環境ゲノム情報時代の 未知微生物探索研究

玉木秀幸*¹, 鎌形洋一*^{1, 2}

21世紀最初の10年は、環境微生物学・微生物生態学における第二の革命期であったと言えるだろう。言うまでもなく、それは次世代シーケンサーの登場とそれを活用した環境ゲノム解析技術の驚くべき発展によるものである。1990年代の16S rRNA遺伝子に基づいた培養に依存しない複合微生物系解析技術の誕生による第一の革命期から、大規模シーケンシング技術による環境ゲノム科学の時代を経て、今後期待される第三の革命は何であろうか。筆者らは、環境微生物の分離培養技術の革新がそれにあたるのではないかと考えている。本稿では、環境ゲノム解析の現状を概観しつつ、この大規模シーケンシング解析時代の中で少しずつ光の見てきた未知微生物探索の現状と課題について述べる。

次世代シーケンサーを活用した環境ゲノム解析の現状

はじめに、次世代シーケンシング技術の誕生によって飛躍的進展を遂げた環境ゲノム解析の現状について触れて

おきたい。ご存知のように、いわゆる次世代シーケンシング技術というのは、サンガー法（第一世代）に替わる新たなシーケンシング技術（第二世代：逐次DNA合成と光検出法を活用した超並列シーケンシング技術）であり、環境微生物学・微生物生態学の分野ではRoche社製の454、Illumina社製のGenome AnalyzerやHiSeqシリーズが頻繁に用いられている。RocheもIlluminaも次々とモデルチェンジを加えており、たとえば454の場合、454 GS20（総塩基配列量20 Mbp、平均長～100 bp）→454 GS FLX（100 Mbp、～250 bp）→454 GS FLX Titanium（500 Mbp、～400 bp）→454 GS FLX Plus（500 Mbp、～700 bp）へと、わずか5年程度で読解可能な塩基配列の量と長さが大幅に改善されている。特に、最新バージョンは、次世代シーケンシング技術における最大の欠点であった短い配列長の問題を解決しており、もはやサンガー法と同等もしくはそれ以上の配列長を得ることができる。また低価格化の動きも顕著で、たとえば筆者が在籍していた米国の某州立大学の場合、454 FLX Plusを用いて500 Mbpの配列を得るのにわずか60万円程度で済む。2005年頃までは、サンガー法を使用していたために、資金的に環境ゲノム解析を実施できるのは

Exploration of Unseen Organisms in the Era of Environmental Metagenomics

Hideyuki TAMAKI, Yoichi KAMAGATA, ¹産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門, ²北海道大学 農学研究院応用生命科学部門

図1 ■ 次世代シーケンス技術を活用した新しい分子生態学的アプローチ

ほんの一握りの研究者だけであったが、次世代シーケンス技術の革新により、今や多くの研究者が環境ゲノム解析を実施できる環境が整いつつある。さらに近年、1分子の配列を増幅せずに解読する新しいシーケンス技術（第三世代）の開発が精力的に行われており⁽¹⁾、今後、さらに大量のシーケンス情報をさらに低価格で取得できる時代になることは間違いない。

このような背景から、この10年間、環境微生物学・微生物生態学も大きな変貌を遂げてきており、次世代シーケンス技術を活用した新たなアプローチが誕生している（図1）。まず、16S rRNAの超並列タグシーケンス法である⁽²⁾。この手法は、DNA抽出と16S rRNAあるいはその遺伝子をPCR増幅するところまでは従来法と同様であるが、その後、クローニング作業などを経ることなく、直接、次世代シーケンス技術により大量の配列を迅速に解読するというものである。さらに、PCR用プライマーに各々のサンプルに応じたバーコード（タグ）配列を付与しておくことで、複数のサンプルを同時に多重配列解読することができる。これにより、多数の環境試料中の膨大な16S rRNA遺伝子を同時に多重解析することが初めて可能となり、迅速かつ簡便に、そしてこれまでにない高解像度で対象環境の微生物群の

多様性、分布、個体群動態を半定量的に明らかにすることができるようになった。

時を合わせて大規模メタゲノム解析が新たな潮流を形成しつつある⁽³⁾。メタゲノム解析とは環境中から直接抽出したゲノムDNAの塩基配列を次世代シーケンス技術などで決定し、系統と機能の両面から対象環境の微生物生態系をまるごと解明しようとするものである。これにより、各種環境の遺伝子情報プロファイルの作製が可能になり、各々の代謝ポテンシャルを推定すると同時に、メタゲノム情報をもとに異なる環境生態系をさまざまな視点で比較解析することが可能となった。また、未知微生物が優占しているような環境を解析対象とする場合には、メタゲノム配列のアッセンブルによって未知微生物由来のドラフトゲノム情報が取得でき、その未知機能の解明が進められている。実際に、鉱山廃水流路内のバイオフィルムに優占する未知アーキア（ARMAN）⁽⁴⁾やリン除去廃水処理システムにおいて主要な役割を担う未培養リン蓄積細菌（PAO）⁽⁵⁾、さらには海洋や淡水環境においてメタン酸化プロセスに関与する未知細菌‘*Candidatus Methyloirabilis oxyfera*’⁽⁶⁾やアーキア（ANME）⁽⁷⁾などの新たな生物機能がメタゲノム解析によって次々と明らかにされている。メタトランスクリプ

トーム解析は、抽出した全RNAをcDNAにした後に次世代シーケンス解析をするもので、ゲノム・メタゲノム解析により検出された各種遺伝子や代謝ポテンシャルが実際に環境中で発現しているかどうかをこれまでにない解像度で明らかにできる⁽³⁾。また、最近、本解析によって初めて、微生物生態系においてsmall RNAが何らかの重要な役割を果たしている可能性が示され⁽⁸⁾、その未知機能に高い関心が集まっている。そして、ここ数年の間に急速に確立されつつあるのがシングルセルゲノミクスである⁽⁹⁾。シングルセルゲノミクスは、マニピュレーターやフローサイトメーターなどを駆使して対象微生物株を1～10細胞程度回収し、そこからゲノムDNAを抽出・増幅して、未知微生物のゲノムを決定しようとするものである。従来法は非常に煩雑で高度な技術が必要であったが、現在、米国Bigelow海洋研究所や同国エネルギー省の共同ゲノム研究所(JGI: Joint Genome Institute)はロボティクスを活用したハイスループットシステムを開発している⁽¹⁰⁾。実際に解読可能なゲノム断片長にやや問題があるものの、迅速かつ簡便にシングルセルゲノミクスを実施できる環境が整備されつつある。

