

複雑微生物系と微生物間ネットワーク機構の解明

鎌形 洋一

産業技術総合研究所

生物機能工学研究部門 生物資源情報基盤研究グループ

培養を経ない手法によって見えてきた微生物の多様性

20 世紀の最後の 10 年間は微生物学がかつて経験したことのない大きな転換点の期間だった。微生物を培養することなくその存在や性質の一端を明らかにすることができる時代が訪れたのである。すべての微生物(ここでは原核生物に限って話を進める)が持っている遺伝子で、保存性が高く、しかも種によって“微妙に”配列が異なるもの——そうした遺伝子の一つとして 16S rRNA 遺伝子が分類の指標として使われるようになった。この遺伝子の配列情報を用いた微生物学研究は二つの大きな革命をもたらしたといつて良い。

ひとつは、それまでさまざまな尺度で“乱雑に”分類されてきたすべての微生物が、きわめて整然とした系統的位相関係のもとに理解できるようになったことである。もちろん、一つの微生物が持つ何千という遺伝子のうち、16S rRNA というたった一つの遺伝子の配列だけで微生物の分子系統のすべてがわかる訳ではない。しかし“共通言語”が存在しなかった 1980 年代までの分類体系は決してたやすく理解できるものではなく、むしろ特定の分類学者以外を寄せつけない牙城のようなものが築かれていた。今日、我々はすべての微生物の系統的位相を一本の樹状図の中に見ることができる。

もう一つの革命は、16S rRNA 遺伝子の情報はこれまでまったく知られていなかった膨大な微生物群の存在を初めて我々に知らせたことである。16S rRNA 遺伝子の共通配列に基づく PCR プライマーを用いれば環境試料から直接抽出した DNA を鋳型としてあらゆる種類の 16S rRNA 遺伝子を増幅することができる。増幅産物をクローニングして塩基配列を読むことによってこれまでに知られていない配列が次々と明らかになっていったのである。これは多くの微生物学者にとってそれまで経験したことのない衝撃的な出来事だった。もちろん、微生物学者はそれまで何も知らなかったわけではない。さまざまな環境試料を顕微鏡で覗いて見ると、実に多様な微生物がそこにいるにもかかわらず、寒天の上で培養してみるとさまざまな微生物が増殖するものの、それが極めて限られた種類のものであることを経験的に知っていた。しかし、培養できる微生物の背後にどれくらいの種類の未知微生物が潜んでいるのかを定量的に予見することはまったく不

可能だった。今日までに知られている微生物の数は 5,000 種にも満たない。昆虫の 65 万種に比べれば、いかにその数が少ないかがわかる。微生物の種の定義については今なお議論すべき点はあるが、こうした分子遺伝学的な解析の結果は微生物の種が千万を越えていても何ら不思議ではないことを明瞭に示したのである。

ほとんどすべての微生物は未知で培養が困難である

ロバート・コッホ以来寒天の上でコロニーを作らせ、純粋微生物を単離することが微生物学の基盤技術となった。正確に記せばコッホの初期の共同研究者であるウォルター・ヘスの妻が、それまで使われていた扱いにくいゼラチンの替りに寒天を用いることをすすめ、さらにコッホの助手であるペトリによってガラスのプレート(いわゆるペトリ・ディッシュ)の中で、栄養源を含む寒天を固まらせたものを用いたのが始まりである。寒天培地の上で 1 個のコロニーを釣り上げ、あらためて新しい培地に画線塗抹すると一つの細胞が増殖して再びコロニーができる。こうして確立した純粋培養系を単クローンとして維持し、研究に用いてゆく。この手法の簡便さに疑いを挟む余地はない。しかし、ここではすべての微生物は単独で寒天の上でコロニーを作るという暗黙の大前提が存在する。ところが、上述したように環境から丸ごと取ってきた DNA の解析結果から、培養できる微生物の背後には無数の培養できない、もしくは培養が困難な微生物が潜んでいることが明らかになった。表 1 は身近な環境中にいかに普通の寒天培地では培養できない微生物が多いかを示している。海水を例にとると、一定量の海水中の全菌数にくらべ実際に寒天培地の上で生えてくる微生物はわずか 0.1%にも満たないことがわかる。

表 1. 全菌数に対して寒天培地上で生育可能な微生物の割合
(Amann ら Microbiol. Rev. 1995. 59: 143-169 による)

環境試料	生育可能な微生物の割合
海水	0.001 - 0.1 (%)
淡水	0.25
湖	0.1 - 1
汽水	0.1 - 3
活性汚泥	1 - 15
湖沼底泥	0.25
土壌	0.3

