

複合微生物系の解析と制御

九州大学大学院 農学研究院 生命機能科学部門
分子微生物学・バイオマス資源化学講座 土壌微生物学研究室 教授 酒井 謙二



環境中には極めて多様な微生物が棲息し、「分解者」として生態系における物質循環の輪をつなげている。有機化合物の無機化のみならず、窒素、イオウや重金属の酸化還元にも多くの微生物が関与している。微生物は動・植物とは異なる生理・代謝系を持つものが多く、自然界にもともと存在しなかった合成有機物や、芳香族、含塩素化合物なども加水分解、酸化還元、脱離など多彩な酵素系によって分解する。これまでに分離された微生物の特徴的な化学物質の代謝系についての情報がBiocatalysis/Biodegradation Databaseに集約され公開されている (<http://umbbd.ethz.ch>)。一方、自然生態系における物質変換系と同様、有機性廃棄物、都市下水、浄化槽、食品工場や化学工場排水処理有機肥料資材製造など多くの実プロセスは単一菌ではなく、「複合微生物系」によって稼働している。そこでは、微生物が相互に協調、競合、依存をし合いながら物質の分解/変換に関与していると考えられている。しかしながら、以下に述べるように、これら複合微生物系の分析は難しく、現実にはプラントにおける運転管理では微生物系はブラックボックスとして扱われ、化合物、物理化学的

数値とそこから少しずつ見え隠れする既知の微生物情報との相関をつけながらおこなわれてきた(表1)。

自然界に棲息する微生物はその個々の機能がわかっておらず、ほとんどが命名されていない。名前が付いていないのは純粋分離がされていないからである。微生物はその名の通りマイクロメーターレベルの微小な細胞を持っており、顕微鏡等を用いないと観察できない。特に細菌は分裂増殖をし、光学顕微鏡では球菌、桿菌、らせん菌、放線菌程度の識別しかできないため、個体の形態的特徴のみで種名が異なる動・植物とは分類体系は大きく異なっている。微生物では純粋な培養系として生きたまま分離され、生理・生化学的性状が記述されて初めて命名することができる。

2 難培養微生物

土壌や海水などの試料をDNAのインターカラー色素などで染色して直接蛍光顕微鏡観察すると、極めて多数の微生物細胞様物体が観察される。同時にこの試料を各種条件で培養した際に寒天培地上に形成される細胞群集の数(Colony Forming Unit, CFU)は常に1/100以下と低い。これが1995年に生態系微生物の培養可能割合(Culturability)としてまとめられた(表2)¹⁾。即ち、自然生態系では、細胞群集を形成できない難培養性微生物が主要なメンバーであり、自然界に

棲息する微生物のことはほとんど解っていないということが判ってきたのである。本総説で示された以降も命名される微生物の数は匍匐前進である。

未分離菌の多く

表1 各種微生物定量・分析法

物理化学的定量法	*バイオマス・成分定量 (菌体重量, 脂肪酸, 核酸, 蛋白質, クロロフィル, コピキノン) *濁度測定法 (Turbidometry)
生物化学的定量法	*コロニー形成法 希釈平板法 混釈培養法 *希釈頻度法 (最確値法 -MPN 法) *生物活性測定法 (酵素活性, 呼吸量, ATP 含量) *抗原抗体法 *分子生物学的方法 PCR 反応 (16S rDNA, 機能遺伝子)
直接観察法	*光学顕微鏡 (グラム染色, 位相差, 微分干渉) *蛍光顕微鏡 (共焦点レーザー顕微鏡) *蛍光染色 (AODC 法, DVC 法) *蛍光プローブ法 (蛋白質, DNA, RNA) *電子顕微鏡 (SEM, TEM)

著者略歴

1987年 京都大学大学院農学研究科食品工学専攻博士課程単位取得退学
農学博士(京都大学)
同年 三菱化成生命科学研究所 特別研究員
1988年 大分大学 工学部 講師
1990年 大分大学 工学部 助教授
1994年~1995年 英国ウェールズ大学 客員研究員
2006年~ 九州大学大学院 農学研究院 教授

主な研究領域

- (1) 制御型非殺菌発酵(メタ発酵法)による循環型物質生産システムの確立
- (2) 高度好熱性細菌群の生態解明
- (3) 無機窒素化合物の新奇な酸化還元系の解明
- (4) 難培養微生物の分離/育種と機能解析法の確立
- (5) 生物多様性および環境保全型バイオマス利用工業の確立