このような微生物集団を遺伝子プールとしてとらえて未知微生物群の実体を解明しようとする環境ゲノム解析は、米国を中心に盛んに行われてきた。これはとりもなおさず、環境微生物集団の統合的理解がエネルギー・環境・気候変動などのグローバルな問題の解決の鍵になるという認識に基づいて、国を挙げて取り組もうとする意思の表れである。海洋環境を対象としたGlobal Ocean Sampling Expedition (GOS)⁽¹¹⁾や土壌環境を対象としたTerragenomeプロジェクト(<http://www.terragenome.org/>)などはその代表例であり、膨大なゲノム・遺伝子断片情報が蓄積されてきている。またごく最近になって、地球上の多種多様な環境からなんと20万種ものサンプルを収集し、環境ゲノム情報と各種環境因子(メタデータ)を統合的に解析するプロジェクト(Earth Microbiome Project: <http://www.earthmicrobiome.org/>)が始まり、すでに5万サンプルが解析に供されている。現在、さらに、シングルセルゲノミクス技術を駆使し、100以上の門レベルの未培養系統群のゲノム情報を網羅することを目的としたUncultured GEBA (Genomic Encyclopedia for Bacteria and Archaea)プロジェクトが進行している。もしこのUncultured GEBAプロジェクトが成功すれば、門レベルの未培養系統群の基本的な代謝様式や機能が明らかにされる可能性があり、さらにゲノム・遺伝子データベースが拡充され、より高精度なメタゲノム・メタトランスクリプトーム解

析が可能になりうることから、非常に高い関心と期待を集めている。このように膨大かつ多様なゲノム、遺伝子情報が蓄積されてきている中で、21世紀以降、未知微生物探索はどのような進展をしてきたのであろうか。次節以降、この10年の歩みを振り返ってみたい。

未知微生物探索—21世紀最初の10年の歩み—

1. どのくらいの微生物の培養が可能になったのか

地球上にはどのくらいの微生物種が存在しているのだろうか。そして、これまでにどのくらいの微生物の培養が可能になったのであろうか。有性世代をもたない微生物(原核生物)の種の定義についてはさまざまな議論があるが、現在最も汎用されているSSU rRNA (small subunit ribosomal RNA) 遺伝子に基づいた分子遺伝学的解析結果に基づいた推定によると、土壌1グラムだけで100万種のオーダーで存在するのではないかとされている⁽¹²⁾。この値の真偽は定かではないが、昆虫でさえも100万を下らない種が存在するという事実を考えても、地球環境に生息する微生物の種数は100万種を優に超えることが容易に想像できる。一方で、2011年10月現在において正式な学名登録がなされた微生物の種数はおよそ1万種である(図2)。仮に、地球上の微生物の種数を少なく見積もって100～1000万種としても、

図2 ■ 各分類レベルにおける原核生物学名の登録数の推移 (図はList of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (LPSN, <http://www.bacterio.cict.fr/>) のデータを用いて作成した)

現在、純粋分離が可能となった微生物種の割合は0.1～1%に過ぎない。もちろん、実際には、培養されているが正式な学名登録がなされていない微生物種も数多く存在する。それでも100万種という数字には全く到達しない数であることは明らかである。

その一方で、1980年代以降の微生物の学名登録数の推移(図2)を見ていくと、2001年以降、新属、新種ともにその登録数が顕著に増えていることがわかる。実際に、1991～2000年の年間平均登録数が41属、194種なのに対して、2001～2010年では92属、478種と実に2.2～2.5倍の増加率を示している。また、2001年までに登録された微生物種の数はおおよそ5000種だったが、2001年以降の10年間でその数に匹敵する微生物種が新たに登録されている。高次分類群(科、目、綱)の学名登録数も2001年以降顕著に増加してきている(図2)。このように微生物の学名登録数が近年増加している背景には、SSU rRNA 遺伝子に基づいた分子系統分類学の導入によって、微生物系統分類学の専門家に限らず、多くの微生物学研究者が分離した菌株の系統学的新規性を客観的かつ迅速に評価できるようになったことが挙げられる。つまり、微生物のインベントリー作成方法が明瞭に整理され、それまで煩雑であった微生物学名の記載登録がかなり一般的に行われるようになったのである。特に、門、綱、目、科などの高次分類群レベルでの微生物の系統分類は、SSU rRNA 遺伝子という指標ができて初めて実現可能になったと言える。しかし、微生物学名登録数が伸びている理由はそれだけではない。この10年の間にさまざまな創意工夫を凝らした新しい培養法が開発・提案され、新規微生物の培養に至るケースが高まってきていることも理由の一つとして挙げられる。こ

こからは2001年以降のおおよそ10年という歳月のなかでどのような未知微生物が実際に分離培養され、またどのような新しい培養手法の開発に向けた取組みがなされてきているのかについて触れていきたい。

2. 高次分類基準で新規な微生物の可培養化—新門微生物の分離培養化と新門提案—

21世紀最初の10年において、未知微生物探索における特筆すべき成果の一つは、門レベルで新規な微生物の分離培養化と新しい門(新門)の学名提案である。門(phylum)は、原核生物の系統分類体系において、バクテリアドメインならびにアーキアドメインでは実質的に最も上位の分類階級にあたる。つまり、新しい門に属する、ということは系統学的に極めて新しい微生物であることを意味している。

門レベルの未培養系統群、いわゆる候補門(candidate phylum)について体系的な整理がなされたのは1998年のことである。候補門とは、純粋分離培養株の存在しない、環境クローン配列のみからなる門レベルの系統群のことである。1998年、Hugenholtzは膨大な環境クローン配列情報をもとに詳細な分子系統解析を行い、バクテリアドメインだけで門レベルの系統群が36存在し、そのうちの14門が純粋分離株の存在しない候補門であることを初めて示した⁽¹³⁾。その後、門レベルの未培養系統群が次々と見いだされ、その数は26門(2003年)から80門(2005年)へと急増し、現在は100門以上(2011年現在)存在すると推定されている。このことから、地球上にはいかに多様な未知微生物が存在するかおわかりいただけると思う。また、同時に、門レベルで見ると、これまでいかに系統的に偏った細菌し

図3 ■ 16S rRNA 遺伝子に基づいた純粋分離株の存在する門の分子系統樹(太い文字は2001年以降新門提案された系統群を示す)

か分離されてこなかったかという事実が浮き彫りになる。実際、これまで登録されてきたおよそ1万種の細菌種のうち、実に90%以上が、*Proteobacteria*門、*Firmicutes*門、*Bacteroidetes*門、*Actinobacteria*門、*Cyanobacteria*門のわずか5つの門に集約されているのである。

しかしながら、この10年間、地道に行われてきた未知微生物探索の結果として、門レベルで新しい微生物の純粋分離がなされ、それまで実体のなかった6つの候補門 (candidate phylum) が正式に新しい門として提案、認定されている (図3)。そのうち、実に半数の3門は日本人研究者の手によって純粋分離に成功し、新門提案がなされている。以下に、新門微生物の分離培養化についてその多様な生理機能を交えて概説したい。

