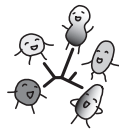


## 総 説

微生物系統分類学の潮流



# 環境微生物の培養性とその生態学的意義

平石 明

豊橋技術科学大学環境・生命工学系 〒441-8580 愛知県豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1

Key words: culturability, 16S rRNA gene amplicons, next-generation sequencing, quinone profiling, microbial ecology

### はじめに

19世紀後半、R. コッホによって固形平板培地上に微生物をコロニーとして生育させる培養技術が開発された。その結果、環境中から容易に微生物が純粋分離できるようになり、微生物学は格段の発展を遂げた。菌数測定といえば、もっぱら平板培地上で生えてくるコロニー形成単位 (colony-forming unit, CFU) を数えることが長い間常法であった。約1世紀遅れで、核酸結合蛍光試薬と蛍光顕微鏡を利用した総菌数 (direct total count, DTC) 測定が行なわれるようになり (Hobbie *et al.*, 1977)、環境中の DTC と平板培養で得られる生菌数との間に大きな開きがあることが明らかとなった。すなわち、さまざまな環境中における総菌数は一般的に CFU 数よりも圧倒的に多く、またその事実は、いくつかの直接生菌数 (direct viable count, DVC) の検出技法の適用 (Kogure *et al.*, 1979) によって、現在の培養技術ではとらえることができない微生物が優占しているという認識につながった。1980年代の PCR 法の開発 (Mullis & Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988) に始まって、その後の10年間における PCR アンプリコンのサブクローン化とサンガー・シーケンシングを組み合わせたクローンライブラリー法 (Giovannoni *et al.*, 1990)、rRNA 標的 fluorescence *in situ* hybridization (FISH) (DeLong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1995)、PCR-変性濃度勾配ゲル電気泳動 (PCR-DGGE) (Muyzer *et al.*, 1993) などの分子技法の登場は、微生物生態学分野における非培養的

アプローチによる微生物群集構造や多様性の研究に拍車をかけ、培養をまったく行なわない研究も含めて膨大な論文が出版されてきた。

21世紀に入ると、サンガー法の次という意味合いの次世代シーケンシング (next-generation sequencing, NGS) 技術が登場し (図1)、微生物のゲノムレベルでの解析を比較的短時間でこなすことが可能となった。とくに安価で高性能の NGS 機器とその解析プロトコルの普及は、現在、微生物多様性の研究と理解に多大なる影響をもたらしている。すなわち、網羅的に大量の遺伝子アンプリコンの解析を可能とすることで、環境中に数万から数百万分の1以下程度にしか存在しないごく少数の系統群の動態も把握できるようになっている。また、細胞レベルでのゲノム解析技術も格段に進歩し、これらを含めたゲノム・メタゲノム解析プロジェクトの数 (GOLD, <https://gold.jgi.doe.gov/statistics>) で見れば、細菌に関するものだけでも正当名としての原核生物の全記載種の数 (本稿執筆時点で約12,000種, LPSN, <http://www.bacterio.net/>) をはるかに上回っている。

種々の環境から再構成されるメタゲノムの比較からは、生物の進化と多様性に関わる概念も大きく改変させるような成果も報告されている。たとえば、原核生物の細胞レベルでのメタゲノム解析からは、“microbial dark matter” と称される未培養群をも含めたゲノム構造に基づく門レベルでの系統関係が明らかにされた (Rinke *et al.*, 2013)。さらに、さまざまな環境由来の再構築メタゲノムをも含めた1,011のゲノムに基づいた系統樹からは、これまで培養例がない“Candidate

E-mail: hiraishi@ens.tut.ac.jp

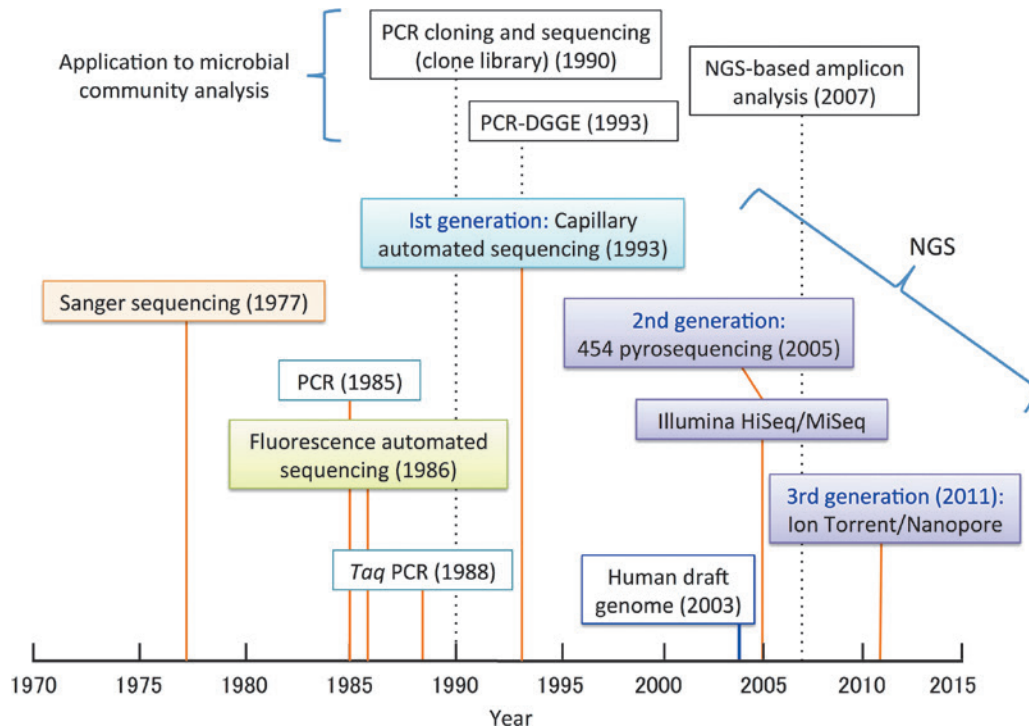


図1 History of DNA sequencing and related molecular biological technologies (lower) and their applications to microbial community analysis (upper). NGS=next-generation sequencing

Phyla Radiation”と仮称される細菌群が優勢であることが示されている (Hug *et al.*, 2016). これらの系統樹や海底堆積物のメタゲノム解析から発見されたロキアーキオータ “Lokiarchaeota” 門の系統樹 (Spang *et al.*, 2015) は、初期段階の真核生物がアーキアの “TACK” 系統から派生していることをあらためて示している. このような真核生物に特徴的なゲノム構造をもつアーキアの発見 (Spang *et al.*, 2015) は、すでに進化の途上にあつた真核細胞にミトコンドリアの起源である細菌が取り込まれたとする新知見 (Pittis & Gabaldón, 2016) ともつながる.