表2 微生物の培養可能な割合¹⁾

分離源	分離培養率 (%)
活性汚泥	1-15
土壌	0.3
堆積層	0.25
淡水	0.25
湖沼	0.1-1
汽水域	0.1-3
海水	0.001-0.1

表3 微生物が分離培養困難な推定理由

- (i) 生育速度が著しく遅い
- (ii) 寒天上でコロニーを形成しない
- (iii) 生育に一定以上の細胞濃度を必要とする
- (iv) 低細胞数レベルで静止期を迎えてしまう
- (v) 他の微生物が生産する生育因子を必要とする
- (vi) 種間水素伝達を行い共生している
- (vii) 昆虫や動物などに共生する
- (viii) そもそも環境中で非優占的である

は、ただ単に分離培養法が適切で無いために成功していない (Not Yet Isolated) 場合が多いと筆者は考えているが、「難培養性微生物」の意味は表3のように雑多で曖昧である²⁾。(i)に属する微生物は、淘汰が激しく、機能(活性)の総体が重要となる自然界や複合微生物系では、存在意義が低いかと思われがちであるが、例えば長期間安定に植え継がれている糠床の主要優勢菌であるにもかかわらず、未だに純粋分離ができない、*Lactobacillus acetotolerance*などはこのグループに属すると思われる³⁾。発酵性微生物や多くの既分離菌のように、ある条件下において増殖速度で他者を圧倒する微生物は一過性であることも多く、長期間安定な生態環境中ではむしろ穏やかな微生物が主要菌であり、バイオマスの多さで重要な機能を果たしている場合もある。(iv)に分類される何らかの環境因子の影響で増殖を停止しいわば休眠状態に陥った細胞群、VBNC (Viable But Not Unculturable) と呼ばれる一群や、微生物種同士が偏利共生あるいは相利共生関係にある(v)やその特殊なケースと考えられる(vi)のような微生物の純粋分離は簡単ではない。

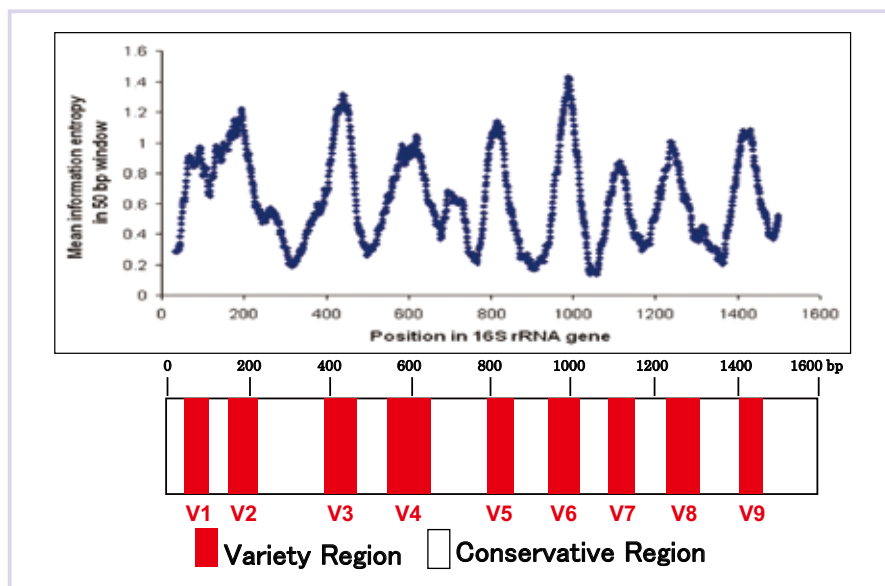


図1 細菌16SrRNA遺伝子に交互に現れる可変・保存領域⁵⁾

3 16S rRNA遺伝子による分子系統学的分類

C. Woeseは、リボゾームを構成する16S rRNAあるいは18S rRNAサブユニットの一次構造を微生物間で比較し、その相同性(配列の保存性)の距離関係から、原核細胞生物をさらに真正細菌(Bacteria)と古細菌(Archaea)に区別すべきと提唱した⁴⁾。この分子系統学的な考え方は、形態や生理学的性状から見た進化分類学的位置関係と比較的良く合致し、今では広く受け入れられている。16S rRNA遺伝子は約1,500塩基(bps)の配列情報を持ち、ここ20年でデータの蓄積が最も進んだ分子である(RDP, <http://rdp.cme.msu.edu>)。遺伝子上に種間に共通な配列を持つ保存領域と、種・属等によって配列の異なる可変領域が交互に現れ、V1-V9と呼称されている(図1)⁵⁾。V1-V9領域の配列比較は系統分類学上の位置を知り、所属する属や門などのグループを特定するのに有用である。一方、V1-V9領域と交互に現れる両末端付近を含めた保存領域は、遺伝子の可変領域の配列が不明でもPCR増幅できる共通配列を

