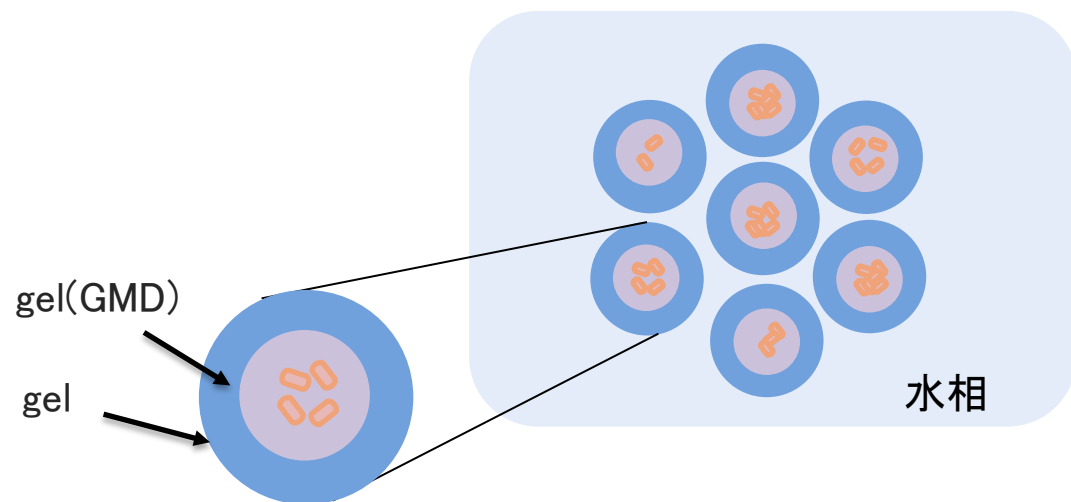
Multi-layered-Micro-Droplet (mMD)



特願2023-139257 (PCT/JP2024/010423)

2種類のmMD (bGMDとGMD in WODL)

bGMD (bilayer Gel Micro droplet)



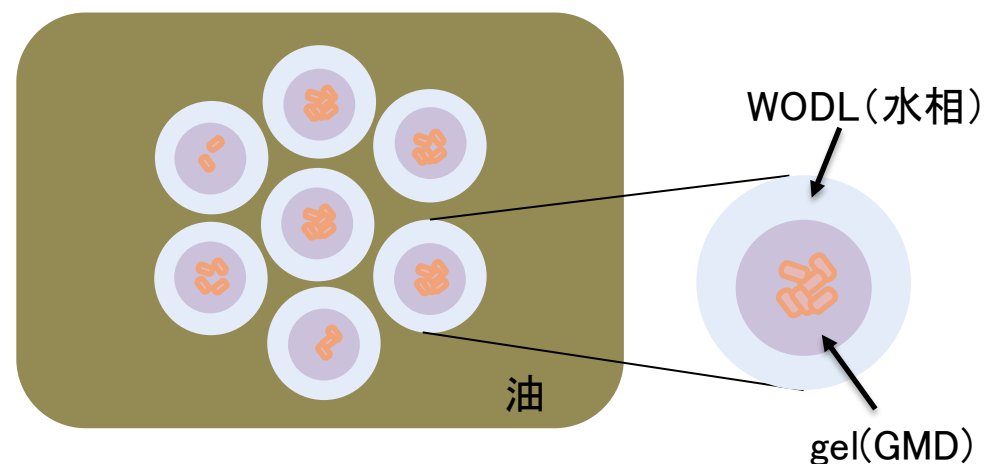
ドロップレットが**水相**に懸濁されている



既存のセルソーターを**利用可能**

ドロップレット内に**水溶性の低分子化合物**を保持**困難**

GMD in WODL (Water in oil droplet)



ドロップレットが**油**に懸濁されている



既存のセルソーターを**利用不可能**

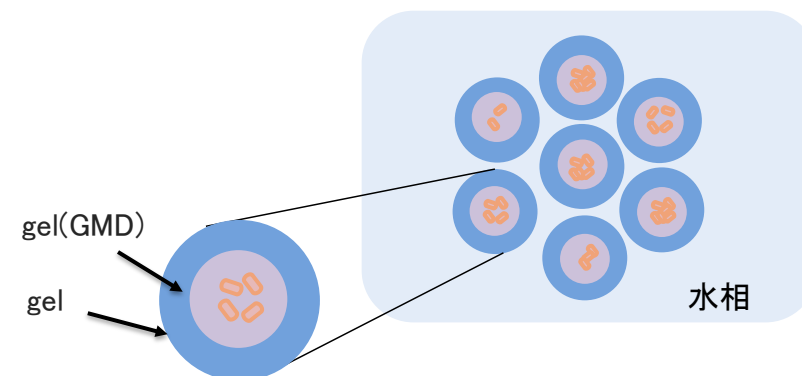
ドロップレット内に**水溶性の低分子化合物**を保持**可能**

1. 抗菌活性を指標とした検証

抗菌活性を有する微生物のスクリーニング

- ・モデル微生物を用いた検証
- ・環境微生物からのスクリーニング

bGMD (bilayer Gel Micro droplet)

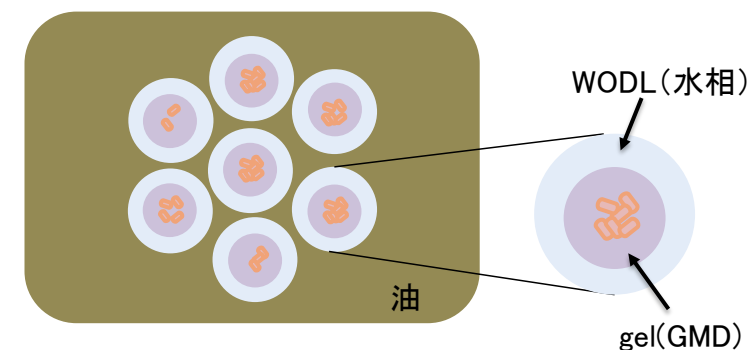


2. 酵素活性を指標とした検証

特定の活性を有する微生物のスクリーニング

- ・モデル微生物を用いた検証
- ・環境微生物からのスクリーニング

GMD in WODL (Water in oil droplet)



PoC: 抗菌物質生産菌をターゲットにしたスクリーニング系の構築

モデル系を用いた検証

抗菌物質生産菌 : *Lactobacillus paracasei* ⇒ バクテリオシンの産生)