このように NGS を駆使した自然界における微生物のメタゲノム解析や微生物多様性の網羅的解析が可能となった現在、とくに微生物生態研究における培養性 (culturability) の意義は何かということがあらためて問われる. もちろん、微生物学の基礎となる微生物分類学は、基本的に培養株の情報および生物遺伝資源保存機関による基準株の保存・管理の上に成り立っているため、培養法を工夫しながら未記載種の分離にも注力することはきわめて重要である. とはいえ、上述のようにさまざまな環境に対して平板培養法を適用する

と、多くの場合少数群集しか検出できない. また、この CFU 検出効率は環境に応じて比較的特有であり (表 1)、格段に検出効率を向上させることも現状ではむずかしい. このような場に応じて一定の割合で検出されるコロニーや少数・希少群集の意義については、まだ詳しくはわかっていない. 一方で、比較的培養性が高い堆肥化プロセスや廃水処理系などにおいては、NGS によるアンプリコン解析と平板培養・分離に基づく菌株の系統解析の結果では、必ずしも一致しない場合もあることもわかってきた.

本稿では、クローンライブラリーや NGS による rRNA 遺伝子アンプリコン解析を比較対照としながら、また、従来の蛍光顕微法による DVC と CFU 検出との関係に関する例外的事実をふまえながら、あらためて微生物生態研究における培養性の意義について考える. さらに、今回はまったく検出原理が異なるバイオマーカー法であるキノン分析 (Hiraishi, 1999) との比較データについても紹介し、これらの非培養分子技法の精度と信頼性をも検証したい.

**表1 Culturability as a ratio of culturable bacteria to direct total cell counts in different environments**

Habitat	Culturability (%)*
Aquatic environments	
Activated sludge	1-18
Freshwater	0.25
Mesotrophic lake	0.1-1
Seawater	0.001-0.1
Unpolluted estuarine waters	0.1-3
Sediments	0.25
Terrestrial environments	
Compost (fed-batch)	10-70
Compost (sequencing-batch)	1-20
Soil	0.3

\*Based on information from Amann *et al.* (1995), except that on activated sludge (Yoshida & Hiraishi, 2004) & compost (Narihiro & Hiraishi, 2005; Narihiro *et al.*, 2016; Hiraishi, unpublished data).

#### NGSによるアンプリコン解析と希少微生物群集の検出

非培養的細菌群集構造解析法として威力を発揮してきた従来のクローンライブラリー法では、試料から抽出したDNAを鋳型として特定遺伝子（多くの場合16S rRNA遺伝子）をPCR増幅してサブクローン化し、プラスミドベクターに挿入された各々のクローンの塩基配列をサンガー法で決定する。16S rRNA遺伝子の場合、共通プライマーを用いてほぼ全長を増幅して解読できるので、ポスト解析としてFISH用のプローブなどを設計する場合にはきわめて有用である。しかしながら、解析に手間がかかるため、一般に1試料あたり数百から数千クローン程度のデータで報告される場合が多い。一方、NGSで得られる一つ一つのデータは、解析対象であるPCR産物に含まれる1分子、すなわちクローンライブラリーで得られる一つのクローンのデータに相当し、桁違いのリード数（クローン数）の情報を得ることができる。たとえば、Illumina MiSeqでは、約2日間のシーケンシング時間で最大リード数2,500万（リード長、2×300 bp）のデータを得ることができる。したがって、クローンライブラリー法では困難なきわめて少数の分類群の検出も可能となる。NGSを利用した群集構造解析では、当初ピロシーケンシング（pyrosequencing）法を採用していたが（Liu *et al.*, 2007）、次第にIllumina GAIIxが（Caporaso *et al.*, 2011）、さらにはMiSeq方式（MiSeq platform）（Claesson *et al.*, 2010; Lange *et al.*, 2015; Lazarevic *et al.*, 2009; Sinclair *et al.*, 2015）が多用されるようになってきている。

*et al.*, 2009; Sinclair *et al.*, 2015) が多用されるようになってきている。

上記のようにきわめて解像度が高いNGSによるアンプリコン解析ではあるが、得られるデータが基本的に系統型（phylotype）の相対比であるので、技術的な問題（後述）とは別にデータ解釈には注意が必要である。このようなデータは、総菌数が大きく異なる試料間で比較する場合は、菌数が少ない試料ほど結果が過大・過小評価される傾向になるので、総菌数と系統型の相対比に基づいて大まかな絶対量として補正する必要がある。また、16S rRNA遺伝子に基づく系統型の割合を算出する上で問題となるのが、菌種が有する遺伝子コピー数の違いである。原核生物のゲノム上におけるrRNA遺伝子のコピー数は1-15個（ちなみに真核微生物においては数百個）と大きく幅があるので、アンプリコン解析によって得られる系統型の相対比は、そのままでは元の系の系統学的分布を正確には反映しない。このバイアスを改善するために、系統型に応じたコピー数に基づいて量比を補正する試みがなされている（Kembel *et al.*, 2012）。なお、16S rRNA遺伝子配列は基本的に系統情報のみしか与えないが、それぞれの系統群が有する既知の性質に基づいて、16S rRNA遺伝子情報のみから微生物群集の機能を推定する方法が報告されている（Langille *et al.*, 2013; Okuda *et al.*, 2012）。

