複雑微生物系の解析とその利用

Analyses and utilization of complex microbial community

東京大学大学院農学生命科学研究科

春田 伸 Shin HARUTA

Key words: microbial ecology; microbial community; compost; lignocellulose; complex system

1. はじめに

20 世紀になって急速に進歩した微生物の単離・培養・組換え技術によって一種の微生物の純粋培養によるアミノ酸や抗生物質生産といった発酵産業が発展してきた。一方で生ゴミのように多様な基質を含む有機性廃棄物を分解・再利用するためには多様な微生物（機能）が要求されるであろうし、またリグノセルロースのような複雑な化合物の分解も複数種からなる集団としての微生物機能が有効と考えられる。さらにこれら廃棄物を滅菌することなく処理するためには他菌の混入にも機能的に抵抗性を示す複雑微生物系の利用が望まれる。特に近年、廃棄物からの有用物質生産や堆肥化技術に関心が集まっているが、これらのほとんどは過去の経験をもとに運用されてきた技術である。複雑微生物系を理解し、いかに制御・利用するかというのは今後の応用微生物学の大きな課題である。

自然界の微生物集団を解析する際、培養困難微生物の存在、微生物間または微生物・固体基質間の相互作用などさまざまな問題が立ちはだかつており、従来の培養法だけでは限界がある。そこで分子生物学的手法が多数開発・導入されてきている。その一例として 16S rDNA 遺伝子に基づく denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)¹⁾、定量 PCR、fluorescence *in situ* hybridization (FISH)²⁾ などが挙げられる。これらは培養することなく迅速に解析できる手法であるが、核酸抽出、PCR や細胞固定などの際に生じるバイアスは常に考慮しなければならず、各種手法を組み合わせ多角的に解析する必要がある。本稿ではこれら手法を用いた機能性微生物集団の解析結果を紹介するとともに、その過程で見えてきた複雑微生物系の性質とその利用の可能性について概説する。

2. 生ゴミ分解過程の解析

筆者らは実験室規模の生ゴミ処理機を用いて生ゴミ分解過程の微生物集団を解析している。毎日ゴミを添加するという連続処理過程を DGGE 解析した結果、安定分解期に

はバンドパターンは一定であること、同条件下の処理で再現的に同じバンド (E, F, G) が検出されることを見いだした (図 1)。微生物の単離・スクリーニングの結果、これらバンドは一種の微生物に由来し、その微生物は *Bacillus* 属に近縁の新属新種と考えられた。また定量 PCR および FISH 解析の結果、その微生物は安定分解期にかけて急増し全細菌数の 30~50% を占めることが明らかとなった。しかし最適培養条件で数百コロニーをスクリーニングしても、2 コロニーしか得られておらず、難培養ではないが培養法での検出が難しい微生物であった。また類似の微生物が他の有機性廃棄物処理システムからも検出されており、

図 1 生ゴミ処理過程の DGGE プロファイル
16S rDNA 断片に基づく DGGE 解析。矢印は泳動と変性剤濃度勾配の方向。四角で囲った安定分解期にはバンドパターンの変化はほとんど見られない。また処理過程では生ゴミに付着している微生物由来のバンドは認められない。
各バンドに対応する DNA データベース中の最近縁種。
A, *Enterococcus gallinarum* or *E. saccharolyticus*; B, *Corynebacterium variabilis*; C, *Bacillus thermo-sphaericus*; D, *B. thermoamylovorans*; E, *B. licheniformis*; F, *B. licheniformis*; G, *B. licheniformis*.

有機物分解過程において重要な微生物であると推測される。ところが興味深いことに資化能を示す有機物はごく限られていた。一方で DGGE 法などでは検出されない微生物が幾種も単離されており、それらにアミラーゼ活性、セルラーゼ活性、リパーゼ活性、またはプロテアーゼ活性が観察されている。

安定に分解処理が進行しており、DGGE バンドパターンも一定である生ゴミ分解過程に外来微生物の添加を試みた。その微生物の動向を DGGE 法または PCR 検出により追跡したところ、数日のうちにその数は減少し検出されなくなった (図 2)。同時に既存の微生物集団の変化もなかった。生ゴミ分解過程に構築されている微生物集団には何らかのネットワークが形成されているのではないだろうか。一方、この現象は有害微生物の排除という点では微生物集団利用の利点の一つである。また優占種として検出された微生物であればその増殖能・定着性が期待されることから、遺伝子工学的に各種機能を付加することで微生物製剤としての積極的な利用が可能になるであろう。

