生命の起源研究における CPR バクテリアの重要性

鶴 巻 萌^{*,**} 齋 藤 元 文^{*,**}
丸 山 茂 徳^{***} 金 井 昭 夫^{*,**}

Importance of Candidate Phyla Radiation (CPR) Bacteria for the Origin of Life

Megumi TSURUMAKI^{*,**}, Motofumi SAITO^{*,**},
Shigenori MARUYAMA^{***} and Akio KANAI^{*,**}

[Received 17 May, 2019; Accepted 11 June, 2019]

Abstract

It is well known that the evolution of life is affected by environmental factors, and this should be a fundamental perspective when investigating the origin of life; however, this perspective has not been fully addressed in biology. The Hadean Earth had a completely different surface environment from that of today, with no free oxygen, but instead a local environment rich in H₂ which was generated by serpentinization, while energy–material circulation was driven by nuclear geysers. It is proposed that an anoxic hot-spring environment, with abundant hydrogen produced by serpentinization, was the birthplace of life. It is also proposed that the Hakuba hot spring in Nagano, Japan, is a Hadean-Earth-like environment with an H₂-rich environment. A microbe found there, designated Hakuba OD1, is a member of the Candidate Phyla Radiation (CPR) bacteria group. In this review, CPR bacteria are described and their importance for the origin of life is discussed. The CPR is a bacterial supergroup consisting of dozens of phylum-level lineages of very small bacteria. This group was recently discovered with a metagenomics analysis that allowed unculturable environmental samples to be detected. Biochemical approaches to the CPR bacteria have not yet been successful because almost all the bacteria are unculturable or have not been isolated. However, with the development of massive parallel sequencing technology (next-generation sequencing), the phylogenetic characteristics of the CPR bacteria are becoming clear, and genomic analyses of these bacteria have led to unique discoveries. The sizes of the CPR bacterial genomes range from 400 to 1,500 kilobases (kb), and they contain approximately 400–1,500 genes. Thus, their genomes are remarkably small compared to other well-known and ordinary bacteria, represented by *Escherichia coli*, which have over 4,000 genes, but are similar to those of symbiotic or parasitic bacteria. The CPR bacterial genomes also lack many of the genes involved in essential metabolic pathways, such as the tricarboxylic acid (TCA) cycle and amino acid biosynthesis, so they seem to obtain their essential metabolites from their environments. It is proposed that this knowledge is important when considering the chemical changes that occurred on primitive Earth, which gave rise to the first forms of life through the processes of chemical evolution. Therefore, it is essential to understand the kinds of protein that are encoded in CPR bacterial genomes when studying the origin of life.

* 慶應義塾大学先端生命科学研究所

** 慶應義塾大学大学院 政策・メディア研究科 先端生命科学プログラム

*** 東京工業大学 地球生命研究所

* Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, 997-0017, Japan

** Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University, Fujisawa, 252-0882, Japan

*** Earth-Life Science Institute, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, 152-8551, Japan

Key words : early earth-like environment, origin of life, genome science, bioinformatics, meta-genome analysis, CPR bacteria

キーワード：原始地球類似環境，生命の起源，ゲノム科学，生命情報科学，メタゲノム解析，CPR
バクテリア

I. はじめに

地球上で一番の歴史がある生物はいうまでもなく微生物（原核生物）である。すなわち，その誕生が地球上での生命の誕生と同義であり，生命の起源の研究は，いかにして原始（冥王代）地球上に原核生物たるバクテリア（真正細菌）やアーキア（古細菌）が生まれ出でたのかという問題に解答を求めることに他ならない。ここで，前世紀までの微生物学は，実験室にて培養可能で，そのコロニー（集落）を単離することができるような微生物を中心に研究が遂行されてきた。一方，多様な環境で生息している微生物の90%以上は，現在，その培養法が確立されていない。これでは微生物研究は，とくに多様性や進化の研究では，全体のなかでほんの限られた窓をのぞいているにすぎないと考えられていた。ところが，今世紀になってから著しい発展をみせたメタゲノム法と呼ばれる解析技術の登場をもって状況は一変した。この方法は微生物の培養を介さずに，環境サンプルである土，海水，温泉水あるいは動物の糞便などから直接にDNAやRNAを調製し，その塩基配列を決定することで，どのような種類の微生物がどのような環境に生息しているのかを解析できる（Handelsman, 2004）。また，調べたい環境に特定の微生物が優占種として生息しているような場合には，超並列シーケンサーと呼ばれる，数千万-数億のDNA断片の塩基配列を同時並行的に決定する装置を用いることで，その微生物の完全長ゲノムやドラフトゲノム（完全な塩基配列の決定とはいかないものの，おおよその全貌が再現されたゲノム配列）をコンピューター上で再構築することができる（Tyson *et al.*, 2004）。こうなってしまうと，世界中でこれまでに蓄積された膨大な遺伝子データベースと参照することにより，そ

の微生物にどのような遺伝子が存在しているのかをある程度推測できるようになる。近年，メタゲノム法を用いることで，これまでは正確にみえなかったバクテリアやアーキアの多様性がみえてきた。その成果の1つが本総説でとりあげるCPRバクテリア群であり，本バクテリアの研究から「原始的」な微生物の遺伝子構成や物質代謝などの問題が議論できるようになった。

一方，生命の起源の問題は，「原始的」な微生物がどのような地球環境下で生まれ育ったのかを考えることでもある。この観点からすれば生命の起源の研究が分子生物学者や進化学者のみにより解き明かされることはないことが自明である。ここで，地質学者の丸山らは冥王代の地球環境において，蛇紋岩に由来する高濃度の水素に富んだ局所的な温泉環境を生命誕生の場として提唱した（Suda *et al.*, 2014）。また，このような冥王代の類似環境である長野県白馬地域の温泉からメタゲノム法により同定された微生物は先のCPRバクテリアの1系統であるOD1と称される微生物群に対応する。本総説ではCPRバクテリア研究の現状を紹介すると共に，生命の起源研究における本バクテリアの重要性を指摘したい。

II. 生命誕生時の地球環境

CPRバクテリアの詳細について述べる前に，なぜこのバクテリアに注目するかということを理解する必要がある。そのためには，現在考えられている生命誕生時（冥王代）の地球環境と生命誕生に至る仮説，ひいては現在の冥王代類似環境に関しての知識を共有したい。なお，紙面の都合があり，この問題に関しては必要最小限の記述にとどめざるを得ない。必要に応じて本特集号の他の論文や原著論文を参照していただきたい。

冥王代表層環境は太古代以降の地球表層環境と

図 1 冥王代地球表層の復元図。本図は、冥王代の地球表層環境を復元したものである。上図は鳥瞰図、下図はその断面図である (Kitadai and Maruyama, 2018)。冥王代の地球表層は、現在の表層環境とはまるで異なっており、表層に露出する主要な岩石は、アノーソサイト、KREEP 玄武岩、コマチアイトの 3 種類で、これらの岩石が巨大な原初大陸を構成していた。活発な気象現象によって、風化・侵食・運搬作用が促進され大量の堆積岩が形成された。大陸上には、火山や褶曲山脈、淡水をたたえた湖や河川が多数存在し、きわめて多様な環境が広がっていただろう。そして、原初大陸に豊富に含まれるウランなどの放射性元素が濃集した鉱床が普遍的に存在し、自然原子炉が稼働していたと考えられる。海洋は、超酸性 (pH は 0.1 以下)、超高塩分 (現在の約 10 倍)、重金属元素に富む猛毒海洋だった。

Fig. 1 Speculative illustration of the surface environment on the Hadean Earth. This figure illustrates the surface environment on the Hadean Earth. The upper figure is an aerial view and the lower figure is a cross-sectional view (Kitadai and Maruyama, 2018). The Hadean surface environment is quite different from that of the present day. The main rocks exposed on the surface were anorthosite, KREEP basalt, and komatiite, which formed a huge primordial continent. Active climatic phenomena caused weathering, erosion, and sediment transportation, which formed sedimentary rocks. On the primordial continent, there were many volcanoes, mountains of folded rocks, freshwater-filled lakes and rivers, and extremely diverse environments. It is assumed that natural nuclear reactors operated everywhere on the primordial continent because concentrations of radioactive elements were high. The ocean was extremely acidic ($\text{pH} < 0.1$) and toxic (rich in heavy metals), with ultra-high salinity (about 10 times the current level).