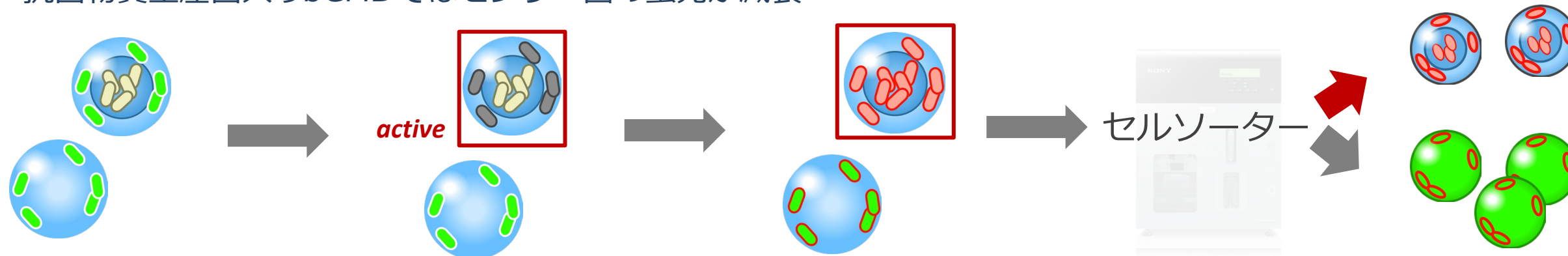
センサー菌 : *GFP E.coli* ⇒ 抗菌物生産菌によって蛍光強度減少)



② 一定期間培養⇒全菌染色

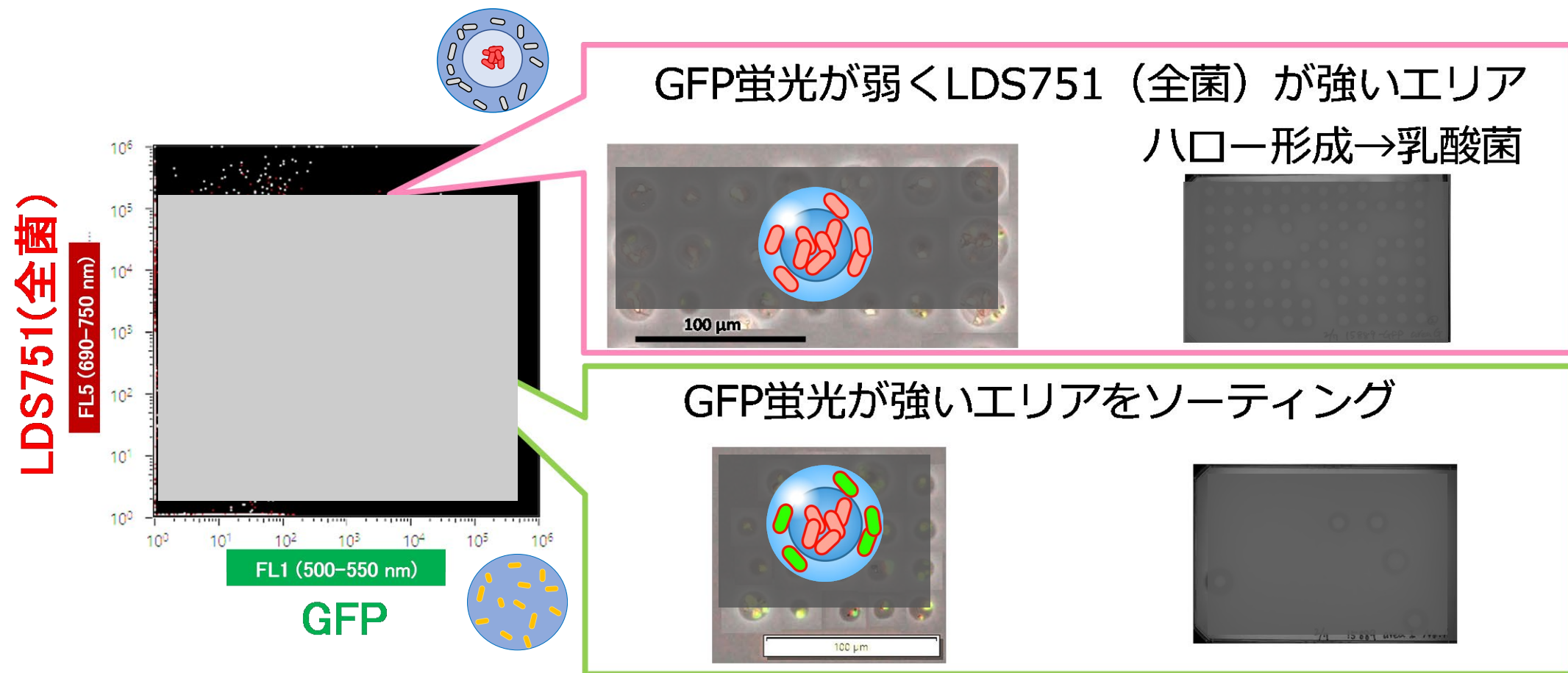
抗菌物質生産菌入りbGMDではセンサー菌の蛍光が減衰

③ センサー蛍光が減衰したbGMDを分取



Proof of Concept : モデル系を用いた実証試験 結果

1. 抗菌物質生産菌をターゲットにしたスクリーニング系の構築 : bGMD (G/G/oil)