1) *Gemmatimonadetes* phyl. nov. (2003年)

Gemmatimonadetes 門は、純粋分離の成功によってその学名が正式に提案・認定された世界初の細菌門である⁽¹⁴⁾ (図3, 図4)。この門は、それまで、遺伝子レベルでは存在が予見されていたものの機能の全く不明な門レベルの未培養系統群 (Candidate phylum BD あるいはKS-Bと呼ばれていた) であったが、この純粋分離の成果ならびに現在進行中のゲノム解析によって、初めてその実体の一部が明らかにされつつある。この門を代表する基準菌種 *Gemmatimonas aurantiaca* はどのように分離されたのだろうか。当時、筆者らは、活性汚泥内においてリン除去に重要な役割を果たすポリリン酸蓄積細菌の純粋分離に力を入れて取り組んでいた。ポリリン酸蓄積細菌は増殖速度が非常に遅く、現在でも分離培養の困難な微生物の一つである。われわれは、ポリリン酸を蓄積している細菌はほかの多くの従属栄養細菌より“重い”のではないかと考え、分散させた活性汚泥を低速遠心処理することによってより“重い細菌種”のみを集め、それを分離源として純粋分離を試みた。さらに、通常よりも薄い栄養培地で長期間の培養を実施した結果と

して得られたポリリン酸蓄積細菌の一つがこの *G. aurantiaca* である。この *G. aurantiaca* は狙って分離されたものではないが、漫然と通常の培養法を繰り返しては決して分離できなかった微生物である。16S rRNA 遺伝子情報から、*Gemmatimonadetes* 門は *Proteobacteria* 門に匹敵する多様性があると推定されており、実際に多種多様な環境からその16S rRNA 遺伝子が検出されている。しかしながら、いまだ学名の記載された種は *G. aurantiaca* の1種のみであり、この門の機能的多様性については全く未知であることを付しておきたい。

2) *Lentisphaerae* phyl. nov. (2004年)

Gemmatimonadetes 門の次に新門提案・認定されたのが *Lentisphaerae* 門である⁽¹⁵⁾ (図3)。当時、Giovannoniらの研究グループは、海洋細菌を効率良く分離培養化するためのハイスループット培養法 (後述のHTC法) を開発しており、この手法を最大限活用し、低栄養条件下 (炭素源として0.001~0.002%という低濃度条件) で海水試料を限界希釈培養することによって、本門に属する2株の海洋細菌の分離に成功している。いずれの2株も、高い溶存炭素濃度では生育が著しく阻害される典型的な低栄養細菌であり、菌体外にスライム状の多糖類を分泌するという特徴を有している。この2株の詳細な性状解析がなされたことにより、VadinBE97という候補門に対して正式な学名 *Lentisphaerae* 門が提案、認定されている。

3) *Thaumarchaeota* phyl. nov. (2008年)

この新門 *Thaumarchaeota* 門の学名提案のきっかけは、Marine Group I (MG I) と呼ばれる未培養アーキア系統群に属する新規アーキアの純粋分離である。MG I アーキア系統群は微生物分子生態学が誕生した当初 (1990年代初め頃) からその存在が知られており⁽¹⁶⁾、海洋環境に優占する未知アーキアとして長い間その機能に高い関心が集まっていた。2005年、Stahlらの手によ

図4 ■ 筆者らの研究グループで純粋分離に成功した新門微生物
(A) *Gemmatimonadetes* 門細菌と (B) *Armatimonadetes* 門細菌の電子顕微鏡写真。

て、ついにMG Iアーキア、*Nitrosopumilus maritimus*が純粋培養され、本アーキアが実にアンモニア酸化能を有するという驚くべき結果を報告した⁽¹⁷⁾。それまでアンモニア酸化能をもつ微生物はバクテリアドメインでしかその存在が知られておらず、アーキアがアンモニア酸化に関与するという事実は博物学的に重要なだけでなく地球規模での窒素循環を考えるうえで極めて重要な知見を提示することとなった。このアンモニア酸化アーキアの分離培養の鍵を握ったのは、分子手法により得られた数々の重要な知見である。というのも、2000年頃までにはすでにMG Iは炭酸固定能を有する独立栄養性生物である可能性が示唆されており、さらにその後のメタゲノム解析によってMG Iがアンモニア酸化酵素遺伝子(*amoA*)によく似た遺伝子を保有している可能性が示されていたからである。もちろん当時は、実際にその遺伝子がAmoAとして機能するかどうか定かではなかったが、集積培養や純粋分離を実施する際の大きなヒントになったことは容易に想像できる。このアンモニア酸化アーキアの純粋分離の後、海洋に限らず、土壌や陸水域環境においても、アンモニア酸化アーキアが窒素循環に大きな影響を及ぼしうることが次々と明らかにされている。さらに、最近になって、土壌ならびに温泉環境からそれぞれ中温性ならびに高温性のアンモニア酸化アーキアが純粋分離され^(18, 19)、*Thaumarchaeota*門アーキアの多様な機能が明らかにされつつある。実は、*Thaumarchaeota*門は正式には認定されていないが、複数の純粋分離株がすでに存在し、16S rRNA 遺伝子配列解析からも本門が新しいアーキア門であることはすでに事実上受け入れられていることから⁽²⁰⁾ (図3)、近いうちに正式認定されるものと思われる。

4) *Elusimicrobia* phyl. nov. (2009年)

昆虫はその腸内に多様な未知微生物を内包していることが知られている。なかでも、シロアリ腸内には門レベルの未培養系統群がいくつか存在しており、Termite Group I (TG I) 候補門はその代表例である。このTG I細菌がシロアリ腸内に豊富に存在することは1996年の時点ですでに知られていたが、2009年になってようやく、Bruneらの研究グループが絶対嫌気性従属栄養TG I細菌 *Elusimicrobium minutum*の純粋分離に成功し、新門*Elusimicrobia*が提案・認定された⁽²¹⁾ (図3)。長い間培養できず、難培養性と考えられていたTG I細菌の可培養化の鍵は一体何だったのであろうか。面白いことに、*E. minutum*は、分離源である腸内試料を“何も接種していない培地”に生育したのである。正確に言えば、Bruneらは“何も接種していない”と思い込んでい

たという。ところが、実際には、腸内細菌を培養するための増殖因子源として、腸内試料をホモジナイズして遠心過処理(0.2 mmフィルターろ過)した上清液を培地に添加しており、この上清液にTG I細菌が豊富に存在していたのである。このからくりはこうである。このTG I細菌はサイズが極めて小さく直径が0.17~0.3 mmほどであり、ポアサイズが0.2 mmのフィルターを通過できたために、増殖因子源として使用した腸内試料処理液の中に存在し、このことが *E. minutum* の純粋分離の鍵となったのである。これは全くの偶然によるものであるが、少なくとも増殖因子源として腸内試料のホモジナイズ処理液を使用しようとする工夫がなければ培養化に至らなかったと言えよう。