はまるで異なった環境であった。図 1 は冥王代地球表層の復元図である (Santosh *et al.*, 2017; Kitadai and Maruyama, 2018)。海洋は pH が 0.1 以下で、現在の塩分濃度 10 倍をもつ猛毒であり、大気に酸素はなく、清浄な水は内陸湖と河川水に限られた。大陸を構成する岩石は、月面に

残された原初大陸と酷似した岩石群である。冥王代は現在よりもマントルの温度が約 300°C 高温であったために、コマチアイト質の火山活動が活発だった。表層は、アノーソサイト、コマチアイトや KREEP 玄武岩で覆われ、ウラン鉱床が原初大陸に散在し、至るところに小規模な自然原子

炉が存在した。自然原子炉は無数の間欠泉を駆動したと思われる (Ebisuzaki and Maruyama, 2017)。

戒崎および丸山により提案された自然原子炉間欠泉の概要 (図 2A) を以下に簡潔に解説する。地下に複数の洞窟があり、洞窟間の境界が狭く、くびれた連結部があると、「間欠泉」が生まれる条件が揃う。ただし、熱源が必要である。熱源は火山のマグマや自然原子炉が担う。熱によって、ドメインのなかの水が 100°C に熱せられると、沸騰し、体積が瞬時に 1,000 倍になるので、その洞窟の水は膨張して地表に噴き出す。地下の隣り合う洞窟にも、自然原子炉胚胎洞窟から高温の熱水が流入するが、くびれの程度に応じた程度に収まり、直上に割れ目があると、そこから地表に大噴水が発生する。その水循環の流路に理想的な岩石 (複数の鉱物から構成され、無機的な栄養塩 (例えばリン) を含む) を配置すると、そこが原始生命誕生場となる。

ミラーの実験以降、生命誕生に至る前駆的化学進化実験がなされ、無機物質 (大気と海洋成分) からアミノ酸や簡単なタンパク質 (スクレオチド) や膜構成物質をつくる化学反応実験がなされてきた。それらを吟味すると、同一の環境場 (例えば酸素濃度が一定) でそれらの有機物を合成することは不可能で、多様な環境場での化学反応が必要である (Kitadai and Maruyama, 2018)。多様な環境場とは、すなわち、(1) 酸化場 (表層)、(2) 超還元場 (無酸素で水素ガスが安定な地下の洞窟)、(3) 乾湿サイクル、(4) 清浄・中性の水、(5) 強アルカリ (pH が約 10; 地下の洞窟の壁岩に橄欖石があると水素ガスが発生し、水は蛇紋石の形成と同時にアルカリになる)、(6) 栄養塩供給岩石 (アノーソサイト, KREEP 玄武岩, コマチアイト)、(7) 強力な外部エネルギー照射 (自然原子炉) である。(8) 大気や海洋の主要成分 (CO_2 , H_2 , N_2) は地表では熱力学的に安定なので、ほとんど、化学反応が起きない。これらからアンモニアやシアン化水素、メタンや一酸化炭素を合成し、アミノ酸やペプチドをつくるには太陽光のエネルギーでは不十分である。そこで、強

力かつ夜昼の区別なく、常に高エネルギーの電離放射線の照射を可能にする自然原子炉が必要になる。自然原子炉 (ウラン鉱床) はまた、熱エネルギーを生み出すので、環境条件の異なる領域 (ドメイン=洞窟) を地下流路で連結し、原始生命誕生に必要な物質・エネルギー循環を駆動し、理想の生命誕生場をつくりだす。この時に重要なのが、生物の体に必須となる P, Ca, K などの栄養塩の供給である。それを可能にしたのが、アノーソサイト (カルシウム, モリブデン), KREEP 玄武岩 (リン, カリウム, 金属タンパク質の形成に必要な遷移金属元素), コマチアイト (橄欖石が約 6 割を占める, クロムやニッケル, コバルトを供給) である (Ebisuzaki and Maruyama, 2017)。

現在の地球表層は、きわめて多様な環境であるが、上述したアノーソサイト, KREEP 玄武岩やコマチアイトの露出は全世界でもきわめて稀である。しかし、冥王代類似表層環境が長野県白馬地域の蛇紋岩熱水系で発見された (図 2B)。この環境には、きわめて特殊な微生物群が棲息しており、これらの微生物群集の特徴は、「生きている環境化石微生物生態系」として捉えることができ、ここに CPR バクテリアのファミリーの 1 つである白馬 OD1 をメタゲノム法にて見いだすに至ったのである。

III. 生命の系統樹と CPR バクテリア

白馬 OD1 を含む CPR バクテリアの進化系統樹上の特徴について解説する。まず CPR (Candidate phyla radiation) は、2015 年に Brown らによって提唱されたバクテリアグループの新しい名称である (Brown *et al.*, 2015)。それまでは、Woese らによって、真正細菌、古細菌、真核生物の 3 つのグループに分類されていたが、Brown らは CPR という巨大なファミリーを提案したのである。図 3 に最新の知見に基づく生命の系統樹 (Hug *et al.*, 2016) を模式的に示している。確認しておきたいが、地球上の生物は大きくバクテリア (真正細菌), アーキア (古細菌), 真核生物の 3 つのドメインに分けられるが、図を一見してわ

図 2 自然原子炉間欠泉モデルと冥王代類似環境。(A) 自然原子炉間欠泉モデル。冥王代の原初大陸上で普遍的に存在する自然原子炉と間欠泉が組み合わせることによって、エネルギー・物質循環環境が形成され、生命誕生に向けた化学進化が進行したと考えられる。自然原子炉で発せられる電離放射線は、化学反応を促進する。そこで生成された多様な物質は、間欠泉の稼働によって、酸化場（表層環境）と還元場（間欠泉内部）、乾湿環境などの異なるドメインの間での循環が可能になる。こうした過程でさまざまな物質が混合し反応することによって、より高次の有機化合物の合成へ至る (Ebisuzaki and Maruyama, 2017)。(B) 現在の地球における冥王代類似環境。長野県白馬地域には、蛇紋岩熱水系が存在し、そこには CPR バクテリアの一種である Hakuba OD1 が生息している。蛇紋岩熱水環境は、遊離酸素がほとんどない水素環境を形成しており、これは冥王代の間欠泉内部ときわめて類似した環境である。

Fig. 2 Nuclear geyser model and pseudo-Hadean environment. (A) Nuclear geyser model. The combination of natural nuclear reactors and geysers, which were universal on the primordial Hadean continent, drove energy-material circulation, which promoted the chemical evolution that resulted in the birth of life. Ionizing radiation from natural reactors promoted key chemical reactions. The various substances generated then circulated between different domains, such as oxidation sites (surface environments), reduction sites (inside the geysers), and dry/wet environments, driven by the energy of the geysers. The mixing and reactions of various substances during these processes led to the synthesis of organic compounds of increasing complexity (Ebisuzaki and Maruyama, 2017). (B) Hadean-like environment on present-day Earth. A hydrothermal system developed in serpentine in the Hakuba area of Nagano Prefecture, Japan, containing Hakuba OD1, a CPR bacterium. The hydrothermal system has generated a hydrogen-rich environment with almost no free oxygen, similar to the environment of Hadean nuclear geysers.

図 3 生物の系統樹における CPR バクテリアの位置づけ。生命の三大ドメインであるバクテリア (Bacteria: 真正細菌), アーキア (Archaea: 古細菌), そして真核生物 (Eukarya) の系統関係を示す (Hug *et al.* (2016) *Nature Microbiology*, 1, 4-5 を改変)。系統樹の葉の色はそれぞれ、紫色が CPR バクテリア, 緑色がその他のバクテリア, 橙色がアーキア, 青色が真核生物を表す。代表的なバクテリア門, アーキアの上門, および CPR 内の 4 つの系統群を黒色の文字で示している。CPR バクテリアにおいて, 星印のついた分類名は, 本論文において著者が仮に命名したものである。

Fig. 3 Position of CPR bacteria on the tree of life. Phylogenetic relationships among the three domains of life: Bacteria, Archaea, and Eukarya (Hug *et al.* (2016) *Nature Microbiology*, 1, 4-5, modified). Leaves are colored as follows: purple (CPR bacteria), green (other bacteria), orange (Archaea), and blue (Eukarya). Major bacterial phyla, archaeal superphyla, and four groups of CPR are noted in black text. *Divisions 1 and 2 are group names given tentatively in this paper.