クローンライブラリー法では、原理上優占群集のみしかとらえることができない制限がある。対照的に平板培養法では、環境にもよるが平均で1%以下程度の少数群集しか検出できない（表1）。したがって、両方の技法でお互い重なって検出される分類群はきわめて少ないのが一般的である。一方、上述したように、NGSによるアンプリコン解析では、平板培地を用いた計数法で検出できる少数群集としてのコロニー集団を原理上網羅できると考えられている。環境中に存在する少数微生物群は、培養性の可否に関わらず希少生物圏（rare biosphere）あるいは希少微生物圏（rare microbial biosphere）とよばれているが（Lynch & Neufeld, 2015; Pedrós-Alió, 2012; Sogin *et al.*, 2006）、これらの生態学的意義についてはまだ萌芽的研究段階である。たとえば、希少群集の動態については、普段は休眠状態にあるが任意に活性化したり（Epstein, 2009）、有機物の流入や生態学的かく乱などの環境変化によって一気に勢力を増すことなどが推察されている（Fuentes *et al.*, 2015; Sjöstedt *et al.*, 2012）。また、従来考えられていたよりも、希少微生物群の生態学的



重要性が認識され始めている (Hamasaki *et al.*, 2016; Shade *et al.*, 2012). 従来から生態学的に重要とされている微生物は、培養可能な希少微生物群が多く含まれているため、培養を介さない微生物生態学研究は群集構造や機能の本質的な面をあいまいにしてしまう可能性があることや、この意味でNGSと培養法の併用が重要であることが指摘されている (Shade *et al.*, 2012).

### 反復回分堆肥化プロセスにおける培養性の意義—DVC vs. CFU

ここで、堆肥化プロセスの培養性に関する筆者らの研究事例について紹介する. 反復回分堆肥化 (fed-batch composting, FBC) プロセスは、厨芥や生ゴミなどの生物系固形廃棄物を一定間隔で投入し続けながら、処理物を引き抜かず堆肥化する方法であり、実用上のみならず、固形有機物の微生物分解プロセスのモデル系としても注目されている (Narihiro & Hiraishi, 2005). FBC プロセスは人為的に制御される生態系の中でも最も培養性が高い系であり、総菌数に対する細菌のCFU数の割合は平均で50%程度に達する (Narihiro *et al.*, 2003, 2016) (表1, 図2). これは、生ゴミが投入されるFBCリアクターが常時高濃度の栄養条件下にあり、計数に用いる平板培地と比較的類似した環境条件にあるためと推察される. それゆえ、平板培地を用いて定量的に分離された菌株のデータに基づいて再構成された群集構造は、比較的元の系のそれを反映できると考えられ、非培養の分子技法と比較しながら培養性の意義を評価する上で格好の研究対象である.

培養性が50%に達するFBC処理系においては、当然ながらLIVE/DEAD *BacLight* キットによるDVCや酸化還元指示薬CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) で検出される生菌数 (CTC<sup>+</sup> count) も、CFU値以上に高いことが予想される. たとえば、活性汚泥における菌数相対比では、DTC (SYBR Green 染色) に対して平均で70%のDVC (LIVE/DEAD *BacLight*), 50%のCTC<sup>+</sup>値, 10%のCFU値が得られており (Yoshida & Hiraishi, 2004), 環境試料においてはDVCがCFU数よりも高いのが一般的傾向である. ところが興味深いことに、完全に馴養されたFBCリアクターにおいては、DVCとCFUはほぼ同じ値であり、CTC<sup>+</sup>値はこれらよりもかなり低くなることがわかった (Takebayashi *et al.*, 2007; Narihiro *et al.*, 2016). CTC染色法は、培養困

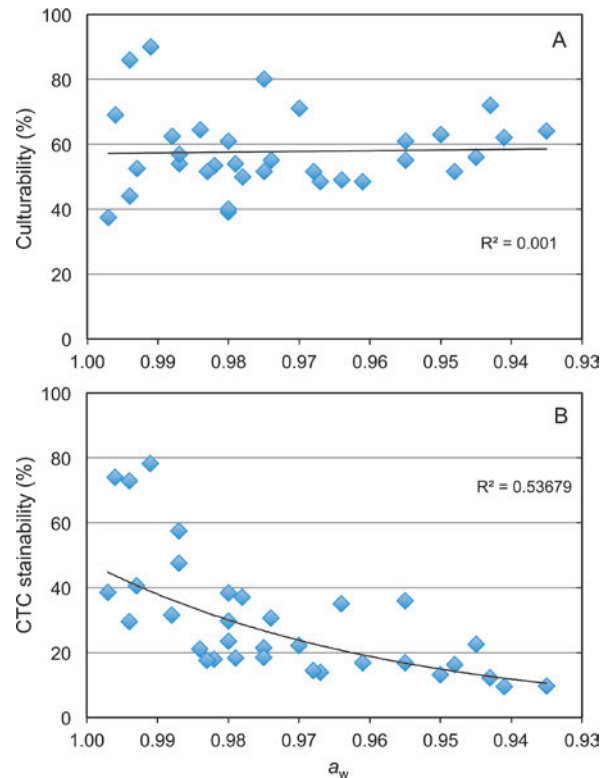


図2 Correlation between the culturability (A) or CTC stainability (B) of bacteria and water activity levels during FBC operation (Narihiro *et al.*, 2016)

難な菌をも含めて生きている代謝活性 (呼吸活性) の高い菌をとらえる目的で従来利用されており、この常識から考えれば、CFU値 > CTC<sup>+</sup>値は奇妙な現象である. そこで著者らはこの謎を解くべく、FBC処理系における培養性とCTC反応との関係を生理学的に解明することを試みた.