5) *Caldiserica* phyl. nov. (2009年)

米国イエローストーン国立公園にObsidian Pool (OP)と呼ばれる温泉がある。1998年、この温泉環境には極めて多様な微生物が存在し、それまで遺伝子レベルでも全く存在の知られていなかった門レベルの未培養系統群が実に7つ以上も発見された。それらがいわゆる候補門 OP1, OP3, OP5, OP8, OP9, OP10そしてOP11である。その後、温泉環境に限らず、多種多様な環境試料でOP候補門が検出されていたが、長らく全く純粋分離株の存在しない細菌候補門としてその機能はバールに包まれていた。2008年、森らは、このOP候補門細菌を世界で初めて純粋分離することに成功した。その新規細菌 *Caldisericum exile* は日本の温泉環境から分離され、OP候補門の一つであるOP5に属することが判明し、2009年に新門*Caldiserica*が正式に提案・認定された⁽²²⁾ (図3)。*C. exile*は好熱性のチオ硫酸還元細菌であり、硫黄循環に関与していると考えられている。実際に、硫黄化合物が豊富に存在する環境から、*Caldiserica*門に属する環境クローンが世界中で検出されており、少なくとも本門の一部の細菌群は硫黄循環プロセスに重要な役割を果たしている可能性がある。*C. exile*の可培養化の明確な成因は定かではないが、本菌を単離した著者によれば「自分の運を信じ、生えてくるよう培地に祈りを込める」ということらしい(私信)。

6) *Armatimonadetes* phyl. nov. (2011年)

OP候補門の一つであるOP10候補門は、世界中のさまざまな環境(土壌、河川、湖沼、海洋、底泥、植物根圏、温泉、腸内環境、堆肥、廃水処理システムなど)から比較的高いポピュレーションで検出されており、古くからその未知機能に高い関心が寄せられていた門レベルの未培養系統群である。最近、筆者らは、水生植物の根圏環境からOP10候補門に属する新規細菌 *Armatimonas*

*rosea*の純粋分離に成功し、新門*Armatimonadetes*を提案し、2011年に正式に認定された⁽²³⁾ (図3, 図4). *A. rosea*は、非常に限られた有機物しか利用できず、ペクチン、ジェランガム、キサントガムといった高分子有機物を好んで利用する。特に、寒天培地上で非常に堅いプラスチックのようなコロニーを形成するのが特徴であり、門の命名もラテン語で「鎧のように堅い」を意味する「*armatus*」に由来する。これまでOP10候補門に属する微生物は“難培養性微生物”であろうと予想されていたが、少なくとも今回発見した*A. rosea*に限っていえば“難培養性微生物”ではなかった。大腸菌や枯草菌のような培養の容易な細菌と比べれば、生育も遅く、扱いも難しい細菌ではあるが、決して“難培養性”ではなく、薄い栄養濃度の寒天培地で少し通常よりも時間をかけて培養すれば容易に生育する。それではなぜこれまで長い間OP10細菌は純粋分離されてこなかったのであろうか。もちろん偶然によるところもあるが、筆者らは、これまでの創意工夫、経験に加えて、分離源として水生植物の根圏に着目したことが分離培養に成功した大きな要因であったと考えている。水生植物に限らず、根圏環境では、植物の根から供給されるさまざまな物質によって種々の微生物の生育が支えられていることが知られており、*A. rosea*も、おそらく根圏環境で特異的な生育が起きていたことから、その後の培養が比較的容易だったのではないかと推測している。実際に、土壌や河川の水試料などを分離源として培養しても、その環境で優占する細菌はなかなか分離培養できないのが常であるが、今回の研究では、水生植物根圏に数多く生息しているような細菌を高頻度に培養できており⁽²⁴⁾、この仮説を支持するものと考えている。

3. そのほかの重要な微生物の分離培養成功事例

この10年の間、上述のような新門微生物以外にも重要な新規微生物が分離されてきているのでいくつかここで簡単に紹介したい。

アーキアドメインでは、目レベルの未培養系統群Rice Cluster I (RC I) に属する新規水素資化性メタン生成アーキアが純粋分離された。RC Iアーキアの存在もまた古くからよく知られており、長年にわたる分子生態学的解析によって、RC Iアーキアは水田や湖沼底質などの淡水域における無酸素環境において普遍的かつ高頻度に検出されるメタン生成のキープレーヤーであることが明らかにされており、地球規模での炭素循環に大きな役割を果たしている可能性から、その分離培養化には高い関心が集まっていた。2007年、井町らの研究グルー

プは、ついにこのRC Iアーキアの純粋分離に成功した^(25, 26)。その鍵は、基質となる水素の濃度にあった。通常、水素資化性のメタン生成アーキアを培養する際には、0.1 MPa程度の高濃度水素を用いるのが一般的である。しかしながら、実環境で有機物分解に伴って供給される水素濃度はせいぜい10～100 Paであり、培養環境よりも3～4桁も低い。そこで、井町らは、嫌気性共生細菌をその基質とともに培地に添加し、低濃度の水素をゆっくりと連続的に供給する「嫌気共生培養法」を考案した。つまり、実環境に近い濃度の水素の供給を微生物に委ねたのである。この方法によって、実環境に優占していたRC-Iメタン生成アーキアの純粋分離に成功している。また同研究グループは、同様の方法で、科レベルで新規なメタン生成アーキア (*Methanolineaceae* fam. nov.) の分離にも成功している⁽²⁷⁾。

バクテリアドメインでは、まず、SAR11系統群細菌が挙げられる。SAR11は1990年に発見された*Alphaproteobacteria*綱の未培養系統群の一つであり、海水環境で最も優占し（海水環境中の微生物群集の25%を占める）、地球上で最も数の多い細菌種（ 10^{28} 個）であると推定されている。そのため、SAR11は海洋環境の炭素循環に大きな役割を果たしていると考えられている。このように海水環境で最大優占種でありながらも長い間全く培養することができなかったが、2002年にGiovannoniらの研究グループは、SAR11細菌を世界で初めて純粋分離することに成功し⁽²⁸⁾、*Pelagibacter ubique*（海洋に普遍的に存在する細菌）という学名を提案している。SAR11細菌の純粋培養の鍵は、培地として海水そのものを滅菌して使用したこと、FISH法を活用して濁度として検知できないレベルの増殖をとらえて継代培養したこと、後述のHTC法を活用したこと、の3点が挙げられる。実際に、*P. ubique*は0.001%のペプトンを添加するだけで著しく生育が阻害される絶対貧栄養性細菌であり、従来用いられてきた培地成分が増殖を阻害していたために培養できなかったと考えられている。*P. ubique*の純粋分離を通して、本細菌のゲノムサイズが自由生活型の単細胞生物としては最小の1.3 Mbpであること⁽²⁹⁾、またプロテオロドプシンと呼ばれる特殊な光依存性プロトンポンプを有しており、その働きによって代謝エネルギーを供給し、海洋生態系に大きな影響を与えうることなど⁽³⁰⁾、非常にユニークで地球化学上重要な特徴が明らかにされている。