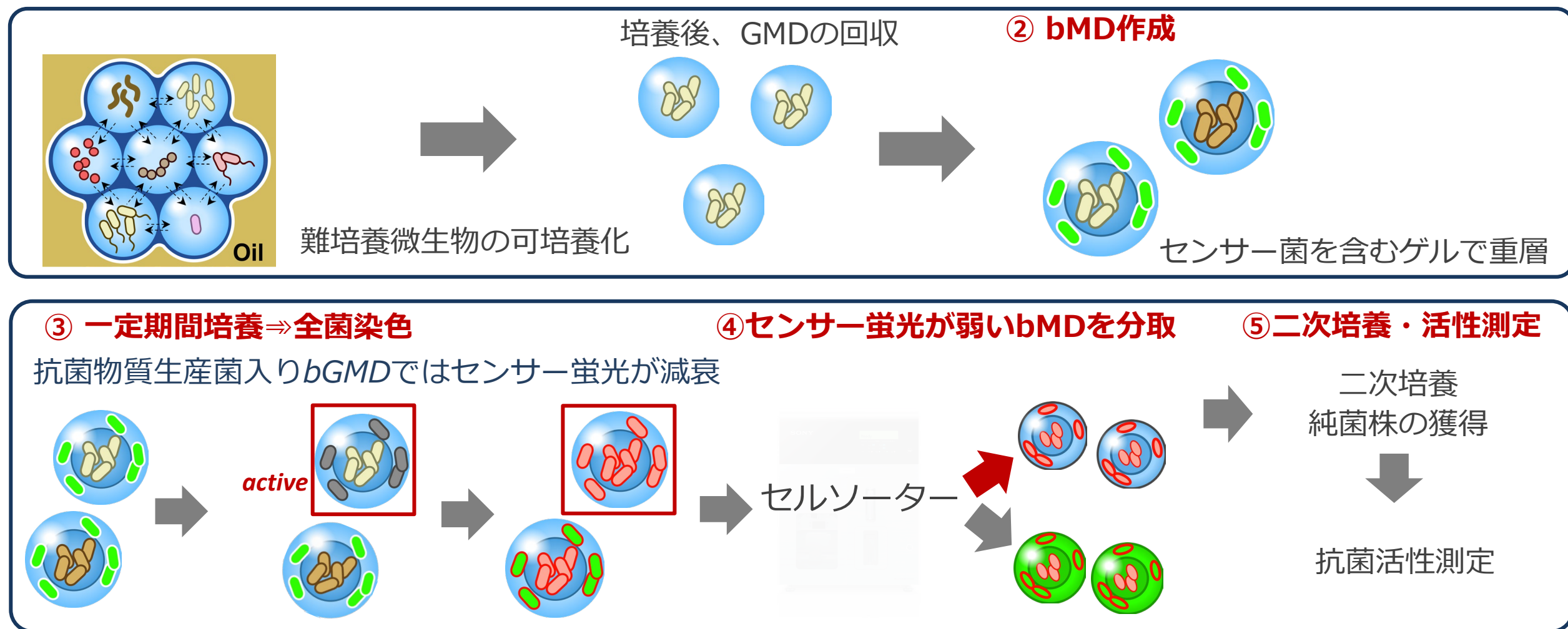
抗菌物質生産菌 (*L.paracasei*)が含まれているGMDを選択的に分取することに成功

抗菌活性を指標としたスクリーニング系の構築に成功

環境微生物からの抗菌活性スクリーニング

モデル系を用いた検証

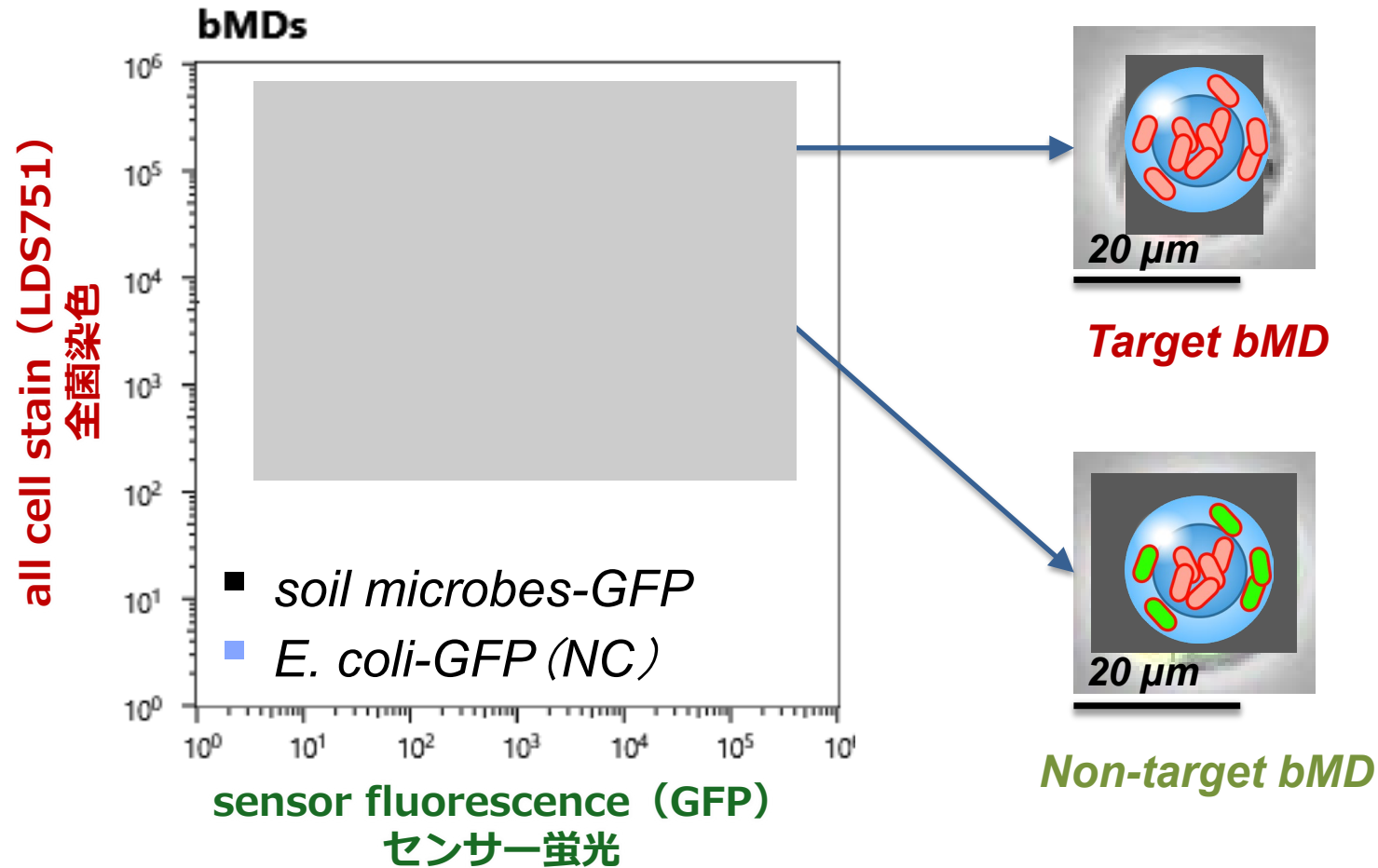
抗菌物質生産菌 : *Lactobacillus paracasei* ⇒ バクテリオシンの産生)
センサー菌 : *GFP E.coli* ⇒ 抗菌物生産菌によって蛍光強度減少)