表4 分子生物学的細菌叢解析法

PCR (Polymerase Chain Reaction) 利用法	<ul style="list-style-type: none"> * クローンライブラリー法 * DGGE (変成剤濃度勾配ゲル電気泳動法) (Denaturing agent Gradient Gel Electrophoresis) * T-RFLP (末端標識制限酵素処理断片多型性) (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) * DNA マイクロアレイ * メタゲノム解析 * 次世代シーケンサによるアンプリコン解析
直接観察法	<ul style="list-style-type: none"> * FISH (Fluorescent <i>In Situ</i> Hybridization)

持つため、新規に分離された細菌であってもユニバーサルプライマーを用いたPCR反応によって増幅できるという利点を与えてくれ、分子系統学的位置を簡単に推定できるようになった。

4 培養を伴わない微生物群集構造解析法

16S rRNA遺伝子をターゲットとした分子生物学的解析手法は、従来の培養方法に強く依存した方法に対して、環境複合微生物系からの抽出DNA混合物を試料として、未分離菌、分離困難菌を含めた多くの種を区別せずにPCR反応によって増幅できるという利点を与える。種々の手法がこの15年ほどで急速に開発されてきたが多くは原理的に類似している(表4)。

TALK ABOUT 21

複合微生物系から増幅された混合16S rRNA遺伝子(16Sアンプリコン)を、制限酵素処理断片のGPCカラム分離(T-RFLP)、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動を用いた解離温度による分離(DGGE)、大腸菌へのクローニングによる単離(Clone Library)という手法で分画/純化した後配列を決定するという手法である(図2)⁶⁾。これらPCRを

介した方法は感度が極めて高いが、試料からのDNAの抽出、増幅プライマーの不完全性や増幅効率の違いなど複数のステップで由来細胞や配列に依存した実験の偏りが生じることも覚えておく必要がある。

また、16S rRNAと相補的な合成オリゴヌクレオチドを蛍光色素でラベルしたプローブを用いて、環境試料中の

ある特定の種やグループの全細胞を染色し、蛍光顕微鏡下で観察する手法(Fluorescence *in situ* hybridization, FISH)が、R. Amannによって開発された。本法は、実験条件により結果が大きく左右されるものの、現場試料を遺伝子増幅せずしかも系統情報を伴って直接観察できる有用な方法である(図3)⁷⁾。

5 次世代シーケンシングとメタゲノム解析

ここ数年ほどの間に普及した、次世代DNAシーケンサは微生物群集構造の分子生物学的解析にさらに大きな革新をもたらしつつある。ピロシーケンス反応を検出の基本とし、高感度CCDカメラにより微小なDNA伸張反応の進行をDNA断片の配列情報として個別且つ大量に記録することができる。ビーズ内やプレート局部にDNAフラグメントを個々に固定することで、DNAフラグメント混合物を純化することなく増幅反応を追跡できるため、一回のオペレーションで得られる配列数が $10^6 \sim 10^7$ リード、解読塩基情報量が $10^9 \sim 10^{10}$ bpsと飛躍的に向上した。これにより、数Mbpsの長さの染色体遺伝子を持つ新規分離細菌の全ゲノム解析、比較ゲノム解析は急速に進んでいる。

複合微生物系についても、混合物全ての遺伝子を読み取った後、それぞれを編集することで構成微生物の全ゲノムを明らかにする「メタゲノム解析」が身近なものとなった。これらの構造(塩基配列)を網羅的に調べることで環境中の微生物の集合体(コミュニティ)がもつ遺伝子群として理解していこうとする考え方である。