*Verrucomicrobia*門細菌と*Acidobacteria*門細菌は世界中の多様な環境中に棲息し、量的にも比較的高い優占度で存在しているにもかかわらず、培養頻度の非常に低い

細菌系統群としてよく知られている。2001年の時点で、たとえば*Proteobacteria*門では1800以上の種が存在する一方で、*Verrucomicrobia*門と*Acidobacteria*門はそれぞれわずか5種ならびに3種と非常に少なく、機能未知な系統群であった。今なお培養頻度が低いことに変わりはないが、この10年、両門に属する多様な新規細菌が土壌環境、温泉環境、水生植物の根圏環境などから次々と分離されてきている^(31~34)。特に、*Verrucomicrobia*門に属する2種の好氣的メタン酸化細菌(*Methylokorus infernorum*, *Acidimethylosilex fumarolicum*)の発見は驚くべきもので、2007年12月6日号のNatureに二つの論文が相次いで掲載された^(35, 36)。それまで好氣的メタン酸化細菌(13属)は*Proteobacteria*門でしかその存在が知られておらず、地球生物化学的研究でも*Proteobacteria*門細菌のみを対象にして展開されており、*Verrucomicrobia*門という門レベルで異なる系統群にメタン酸化能を有する細菌が存在することなど全く予想されていなかった。実際に、これまでメタン酸化細菌群集の多様性解析によく利用されてきた機能遺伝子で、メタンモノオキシゲナーゼのサブユニットをコードする*pmoA*遺伝子の配列が、*Verrucomicrobia*門の新規細菌では非常に特徴的で、従来のプライマーでは検出できず、これまでの解析では見過ごされてきたことも明らかになっている。さらに、*Verrucomicrobia*門のメタン酸化細菌は両種とも極めて好酸性でありpH 0.8~1.0でも生育することが明らかにされている。既知の好氣性メタン酸化細菌が生育可能なpHが4.2以上であったことを考えると、今回発見された2種のメタン酸化細菌がいかに好酸度のレベルが高いかがわかる。また*Acidobacteria*門においても、新規光合成細菌 '*Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*' が発見され⁽³⁷⁾、大きな話題となった。光合成細菌もまた、それまで*Proteobacteria*門、*Firmicutes*門、*Chloroflexi*門、*Chlorobi*門の4門でのみにその存在が認められていたが、今回、門レベルで新しい光合成細菌が、しかも分離培養の困難な系統群として知られる*Acidobacteria*門から見いだされたことは非常に興味深い。実際に、*C. thermophilum*は系統学的新規性だけでなく機能的にもたいへんユニークな光合成細菌であることがわかっている。以上のような発見は、地球規模での炭素循環に大きく影響する光合成プロセスやメタン酸化プロセスに関与する微生物群でさえもわれわれの想像以上に多様である可能性を示唆している。このように純粋分離を経て“活きた生菌”を手にし、生理機能の確かな証拠をつかむというアプローチは、煩雑で時間がかかる戦略であるものの、それまでの微生物生態学や

地球生物化学の考えを一変させる力がある。

ここで紹介した微生物以外にも、たとえば、超好熱性極小共生アーキア *Nanoarchaeum equitans* などをはじめ、ユニークで興味深い新規微生物が多く分離培養されてきているが紙面の都合上、割愛せざるをえないことをご了承ください。

どのような新しい培養手法が開発されたのか？

ここまでは純粋分離されてきた新規微生物とその多様な生物機能について述べてきたが、ここからは主に培養技術に着目し、特に2001年以降に開発、提案されてきた新しい微生物培養技術とそのコンセプトについて概説したい。

1. 古典的培養法の改良

いわゆるコッホやパスツールの時代に開発された微生物の純粋培養手法もこの10年の間に大きく改良されてきており、今なお、古典的培養手法は効果的な微生物培養技術であることに疑いの余地はない。実際に、上述の新門微生物の多くは、いくつかの重要な工夫があるものの基本的には寒天平板培養や限界希釈培養といった古典的培養法によって分離に至っている。つまり、門レベルの未培養系統群のすべてが難培養性であるわけではなく、純粋分離するために必ずしも従来法からの脱却やパラダイムシフトが必要というわけではない。たとえば、筆者らやJanssenらは、コッホの時代以来100年以上にわたって常用され続けている寒天平板培養法の改良として、寒天とは異なるゲル化剤を用いるというアプローチによってさまざまな新規微生物の分離培養に成功している^(31, 33)。特に、Gellan gumを用いた培養法は効果的で、全く同一の培養条件で培養すると、多くの場合、寒天よりも可培養化率が高くなること、また寒天培地ではコロニーを形成しないような新規微生物をGellan gum培地によって容易に培養できることを明らかにしている⁽³⁸⁾。また、同じ寒天平板培養であっても、低栄養培地を用いて通常よりも長く培養すると効果的に新規微生物が分離できることや⁽³⁹⁾、カタラーゼのような抗酸化剤の添加も培養効率を高める効果があることが明らかにされてきている⁽⁴⁰⁾。また、好気条件下での平板培養であっても、CO₂濃度を高めに設定して培養するとCO₂依存性の新規微生物が効率的に単離できることも示されている⁽⁴¹⁾。