環境微生物からの抗菌活性スクリーニング

Target bMD : 抗菌活性 \Rightarrow センサー菌死滅 \Rightarrow センサー (GFP) 蛍光減

Non-target bMD : bMDすべて



抗菌活性を示すbMDを選別

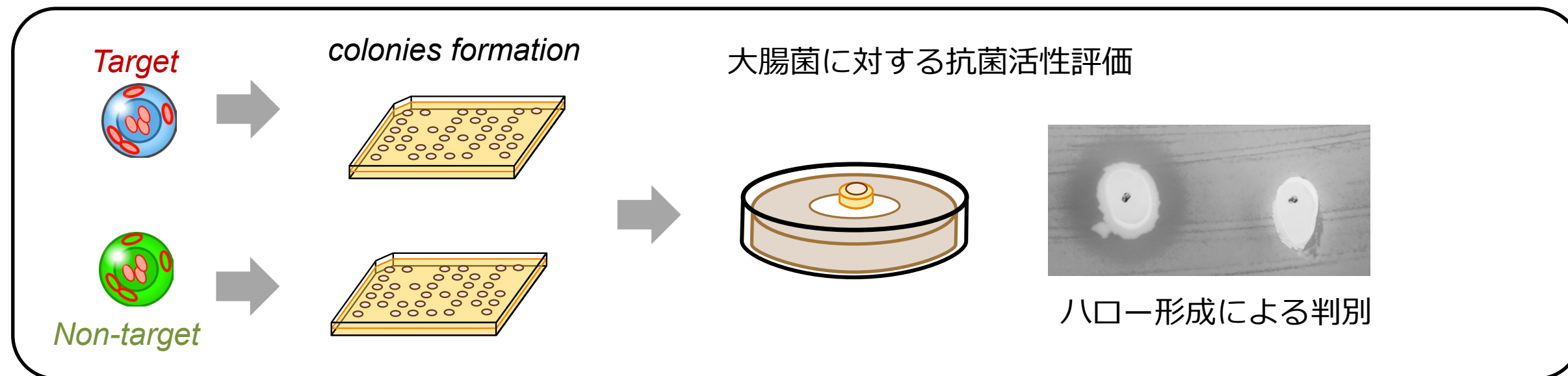


二次培養
純菌株の獲得



抗菌活性測定

環境微生物からの抗菌活性スクリーニング

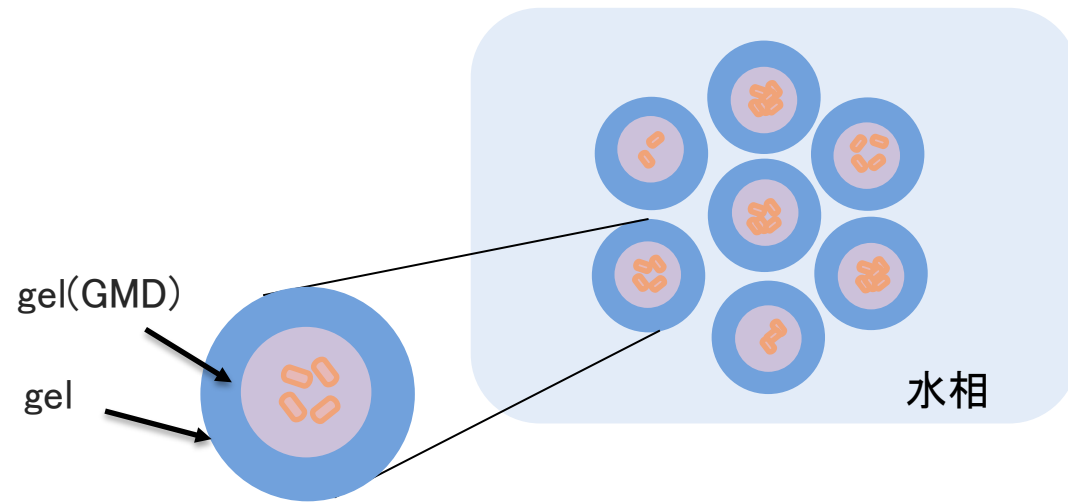


抗菌活性を示したbMDの割合 Targetが優位に高い

複数の菌株を分離株として獲得

2種類のmMD (bGMDとGMD in WODL)

bGMD (bilayer Gel Micro droplet)



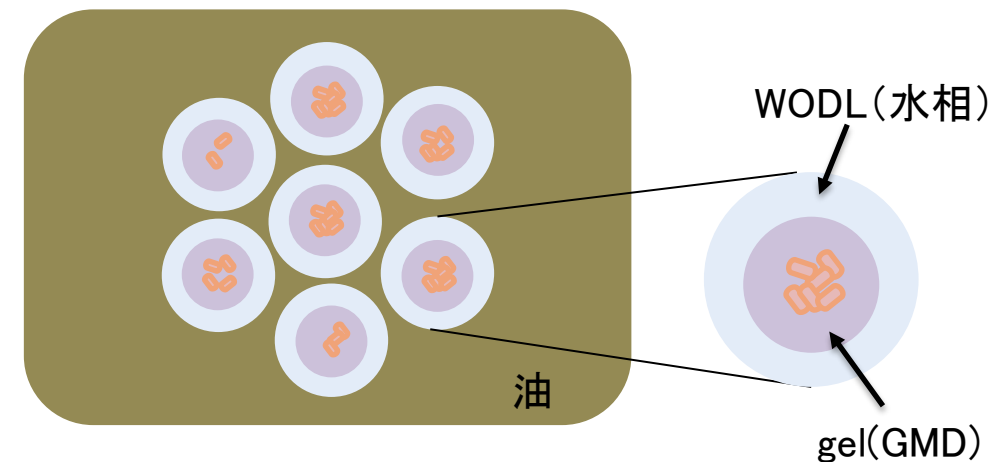
ドロップレットが**水相**に懸濁されている



既存のセルソーターを**利用可能**

ドロップレット内に**水溶性の低分子化合物**を保持**困難**

GMD in WODL (Water in oil droplet)