大腸菌に代表されるような微生物はたやすく寒天で培養でき、そのような微生物を用いることによって、今日の微生物学および分子生物学の基礎が築かれた。しかし、大腸菌は微生物が培養しやすく研究に便利な生物という明らかに誤った固定観念を植え続けてきたことは否めない。現在、私たちのような微生物生態学に携わる者から見れば、大腸菌は完全に例外的な微生物である。平均世代時間、つまり1個の細胞が2個になるまでに要する時間、がわずか30分程度の微生物など、ほんの限られた種類にしか過ぎないのである。

こうして私たちはこれまで扱ってきた微生物が微生物種全体のうちの氷山の一角であることを知りつつある。世紀の変わり目とともに微生物学はまったく新しい局面を迎えたのである。

培養困難な微生物とは

筆者自身、環境微生物がいかに培養困難かを思い知らされたのは、ある種のメタン生成古細菌(アーキア)の純粋分離を試みた時に遡る。それまでは培養が容易な微生物を扱っており、仮に途中で培養がうまくいかなくなる微生物(そのような微生物は実はとても多いのだが)があっても、そのようなものは切り捨てて、ハンドリングが容易なものだけを意識的に扱ってきた。実験室で扱いやすい微生物を相手にするのが微生物学におけるある種の不文律である。

出会った微生物は酢酸を資化するメタン生成古細菌だった。今日地球温暖化ガスとして、または天然ガスの主成分として、さらには嫌気性水処理プロセスの主要生産物としてもメタンの重要性が認識されている。生物学的に発生するメタンの70%が酢酸由来なのだが、なぜか微生物の分離例は極端に乏しかった。しかし、いろいろな証拠からその微生物は嫌気環境に普遍的に存在し、とりわけメタン発酵水処理プロセスには相当量存在していて、しかもどのような形状の微生物かもわかっていて、ただ、絶対嫌気性微生物であるこの菌の分離は、始めた当時の技術の未熟さゆえに遅々として進まなかった。少なくとも技術上の問題が分離できない最大の理由と思われる。しかし、結果としてわかったのは、この菌はそもそも寒天の上でコロニーを形成するという微生物学者が期待する本質的能力に欠けているということだった。さらにはこの菌は液体培養における世代時間が約3日から7日を要した。大腸菌にくらべると天文的な長さであるが、それでも唯一の救いは酢酸のみを唯一の炭素源かつエネルギー源とした液体培地でとにかく生育することだった。そこで、限界希釈培養と呼ばれるひたすら希釈し、もつとも希釈の高いところから生育してくる微生物を改めて希釈培養するという面倒な培養操作を何年も繰り返すことになった。さらにここで問題になったのは、この菌は生育のために初期菌体接種量が少なくとも1000(細胞)個のオーダー必要であるということだった。微生物の分離は1個の細胞を増やす単クローン培養が前提である。残念ながらこの微生物に対してはそれができなかった。理由は今もっ

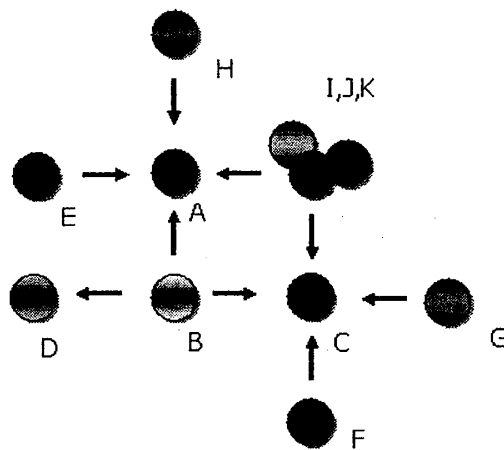


図 1. 物質（生育因子）を介した微生物間コミュニケーションの模式図（文献 1, 2 に基づく）

て明らかではない。結局この微生物を純粋に分離したという証明は、さまざまな有機物を加えた培養を行ってもこの形態の微生物以外の微生物が増殖してこない、という観察結果によってなされた。もちろん単クローンという証明はできなかったわけだが、この種の微生物は今日においても依然として純度証明が難しい。