FBCリアクターにおいては、生ゴミは投入され続けるが処理物は一定期間引き抜かれなため、ミネラルや未分解の溶解物が系内に蓄積されていく. その結果、処理日数の経過とともに系内の電気伝導度は上昇し、逆に水分活性は低下していく. そこで、処理物の水分活性、CFU、CTC<sup>+</sup>を同時に追跡したところ、CFU値は水分活性の変化に関わらず一定であったが、CTC<sup>+</sup>値は水分活性の低下とともに減少することがわかった (Narihiro *et al.*, 2016; 図2). さらに、FBCリアクター内の優占群集であるアクチノバクテリア (*Actinobacteria*) 門細菌を分離し、異なる水分活性条件下で培養したところ、水分活性が低いほどCTC染色率が低下することが認められた. 一方、同じ培養物

でのCFU/総菌数比は、水分活性にあまり影響を受けなかった。これらの結果は、水分活性の低下によって、培養性にはあまり影響がない条件で細胞内の酸化還元活性に関わる遺伝子発現が抑制されることを示唆する。事実、分離株の一つを用いたトランスクリプトームおよびプロテオーム解析においては、低水分活性の影響により全体的な遺伝子発現が抑えられ、とくに炭水化物代謝、TCA回路、電子伝達鎖などの脱水素/酸化還元酵素が抑制的に調節されていることが示された (Narihiro *et al.*, 2016)。

馴養期のFBCリアクター内においては水分活性が低下しているが、その値の変動幅は比較的大きい。これは、新鮮な生ゴミが投入されるたびに局所的に水分活性が一時的に上昇するためと考えられる。したがって、水分活性が低下した処理物のなかでは、微生物は一時的にCTC反応を示さないくらいに代謝が不活発になっているが、投入されてくる新鮮な生ゴミとの界面上では代謝活性を取り戻し、分解に関わることができると考えられる (図3)。これが、FBCリアクターの微生物が平板培養ではCFUとして認められるもののCTC反応では非検出となる理由であり、リアクター中で不活性な状態でも分解機能は維持しているという説明ができる。このように、従来の蛍光顕微鏡技術の常識ではとらえきれない培養性の実態が、FBC処理系の生態学的研究で明らかとなった。

#### 反復回分堆肥化プロセスの群集構造—アンプリコン vs. キノンプロファイル解析

馴養されたFBCリアクターにおいては、水分活性の低下に抵抗性のあるアクチノバクテリア門細菌が優占していることがわかっている (Narihiro & Hiraishi, 2005)。この微生物群集構造の解明には、培養法とともにキノンプロファイル法が大きな役割を果たしてきた。キノンプロファイル法は、化学分類の指標である呼吸鎖キノンをバイオマーカーとして、環境中から直接抽出して得られる分子種の組成から群集構造を推定する方法であり、質的内容のみならず微生物のバイオマス量をも推定することができるなどの利点がある (Hiraishi, 1999; Hiraishi *et al.*, 2003)。アクチノバクテリアの菌種は、比較的長いイソプレン単位 (多くは  $n \geq 9$ ) あるいは部分飽和型の側鎖を有するメナキノンをもつキノンとして有しており、その分子種数は原核生物の中でも多い。したがって、アクチノバクテリアが優占するようなFBCプロセスでは、キノンプロファイル法がきわめて有効にはたらく。

例として、FBCリアクターの運転開始から馴養段階に至るまでに得られたキノン量と分子種組成 (Narihiro *et al.*, 2016) を図4に示す。運転開始からキノン量は増加し、42日目以降の馴養期の総量は平均で  $220 \text{ nmol g}^{-1}$  に達した。堆肥の場合、 $1 \text{ nmol}$  のキノンは  $2.1 \times 10^9$  cells に相当することがわかっている (Hiraishi *et al.*, 2003)、この総キノン量から推定される菌数は  $4.6 \times 10^{11} \text{ cells g}^{-1}$  になり、実際にSYBR Green染色で得られた同期内の平均総菌数 ( $3.0 \times 10^{11} \text{ cells g}^{-1}$ ) に近似した。分子種では運転日数とともにユビキノンの割合が低下する一方、部分飽和型メナキノンの割合が増加し、最終的に60%を占めた。このように、FBCリアクターの立ち上げから馴養までの間に、ユビキノン含有のプロテオバクテリア (*Proteobacteria*) 門細菌からアクチノバクテリアを優占菌とする群集構造の変化が起きていることがわかる。ただし、キノンの絶対量で見れば、ユビキノンの量 (プロテオバクテリアの量) は比較的一定であるのに対し、部分飽和型メナキノンが増加しているため、相対的にはユビキノンが低下している (70日後で18%) 結果になっていることに注意が必要である (図4B)。すなわち、馴養期間のバイオマスの絶対量で見れば、アクチノバクテリアは明らかに増加しているが、プロテオバクテリアは比較的一定であることがわかる (図4A)。これは、高水分活性の生ゴミに付着したプロテオバクテリアが常時供給されているためであり、かつFBCリアクター内では、低水分活性条件によりそれらの増殖が制限されているためと考えられる。この運転期間において定量的に分離された細菌株の系統学的同定に基づいて細菌相を再構成したところ、アクチノバクテリア門細菌は全体の60%を占め (Narihiro *et al.*, 2016; 未発表データ)、キノンプロファイルの結果とよく一致した。

一方、このFBCリアクターから抽出したDNAを鋳型としたMiSeqによる16S rRNA遺伝子アンプリコン解析においては、馴養段階のアクチノバクテリアの占有率は30%程度にしかならず、ユビキノン含有型プロテオバクテリアが30%以上を占めた (図4C, 未発表データ)。アンプリコン解析の結果は、キノンプロファイルや分離株のデータとはおおまかに傾向は一致しているものの、門・綱レベルでの相対比において大きく異なっていることが示された。このようなFBCリアクターからアクチノバクテリアが検出されにくい現象は、PCR-DGGE解析でも認めている (Narihiro *et al.*, 2004)。また、MiSeq解析の繰り返し

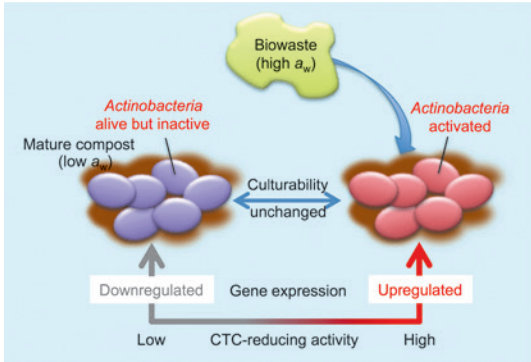


図 3 Schematic model of the physiological state of *Actinobacteria* during FBC under acclimated conditions (Narihiro *et al.*, 2016)