ドロップレットが**油**に懸濁されている



既存のセルソーターを**利用不可能**

ドロップレット内に**水溶性の低分子化合物**を保持**可能**

PoC: 酵素活性（セルラーゼ活性）を指標としたスクリーニング系の構築

モデル系を用いた検証

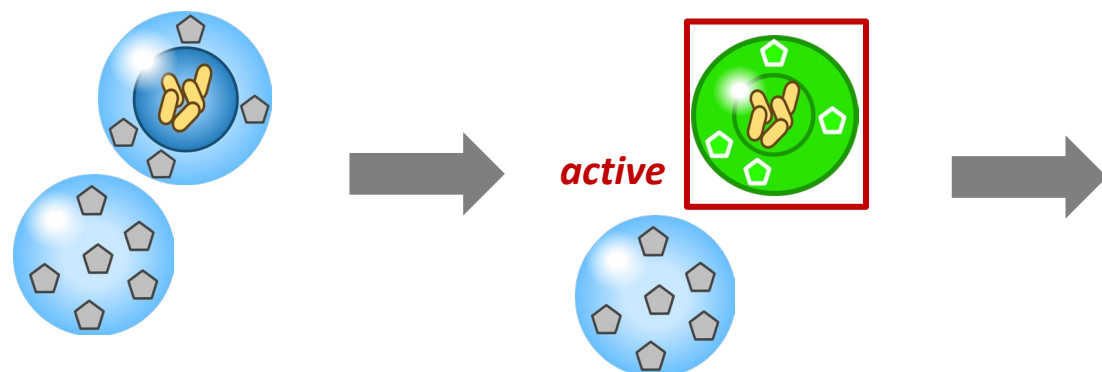
セルラーゼ産生菌： *Cellulomonas sp.*

センサー： 蛍光基質（FCB）⇒ セルラーゼ活性によって蛍光



② 一定期間培養⇒全菌染色

セルラーゼ産生菌入りbGMDではセンサー蛍光増強

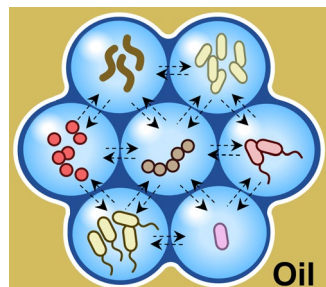


③ センサー蛍光が増強したbGMDを分取



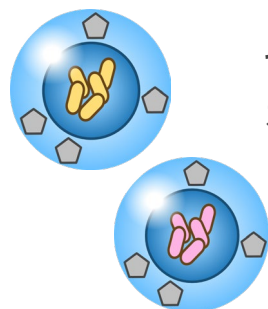
PoC: 酵素活性（セルラーゼ活性）を指標としたスクリーニング系の構築

① GMD凝集培養



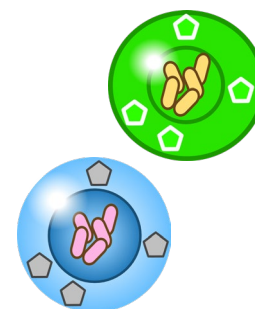
環境微生物
の可培養化

② bMD作成



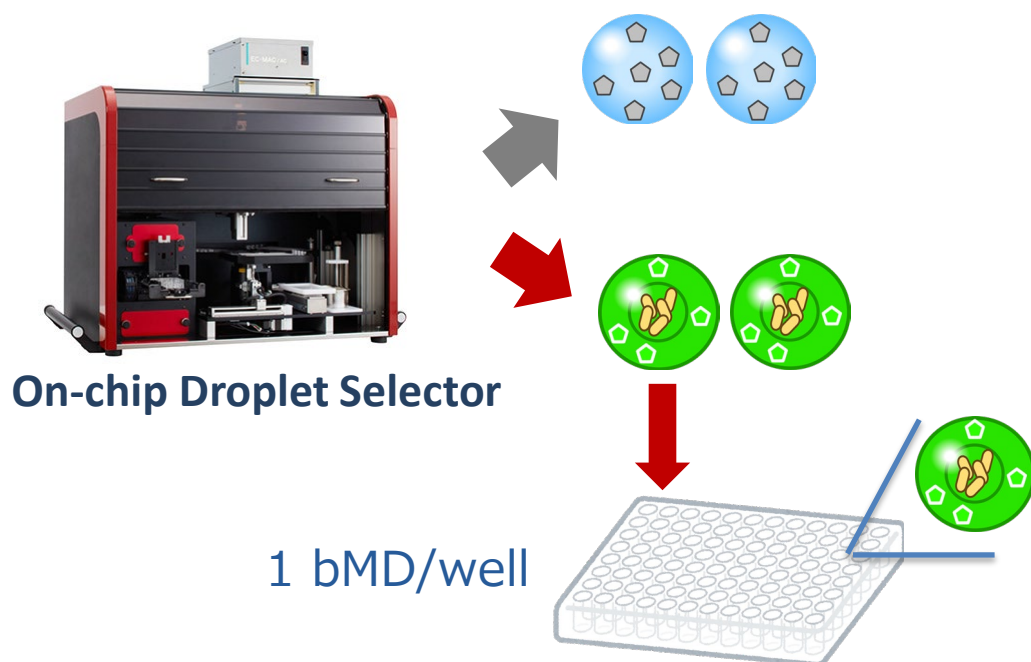
センサー（蛍光基質）
を含むゲルで重層

③ インキュベーション