2. 微生物間相互作用の概念を取り入れた培養法

2001年以降のこの10年間、大きな関心を集めた培養法の一つがこの微生物間相互作用の概念を取り入れた培養法ではないだろうか。その契機となったのは、1990年代に大きな注目を集めたクオラムセンシングと呼ばれる微生物細胞間相互作用の発見である⁽⁴²⁾。それまで、バクテリアのようないわば“下等生物”が高等生物のようにシグナル物質を介して細胞間でコミュニケーションをとることなど全く知られておらず、筆者らも大きな感銘を受けたのを記憶している。さらに、1990年代後半のRpf (Resuscitation promoting factor) の発見も重要な契機の一つとなった。当時、細菌のサイトカインと呼ばれたタンパク質性因子Rpfは、胞子化とは別のメカニズムで休眠し培養不能状態に陥った微生物を再び培養可能状態に戻す、いわば“眠れる微生物の覚醒因子”であり⁽⁴³⁾、この発見は微生物自身が可培養化因子(増殖因子)を生産しうることを明確に示すものとして未知微生物探索に大きな指針を与えた発見であった。そして、2001年以降、アシルホモセリナクトン(AHL)やcyclic AMP (cAMP)といったシグナル物質の添加が未知微生物の培養化に有効であることが報告されている⁽⁴⁴⁾。さらに、実際に、異種微生物間共生現象も発見された。その一つは、*Symbiobacterium*属細菌の発見である⁽⁴⁵⁾。本細菌の生育は*Bacillus*属細菌やほかの細菌の生産する生育因子によって著しく促進される。また筆者らも、*Sphingomonas*属細菌が生産する未知因子によって生育が支持される新規細菌*Catellibacterium nectarophilum*の分離に成功している⁽⁴⁶⁾。さらに最近、Lewis博士とEpstein博士の研究グループによって、ほかの微生物が生産するシデロフォアやペプチド性因子を生育に必要とする新規海洋細菌も分離されてきており⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾、これらの発見は、“微生物は単独で生育する”という固定概念に縛られていた古典的培養手法に大きな一石を投じたと言える。異種間でやりとりされる微生物間コミュニケーションやクロストークのメカニズムの解明は、今後、未知微生物探索に向けた重要な鍵の一つになりうると筆者らは考えている。

3. 現位置培養法や現場環境を模擬した培養法

現位置で培養したり、現場環境を模擬することによって未知微生物を効率的に分離培養化しようとする試みも精力的に行われてきている。これらの培養法の狙いは、通常の培養では再現するのが困難な微生物間相互作用やほかの非生物学的な生育因子・環境因子を分離培養に取り入れることが可能になる点である。特に、2002年、

Epsteinらのグループにより*Science*誌に発表された現位置培養法はその代表例である⁽⁵⁰⁾。同博士らは、フィルターメンブレンによって微生物細胞を膜の内部に閉じ込め、その膜の内外の物質(生育因子や代謝産物など)のみが自由に行き来することのできるデバイス(diffusion chamber)を開発し、本デバイスを環境中(例:海洋底泥表面や地下堆積物)に設置して培養することによって、従来法では培養の困難な新規微生物の分離に成功している。Ferrariらもまた、フィルターメンブレンを巧みに利用して土壤環境を模擬したマイクロコロニー培養法を考案し^(51, 52)、門レベルの未培養系統群TM7細菌などの未知土壤微生物の培養化に成功している。また、青井らは、フィルターメンブレンではなく中空糸膜を活用した新しい現位置培養システムを開発し、同システムを海洋底泥や廃水処理汚泥リアクター内に設置して培養を試み、いずれの環境においても従来法よりも高い培養効率を達成している⁽⁵³⁾。

4. ハイスループットな微生物培養技術

この10年間、大きな成果を上げた新規培養法の一つが、ハイスループット限界希釈培養法(HTC法: high-throughput dilution-to-extinction cultivation method)⁽⁵⁴⁾である。この方法は、名称に“ハイスループット”とついているが、基本的には古典的な液体培養法である限界希釈法の改良法である。本手法の特徴は、(i) 現場環境水そのものを滅菌して培地として用いること、(ii) マイクロウェルプレートを活用して、従来よりも小スケールで数多く限界希釈培養を試みること、(iii) さらに従来ならば“生育していない”と判断していた、濁度では検知できない低レベルの増殖($10^3 \sim 10^6$ cells/ml)を、DAPI染色などによりとらえて純粋培養につなげることである。この方法により、上述のSAR11や新門 *Lentisphaerae* 細菌をはじめ、海洋や湖沼などの水圏環境から数多くの多様な未知微生物の純粋分離がなされてきている。

真の意味でのハイスループット培養法の先駆けは、2002年にZenglerらが発表したゲルマイクロドロップ法(GMD法: gel microdroplets)⁽⁵⁵⁾であろう。本手法の特徴は、まず試料中の微生物細胞を一つずつゲルマイクロカプセル内に閉じ込め、培養する前に“分離”する点にある。これにより、多数のマイクロカプセルを同一環境下において混合状態で培養することが可能になる。実際に、Zenglerらは、多数のマイクロカプセルを小型の容器に詰め、外部から連続的に滅菌した環境水そのもの、もしくは低栄養培地を連続供給しながら共培養するとい

うアイデアを提案している⁽⁵⁶⁾。これは、自然環境と同じレベルの栄養濃度を供給すること、それから、培養容器内で異種微生物間相互作用を簡易に再現することを意図したものであり、前述の現場環境を模擬した培養法の一つでもある。さらに、セルソーターによって、カプセル内での微生物の増殖を高感度に検知し、生育したカプセルのみを極めて迅速かつ容易に分別回収できるのが大きな利点である。本手法の適用範囲は広く、メタン生成アーキアのような絶対嫌気性微生物の培養も可能であるとされている。これまでのところ、本手法がどの程度未知微生物の分離培養化に有効であるか十分に実証されていないが、本手法のハイスループット性はそれまでの培養法を遥かに凌駕するものであり、今後の成果が期待される。

ここ数年、ナノテクノロジーを活用した新しい微生物培養デバイスの開発に関する知見も報告されてきている。その先駆的成果の一つが、微生物培養チップの開発である。Inghamらは、数万～数百万のミクロンスケールウェルからなるチップ（micro-Petri dish）を作製し、ウェル内に微生物細胞を接種して実際に培養することに成功している⁽⁵⁷⁾。このチップは多孔性の基盤を使用して作製されており、固体培地に置くと、拡散効果によって培地成分がチップの底からウェル内に供給される仕組みになっている。また、Epsteinらの研究グループも前述のdiffusion chamberを小型化した微生物培養チップ（iChip: isolation chip）を開発し、海水や土壌試料中の未知微生物を効率的に分離培養化できることを実証している⁽⁵⁸⁾。また、ごく最近になって、同博士の研究グループは、微生物培養チップをなんとヒトの口腔内に設置し*in vivo*で口腔内微生物を培養することにも成功しており、さらに本法が従来法よりも10倍以上高い培養効率を示すことを明らかにしている⁽⁵⁹⁾。この成果は、培養デバイスを小型化することで、ハイスループット性を兼ね備えた現場培養が簡便かつ容易に実施できることを示しておりたいへん興味深い。最近、マイクロ流体デバイスを活用した微生物培養法も提案されはじめている。Liuらは、微小流体特性を活用し、複数細胞からなる環境試料をマイクロ流路内で1細胞ずつ小さなプラグ内に分離し、それらをマイクロ流路内で一定期間培養し、さらに増殖した一つ一つのプラグを2つないし4つにスプリットし、レプリカを作製する方法を考案し、それによって、プラグ内で増殖した微生物を継代培養、保存、生理性状解析、分子的解析といった別々の目的に利用するというこれまでにない斬新なアイデアを提案している⁽⁶⁰⁾。もちろん、これらの手法にはさまざまな問題