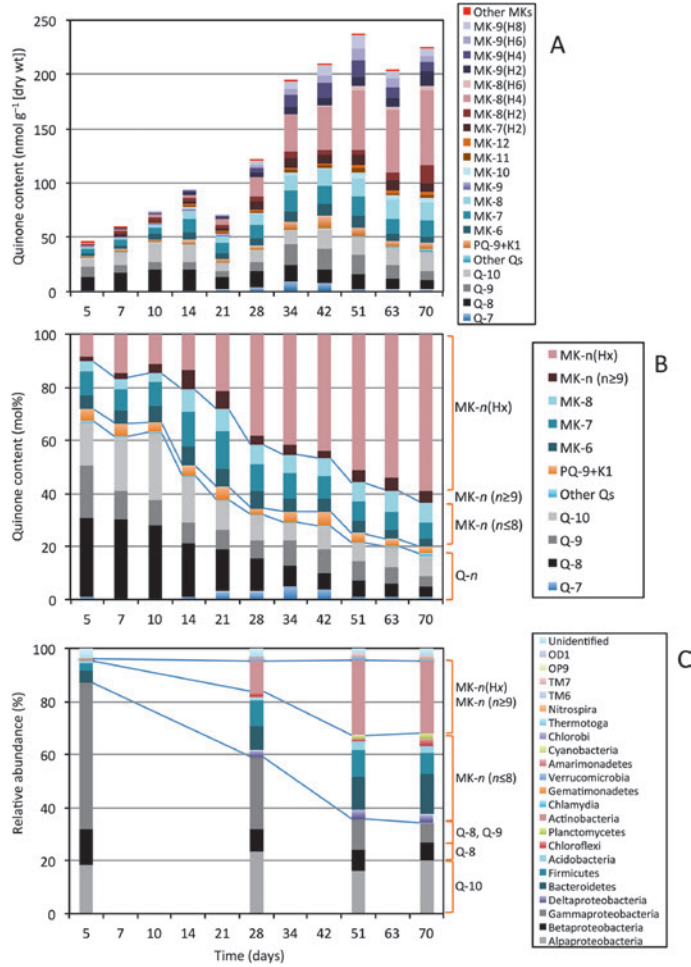
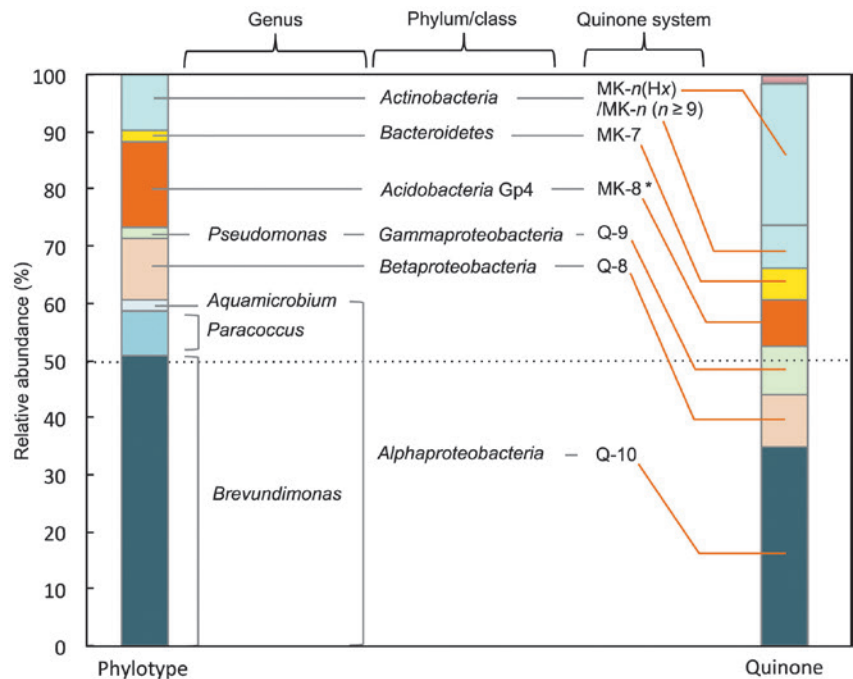


図 4 Changes in quinone profiles and relative abundance of 16S rRNA gene-based phylotypes during a fed-batch composting of household biowaste. (A), total amounts of all quinone homologs detected; (B), relative quinone content (mol%); (C) relative abundance (%) of 16S rRNA gene amplicon phylotypes with their possible quinone systems. Based on information from Narihiro *et al.* (2016) and unpublished work.

図 5 Relative abundance of clone library-based phylotypes (left) and quinone species (right) in 3,5-DCP-added activated sludge (modified from Kimura *et al.* (2016)). Phylogenetic assignment of phylotypes at the generic and higher taxonomic levels are shown with their possible quinone systems. The quinone system of *Acidobacteria* (asterisked) is based on the available information on *Acidobacteria* subgenus Gp1.





の再現性については既出の報告で問題ないことが示されているが (Sinclair *et al.*, 2015), 筆者らの堆肥の群集解析においてはやや低い再現性を認めている (未発表データ).

現行の MiSeq によるアンプリコン解析においてはいくつかの技術的問題があることが知られている. たとえば, 用いる PCR プライマーや増幅領域の違いによって結果が異なることや, 複数の増幅段階を経るために質の低いアンプリコンを生じることが報告されており, これらに対する改良法も報告されている (Lange *et al.*, 2015; Sinclair *et al.*, 2015). また, 環境中の原核生物のアンプリコン解析においては, 10% 程度の群集が未検出になることが報告されている (Eloe-Fadros *et al.*, 2016). とはいえ, この取りこぼしは主として培養・分離株が記載されていない系統に集中することであって, プライマーセットを含めた従来の PCR 技術の問題であるとされている. 筆者らの研究における上記の 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析とキノン分析あるいは分離培養の結果の相違は, おそらくは NGS 技術特有の問題というよりも, DNA 抽出と PCR を基本とする分子技法のバイアスに原因があると思われる. なお, アンプリコン解析データのみでは, 馴養期間内のプロテオバクテリアの相対比が減少しているため (図 4C), そのままでは本門細菌のバイオマス量そのものが低下しているような事実と異なる印象を与えてしまうことは, 先に述べた問題点である.