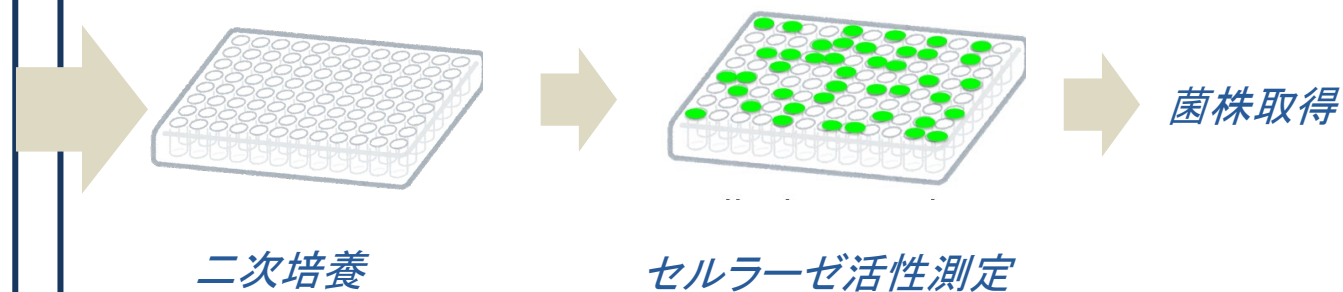


セルラーゼ活性を有する
bMDは緑色蛍光を呈する

④ セルラーゼ活性を有するbMDを分取

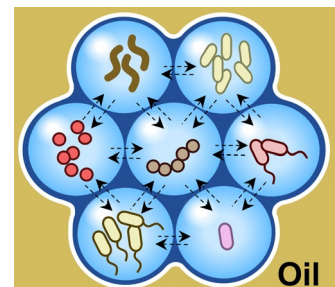


⑤ 二次培養・セルラーゼ活性測定



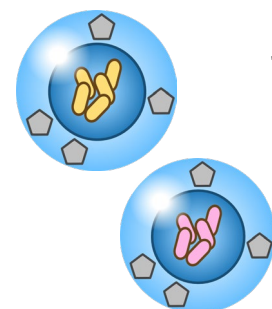
環境微生物の可培養化と酵素活性（セルラーゼ活性）の検出

① GMD凝集培養



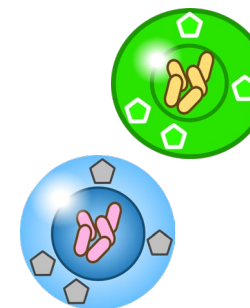
環境微生物
の可培養化

② bMD作成

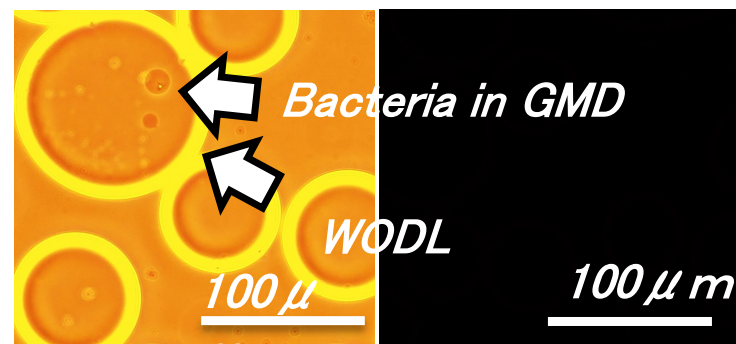


センサー（蛍光基質）
を含むゲルで重層

③ インキュベーション



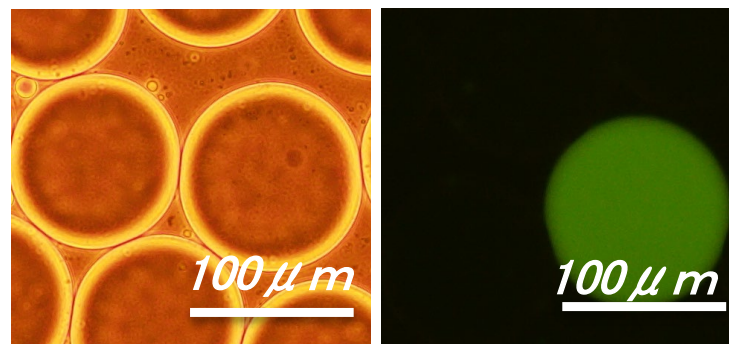
0 hours



0 %

蛍光をもつbMDの割合

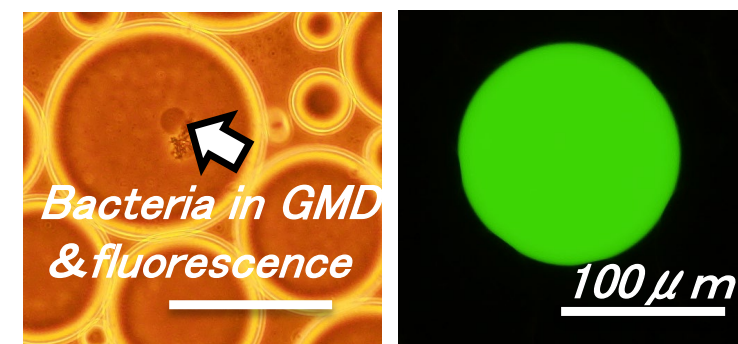
24 hours



1.2 %

蛍光をもつbMDの割合

48 hours

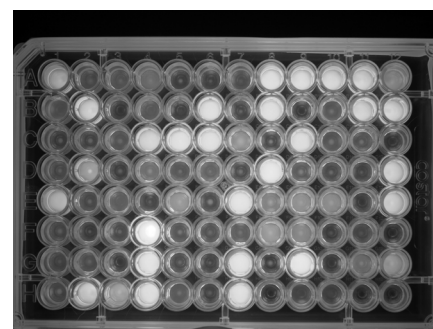
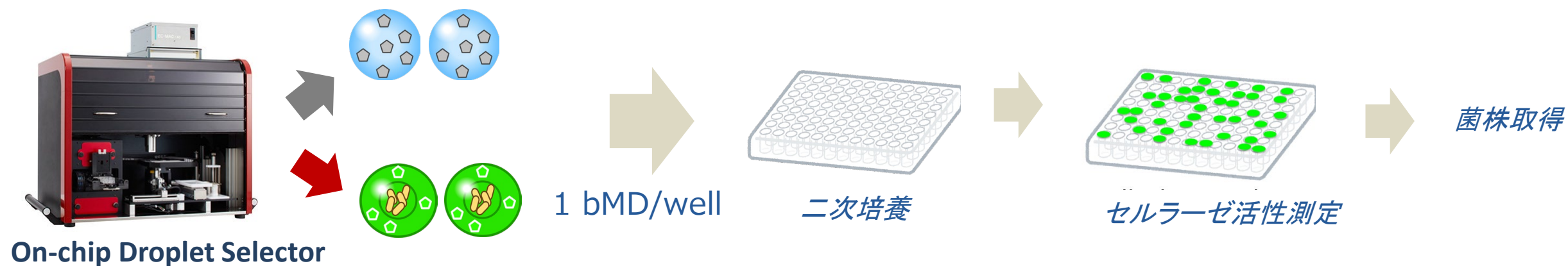