純粋培養を基礎にした微生物学から複雑微生物系へ

爾来我々はもっぱら分離培養が厄介な微生物を単離し、機能を解明する研究を行ってきた。厄介さにもさまざまな程度やタイプがあることもわかってきた。さまざまな研究を通して筆者らが得たものは、そうした微生物は他の微生物と共存させたときに初めて生育したり、分離できるものが多いということである。例えば微生物間ではさまざまな物質のやりとりがあると考えられている。いわゆるシグナル物質や生育因子と呼ばれるものがそれにあたる。このような物質の介在が明確であれば、その物質を添加することによって純粋培養が可能になるはずである。しかし、物質のやりとりを証明し、その構造を決めてゆく研究は思うほどたやすくはない。そうした中、我々は、ある種の微生物(A)が別種の微生物(B)の生産する何か（何かというのは現在まだ構造がわかっていないという意味である）によって生育が著しく助長されることを見いだした（図 1）（文献 1, 2）。さらに微生物(B)の生産物は微生物(A)のみならず、種や属を越えた他の微生物(C)や微生物(D)の生育を促進すること、さらに微生物(C)は属種の異なる微生物(G, F, I, J, K)の生産物によっても生育促進を受けることを明らかにした。これらのことは微生物間での物質のやり取りは我々が想像する以上に複雑多様であり、さまざまな微生物間の cross talk が行われているこ

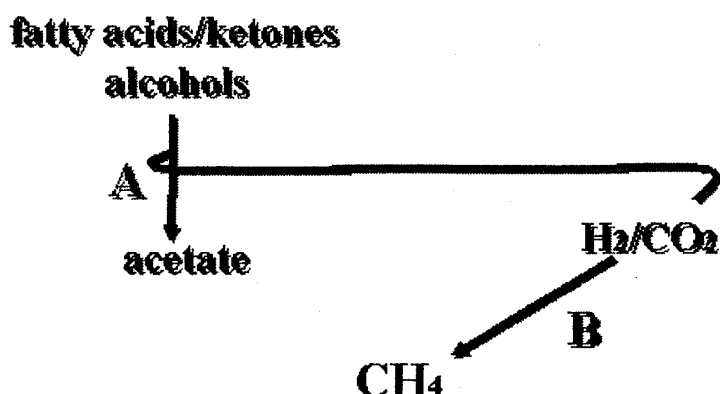


図2. 無酸素環境における微生物間共生。多くの絶対嫌気性微生物 (A) は自ら産生する水素が一定以上の濃度に達すると生体反応を停止させてしまう。そのため反応 (生育) が進行するためには水素除去者としての第2の微生物 (B) を必要とする。

とを強く示唆するものである。現在生育促進物質の精製と構造決定を行うとともに、cross talkの広がりを見極める実験を行うことによって明らかにしようとしている。

これとは別に嫌気性微生物においては種間で主にやりとりされる分子は水素である。図2に示すように、多くの嫌気性微生物は物質の分解過程で水素を発生する。しかし、水素は一定以上の濃度まで蓄積すると、物質の嫌氣的酸化反応そのものを阻害してしまう。嫌気性微生物群はこれを回避するために、発生する水素を速やかに除去する微生物をそばに配置している。”水素除去者”は多くの場合、水素を用いて炭酸ガスを還元しメタンを作るメタン生成古細菌である。実際の複雑系を *in situ* hybridization などの手法で観察すると、水素発生を行う微生物を取り囲むように水素資化性メタン生成古細菌が存在していることがわかる (文献3,4,5)。我々は種間水素伝達を介した微生物間相互作用を嫌気環境における微生物共生系として定義している。このようにメタン生成古細菌に依存して生育する嫌気性微生物は非常に多いと考えられており、実際我々の研究でも多数の共生微生物の分離 (この場合、純粋な2種類あるいは3種類の微生物によって構成された継代培養可能な安定した共生系というのが筆者らの“純粋分離”の定義である) に成功している (文献6)。一方、一見こうして他者依存的な微生物も我々の想像以上に変幻自在であり、基質によっては単独で生育することもあることを数多く見いだしている (文献6,7,8,9)。すなわち、これらの微生物は環境中に存在する基質の種類によって“単独生活者”になるか、他者依存的な生活者になるかを自在に選んでいるとも言える。”単独生活者”と、他者依存的な生活者として存在している時との間では発現する遺伝子群が大きく異なることもあり、そのような微生物については現在詳細なプロテオーム解析を進めている (文献10)。