かるように、このなかでもバクテリアは独自のドメインを形成している。その一方で、アーキアと真核生物はきわめて進化的な距離が近いところに各ドメインが存在している。さらに、バクテリアドメインがこれまでに報告されてきたプロテオバクテリア門やファーミキューテス門、アクチノバクテリア門などを含む系統関係と、新しく提唱された CPR バクテリアの系統関係に大きく二分されていることがわかる。CPR のクレードには門レベルに相当するグループが数十個含まれると推定されており、このような推定上の門は候補門 (Candidate phyla) と呼ばれる。それらが系統

樹上で放射状に枝を広げる様子から、Candidate phyla radiation という名称がつけられた。系統学的な分析は CPR がその他のバクテリアと初期に分岐したことを示唆しており、CPR がバクテリア、ひいては初期生命の進化を追究する上で重要な存在であることを示している。CPR のなかにはパークバクテリア (Parcuprobia) とマイクロジェノメイト (Microgenomates) と呼ばれる 2 つの大きなグループが存在し、CPR 内の候補門の半分以上はこのいずれかに属する。また本稿では、2 つのグループのいずれにも属さないバクテリアを便宜上、区分 1 と区分 2 (Division

1 と Division 2) と表している (図 3)。パーク
 バクテリアとマイクロジェノメイトは、当初、
 OD1 や OP11 と呼ばれていたものが 2013 年に
 Rinke らによって新たに命名されたものである
 (Rinke *et al.*, 2013)。OD1 と OP11 それぞれの
 成り立ちについては後述する。

ここで、より正確な理解のために、系統樹の作
 成に関して簡単に説明しておきたい。系統樹は生
 物の類縁関係や進化的な道筋を示すものである。
 DNA の塩基配列やタンパク質のアミノ酸配列な
 どは一定の速度で変化していると仮定すれば、各
 種生物間で配列の変化量を比較検討することで、
 祖先からの分岐年代を測定することが可能となる
 (分子時計と呼ばれる)。分子時計を用いて系統解
 析を行う際には、生物間で保存された (どの種に
 もあることがわかっている) タンパク質を複数使
 うような場合や、非常に保存性の高いリボソーム
 RNA (rRNA) の配列を使うことが多い。ここ
 で、リボソームはすべての生物の細胞内に存在し、
 mRNA の情報をタンパク質へと変換する高分子
 複合体であり、大小 2 つのサブユニットで構成さ
 れる (図 4)。原核生物の場合、大サブユニット
 (50S サブユニット) 23S rRNA と 5S rRNA、お
 よび約 30 個のリボソームタンパク質で構成され
 ており、一方、小サブユニット (30S サブユニッ
 ト) 16S rRNA と約 20 個のリボソームタンパク
 質で構成される。rRNA をコードする遺伝子は生
 物間で高い保存性をもち、それに加えて変異しや
 すい部位も有している。その配列には種レベルで
 の差異が認められることから、配列の比較による
 系統解析にもっとも適していると考えられてきた。

IV. 極小のバクテリアの発見

1998 年、Hugenholtz らは米イエローストーン
 国立公園内の熱水泉である Obsidian Pool (OP)
 から得た堆積物をサンプルとして、培養に依存し
 ない微生物の検出を試みた (Hugenholtz *et al.*,
 1998)。すなわち、サンプルから DNA を直接抽
 出し、16S rRNA 遺伝子領域を特異的に増幅させ
 た後に塩基配列を読みとり、系統樹を作成して
 類縁関係を解析した (上述のメタゲノム法)。結

図 4 原核生物のリボソームとその構成成分。原核生
 物の細胞内に存在するリボソームの構造を模式
 的に示した (左図)。リボソームは 2 つのサブユ
 ニット (50S 大サブユニット (青色) および 30S
 小サブユニット (緑色)) から構成され、各々の
 サブユニットは特定のリボソーム RNA (rRNA)
 およびリボソームタンパク質群からなる複合体
 である。サブユニットの大きさの単位となっ
 ている S 値は超遠心分離における沈降係数である。

Fig. 4 Prokaryotic ribosome and its components. Schem-
 atic illustration of prokaryotic ribosomal structure
 (left) and components of each subunit (right).
 The prokaryotic ribosome consists of a 50S large
 subunit (blue) and a 30S small subunit (green),
 and each subunit is a complex of specific ribosom-
 al RNAs (rRNAs) and ribosomal proteins. The
 Svedberg unit (S-value) is a unit of sedimenta-
 tion and is used to describe ribosomal subunits
 and rRNAs.

果、既知のバクテリアと合致しない 38 個の 16S
 rRNA 遺伝子配列がみつかり、12 群 (OP1 ~
 12) に分類された。その 1 つである OP11 は、
 これまでのバクテリア 16S rRNA 遺伝子配列と
 の類似性がとくに低く、新規のバクテリアであ
 ると考えられた。これが、現在 CPR バクテリアと
 して呼称されるバクテリアの最初の報告となった。
 その後、2004 年に Harris らは 17 種類の環境サ
 ンプルを対象として 16S rRNA 遺伝子解析を行
 い、Hugenholtz らが発見した OP11 に近縁な配
 列を多数取得した (Harris *et al.*, 2004)。彼らは
 系統解析によってこれをさらに OP11, OD1,
 SR1 の 3 つの群に分類した。これらの報告以降
 もさまざまな環境を対象とした 16S rRNA 遺伝
 子解析が行われ、従来のような培養・単離による
 手法ではみつからなかった数多くのバクテリアが
 発見された。とくに OD1 と OP11 に属するバク
 テリアが数多く発見されたことで、この 2 つは非
 常に大きな系統群であることがわかった。前章で
 述べた通り、2013 年にはそれぞれパークバクテ

リアとマイクロジェノメイトとして新たな名称が与えられ、後に CPR が提唱された際にはその大部分を構成することとなった。CPR バクテリアはさまざまな環境に存在している。例えば OD1 は、河川水 (Ntougias *et al.*, 2016; Reis *et al.*, 2016; Proctor *et al.*, 2018), 湖水 (Briee *et al.*, 2007; Borrel *et al.*, 2010; Peura *et al.*, 2012; Rinke *et al.*, 2013; Wurzbacher *et al.*, 2017; Tandon *et al.*, 2018), 海水 (Kirkpatrick *et al.*, 2006), 地下水 (Gihring *et al.*, 2011; Nelson and Stegen, 2015; Anantharaman *et al.*, 2016; Burstein *et al.*, 2016; Wrighton *et al.*, 2016; Ludington *et al.*, 2017), 硫黄泉 (Hugenholtz *et al.*, 1998; Elshahed *et al.*, 2005; Coveley *et al.*, 2015), 熱水噴出孔 (Rinke *et al.*, 2013), 河川や海底の堆積物 (Kantor *et al.*, 2013; Baker *et al.*, 2015; Leon-Zayas *et al.*, 2017; Kato *et al.*, 2018), 土壌 (Correa-Galeote *et al.*, 2016; Frey *et al.*, 2016; Finstad *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2017), 油田 (Hu *et al.*, 2016), 浄水槽 (Mei *et al.*, 2016; Speth *et al.*, 2016; Bruno *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2017) などから検出されている。通常は、CPR バクテリアが環境中の微生物群集で多数を占めているわけではなく、相対存在量は数%程度である。しかしながら、ある特殊な環境下では OD1 が群集の大半を占めるという稀有な例も存在する。それは米・カリフォルニアにあるシダーズ地区 (The Cedars) 地下深部に由来する湧水で、そこでは OD1 が群集の約 60% を占めることがわかっている (Suzuki *et al.*, 2017)。この水は蛇紋岩化反応が活発な地下水に由来し、栄養分が乏しく強アルカリ性という一種の極限環境を形成している。この事実、少なくともシダーズ地区の OD1 は寄生性のバクテリア (後述) でなく、自由生活性バクテリアであることを示唆しているように考えられる。

OD1 が極小の微生物であるとの報告は最初に日本からなされた (Miyoshi *et al.*, 2005)。2005 年に広島大学の長沼らは岐阜県東濃地区のウラン鉱床、深層地下水に由来する 16S rRNA 遺伝子解析によって、OD1 および OP11 に分類される

図 5 CPR バクテリアは極小のバクテリアである。CPR バクテリアとバクテリアの代表種である大腸菌 (*Escherichia coli*) の大きさを比較している。CPR バクテリアの図はクライオ電子顕微鏡の画像 (Luef *et al.* (2015) *Nature Communications*, 6, 1-8) を模式的に示した。スケールバー: 0.2 μm.