1.62%

蛍光をもつbMDの割合

セルラーゼ活性を持つと思われる微生物が封入されたWODLで蛍光検出確認

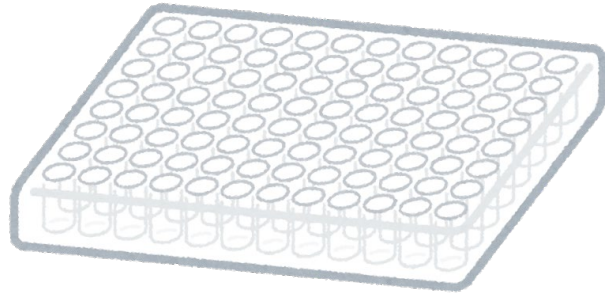
環境微生物の可培養化と酵素活性（セルラーゼ活性）の検出



多様な分離株を取得

GMD凝集培養 → 環境微生物の可培養化 → 機能スクリーニング → 分離株の取得

従来法

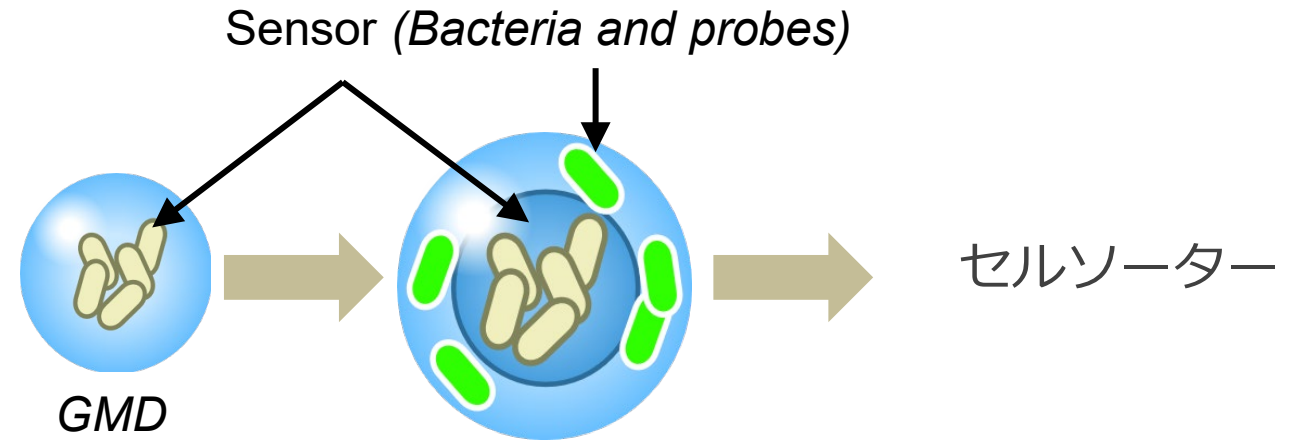


マルチウェルプレート

- 手作業でピペッティング
- スクリーニング数に限り

サンプルサイズ： $\sim 10^3$
期間：数か月
人数：2-3人

新規手法



BMD スクリーニング

- GMDをセンサー入りの培地で重層
- 培養したGMDの全てをスクリーニングに供試可能

サンプルサイズ： $\sim 10^8$
期間：数日
人数：1人



結論と展望

従来大きな課題を解決：

課題 1：ほとんどの微生物は培養困難



50%程度の微生物を可培養化

GMD凝集培養（微生物間相互作用の促進）

課題 2：目的活性を有する微生物の割合は少ない

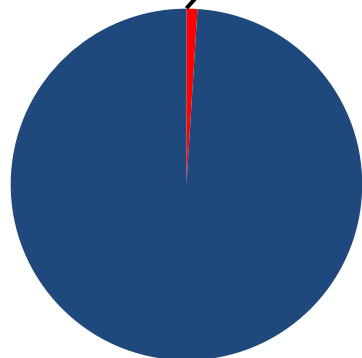


超ハイスループットスクリーニング可能

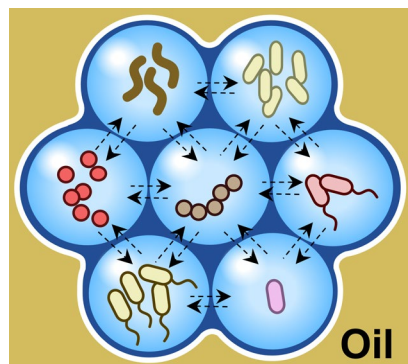
ドロップレット培養（増殖）と機能スクリーニングを逐次的に実施可能

ほとんどが未培養

従来法で培養可能

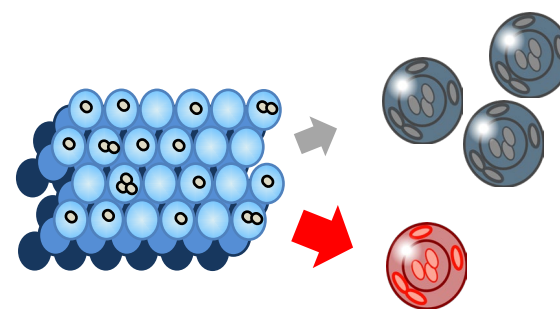


GMD凝集培養



未培養微生物を可培養化

機能スクリーニング



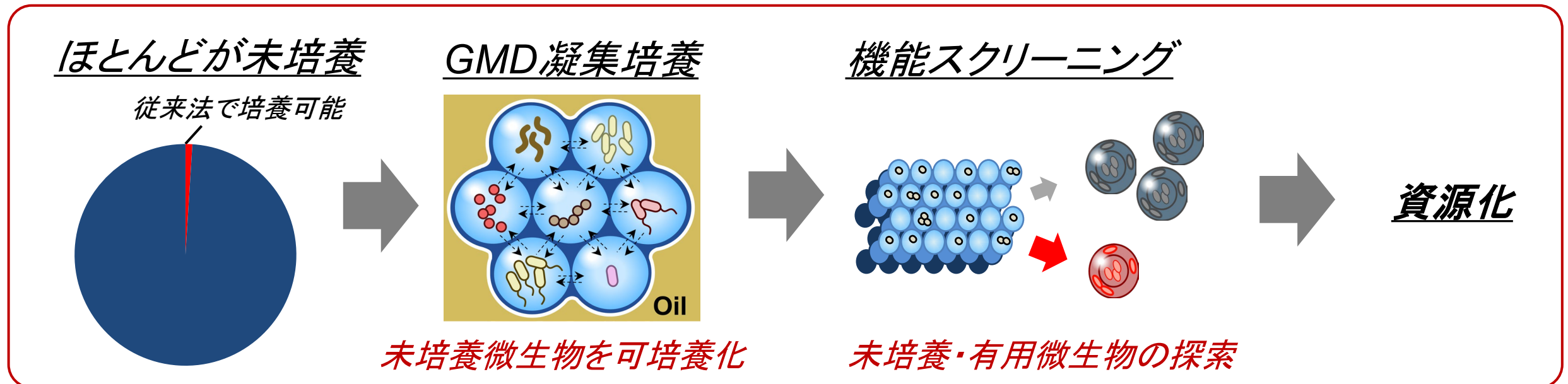
未培養・有用微生物の探索

資源化

結論と展望

実用化に向けた今後の課題

- 1) 目的の機能を有する新規微生物を獲得する
- 2) 多様な機能を検出可能なスクリーニング系の構築
- 3) 実用的なターゲットで方法論の有効性を実証する

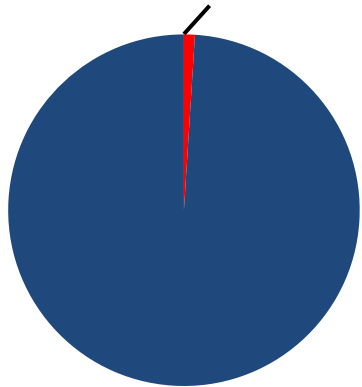


結論と展望

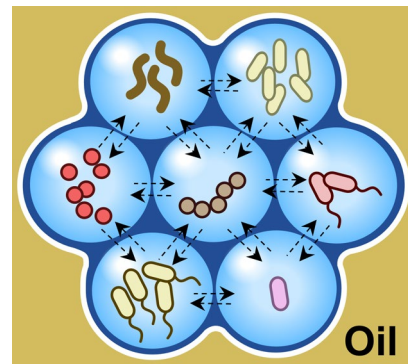
- ・ 難培養微生物を可培養化（従来アクセスできなかった微生物を利用可能）
- ・ 超ハイスループット（ 10^8 株を短時間で機能評価することが可能）
- ・ 多様な機能（抗菌、酵素活性など）を指標とした探索に適用可能
- ・ 環境微生物、変異株ライブラリーなど、様々な生物種に適用可能

ほとんどが未培養

従来法で培養可能

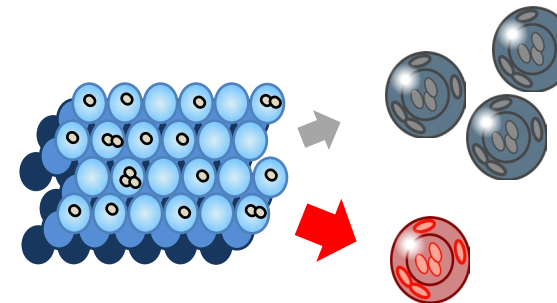


GMD凝集培養



未培養微生物を可培養化