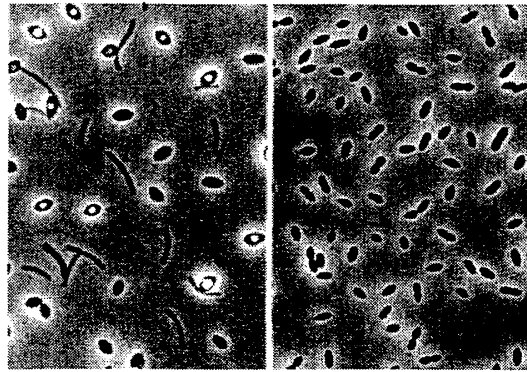


図 3. 微生物間共生の例：左は benzoate を分解する純粋 2 者培養系。短桿菌が benzoate を分解する微生物、長桿菌は水素を除去するメタン生成古細菌。メタン生成古細菌がいないと短桿菌は benzoate を分解することができず、生育もできない。一方右の写真は短桿菌の純粋培養。この短桿菌は crotonate という不飽和脂肪酸を基質にした場合には純粋培養が可能である（文献 7 参照のこと）。

こうして我々はようやく 1 種類の微生物の独立した情報から複雑系全体を理解しなければならなかった限界を一步乗り越えて、複数種の微生物の相互作用から複雑系を理解する世界に向かいつつある。二人の人間の関係から千人の人間社会を理解するのは困難であるが、少なくとも二人の人間の関係の中から社会の仕組みの本質を垣間見る事ができる。これと同じように微生物が織りなす複雑系を理解するためには少なくとも 2 種の微生物の相互作用を理解することは必要不可欠である。このことは結果的に、これまで見えなかった微生物の存在を明らかにすることにもつながる。

最後に

改めて強調したいのは、微生物は純粋培養できてこそ初めてその遺伝学的、生化学的、生理的実体を明らかにできるということである。しかし、従来の培地の上で、従来どおりの単一種の純粋培養を目指している限り、その背後にある膨大な未知未培養微生物の実体に迫ることはできないだろう。微生物間コミュニケーションという視点から新たな複雑系解析のアプローチが生まれると筆者は信じている。

引用文献

1. Tanaka, Y., S. Hanada, A. Manome, T. Tsuchida, R. Kurane, K. Nakamura, and Y. Kamagata : *Catellatibacterium nectariphilum* gen. nov., sp. nov.,

- which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**: 955-959 (2004).
2. **Tanaka, Y., S. Hanada, H. Tamaki, K. Nakamura, and Y. Kamagata** : Isolation and identification of bacterial strains producing diffusible growth factor(s) for *Catellibacterium nectariphilum* strain AST4T. *Microb. Environ.*, **20**: 110-116 (2005).
 3. **Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada** : Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 1280-1288 (1999).
 4. **Imachi, H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada** : Cultivation and in situ detection of a thermophilic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 3608-3615 (2000).
 5. **Sekiguchi, Y., H. Takahashi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada** : In situ detection, isolation and physiological properties of a thin filamentous microorganism abundant in methanogenic granular sludges : a novel isolate affiliated with a clone cluster, the Green Non Sulfur Bacteria subdivision I. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 5740-5749 (2001).
 6. **Kamagata, Y. and H. Tamaki** : Cultivation of uncultured fastidious microorganisms. *Microb. Environ.*, **20**: 85-91 (2005).
 7. **Qiu Y-L., Sekiguchi, Y., Imachi, H., Kamagata, Y., Tseng, I-C., Cheng, S-S., Ohashi, A., Harada, H.** : *Sporotomaculum syntrophicum* sp. nov., a novel anaerobic, syntrophic benzoate-degrading bacterium isolated from methanogenic sludge treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Arch. Microbiol.*, **179**, 242-249 (2003).
 8. **Hattori, S., A.S. Galushko, Y. Kamagata, and B. Schink** : Operation of the CO dehydrogenase/acetyl-CoA pathway both in acetate oxidation and acetate formation by the syntrophically acetate-oxidizing bacterium

- Thermacetogenium phaeum* J. Bacteriol., 187: 3471-3476 (2005).
9. Qiu, Y-L., Y. Sekiguchi, S. Hanada, H. Imachi, I-C. Tseng, S-S. Cheng, A. Ohashi, H. Harada, and Y. Kamagata : *Pelotomaculum terephthalicicum* sp. nov. and *Pelotomaculum isophthalicicum* sp. nov.: two anaerobic bacteria that degrade phthalate isomers in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens. Arch. Microbiol., published online (2006).
10. Luo, H-W., H. Zhang, T. Suzuki, S. Hattori, and Y. Kamagata : Differential expression of methanogenesis genes of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (formerly *Methanobacterium thermoautotrophicum*) between in pure culture and in cocultures with fatty acid-oxidizing syntrophs. Appl. Environ. Microbiol., 68: 1173-1179 (2002).