3. 稲わら分解微生物集団の構築³⁾

筆者らは稲わらを効率的に分解する微生物集団をフラスコの中に構築することに成功している。堆肥化処理過程を

微生物集団源とし 2 年にわたる継代培養により、50℃ の液体静置培養で 3 日以内に稲わら (未滅菌) の半分以上を

図 2 生ゴミ処理過程への外来微生物の添加
外来微生物として *Bacillus subtilis* を全菌数の約 1% 添加した。BS は添加微生物の DNA のみ、0 日は添加前のサンプル。添加後 1 日、2 日では明確に観察されていたバンドが 3 日目にはほとんど認められなくなった。

図 3 構築した微生物集団による稲わらの分解

各写真の左のフラスコは微生物非添加のコントロール、右は微生物集団添加。培養時間とともに稲わらの可溶化が観察され、培養 4 日で稲わら重量の 60% 以上が減少した。

分解(可溶化)できる微生物集団を得た(図3)。注目すべきはその高い安定性で、20回を超える植え継ぎ後も機能低下は見られず、またセルロース基質なしの栄養培地での植え継ぎも可能であった。さらに培地のpHにも非感受性でpH 5から9の条件下で培養を始めても培地のpHは数日でどれも同様の値を示し分解活性も変わらなかった。DGGEのバンドパターンは分解に伴って変化していたが、同様の変化は植え継ぎ後も観察された。つまり構成メンバーを変えることなく、そのポピュレーションを変えていくことで効率的な分解を達成し、また環境にも適応していると考えられる。このように制御をほとんど必要としない高い分解活性と安定性は複雑微生物系のなせる技で、集団利用の有効性を強く示している例である。なお微生物の単離の結果、DGGE解析で検出された*Brevibacillus* sp., *Bordetella* sp., *Pseudoxanthomonas* sp.とともに*Bacillus licheniformis*や*Virgibacillus* sp.が再現的に得られており、マイナーと思われる種も微生物集団の維持に寄与していることを示している。ただしここに挙げた単離菌にセルロース分解性はなく、現時点では分解産物の消費などの役割が考えられている。また分解過程の稲わらに付着する微生物集団をDGGE解析すると*Clostridium* sp.が主に検出され稲わら分解の第1段階を担っている可能性が示唆されている。これら好気・嫌気微生物の調和のとれた相互作用が集団全体としての機能の発現および維持に重要であると考えられる。

4. おわりに

以上のように多数を占める微生物がその系を代表するような働きをしているとは限らず、既存の検出法でマイナー種として扱われている微生物の寄与も考えなければならない例を示した。また複雑系としての微生物集団をより深く理解するためには、微生物間相互作用、*in situ*での活性や局在性、さらには固体基質との相互作用などの解明も必要である。これまでの解析結果から微生物社会は高度に組織化されたネットワークを形成していることが予想され、完全に理解することは容易ではない。従来の還元的手法を越えた全く新たな微生物生態学の展開(手法および理論)が求められる⁴⁾。稲わら分解微生物集団のように比較的シンプルでかつ複雑微生物系の特徴をもった微生物集団を単離菌から再構成できれば、微生物社会をひもとく一つの糸口が掴めると考えている。

稲わら分解微生物集団の例で示したように、人類の求める機能をもった微生物集団の育種・利用は、これまでの微生物育種、植物育種と同様に重要な微生物利用技術になっていくであろう。また複雑微生物系のさらなる理解により、微生物集団の理論的育種も可能になるであろう。

- 1) G. Muyzer: *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 317-322 (1999).
- 2) R. Amann, and W. Ludwig: *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 555-565 (2000).
- 3) S. Haruta, Z. Cui, Z. Huang, M. Li, M. Ishii, and Y. Igarashi: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, in press **59** (2002).
- 4) P. Nurse: *Nature*, **387**, 657 (1997).