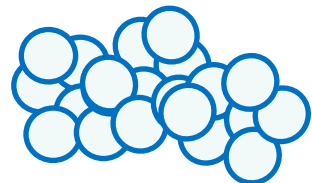
機能スクリーニング



未培養・有用微生物の探索

資源化

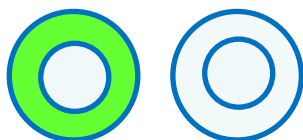
Droplet technologiesをベース
にした新規培養法



Cultivation of Uncultivated

従来法 1 % 未満 → 50 % 以上の微生物を可培養化
未培養系統群の可培養化

ハイスループットスクリーニング (Bilayer MD technology)

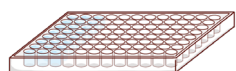
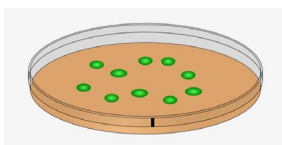


抗 × × 活性

新規酵素活性

有用物質
生産活性

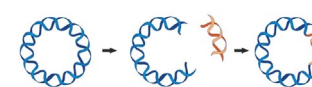
分離株の獲得 → 目的物質の生産



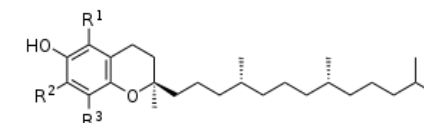
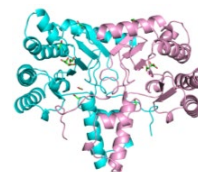
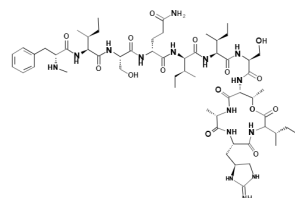
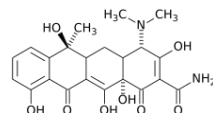
ゲノム情報の取得 → 目的物質の異種発現



BIOLOGICAL DATA



活性分子の取得



本技術の創出に寄与した外部資金

科研費

- ・ 基盤研究（B） 25K01934
- ・ 新学術領域研究（研究領域提案型） 22H04887
- ・ 新学術領域研究（研究領域提案型） 20H05587
- ・ 基盤研究（B） 19H02873
- ・ 若手研究（A） 26709063

NEDO

NEDO カーボンリサイクル実現を加速するバイオ由来製品生産技術の開発

財団

内藤記念科学振興財団 研究助成

シオノギ感染症研究振興財団 研究助成

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 微生物の分離培養方法及び凝集体含有溶液
 - 出願番号 : 特願2015-196882 (特許第6785465)
 - 出願人 : 広島大学
 - 発明者 : 青井 議輝、高木雄貴、大橋 晶良
-
- 発明の名称 : スクリーニング方法および溶液
 - 出願番号 : 特願2023-139257 (PCT/JP2024/010423)
 - 出願人 : 広島大学
 - 発明者 : 青井議輝、下村有美、新山海

お問い合わせ先

広島大学

産学連携部 産学連携部門

T E L : 082-424-4302

e-mail : techrd@hiroshima-u.ac.jp