Fig. 5 CPR bacteria are ultra-small bacteria. Comparison of cell sizes of a typical CPR bacterium (left) and *Escherichia coli* (right). The image of the CPR bacterium is drawn with reference to a cryo-electron-microscopic image (Luef *et al.* (2015) *Nature Communications*, 6, 1-8). Scale bar, 0.2 μm.

バクテリアを検出した。彼らはサンプル水を孔径 0.2 μm と 0.1 μm のフィルターで順に濾過し、それぞれのフィルターで捕捉された微生物を回収して分析を行った。そうしたところ、既知のバクテリアが孔径 0.2 μm のフィルターから検出されたのに対し、孔径 0.1 μm のフィルターからは OD1 や OP11 に分類されるバクテリアが検出された。この事実は、OD1 や OP11 が既知のバクテリアと比べて細胞が小さいことを示唆していた。その後も複数の研究において、CPR バクテリアが孔径 0.2 μm のフィルターを通過したサンプル中に豊富であることが報告されている (Brown *et al.*, 2015; Luef *et al.*, 2015; Proctor *et al.*, 2018)。近年になって、このようなサンプルをクライオ電子顕微鏡で観察したところ、細胞の短径が 0.2 μm 前後であることが確かめられた (図 5) (Luef *et al.*, 2015)。バクテリアの代表種である大腸菌 (*Escherichia coli*) の大きさは 0.5 μm × 1 ~ 3 μm であるから、比較すると CPR バクテリアの細胞は、非常に小さなものであることがわかる。CPR バクテリアのサイズは *E. coli* よりも約 1 桁小さく、体積に換算すると *E. coli* の約 1,000 分

の1になり、遺伝子数や代謝の機能が限られていることを示唆している。

V. CPR バクテリアのゲノム解析

2010 年以降、超並列シーケンサーの急激な発展によって CPR バクテリアのゲノム解析は花開くことになる。すなわち、系統学的な位置だけではなく、CPR バクテリアがどのような遺伝子を有しているかという情報が得られるようになった。2012 年には OD1 に属するバクテリアのドラフトゲノムが初めて構築された (Wrighton *et al.*, 2012)。DNA シーケンサーと情報解析技術、この両方の発達に伴いゲノム再構築の効率や精度が向上すると、CPR バクテリアのドラフトゲノムの報告数は増加し、ついには完全長のゲノムも報告されるようになった。2018 年 11 月 9 日時点で利用可能な完全長ゲノムの数は計 18 個あり (表 1)、いずれも公開データベースである NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank において参照可能となっている。その内訳は、パークバクテリア (OD1) に属するものが 3 個、マイクロジェノメイト (OP11) に属するものが 3 個、区分 1 に属するものが 11 個、区分 2 に属するものが 1 つである。

ゲノム情報がある程度蓄積されてくると、CPR バクテリアのゲノムは、ある特徴を有することがわかってきた。まず、ゲノムサイズが非常に小さい。図 6A は CPR バクテリア (表 1 の 18 ゲノム) および自由生活性のバクテリア 11 種について、ゲノムサイズとゲノムから推定されるタンパク質 (ここではオープンリーディングフレーム (ORF) 数を比較したものである。代表的なバクテリアでプロテオバクテリア門に属する大腸菌 (*Ec*) ゲノムサイズはおおよそ 4.6 Mbase (メガベース) あり、約 4,500 個のタンパク質をコードしている。また、アクチノバクテリア門に属するストレプトマイセス・グリセウス (*Sg*) ような 10 Mbase 近いバクテリア (約 7,200 個のタンパク質をコード) が存在するなかで、どの CPR バクテリアもおおよそ 0.6 ~ 1.3 Mbase のゲノムサイズ (ドラフトゲノムも含めれば、おおよそ

0.4 ~ 1.5 Mbase と推定される) で、数百から千個強のタンパク質をコードしているばかりである。また、このグラフからバクテリアのゲノムサイズとコードされるタンパク質数がほぼ相関していることがわかる。さらに、既知のバクテリアのなかでも、共生あるいは寄生性のバクテリアは小さいゲノムを有することが知られており、図 6B ではそれらの代表種 5 つと CPR バクテリアを比較した場合、CPR バクテリアのゲノムサイズがやや大きい、同程度であることが示された。

CPR バクテリアの少なくとも一部では、すべての生物で保存されている rRNA 遺伝子にも特徴を有する。図 7 は、図 6 と同じバクテリア群を用いて、16S rRNA 遺伝子、23S rRNA 遺伝子、および 5S rRNA 遺伝子の配列長を比較したものである。例えば、既知のバクテリアの 16S rRNA 遺伝子のサイズは、各バクテリアのゲノムサイズに関わらず約 1,500 塩基であったのに対し、CPR バクテリアでは約 1,400 ~ 4,400 塩基と、かなりの幅があった。また、23S rRNA 遺伝子のサイズは、既知のバクテリアでは約 3,000 塩基長であるのに対して、CPR バクテリアでは約 5,000 塩基にも及ぶものが存在していた。ここで、一部の CPR バクテリアの 16S rRNA 遺伝子および 23S rRNA 遺伝子には、転写後に除去される大きな挿入配列 (イントロン) があることが報告されている (Brown *et al.*, 2015)。現状では、これらイントロンをすべての CPR バクテリアで明確に定義することができていないために、図 7 では 16S rRNA も 23S rRNA も、イントロンを含んだままのサイズで示している。CPR バクテリアの有するサイズの大きな rRNA に関しては、イントロン除去後には既知のバクテリアの有する rRNA と同程度の長さになると考えられる。一方で、CPR 区分 2 の WWE3 バクテリアが有する小さいサイズの 16S rRNA 遺伝子に関しては、CPR バクテリアの一部は、既知のバクテリアよりも小型な rRNA をもつことを示しており、この情報が、比較ゲノム解析による 16S rRNA の保存領域の推定に有用となるだろう。また、5S rRNA 遺伝子長に関しては、既知のバクテリア

表 1 完全長ゲノムが決定された CPR バクテリア (2018 年 12 月現在).

Table 1 List of complete genomes of CPR bacteria (Dec. 2018).

Group	Organism	GenBank assembly accession	Genome size (Mega base)	Source	Reference
Parcubacteria	Parcubacteria bacterium RAAC4_OD1_1	GCA_000505065.1	0.69	Sediment	Kantor <i>et al.</i> , 2013
	Candidatus Campbellbacteria bacterium GW2011_OD1_34_28	GCA_001029775.1	0.75	Ground water	Brown <i>et al.</i> , 2015
	Candidatus Wolfebacteria bacterium GW2011_GWB1_47_1	GCA_001029635.1	0.98	Ground water	Brown <i>et al.</i> , 2015
Microgenomates	Candidatus Beckwithbacteria bacterium GW2011_GWC1_49_16	GCA_001029675.1	1.05	Ground water	Brown <i>et al.</i> , 2015
	Candidatus Woesebacteria bacterium GW2011_GWF1_31_35	GCA_001029755.1	0.82	Ground water	Brown <i>et al.</i> , 2015
	Candidate division TM6 bacterium GW2011_GWF2_28_16	GCA_001029715.1	0.85	Ground water	Brown <i>et al.</i> , 2015
Division 1	Candidatus Saccharibacteria bacterium GW2011_GWC2_44_17	GCA_001029695.1	1.04	Ground water	Brown <i>et al.</i> , 2015
	Candidate division Kazan bacterium GW2011_GWA1_50_15	GCA_001029795.1	0.60	Ground water	Brown <i>et al.</i> , 2015
	Berkelbacteria bacterium GW2011_GWE1_39_12	GCA_001029735.1	0.92	Ground water	Brown <i>et al.</i> , 2015
	Candidate division SR1 bacterium RAAC1_SR1_1	GCA_000503875.1	1.18	Sediment	Kantor <i>et al.</i> , 2013
	Candidatus Saccharibacteria bacterium RAAC3_TM7_1	GCA_000503915.1	0.85	Sediment	Kantor <i>et al.</i> , 2013
	Candidatus Peribacter riflensis	GCA_001430885.1	1.25	Ground water	Anantharaman <i>et al.</i> , 2016
	Candidatus Peribacter riflensis	GCA_001430755.1	1.25	Ground water	Anantharaman <i>et al.</i> , 2016
	Candidatus Peribacter riflensis	GCA_001430845.1	1.25	Ground water	Anantharaman <i>et al.</i> , 2016
	Candidatus Peribacter riflensis	GCA_001430805.1	1.25	Ground water	Anantharaman <i>et al.</i> , 2016
	Candidatus Peribacter riflensis	GCA_001430905.1	1.25	Ground water	Anantharaman <i>et al.</i> , 2016
	Candidatus Saccharimonas aalborgensis	GCA_000392435.1	1.01	Activated sludge	Anantharaman <i>et al.</i> , 2016
Division 2	Candidate division WWE3 bacterium RAAC2_WWE3_1	GCA_000503835.1	0.88	Sediment	Kantor <i>et al.</i> , 2013