がある。たとえば、マイクロチップ培養法では、増殖の速い微生物が接種された場合、ウェル外部にまでコロニーを広げ、ほかの微生物の増殖を阻害する可能性があるし、そもそも微生物細胞を数万ものウェルに効率よく接種することは容易ではない。しかしながら、微生物培養チップやマイクロ流体デバイス培養法は、その高いハイスループット性に加えてオートメーション化の可能性を秘めており、次世代の微生物培養デバイス開発につながる大きな第一歩であろう。今後の成果に期待したい。

未知微生物探索技術の革新に向けて

これまで述べてきたように、2001年以降の10年、次世代シーケンス技術を活用した環境ゲノム解析が大きな進展を遂げる中で、未知微生物探索の分野でもさまざまな新しい培養方法が開発・提案され、実際に6つに及ぶ新門微生物の純粋分離がなされるなど、未知微生物探索の分野も着実に進展してきていると言える。しかしながら、その一方で、大きな課題も見えてきている。確かに、さまざまな新しい培養技術が提案されてきているが、実際に新門微生物や機能的に重要な微生物の純粋分離に結びついた事例は多くはなく、強いて挙げるとすればSAR11細菌や*Lentisphaerae*門細菌の培養化に大きく貢献したHTC法や嫌気共生培養法くらいである。また上述のように、ほとんどの新門微生物は、さまざまな創意工夫はあるもののあくまで古典的培養法に基づいて純粋分離されており、また必ずしも狙って培養されたものではなく、偶発的に分離培養された感は否めない。つまり、現行技術は、目的の未知微生物を体系的かつ効率的に分離培養する技術にまで至っていないということである。優占しているような微生物さえ培養できないこともしばしばであり、希少構成種に至っては分離培養の明確な手だてすらないのが現状である。明確な青写真はなく、手探り状態で、各々の研究者の創意工夫に委ねられてきた未知微生物探索は今後どのような革新が必要なのであろうか。

そのヒントになる成果が最近報告されてきている。その一つは、次世代シーケンス技術によって得られる膨大なシーケンス情報を効果的に未知微生物探索に活用する流れである。Popeらは、メタゲノム情報を最大限活用し、ワラビの腸内環境に優占する未培養微生物（WG I: Wallaby Group I）の純粋分離に成功し、その成果を2011年7月、*Science*誌に発表した⁽⁶¹⁾。本研究の最大の特徴は、500種以上からなる複雑な微生物コミュニティを対象としながらも、バイオインフォマティクス

(PhyloPythia) を駆使してメタゲノム配列情報から WG I 系統群の塩基配列だけを分別収集し、約 80% 弱のゲノム情報を解読することによって、同細菌のエネルギー代謝経路や生理性状を推定しながら純粋分離にこぎつけたことである (Pope らは “reverse metagenomics” と呼ぶ)。具体的には、ゲノム断片情報から、WG I 細菌が嫌気性発酵細菌であり、starch を唯一の炭素源として利用可能であること、また窒素源として尿素を利用しうること、ポリペプチド性の抗生物質 (bacitracin) に耐性がありうること、さらに生育に二酸化炭素を必要とする好二酸化炭索性 (capnophilic) でありうること、が推定された。これらの情報をもとに最適な培養条件を設定し、最終的に WG I 細菌の純粋分離に成功したのである。またほぼ同時期に、Bomar らはマウス腸内環境を対象としたメタトランスクリプトーム解析情報をもとに同腸内に優占する未培養細菌の純粋分離に成功している⁽⁶²⁾。現行のバイオインフォマティクスを駆使すれば、未知微生物であっても配列の持ち主をある程度特定することが可能になってきていることから、上述のようにシーケンス情報を活用して、未知・未培養微生物の代謝特性や重要な生理機能を推定し、最適な培養条件を考案するという、いわば“テーラーメイド型培養法”は今後の未知微生物探索の大きな柱の一つになるかもしれない。

このようないわゆる“ソフト面”での革新とともに、培養基剤、培養デバイスといった“ハード面”の革新ももちろん必要であろう。まずは培養のスループットを上げることである。これまでのシャーレや試験管を用いた培養法は手間も時間もかかり、膨大に眠る未知微生物資源を掘り起こすには、何らかの全く新しい培養装置を開発することが必要であろう。特に、先に述べたようにナノテクノロジーを活用して次世代培養デバイスを構築する動きは今後ますます活発になるとされる。今現在化しているニーズは、これまでにないスループットを実現し、できればオートメーション化につなげる、さらに現場培養や現場を模擬した培養に適応可能な技術にすることであるが、それ以外の潜在化ニーズを呼び起こすような新しい発想も期待される。

次世代シーケンス技術によりメガ、ギガ単位の配列情報が容易に手に入れられる時代に、筆者らが時折考えるのは、未知微生物探索において、“ギガアイソレーション” (膨大かつ網羅的な未知微生物分離探索) をしてみたら何が見えてくるのか、ということである (妄想と言われるかもしれないが)。たとえば、培養に心血を注ぎ込んで来た研究者でさえも、仕込んだすべてのシャーレに生育するすべてのコロニーを同定したりはし

ない。そこには、門レベルの未培養系統群のような未知微生物がわずかでも生育しているかもしれない。先に述べたように、これまで分離に成功した新門微生物の多くは決して“難培養性”ではない、という事実を考えると、これまで実は培養化されながらも見過ごされてきた未知微生物が少なからず存在することは容易に想像できる。もちろん、今の培養技術 (スループット) でギガアイソレーションを実施するのは煩雑で労力がかかり過ぎるため現実的ではない。まずは微生物分離培養におけるスループットの向上が望まれる。

そして、最後に強調したいのは、「環境を知り、生態を知る」努力を継続することの重要性である。ラボでは扱いの難しい未知・未培養微生物が、環境中では比較的高いポピュレーションを保ち活発に活動しているのである。自然から学び、未知微生物探索に役立てたいものである。環境科学的情報や、従来の 16S rRNA 遺伝子を基盤とした分子生態学的解析技術、アイソトープなどを活用した地球化学的解析技術、Nano-SIMS のような高精度顕微鏡を利用した新技術などを通じて得られる分子生態情報もまた分離培養戦略を立てるうえで重要である。そして、これまで述べてきたように、次世代シーケンス技術により得られた膨大なシーケンス情報に基づいたテーラーメイド型培養のアプローチと次世代培養デバイス開発などの工学的アプローチを相互補完的に駆使することによって、さらには全く別の新しい培養手法やコンセプトの確立によって、未知・未培養微生物を自在に可培養化し、その新生物機能を解明し、深遠な未知微生物の生き様を知ることのできる時代が、すぐそこまで来ているかもしれない。