#### 廃水処理プロセスにおける群集構造と培養性

もう一つの研究事例として廃水処理系を取り上げる. 活性汚泥をはじめとする廃水処理系は, 堆肥に次いで比較的高い培養性が得られる複合微生物系であり (表 1 参照), アンプリコン, バイオマーカー, および分離株のデータに基づいて再構成する群集構造の整合性を検証するのに適している. 筆者らは, 活性汚泥処理プロセスに脱共役剤としての 3,5-ジクロロフェノール (3,5-DCP) を添加し, 余剰汚泥減量の効果を試験した (Kimura *et al.*, 2016). その結果, 3,5-DCP による減量効果は運転期間とともに失われることを認め, この脱共役効果の消失に群集構造の大きな変化が関わっている状況証拠を得た. この系の群集構造の解析には 16S rRNA 遺伝子を標的とするクローンライブラリーなどの分子技法とともにキノンプロファイル法を適用したところ, クローン解析では, アルファプロテオバクテリア (*Alphaproteobacteria*) 網細菌およびアクチノバクテリアがそれぞれ 61% および 9.5% を占

めることが示された一方, キノン分析ではそれぞれ 35% (ユビキノン-10) および 30% 以上 (長鎖および部分飽和型メナキノン) という, 両者の比率に違いが見られる結果となった (Kimura *et al.*, 2016; 図 5).

以上の結果を受けて, 3,5-DCP を添加した活性汚泥リアクターを再度構築して MiSeq によるアンプリコン解析を行なったところ, クローンライブラリーと同様な結果となった (未発表データ). クローン解析でアクチノバクテリアの検出率が低下すること (図 5) は, 先の堆肥における MiSeq 解析の結果と同様な傾向であり, やはり複合微生物系からの DNA 抽出や PCR においてバイアスを生じる可能性がある (Farris & Olson, 2007; Feinstein *et al.*, 2009). つまり, アクチノバクテリアを含めた細菌に共通な PCR プライマーを用いたとしても, 何らかの理由でアクチノバクテリアのような特定の系統群が検出されにくい状況がある可能性があらためて示されている. このようなバイアスがある事実は, 単一の分子技法のみで解析を行っている限りは認識することが困難であり, この点でキノンプロファイル法のような検出原理の異なる技法を併用することは重要である.

上記した 3,5-DCP 添加汚泥系における CFU に基づく生菌数の割合は 19% と比較的高かったため, この系からの分離株の系統学的同定に基づく群集構造の再構成を試みた. その結果, アルファプロテオバクテリア 20%, ベータプロテオバクテリア (*Betaproteobacteria*) 11%, ガンマプロテオバクテリア (*Gammaproteobacteria*) 60%, アクチノバクテリア 6% の割合となった (Kimura *et al.*, 2016). すなわち, 高次分類群の相対比においては, クローンライブラリー, キノンプロファイル, および分離株の解析結果はお互い統計学的に有意な差異があった. この事実は, すでに Shade *et al.* (2012) が NGS と培養法の併用を勧めているように, 群集構造解析における培養技術やバイオマーカー法の重要性は色あせていないことを意味する.

筆者らは, 酸性硝化回分リアクター (acidophilic nitrifying sequencing-batch reactor, ANSBR) を構築し, pH 4.0 以下の酸性条件下でも硝化が起こることを証明している (Hanada *et al.*, 2014; Kurogi *et al.*, 2014). 酸性土壌や酸性培養条件でアンモニア酸化を行なう微生物としてアーキアが知られているが (Lehtovirta-Morley *et al.*, 2011; Okamura *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012), ANSBR 中ではアーキアではなく, 細菌ドメインの TM7 ("*Saccharibacteria*"), ガンマプロテオバクテリア, およびアクチノバクテリアが主

要系統群として存在していることがわかった。筆者らは数年間にわたって pH 4.0 の人工無機廃水のみで ANSBR を運転・維持してきたが、系統群の存在比に若干の変化はあるものの、この系の群集構造と硝化活性はきわめて安定であることを認めている。この ANSBR についても MiSeq によるアンプリコン解析、キノン分析、分離株に基づく系統解析を併用して行なっているが、やはり NGS では、バイオマーカー法や培養法と比較してアクチノバクテリアの検出比率が低い傾向を認めている（未発表データ）。

#### アンプリコン解析で培養性のあるものを網羅できるか

上記したように、1,000 万オーダーのリード数が得られる NGS では、理論上は、一般に総菌数の 1% 以下として存在する培養可能なコロニー群集の系統情報も網羅できるはずである。しかしながら、NGS によるアンプリコン解析と平板培養で得られる分離株の系統解析では、必ずしも同じ結果にならないことは、すでに述べたとおりである。Shade *et al.* (2012) は、土壌細菌群集を対象とするピロシークエンス法によるアンプリコン解析分離株の系統解析とを比較した結果、NGS ではとらえきれない培養可能な系統型が多数あることを報告している。筆者らは先に述べた FBC プロセスおよび下水活性汚泥から得られた 16S rRNA 遺伝子アンプリコンと分離株の系統型を比較してみた。その結果、98% の閾値の操作的分類単位 (OTU) の類別化で、培養・分離株の 16–26% がアンプリコン解析で検出されないことを認めた (図 6, 未発表データ)。

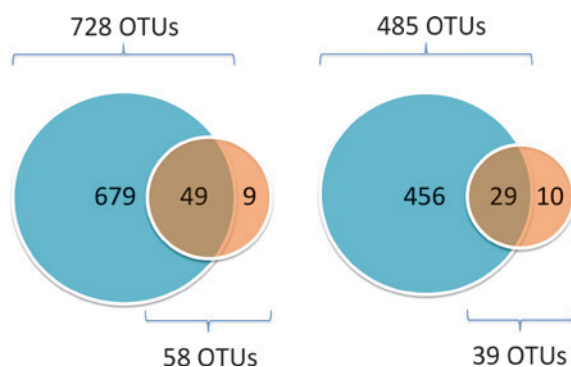


図 6 Culture-based and culture-independent amplicon analyses of FBC (left) and activated sludge (right) bacterial communities. The data show the number of OTUs shared between culture-based (orange) and culture-independent (cyan) analyses and the number of OTUs unique to each analysis.