図 6 CPR バクテリアとその他のバクテリアのゲノムサイズと遺伝子数の関係。CPR バクテリア 18 系統と既知のバクテリア 16 種（自由生活性 11 種，寄生・共生性 5 種）のゲノムサイズとタンパク質コード領域（ORF）の数との関係を示す。CPR バクテリアは黒丸，自由生活性バクテリアは白三角，共生性バクテリアは白四角で示している。(A) CPR バクテリアと既知の自由生活性バクテリアを比較した図。(B) CPR バクテリアと既知の共生性バクテリアを比較した図であり，縦軸・横軸の範囲は A の点線内部を反映している。Hi: インフルエンザ菌，Ec: 大腸菌，Sg: ストレプトマイセス・グリセウス，Wp: ボルバキア・ピピエンティス，Cr: カルソネラ・ルディアイ，Kb: CPR 区分 1 のカザンバクテリア，OD1 (RAAC4): CPR パークバクテリア OD1 (RAAC4)，Rp: リケッチア・プロワゼキ，Pr: CPR 区分 1 のペリバクター・リフレンシス。

Fig. 6 Relationship between genome size and gene number in CPR and other bacteria. Scatterplot of genome sizes and numbers of protein-coding genes (open reading frames, ORFs) of 18 CPR bacteria and 16 known representative bacteria (11 free-living and five symbiotic or parasitic bacteria). Black dots, open triangles, and open squares denote CPR bacteria, known free-living bacteria, and known symbiotic or parasitic bacteria, respectively. (A) CPR bacteria and known free-living bacteria. (B) CPR bacteria and known symbiotic or parasitic bacteria. The box corresponds to the inset in (A). Hi: *Haemophilus influenzae*; Ec: *Escherichia coli*; Sg: *Streptomyces griseus*; Wp: *Wolbachia pipientis*; Cr: *Carsonella ruddii*; Kb: Kazan bacterium (CPR Division 1); OD1 (RAAC4): CPR parcubacteria OD1 (RAAC4); Rp: *Rickettsia prowazekii*; Pr: *Peribacter rificensis* (CPR Division 1).

では約 120 塩基であるが，CPR バクテリアでは 107 ～ 117 塩基の長さであり，それほどの差は見うけられない。

VI. CPR バクテリアは主要な代謝酵素を欠いている

CPR バクテリアが数少ない遺伝子でどのように生きているかを明らかにするため，ゲノムの塩基配列から推定されるタンパク質の機能を考えることで，CPR バクテリアがもつ代謝経路を予測することが試みられている (Wrighton *et al.*, 2012; Kantor *et al.*, 2013; Brown *et al.*, 2015; Nelson and Stegen, 2015; Castelle *et al.*, 2017; Danczak *et al.*, 2017)。ここで，完全長ゲノムや精度の高いドラフトゲノムがある場合には，代謝系全体をある程度予測しモデル化することができ

る (Wrighton *et al.*, 2012; Kantor *et al.*, 2013; Castelle *et al.*, 2017; Danczak *et al.*, 2017)。既知のバクテリアでは広く保存されている代謝経路や生合成経路に関わる酵素などが，CPR バクテリアでは部分的あるいは完全に欠けていると報告されている。表 2 および図 8 は，CPR バクテリア全体もしくは CPR 内の複数の門において，欠けていると推定されているタンパク質の例と，これに該当する反応系が代謝地図上でどこにあるのかを大まかに示している。なかでもとくに重要なものとして，トリカルボン酸 (tricarboxylic acid; TCA) 回路や電子伝達系といったエネルギーを生み出すための経路や，アミノ酸やヌクレオチド，脂肪酸など細胞を構成する上で不可欠な物質を生合成する経路に関わるものがあげられる。これらは昆虫の共生細菌など，一部の偏性細胞内寄生体

図 7 CPR バクテリアとその他のバクテリアのリボソーム RNA 遺伝子配列長の比較。各バクテリアのゲノムサイズとリボソーム RNA 遺伝子 ((A) 16S rRNA, (B) 23S rRNA, (C) 5S rRNA) の配列長の関係を示す。CPR バクテリアは黒丸, 自由生活性バクテリアは白三角, 共生性バクテリアは白四角で示される。微生物名の略称は図 5 のレジェンドを参照のこと。Wb: CPR マイクロジェノメイト ウーズバクテリア, WWE3: CPR 区分 2 WWE3 バクテリア, Bb: CPR 区分 1 バーケルバクテリア, SR1: CPR 区分 1 SR1 バクテリア, Dr: デイノコッカス・ラディオデュランス。

Fig. 7 Comparison of ribosomal RNA gene lengths in CPR bacteria and other bacteria. Scatterplot of genome sizes and lengths of ribosomal RNA genes. (A) 16S rRNA gene, (B) 23S rRNA gene, and (C) 5S rRNA gene. Black dots, open triangles, and open squares denote CPR bacteria, known free-living bacteria, and known symbiotic or parasitic bacteria, respectively. Wb: Woesebacteria (CPR Microgenomates), WWE3: WWE3 bacterium (CPR Division 2); Bb: Berkelbacteria (CPR Division 1); SR1: SR1 bacterium (CPR Division 1); Dr: *Deinococcus radiodurans*. For other abbreviations, see Figure 5 legend.

では欠落している例も報告されているが、門レベルといった広い範囲での欠落は既知のバクテリアではみられない。それでは、CPR バクテリアの細胞内ではどのように代謝が回っているのだろうか。多くの CPR バクテリアで共通する代謝系(嫌気発酵, ATP シンターゼ, およびアミノ酸やヌクレオチド, 脂肪酸などの合成)に焦点を合わせて解説したい。

代謝系の重要な役割の 1 つにエネルギーの獲得がある。ATP (エネルギー源) を得る機構の 1 つである解糖系はグルコースがグルコース-6-リン酸となり、最終的にピルビン酸を生じる経路であり、呼吸代謝 (TCA サイクルおよび電子伝達系) あるいは嫌気発酵の前段階となっている (図 8)。ここで、解糖系を構成する酵素は CPR バクテリアの大部分において保存されていることが知られている (Wrighton *et al.*, 2012; Castelle *et al.*, 2017; Danczak *et al.*, 2017; Kato *et al.*, 2018)。一方、前述のように、CPR バクテリアは呼吸代謝に関わる酵素の大部分をもたないため、呼吸を行わずに嫌気発酵によってエネルギーを獲得していると推測できる。その裏づけとして、ほとんどの CPR バクテリアは代表的な嫌気発酵である乳酸発酵経路とエタノール発酵経路のいずれかもしくは両方を有している。乳酸発酵はピルビン酸を乳酸に、エタノール発酵はピルビン酸から変換された Acetyl-CoA をエタノールに代謝する経路であり、いずれも解糖系で NAD^+ から生

表 2 CPR バクテリアで欠落しているおもなタンパク質の例.

Table 2 Example of the major proteins lacked in CPR bacteria.