謝辞：本解説において紹介した筆者らの研究の多くは、山梨大学医学工学総合研究部の田中靖浩博士、松澤宏朗博士、森一博博士ならびに産業技術総合研究所の村松瑞穂、孟憲英、関口勇地、花田智、中村和憲をはじめとする多くの共同研究者とともに実施したものである。なお、本解説で紹介した内容の一部は、科学研究費補助金若手研究 (A) (課題番号：11001131)、挑戦的萌芽研究 (課題番号：11018263) ならびに科学技術振興機構先端的低炭素化技術開発事業 (課題番号：11102938) の支援により行われた。

文献

- 1) C. S. Pareek, R. Smoczynski & A. Tretyn: *J. Appl. Genet.*, **52**, 413 (2011).
- 2) M. L. Sogin *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12115 (2006).
- 3) C. Simon, R. Daniel: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 1153 (2011).
- 4) B. J. Baker *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8806 (2010).
- 5) H. Garcia Martin *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1263 (2006).
- 6) K. F. Ettwig *et al.*: *Nature*, **464**, 543 (2010).
- 7) S. J. Hallam *et al.*: *Science*, **305**, 1457 (2004).
- 8) Y. Shi, G. W. Tyson & E. F. DeLong: *Nature*, **459**, 266

- (2009).
- 9) T. Ishoe, T. Woyke, R. Stepanauskas, M. Novotny & R. S. Lasken : *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 198 (2008).
 - 10) B. K. Swan *et al.* : *Science*, **333**, 1296 (2011).
 - 11) D. B. Rusch *et al.* : *PLoS Biol.*, **5**, e77 (2007).
 - 12) J. Gans, M. Wolinsky & J. Dunbar : *Science*, **309**, 1387 (2005).
 - 13) P. Hugenholtz, B. M. Goebel & N. R. Pace : *J. Bacteriol.*, **180**, 4765 (1998).
 - 14) H. Zhang *et al.* : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1155 (2003).
 - 15) J. C. Cho, K. L. Vergin, R. M. Morris & S. J. Giovannoni : *Environ. Microbiol.*, **6**, 611 (2004).
 - 16) E. F. DeLong : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5685 (1992).
 - 17) M. Konneke *et al.* : *Nature*, **437**, 543 (2005).
 - 18) M. Tourna *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8420 (2011).
 - 19) R. Hatzenpichler *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 2134 (2008).
 - 20) C. Brochier-Armanet, B. Boussau, S. Gribaldo & P. Forterre : *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 245 (2008).
 - 21) O. Geissinger, D. P. Herlemann, E. Morschel, U. G. Maier & A. Brune : *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 2831 (2009).
 - 22) K. Mori, K. Yamaguchi, Y. Sakiyama, T. Urabe & K. Suzuki : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**, 2894 (2009).
 - 23) H. Tamaki *et al.* : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **61**, 1442 (2011).
 - 24) Y. Tanaka *et al.* : *Microbes Environ.*, **26**, 266 (2011).
 - 25) S. Sakai *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4326 (2007).
 - 26) S. Sakai *et al.* : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 929 (2008).
 - 27) S. Sakai *et al.* : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, in press.
 - 28) M. S. Rappe, S. A. Connon, K. L. Vergin & S. J. Giovannoni : *Nature*, **418**, 630 (2002).
 - 29) S. J. Giovannoni *et al.* : *Science*, **309**, 1242 (2005).
 - 30) S. J. Giovannoni *et al.* : *Nature*, **438**, 82 (2005).
 - 31) P. H. Janssen, P. S. Yates, B. E. Grinton, P. M. Taylor & M. Sait : *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 2391 (2002).
 - 32) S. J. Joseph, P. Hugenholtz, P. Sangwan, C. A. Osborne & P. H. Janssen : *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 7210 (2003).
 - 33) H. Tamaki *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 2162 (2005).
 - 34) H. Matsuzawa, Y. Tanaka, H. Tamaki, Y. Kamagata & K. Mori : *Microbes Environ.*, **25**, 302 (2010).
 - 35) A. Pol *et al.* : *Nature*, **450**, 874 (2007).
 - 36) P. F. Dunfield *et al.* : *Nature*, **450**, 879 (2007).
 - 37) D. A. Bryant *et al.* : *Science*, **317**, 523 (2007).
 - 38) H. Tamaki, S. Hanada, Y. Sekiguchi, Y. Tanaka & Y. Kamagata : *Environ. Microbiol.*, **11**, 1827 (2009).
 - 39) K. E. Davis, S. J. Joseph & P. H. Janssen : *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 826 (2005).
 - 40) B. S. Stevenson, S. A. Eichorst, J. T. Wertz, T. M. Schmidt & J. A. Breznak : *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4748 (2004).
 - 41) K. Ueda *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4535 (2008).
 - 42) W. C. Fuqua, S. C. Winans & E. P. Greenberg : *J. Bacteriol.*, **176**, 269 (1994).
 - 43) G. V. Mukamolova, A. S. Kaprelyants, D. I. Young, M. Young & D. B. Kell : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8916 (1998).
 - 44) A. Bruns, H. Cypionka & J. Overmann : *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3978 (2002).
 - 45) M. Ohno *et al.* : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**(Pt 5), 1829 (2000).
 - 46) Y. Tanaka *et al.* : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 955 (2004).
 - 47) A. D'Onofrio *et al.* : *Chem. Biol.*, **17**, 254 (2010).
 - 48) D. Nichols *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4889 (2008).
 - 49) S. S. Epstein : *Nature*, **457**, 1083 (2009).
 - 50) T. Kaeberlein, K. Lewis & S. S. Epstein : *Science*, **296**, 1127 (2002).
 - 51) B. C. Ferrari, S. J. Binnerup & M. Gillings : *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8714 (2005).
 - 52) B. C. Ferrari, T. Winsley, M. Gillings & S. Binnerup : *Nat. Protoc.*, **3**, 1261 (2008).
 - 53) Y. Aoi *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 3826 (2009).
 - 54) S. A. Connon & S. J. Giovannoni : *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3878 (2002).
 - 55) K. Zengler *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15681 (2002).
 - 56) K. Zengler *et al.* : *Methods Enzymol.*, **397**, 124 (2005).
 - 57) C. J. Ingham *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18217 (2007).
 - 58) D. Nichols *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 2445 (2010).
 - 59) M. V. Sizova *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 194 (2012).
 - 60) W. Liu, H. J. Kim, E. M. Lucchetta, W. Du & R. F. Ismagilov, *Lab Chip*, **9**, 2153 (2009).
 - 61) P. B. Pope *et al.* : *Science*, **333**, 646 (2011).
 - 62) L. Bomar, M. Maltz, S. Colston & J. Graf : *MBio*, **2**, e00012 (2011).