培養可能な少数群集において、アンプリコン解析でとらえられない場合があることに加えて、培養可能な優占群集においてもそれが該当するという事は、あらためて NGS を用いた群集構造解析を注意深く行なう必要性を提示している。筆者らは、現在、MiSeq 方式によるアプローチ、バイオマーカー法、培養法を併用しながら、さらに群集構造解析技術における問題点とその改良についてを慎重に検討している。

#### おわりに

自然界に生息する微生物群集の多くは培養・分離できないという常識の確立と同時に、微生物を培養してとらえるという古典的アプローチは、微生物生態学分野では衰退してきた感がある。微生物群集構造解析の目的としては、現在 NGS を駆使したメタゲノムアプローチが全盛である。しかしながら、本稿で紹介したように、微生物を培養・分離することは少なくとも三つの意味で意義がある。一つ目はもちろん、系統・分類学的な未記載種を発見し、それらの機能・性質を明らかにするとともに微生物遺伝資源としての保存と有用性の探究を進めていくことである。二つ目は、さまざまな環境には常時一定の割合でコロニーを形成しうる微生物が存在しており、希少微生物群集としての重要な生態学的役割の可能性があるということである。三つ目は、非培養的アプローチとして NGS を用いたとしても、原理上網羅できるはずの培養可能微生物が見逃される可能性があるということである。このような観点から、微生物群集構造や多様性の解析においては NGS と培養法、あるいは検出原理が異なるバイオマーカー法などを併用し、結果の精度を高めていく必要がある。

最後に、NGS を駆使した微生物のゲノム解析の多くが基準株以外の変異株や未培養物について行なわれている現状の中で、用いられている学名の保証がない場合が決して少なくないことを指摘しておきたい。このようなゲノムの比較解析からの機能的、生態学的多様性の論述は、無用な混乱を生じることもありうることは前報 (平石, 2010) でも述べた。学名の命名を取り扱う微生物分類学では微生物学の基盤であり、基準株の記載に立脚していることに鑑みて、基準株のゲノム解析が進展することを望みたい。

#### 謝辞

本稿で紹介した堆肥や廃水処理の研究事例の一部は、産業総合技術研究所 成廣 隆博士および呉工業



高等専門学校 木村善一郎博士の本研究室大学院生時代の研究成果に基づくものであり、この場を借りて深謝の意を表す。また、本稿は日本微生物資源学会第22回大会（2015年9月、鳥取）で講演した内容を中心にまとめたものであり、執筆の機会を与えていただいた河地正伸博士（国立環境研究所）および内野佳仁博士（製品評価技術基盤機構）に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N. & Knight, R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (Suppl 1): 4516-4522.
- Claesson, M.J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P. & O'Toole, P.W. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res.* **38**: e200.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S. & Pace, N.R. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single. *Science* **243**: 1360-1363.
- Eloe-Fadrosh, E.A., Ivanova, N.N., Woyke, T. & Kyrpides, N.C. 2016. Metagenomics uncovers gaps in amplicon-based detection of microbial diversity. *Nat. Microbiol.* published online: 01 February 2016.
- Epstein, S.S. 2009. Microbial awakenings. *Nature* **457**: 1083.
- Farris, M.H. & Olson, J.B. 2007. Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**: 376-381.
- Feinstein, L.M., Sul, W.J. & Blackwood, C.B. 2009. Assessment of bias associated with incomplete extraction of microbial DNA from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5428-5433.
- Fuentes, S., Barra, B., Caporaso, J.G. & Seeger, M. 2015. From rare to dominant: a fine-tuned soil bacterial bloom during petroleum hydrocarbon bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 888-896.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. & Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* **345**: 60-63.
- Hanada, A., Kurogi, T., Giang, N.M., Yamada, T., Kamimoto, Y., Kiso, Y. & Hiraishi, A. 2014. Bacteria of the candidate phylum TM7 are prevalent in acidophilic nitrifying sequencing-batch reactors. *Microbes Environ.* **29**: 353-362.
- Hamasaki, K., Taniguchi, A., Tada, Y., Kaneko, R. & Miki, T. 2016. Active populations of rare microbes in oceanic environments as revealed by bromodeoxyuridine incorporation and 454 tag sequencing. *Gene* **576**: 650-656.
- Hiraishi, A. 1999. Isoprenoid quinones as biomarkers of microbial populations in the environment. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 449-460.
- 平石 明 2010. 光栄養細菌の多様性—ゲノムおよびメタゲノム解析から見えてきたもの. *光合成研究* **20**: 84-92.
- Hiraishi, A., Iwasaki, M., Kawagishi, T., Yoshida, N., Narihiro, T. & Kato, K. 2003. Significance of lipoquinones as quantitative biomarkers of bacterial populations in the environment. *Microbes Environ.* **18**: 89-93.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J. & Jasper, S. 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 1225-1228.
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., Butterfield, C.N., HERNSDORF, A.W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D.A., Finstad, K.M., Amundson, R., Thomas, B.C. & Banfield, J.F. 2016. A new view of the tree of life. *Nat. Microbiol.* published online: 11 April 2016.
- Kembel, S.W., Wu, M., Eisen, J.A. & Green, J.L. 2012. Incorporating 16S gene copy number information improves estimates of microbial diversity and abundance. *PLoS Comput. Biol.* **8**: e1002743.
- Kimura, Z.-I., Hirano, Y., Matsuzawa, Y. & Hiraishi, A. 2016. Effects of 3,5-dichlorophenol on excess biomass reduction and bacterial community