Category	Proteins
Nucleotide biosynthesis pathway	Adenylosuccinate synthase Phosphoribosylglycinamide synthase Phosphoribosylformylglycinamidine synthase
Nucleotide salvage pathway	AMP Phosphorylase Ribose isomerase Nucleoside Phosphorylase
Amino acids biosynthesis and metabolism	Glutamine synthetase Tryptophan synthase alpha chain Tyrosine aminotransferase
Fatty acids metabolism	Acetyl CoA acetyltransferase Acyl CoA Dehydrogenase Acyl CoA synthetase
Phospholipid biosynthetic pathway	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase Glycerol acyltransferase
Mevalonate pathway	Phosphomevalonate carboxylase Mevalonate-3-phosphate 5-kinase
Gluconeogenesis	Fructose-1 6-bisphosphatase Phosphoenolpyruvate carboxykinase
Pyruvate metabolism	Phosphoenolpyruvate carboxylase Pyruvate dehydrogenase
TCA cycle	Citrate Synthase Succinate Dehydrogenase Fumarate hydratase
Oxidative phosphorylation chain	Complex I (NADH Dehydrogenase) Complex II (Succinate Dehydrogenase) Cytochrome c
Complex carbon compounds degradation	Exoglucanase Galactosidase Xylosidase
Acetate metabolism	Phosphotransacetylase Acetate kinase
Flagella	Flagella protein Preflagellin peptidase

じた NADH を酸化して再び NAD^+ を供給することで、解糖系による ATP の産生を維持する働きをもつ。また CPR バクテリアは、Acetyl-CoA を酢酸に代謝して ATP を産生する経路も有している。CPR バクテリアのなかには特定のアミノ酸をピルビン酸に変換する酵素の遺伝子を有するものもあり、アミノ酸の一部をエネルギー代謝に利

用している可能性も指摘されている。

また、CPR バクテリアの多くは細胞膜で働く ATP シンターゼの遺伝子を有している。通常、この酵素が ATP 合成を行うには電子伝達系によって形成される細胞膜内外のプロトン濃度勾配が必要となるが、前述の通り CPR バクテリアは電子伝達系をもたない。一方、パークバクテリアの一

図 8 CPR バクテリアは主要な代謝酵素を欠いている。CPR バクテリアの中心代謝系を模式的に示した。主要な代謝経路を青色の文字で、CPR バクテリアの大部分で欠如している経路を赤いバツ印で示している。G6P: グルコース-6-リン酸, F6P: フルクトース-6-リン酸, F1,6BP: フルクトース-1,6-ビスリン酸, GAP: グリセルアルデヒド-3-リン酸, 1,3-BPG: 1,3-ビスホスホグリセリン酸, 3PG: 3-ホスホグリセリン酸, 2PG: 2-ホスホグリセリン酸, PEP: ホスホエノールピルビン酸。Cx I: 複合体 I (NADH デヒドロゲナーゼ), Cx II: 複合体 II (コハク酸デヒドロゲナーゼ), Cx III: 複合体 III (シトクロム bc1 複合体), Cx IV: 複合体 IV (シトクロム c オキシダーゼ)。

Fig. 8 CPR bacteria lack major metabolic enzymes. Schematic model of central metabolic pathways of CPR bacteria. Major metabolic pathways are colored blue, and pathways lacking CPR bacteria are marked with a red cross mark. G6P: glucose 6-phosphate; F6P: fructose 6-phosphate; F1,6BP: fructose 1,6-bisphosphate; GAP: glyceraldehyde 3-phosphate; 1,3-BPG: 1,3-bisphosphoglycerate; 3PG: glycinate 3-phosphate; 2PG: 2-phosphoglycerate; PEP: phosphoenolpyruvate; Cx I: complex I (NADH dehydrogenase); Cx II: complex II (succinate dehydrogenase); Cx III: complex III (cytochrome bc1 complex); Cx IV: complex IV (cytochrome c oxidase).

部などは膜結合型のヒドロゲナーゼの遺伝子をもっている (Wrighton *et al.*, 2014; Castelle *et al.*, 2017, 2018; Danczak *et al.*, 2017), ヒドロゲナーゼを介して膜外にプロトンを排出することで濃度勾配を形成し ATP 合成を行なっている可能性がある。その他の大多数の CPR バクテリアに関しては、電子伝達系に代わるプロトン濃度勾配の形成機構はみつかっていない。勾配を形成する未知の機構が存在するのか、あるいは ATP シンターゼによる ATP 合成が行われていないのかは不明である。

アミノ酸やヌクレオチド、脂肪酸などの合成もまた、エネルギーの獲得と並んで重要な代謝の役割である。アミノ酸とヌクレオチドはそれぞれタンパク質と核酸 (DNA・RNA) の合成に、脂肪酸は細胞膜の主要成分であるリン脂質の合成に必要となる。CPR バクテリアのほとんどはアミノ酸とヌクレオチド、脂肪酸の生合成に関わる酵素を欠くため、他の方法でこれらの物質を獲得する必要がある。例えばアミノ酸とヌクレオチドの場合は、外部からとり込んだタンパク質や核酸を細胞内で分解している可能性が考えられる。CPR バクテリアは膜輸送タンパク質や多数のプロテアーゼ、ヌクレアーゼをコードする遺伝子を有しており、それらの機能によって外部環境からの物質のとり込みや分解を行なっていると考えられる。脂肪酸についても、細胞の外部から他生物やその残骸に由来するものを取り込んでいると推測される。

以上が CPR バクテリアで一般的とみられる代謝機構であるが、これにあてはまらず、CPR バクテリアの大部分がもつ遺伝子をもたない系統も存在する。例えば CPR に含まれる候補門のうち、区分 1 の BD1-5 や区分 2 の WS6 に属するバクテリアは解糖系の一部を欠如しており、WS6 と区分 1 の Kazan に属するバクテリアは ATP シンターゼの遺伝子を有していない。一方で CPR バクテリアの大部分がもたない遺伝子や代謝経路をもつものも存在し、区分 1 の PER に属するバクテリアはアミノ酸とヌクレオチドの生合成経路を、パークバクテリアのなかの 1 種として発見された *Parcunitro bacter nitroensis* は電子伝達

系を有している。さらには、個々のゲノムから推測される代謝系だけでは、その生存機構を説明できないバクテリアも存在する。例えば、先に述べたシダーズ地区の OD1 については、周囲の環境からエネルギーを得ていることを示唆する報告がある (Suzuki *et al.*, 2017)。前述の通り、シダーズ地区の地下水は活発な蛇紋岩化反応 (カンラン岩などが水と反応し蛇紋岩となる反応) により強アルカリ性となった極限環境である。栄養源が乏しいため、通常であれば CPR バクテリアのエネルギー獲得系の中心と考えられる嫌気発酵経路は使えない。また、シダーズ OD1 が群集の大半を占めていることから、他生物との共生関係にあり、エネルギーは宿主側に提供してもらうといったようなストーリーにも無理がある。ここで、シダーズ OD1 は地下水中で鉱物粒子の表面に局在していることが示されており、この粒子はおもにケイ素、鉄、マグネシウムで構成されることからカンラン石もしくは蛇紋石と推定されている。そこから、シダーズ OD1 は、鉱物表面に付着することで蛇紋岩化反応に依存したエネルギーの獲得を行っているという仮説が生じる。蛇紋岩化反応の過程では水素とメタンが発生することが知られており、これらの物質は、ATP シンターゼの駆動に必要なプロトン濃度勾配を形成するための電子伝達において、電子供与体として利用することができる。すなわち、シダーズ OD1 は何らかの機構で蛇紋岩化反応の産物を利用し、ATP シンターゼを駆動している可能性がある。その一方で、シダーズの地下水環境には電子受容体となる物質が乏しく、排出したプロトンが維持されにくい還元的环境でもあるため、ATP 産生の機構を十分に説明することは現段階では難しい。またシダーズ OD1 のなかには ATP シンターゼを有さないバクテリアもみつかっており、まったくの未知のエネルギー獲得機構が存在する可能性も指摘されている。シダーズ OD1 は他の CPR バクテリアと同様にアミノ酸や核酸、脂肪酸の生合成経路も欠如しているが、これらの物質をどのように得ているか、そこに蛇紋岩化反応が関連しているのかは不明である。

VII. 考察とまとめ

CPR バクテリアが、上記のように小型かつ生存に重要とされる遺伝子を数多く欠落したゲノムをもつ背景として、おもに以下 2 つの可能性があげられる。(1) このバクテリアが原始のバクテリアゲノムを少なくとも一部反映しており、微生物の進化初期から現在に至るまで小さなゲノムを有している可能性 (先天的進化形態)。(2) 共生などの生活様式により徐々に遺伝子を失ってきた可能性 (後天的進化形態)。しかしながら、いずれも証拠づけられるには至っていない。本稿で説明した CPR バクテリアのゲノムサイズが共生・寄生性のバクテリアに近いという事実や、最重要の物質であるスクレオチド等の代謝系を欠いたものがあるという事象 (Brown *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2017; Castelle *et al.*, 2018)、さらには、既知のバクテリアより小さい孔径のフィルターを通り抜けることによって、大型の細菌を除去して結果的に濃集され検出できた事実を考えると、CPR バクテリアは既知の生物の内部共生体ではなく、自身以外の何らか (それが他の生物種でも環境由来の物質でも) に依存した生存機構をもつ可能性がある。ここで、シダーズ OD1 のように、このバクテリアが特定の環境に適応した優占種となっていることや、環境と関連した生存機構を示唆する例があることは、その依存性が他の生物種でなく、環境であることを示唆しているように思われる。想像を逞しくして考えれば、現在の寄生性バクテリアは、生命の維持に関して特定の生物種の細胞に依存しているが、CPR バクテリアにおいては依存する対象が環境なのではないかと考えられるのである。