前記したように、第一世代の分子生物学的手法が、複合微生物系混合物DNAをPCR増幅後分離/分画した後

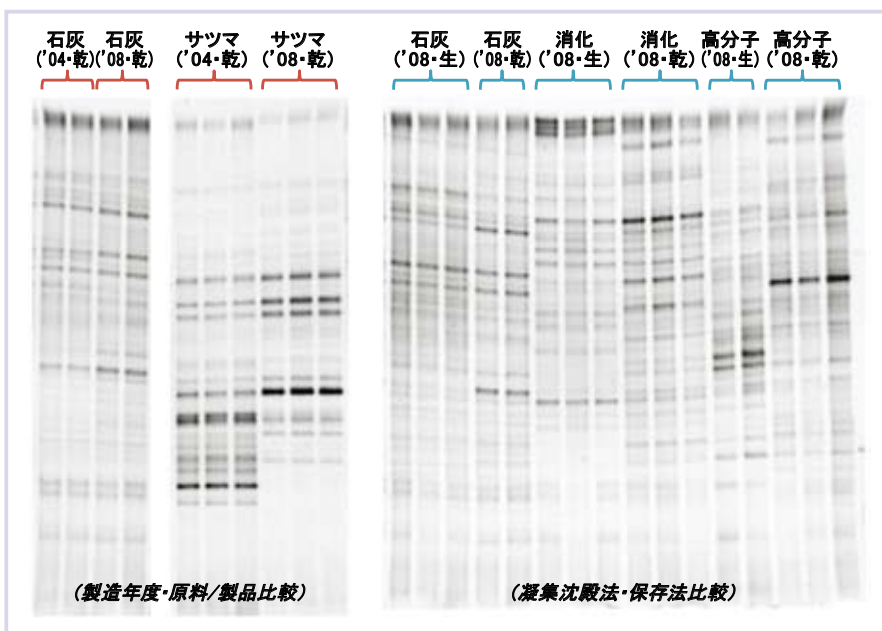


図2 DGGEによる下水汚泥と汚泥コンポストの細菌叢解析の一例

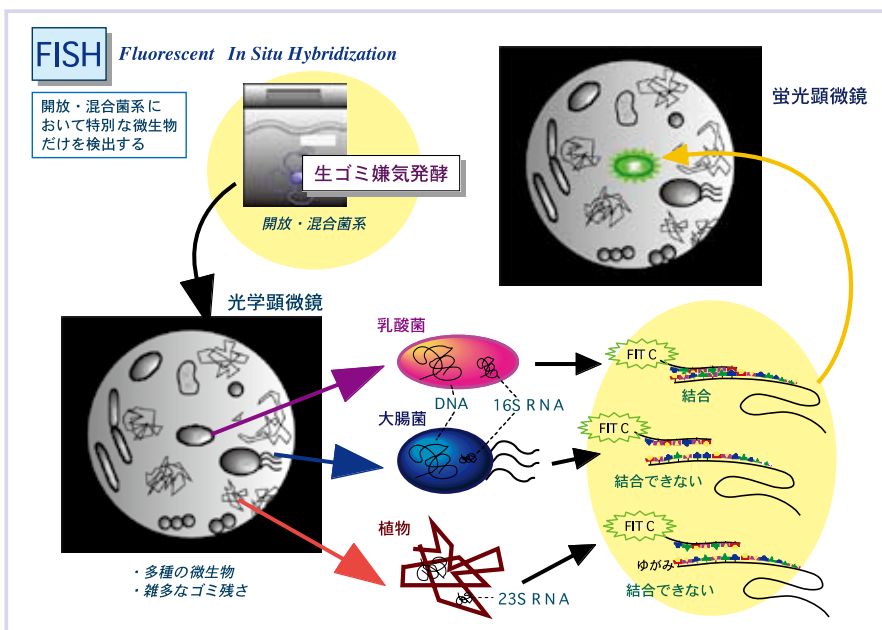


図3 16rRNAプローブを用いたFISHによる特異的微生物観察

に塩基配列解析を行っていたのに対して、次世代シーケンサでは、その分画操作がシーケンシングの装置一検出原理に内包されており、煩雑なステップが必要なくなったわけである。さらに、16Sアンプリコンを調製する際に、複数の採取試料についてあらかじめ目印となる配列（タグ、バーコード、MID配列などと呼ばれる）を付加することで、1回のオペレーションで同時に複数の試料の解析が可能となる（図4）。理論的には、微生物群集構造を4桁の精度で解析したいとすると 10^4 の有効リード数が必要であるから、1回のオペレーションで $10 \sim 10^3$ 個の異なる検体を供試できる。これらにより、試料検体あたりの解析コストが格段に低下しルーチンワーク可能なレベルになってきた。微生物の種名まで特定するためにはビーズ方式でリード長が長いRosch製が有効であるが、プレート方式のIllumina製は前処理が簡単でリード数の多さとランニングコストで勝っている。解析リード当たりの有効塩基数がさらに伸びれば、群集構造のフィンガープリンティング以上の情報を与えてくれ、今後さらに一般化していくであろう。