- dynamics in activated sludge as revealed by a polyphasic approach. *J. Biosci. Bioeng.*, in press.
- Kogure, K., Simidu, U. & Taga, N. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**: 415-420.
- Kurogi, T., Linh, N.T.T., Kuroki, T., Yamada, T. & Hiraishi, A. 2014. Culture-independent detection of "TM7" bacteria in a streptomycin-resistant acidophilic nitrifying process. *AIP Conf. Proc.* **1585**: 53-58.
- Lange, A., Jost, S., Heider, D., Bock, C., Budeus, B., Schilling, E., Strittmatter, A., Boenigk, J. & Hoffmann, D. 2015. AmpliconDuo: A split-sample filtering protocol for high-throughput amplicon sequencing of microbial communities. *PLoS One* **10**: e0141590.
- Langille, M.G., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., Clemente, J.C., Burkepille, D.E., Thurber, R.L.V. & Knight, R. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* **31**: 814-821.
- Lazarevic, V., Whiteson, K., Huse, S., Hernandez, D., Farinelli, L., Osterås, M., Schrenzel, J. & François, P. 2009. Metagenomic study of the oral microbiota by Illumina high-throughput sequencing. *J. Microbiol. Methods* **79**: 266-271.
- Lehtovirta-Morley, L.E., Stoecker, K., Vilcinskas, A., Prosser, J.I. & Nicol, G.W. 2011. Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 15892-15897.
- Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D. & Knight, R. 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Res.* **35**: e120.
- Lynch, M.D. & Neufeld, J.D. 2015. Ecology and exploration of the rare biosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 217-229.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- Narihiro, T., Abe, T., Yamanaka, Y. & Hiraishi, A. 2004. Microbial population dynamics during fed-batch operation of commercially available garbage composters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 488-495.
- Narihiro, T. & Hiraishi, A. 2005. Microbiology of fed-batch composting. *Microbes Environ.* **20**: 1-20.
- Narihiro, T., Kanosue, Y. & Hiraishi, A. 2016. Cultural, transcriptomic, and proteomic analyses of water stressed cells of actinobacterial strains isolated from compost: ecological implications in the fed-batch composting process. *Microbes Environ.*, in press.
- Narihiro, T., Yamanaka, Y. & Hiraishi, A. 2003. High culturability of bacteria in commercially available personal composters for fed-batch treatment of household biowaste. *Microbes Environ.* **18**: 94-99.
- Okamura, K., Takanashi, A., Yamada, T. & Hiraishi, A. 2012. Ammonia-oxidizing activity and microbial community structure in acid tea (*Camellia sinensis*) orchard soil. *J. Phys. Conf. Ser.* **352**: 012052.
- Okuda, S., Tsuchiya, Y., Kiriya, C., Itoh, M. & Morisaki, H. 2012. Virtual metagenome reconstruction from 16S rRNA gene sequences. *Nat. Commun.* **3**: 1203.
- Pedrós-Alió, C. 2012. The rare bacterial biosphere. *Ann. Rev. Mar. Sci.* **4**: 449-466.
- Pittis, A.A. & Gabaldón, T. 2016. Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nature* **531**: 101-104.
- Rinke, C., Schwientek, P., Sczyrba, A., Ivanova, N.N., Anderson, I.J., Cheng, J.F., Darling, A., Malfatti, S., Swan, B.K., Gies, E.A., Dodsworth, J.A., Hedlund, B.P., Tsiamis, G., Sievert, S.M., Liu, W.T., Eisen, J.A., Hallam, S.J., Kyrpides, N.C., Stepanauskas, R., Rubin, E.M., Hugenholtz, P. & Woyke, T. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature* **499**: 431-437.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of

- DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487–491.
- Shade, A., Hogan, C.S., Klimowicz, A.K., Linske, M., McManus, P.S. & Handelsman, J. 2012. Culturing captures members of the soil rare biosphere. *Environ. Microbiol.* **14**: 2247–2252.
- Sinclair, L., Osman, O.A., Bertilsson, S., Eiler, A. 2015. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: evaluating the illumina platform. *PLoS One* **10**: e0116955.
- Sjöstedt, J., Koch-Schmidt, P., Pontarp, M., Canbäck, B., Tunlid, A., Lundberg, P., Hagström, A. & Riemann, L. 2012. Recruitment of members from the rare biosphere of marine bacterioplankton communities after an environmental disturbance. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 1361–1369.
- Sogin, M.L., Morrison, H.G., Huber, J.A., Welch, D.M., Huse, S.M., Neal, P.R., Arrieta, J.M. & Herndl, G.J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 12115–12120.
- Spang, A., Saw, J.H., Jørgensen, S.L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A.E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L. & Ettema, T.J. 2015. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* **521**: 173–179.
- Takebayashi, S., Narihiro, T., Fujii, Y. & Hiraishi, A. 2007. Water availability is a critical determinant of a population shift from *Proteobacteria* to *Actinobacteria* during start-up operation of mesophilic fed-batch composting. *Microbes Environ.* **22**: 279–289.
- Yoshida, N. & Hiraishi, A. 2004. An improved redox dye-staining method using 5-cyano-2,3-diteryl tetrazolium chloride for detection of metabolically active bacteria in activated sludge. *Microbes Environ.* **19**: 61–70.
- Zhang, L.M., Hu, H.W., Shen, J.P. & He, J.Z. 2012. Ammonia-oxidizing archaea have more important role than ammonia-oxidizing bacteria in ammonia oxidation of strongly acidic soils. *ISME J.* **6**: 1032–1045.

#### Culturability of microorganisms in the environment and its ecological implications

Akira Hiraishi

Department of Environmental and Life Sciences, Toyohashi University of Technology

It is common knowledge in microbial ecology that most microorganisms in nature are not recovered on standard culture media. Therefore, although microbiologists are still making efforts to isolate unknown microorganisms, culture-independent molecular approaches to the analysis of microbial diversity are essential in this research area. High-throughput next-generation sequencing (NGS) is accelerating the growth of microbial ecology and phylogenetics strategies based on genomic and metagenomic information. In light of the current status of this research, we need to reconsider the significance of bacteria isolated as colony-forming units from the environment. One of the major foci regarding the culturability of bacteria is their ecological importance as “rare biospheres” of complex microbial communities. Another area of interest in culturable bacteria in the environment is whether their phylotypes can be covered completely by NGS-aided amplicon analyses. This paper focuses on the extent to which NGS and clone library approaches and conventional culture methods share the numbers of operational taxonomic units of environmentally derived bacteria. Biases in culture-independent molecular approaches are also discussed on the basis of comparative data on 16S rRNA gene amplicons and respiratory quinone as biomarkers.