また、現在の分子進化研究は多くの場合、分子時計が一定のスピードで進むことを前提としているように思われる。しかしながら、生物化石の研究からは、特定の生物種が特定の時期 (環境) に絶滅に至ったり、爆発的な進化を起こしたりすることがよく知られている。すなわち、分子時計は一定のスピードではなく、環境に依存したスピードで進んでいるということである。環境が安定で

変化に乏しい深海などでは分子進化時計の進みは遅く、そのことが生きた化石であるシーラカンスの現在での生存を可能にしていると考えられるのである。このように考えると、地球の歴史上で実際に存在した環境と原始微生物との対応関係を明らかにしなければ生命の起源研究には至らないことになる。前述したように、CPR バクテリアが欠く代謝系は、現在の多くのバクテリアにとって生命活動を司るために中心的な役割を有しているので、欠いた代謝系の代わりとして環境由来の物質が関与しているとなれば、特殊な環境で中心的な代謝に関わる生体分子がいかにつくられ、バクテリアに提供されうるのかという考察に通じ、さらには生物進化に先んじて起こった化学進化を生物がどのようにとり入れていったかということを示す直接的な例になるかもしれない。すなわち、冥王代の類似環境とそこで生息している CPR バクテリアの研究が、生命の起源を考えることに他ならないことに気づく。一方で、冥王代の類似環境で新しい原始生命体が生まれているということはない。現在は、前述したような自然原子炉に基づく化学進化のためのエネルギー源が存在しないことが一番の理由である。また、本研究遂行のためには、必要な CPR バクテリアのゲノム情報がまだまだ不足している状況にある。完全長の配列には限りがあり、大規模な比較解析はドラフトゲノムや部分ゲノムに頼るところが大きい。今後より多くの CPR バクテリアの完全長配列を決定し、最小となる遺伝子セットの同定を行いつつ、その全体像に迫っていく必要があるだろう。

謝 辞

本内容に関して議論に応じていただいた慶應義塾大学先端生命科学研究所 RNA グループの皆様には感謝いたします。また一部の図版については、佐藤友彦氏にご提供いただきました。本研究は、科学研究費助成事業（新学術領域研究「冥王代生命学の創成（課題番号 26106002 ならびに課題番号 26106003）」の助成をうけています。

文 献

- Anantharaman, K., Brown, C.T., Hug, L.A., Sharon, I., Castelle, C.J., Probst, A.J., Thomas, B.C., Singh, A., Wilkins, M.J., Karaoz, U., Brodie, E.L., Williams, K.H., Hubbard, S.S. and Banfield, J.F. (2016): Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. *Nature Communications*, **7**, 13219.
- Baker, B.J., Lazar, C.S., Teske, A.P. and Dick, G.J. (2015): Genomic resolution of linkages in carbon, nitrogen, and sulfur cycling among widespread estuary sediment bacteria. *Microbiome*, **3**, 14.
- Borrel, G., Lehours, A.C., Bardot, C., Bailly, X. and Fonty, G. (2010): Members of candidate divisions OP11, OD1 and SR1 are widespread along the water column of the meromictic Lake Pavin (France). *Archives of Microbiology*, **192**, 559–567.
- Brie, C., Moreira, D. and Lopez-Garcia, P. (2007): Archaeal and bacterial community composition of sediment and plankton from a suboxic freshwater pond. *Research in Microbiology*, **158**, 213–227.
- Brown, C.T., Hug, L.A., Thomas, B.C., Sharon, I., Castelle, C.J., Singh, A., Wilkins, M.J., Wrighton, K.C., Williams, K.H. and Banfield, J.F. (2015): Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain Bacteria. *Nature*, **523**, 208–211.
- Bruno, A., Sandionigi, A., Rizzi, E., Bernasconi, M., Vicario, S., Galimberti, A., Cocuzza, C., Labra, M. and Casiraghi, M. (2017): Exploring the under-investigated “microbial dark matter” of drinking water treatment plants. *Scientific Reports*, **7**, 44350.
- Burstein, D., Sun, C.L., Brown, C.T., Sharon, I., Anantharaman, K., Probst, A.J., Thomas, B.C. and Banfield, J.F. (2016): Major bacterial lineages are essentially devoid of CRISPR-Cas viral defence systems. *Nature Communications*, **7**, 10613.
- Castelle, C.J., Brown, C.T., Thomas, B.C., Williams, K.H. and Banfield, J.F. (2017): Unusual respiratory capacity and nitrogen metabolism in a Parcubacterium (OD1) of the Candidate Phyla Radiation. *Scientific Reports*, **7**, 40101.
- Castelle, C.J., Brown, C.T., Anantharaman, K., Probst, A.J., Huang, R.H. and Banfield, J.F. (2018): Biosynthetic capacity, metabolic variety and unusual biology in the CPR and DPANN radiations. *Nature Reviews Microbiology*, **16**, 629–645.
- Correa-Galeote, D., Bedmar, E.J., Fernandez-Gonzalez, A.J., Fernandez-Lopez, M. and Arone, G.J. (2016): Bacterial communities in the rhizosphere of amilaceous maize (*Zea mays* L.) as assessed by pyrosequencing. *Frontiers in Plant Science*, **7**, 1016.
- Coveley, S., Elshahed, M.S. and Youssef, N.H. (2015): Response of the rare biosphere to environmental stressors in a highly diverse ecosystem (Zodletone spring, OK, USA). *PeerJ*, **3**, e1182.
- Danczak, R.E., Johnston, M.D., Kenah, C., Slattery,