6 複合微生物系の構造と機能の相関

16Sアンプリコンを用いた微生物群集構造の解析は、主に分類学的位置関係から微生物の機能を類推することになるが、プロセスの活性と細胞レベルでの機能や活性を明確にしていく研究は未だ発展途上で道は遠い。複合微生物系により進行する排水処理、廃棄物変換プロセスで重要なのはもちろんその総体の機能＝性能である。総体で見た時、複合微生物系を制御するのは、酸素供給やpHなど増殖のための環境因

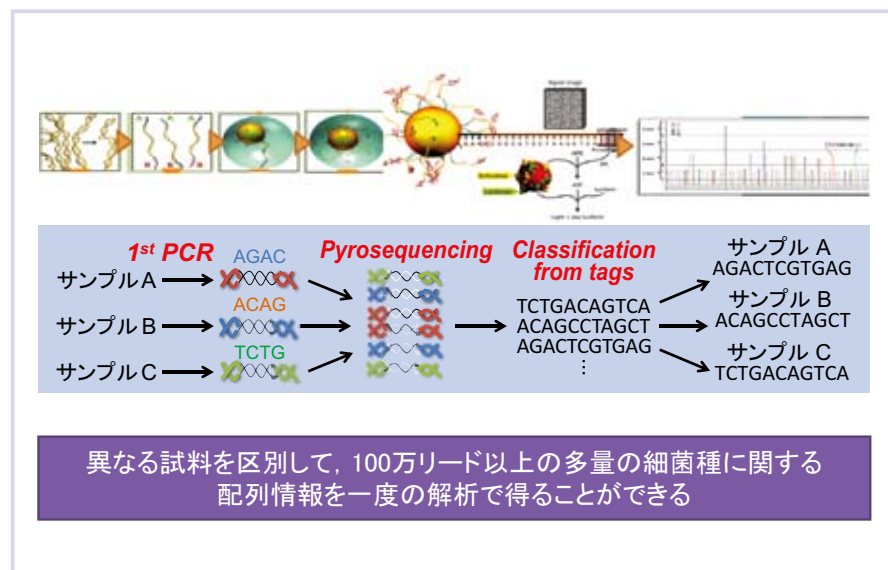


図4 バーコードピロシーケンス法による複数の環境試料細菌叢の同時解析 (Rosch 454)

子と、エネルギー源、炭素源、ビタミンなどの栄養因子に大別される。一方、個々の微生物は、微小な環境で相互に基質と細胞レベルでのレスポンスをおこなっているとされ、それらは他者に対しては生育阻害や殺滅、成長刺激など、相互関係からはいわゆる協調、拮抗、偏利/相利共生などとして現れる。安定な複合系はこれらがバランスされて一定の群集構造を保っているが、それが攪乱によって変化した場合、結果として活性汚泥法におけるバルキング、高度処理における窒素残留、メタン発酵における有機酸蓄積などのように、性能の低下として現れることになる。従って、個々の微生物過程に還元してそれを担っている微生物を明らかにしていく研究は必須である。そのような研究の好例として、例えば排水中窒素除去過程における窒素のバランスと微生物の存在の矛盾の追及から、嫌気性アンモニア酸化-ANNAMOX-と呼ばれる新しい反応代謝系を持ち、分離培養が難しい微生物が集積・同定され、新たな排水処理法としても注目されている⁵⁾。

7 おわりに

微生物の群集構造とその複合微生物系が発揮する総体としての機能を関連づけていく研究は、個々の事例について物理・化学分析や外部条件因子の変動に対するレスポンスを菌叢解析と各種オミックスの変動と共に同時解析し、絡め手で観ていくしかなさそうである。還元的分析と総合オミックス的解析の組み合わせにより、これら個々の構成微生物の相互作用レベルまで切り込むことで、今後「複合微生物工学的手法」が開発され、総体としての高機能化が可能になることを期待する。

文献

- 1) Amman RI et al., Microbiol. Rev. 59:143 (1995)
- 2) 鎌形洋一, J. Environ. Biotechnol. 7:69 (2007)
- 3) Nakayama J et al. J. Biosci. Bioeng. 104:481 (2007)
- 4) Woese, CR. Microbiol. Rev. 51: 221 (1987)
- 5) Anderson AF et al., PLoS ONE 3:e2386 (2008)
- 6) Tashiro Y et al., Biores. Technol. 146:672 (2013)
- 7) Amman RI, Mol. Microbiol. Ecol. Manual. 3.3.6:1 (1995)
- 8) Strous M. et al., Nature 400:446 (1999)