- M., Wrighton, K.C. and Wilkins, M.J. (2017): Members of the Candidate Phyla Radiation are functionally differentiated by carbon- and nitrogen-cycling capabilities. *Microbiome*, **5**, 112.
- Ebisuzaki, T. and Maruyama, S. (2017): Nuclear geyser model of the origin of life: Driving force to promote the synthesis of building blocks of life. *Geoscience Frontiers*, **8**, 275–298.
- Elshahed, M.S., Najar, F.Z., Ayccock, M., Qu, C., Roe, B.A. and Krumholz, L.R. (2005): Metagenomic analysis of the microbial community at Zodletone Spring (Oklahoma): insights into the genome of a member of the novel candidate division OD1. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 7598–7602.
- Finstad, K.M., Probst, A.J., Thomas, B.C., Andersen, G.L., Demergasso, C., Echeverria, A., Amundson, R.G. and Banfield, J.F. (2017): Microbial community structure and the persistence of cyanobacterial populations in salt crusts of the hyperarid Atacama Desert from genome-resolved Metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 1435.
- Frey, B., Rime, T., Phillips, M., Stierli, B., Hajdas, I., Widmer, F. and Hartmann, M. (2016): Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers. *FEMS Microbiology Ecology*, **92**(3).
- Gihring, T.M., Zhang, G., Brandt, C.C., Brooks, S.C., Campbell, J.H., Carroll, S., Criddle, C.S., Green, S.J., Jardine, P., Kostka, J.E., Lowe, K., Mehlhorn, T.L., Overholt, W., Watson, D.B., Yang, Z., Wu, W.M. and Schadt, C.W. (2011): A limited microbial consortium is responsible for extended bioreduction of uranium in a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**, 5955–5965.
- Handelsman, J. (2004): Metagenomics-application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**, 669–685.
- Harris, J.K., Kelley, S.T. and Pace, N.R. (2004): New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 845–849.
- Hu, P., Tom, L., Singh, A., Thomas, B.C., Baker, B.J., Piceno, Y.M., Andersen, G.L. and Banfield, J.F. (2016): Genome-resolved metagenomic analysis reveals roles for candidate phyla and other microbial community members in biogeochemical transformations in oil reservoirs. *MBio*, **7**(1), e01669–01615.
- Hug, L.A., Baker, B.J., Anantharaman, K., Brown, C.T., Probst, A.J., Castelle, C.J., Butterfield, C.N., Hermsdorf, A.W., Amano, Y., Ise, K., Suzuki, Y., Dudek, N., Relman, D.A., Finstad, K.M., Amundson, R., Thomas, B.C. and Banfield, J.F. (2016): A new view of the tree of life. *Nature Microbiology*, **1**, 16048.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K.L. and Pace, N.R. (1998): Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *Journal of Bacteriology*, **180**, 366–376.
- Kantor, R.S., Wrighton, K.C., Handley, K.M., Sharon, I., Hug, L.A., Castelle, C.J., Thomas, B.C. and Banfield, J.F. (2013): Small genomes and sparse metabolisms of sediment-associated bacteria from four candidate phyla. *MBio*, **4**(5), e00708–00713.
- Kato, S., Shibuya, T., Takaki, Y., Hirai, M., Nunoura, T. and Suzuki, K. (2018): Genome-enabled metabolic reconstruction of dominant chemosynthetic colonizers in deep-sea massive sulfide deposits. *Environmental Microbiology*, **20**, 862–877.
- Kirkpatrick, J., Oakley, B., Fuchsman, C., Srinivasan, S., Staley, J.T. and Murray, J.W. (2006): Diversity and distribution of Planctomycetes and related bacteria in the suboxic zone of the Black Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**, 3079–3083.
- Kitadai, N. and Maruyama, S. (2018): Origins of building blocks of life: A review. *Geoscience Frontiers*, **9**, 1117–1153.
- Leon-Zayas, R., Peoples, L., Biddle, J.F., Podell, S., Novotny, M., Cameron, J., Lasken, R.S. and Bartlett, D.H. (2017): The metabolic potential of the single cell genomes obtained from the Challenger Deep, Mariana Trench within the candidate superphylum Parcubacteria (OD1). *Environmental Microbiology*, **19**, 2769–2784.
- Ludington, W.B., Seher, T.D., Applegate, O., Li, X., Kliegman, J.I., Langelier, C., Atwill, E.R., Harter, T. and DeRisi, J.L. (2017): Assessing biosynthetic potential of agricultural groundwater through metagenomic sequencing: A diverse anammox community dominates nitrate-rich groundwater. *PLoS One*, **12**(4), e0174930.
- Luef, B., Frischkorn, K.R., Wrighton, K.C., Holman, H.Y., Birarda, G., Thomas, B.C., Singh, A., Williams, K.H., Siegerist, C.E., Tringe, S.G., Downing, K.H., Comolli, L.R. and Banfield, J.F. (2015): Diverse uncultivated ultra-small bacterial cells in groundwater. *Nature Communications*, **6**, 6372.
- Mei, R., Narihiro, T., Nobu, M.K., Kuroda, K. and Liu, W.T. (2016): Evaluating digestion efficiency in full-scale anaerobic digesters by identifying active microbial populations through the lens of microbial activity. *Scientific Reports*, **6**, 34090.
- Miyoshi, T., Iwatsuki, T. and Naganuma, T. (2005): Phylogenetic characterization of 16S rRNA gene clones from deep-groundwater microorganisms that pass through 0.2-micrometer-pore-size filters. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1084–1088.
- Nelson, W.C. and Stegen, J.C. (2015): The reduced genomes of Parcubacteria (OD1) contain signatures of a symbiotic lifestyle. *Frontiers in Microbiology*, **6**, 713.
- Ntougias, S., Polkowska, Z., Nikolaki, S., Dionysopoulou, E., Stathopoulou, P., Doudoumis, V., Ruman, M., Kozak, K., Namiesnik, J. and Tsiamis, G. (2016): Bacterial community structures in freshwater polar environments of Svalbard. *Microbes and Environ-*

- ments, **31**, 401–409.
- Peura, S., Eiler, A., Bertilsson, S., Nykanen, H., Tirola, M. and Jones, R.I. (2012): Distinct and diverse anaerobic bacterial communities in boreal lakes dominated by candidate division OD1. *ISME Journal*, **6**, 1640–1652.
- Proctor, C.R., Besmer, M.D., Langenegger, T., Beck, K., Walser, J.C., Ackermann, M., Burgmann, H. and Hammes, F. (2018): Phylogenetic clustering of small low nucleic acid-content bacteria across diverse freshwater ecosystems. *ISME Journal*, **12**, 1344–1359.
- Reis, M.P., Dias, M.F., Costa, P.S., Avila, M.P., Leite, L.R., de Araujo, F.M.G., Salim, A.C.M., Bucciarelli-Rodriguez, M., Oliveira, G., Chartone-Souza, E. and Nascimento, A.M.A. (2016): Metagenomic signatures of a tropical mining-impacted stream reveal complex microbial and metabolic networks. *Chemosphere*, **161**, 266–273.
- 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. and Woyke, T. (2013): Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*, **499**, 431–437.
- Santosh, M., Arai, T. and Maruyama, S. (2017): Hadean Earth and primordial continents: The cradle of prebiotic life. *Geoscience Frontiers*, **8**, 309–327.
- Speth, D.R., In 't Zandt, M.H., Guerrero-Cruz, S., Dutilh, B.E. and Jetten, M.S. (2016): Genome-based microbial ecology of anammox granules in a full-scale wastewater treatment system. *Nature Communications*, **7**, 11172.
- Suda, K., Ueno, Y., Yoshizaki, M., Nakamura, H., Kurokawa, K., Nishiyama, E., Yoshino, K., Hongoh, Y., Kawachi, K., Omori, S., Yamada, K., Yoshida, N. and Maruyama, S. (2014): Origin of methane in serpentinite-hosted hydrothermal systems: The CH₄–H₂–H₂O hydrogen isotope systematics of the Hakuba Happo hot spring. *Earth and Planetary Science Letters*, **386**, 112–125.
- Suzuki, S., Ishii, S., Hoshino, T., Rietze, A., Tenney, A., Morrill, P.L., Inagaki, F., Kuenen, J.G. and Nealson, K.H. (2017): Unusual metabolic diversity of hyperalkaliphilic microbial communities associated with subterranean serpentinization at The Cedars. *ISME Journal*, **11**, 2584–2598.
- Tandon, K., Yang, S.H., Wan, M.T., Yang, C.C., Baatar, B., Chiu, C.Y., Tsai, J.W., Liu, W.C. and Tang, S.L. (2018): Bacterial community in water and air of two sub-alpine lakes in Taiwan. *Microbes and Environments*, **33**, 120–126.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S. and Banfield, J.F. (2004): Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature*, **428**, 37–43.
- Wrighton, K.C., Thomas, B.C., Sharon, I., Miller, C.S., Castelle, C.J., VerBerkmoes, N.C., Wilkins, M.J., Hettich, R.L., Lipton, M.S., Williams, K.H., Long, P.E. and Banfield, J.F. (2012): Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla. *Science*, **337**, 1661–1665.
- Wrighton, K.C., Castelle, C.J., Wilkins, M.J., Hug, L.A., Sharon, I., Thomas, B.C., Handley, K.M., Mullin, S.W., Nicora, C.D., Singh, A., Lipton, M.S., Long, P.E., Williams, K.H. and Banfield, J.F. (2014): Metabolic interdependencies between phylogenetically novel fermenters and respiratory organisms in an unconfined aquifer. *ISME Journal*, **8**, 1452–1463.
- Wrighton, K.C., Castelle, C.J., Varaljay, V.A., Satogopan, S., Brown, C.T., Wilkins, M.J., Thomas, B.C., Sharon, I., Williams, K.H., Tabita, F.R. and Banfield, J.F. (2016): RubisCO of a nucleoside pathway known from Archaea is found in diverse uncultivated phyla in bacteria. *ISME Journal*, **10**, 2702–2714.
- Wurzbacher, C., Nilsson, R.H., Rautio, M. and Peura, S. (2017): Poorly known microbial taxa dominate the microbiome of permafrost thaw ponds. *ISME Journal*, **11**, 1938–1941.
- Xu, D., Liu, S., Chen, Q. and Ni, J. (2017): Microbial community compositions in different functional zones of Carrousel oxidation ditch system for domestic wastewater treatment. *AMB Express*, **7**(1), 40.
- Zhou, Y.J., Li, J.H., Ross Friedman, C. and Wang, H.F. (2017): Variation of soil bacterial communities in a chronosequence of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) plantations. *Frontiers in Plant Science*, **8**, 849.