

難培養微生物とは何か？

What Are Uncultured Microbes?

鎌 形 洋 一
YOICHI KAMAGATA

産業技術総合研究所 ゲノムファクトリー研究部門 〒062-8517 札幌市豊平区月寒東2-17-2-1

TEL: 011-857-8914 FAX: 011-857-8915

E-mail: y.kamagata@aist.go.jp

Research Institute of Genome-Based Biotechnology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),
Toyohira, Sapporo, Hokkaido 062-8517, Japan

キーワード：難培養微生物，未知微生物，共生

Key words: uncultured microbes, cultivation, cell-cell communication, syntrophy

(原稿受付 2007年10月26日/原稿受理 2007年10月28日)

1. 難培養性微生物が認知されるまで

難培養性微生物という言葉が微生物学の世界で使われるようになったのはここ10数年のことであるが、微生物学に携わる研究者はそれ以前に培養できない微生物が数多く存在していることを何も知らなかった訳ではない。どんな環境試料を顕微鏡で観察して見ても、実に多様な形態や運動性を有する微生物がそこに存在していることがわかる。しかし、これらの試料を寒天培地上に接種して出現するコロニーを、一つ一つ、つぶさに観察してみたとしても限られた姿の微生物しか生育しておらず、もとの試料に存在していたはずの“あの多様な微生物”が寒天培地の上では忽然と姿を消してしまっていることに誰しも気づいていた。少なくとも20年前までの微生物学であればここで話が終わってしまっていたであろう。実際、培養できない(できなかった)微生物とは何なのかを想像するすべもなかったからである。

しかし1990年代前半から微生物学は革命的な変貌をとげた。20世紀の最後から今日までの10数年間は端的に言えば微生物を培養することなくその存在や機能・性質の一端を明らかにすることができるようになった時代である。その結果、これまでに知られている微生物の種類は実際に地球上に存在するであろう微生物種ほんの一握りであること、そして我々が研究のために扱ってきた微生物はもっぱらたやすく培養できる“特別”な微生物だったことが明らかになった。とりわけ16S rRNA 遺伝子配列の情報蓄積がこれまでまったく知られていなかった膨大な微生物群の存在を初めて我々に知らしめたのである。

2. 多くの微生物は難培養性微生物である

これまでのさまざまな研究から地球上に存在する微生

物の総数(細胞の数)はおおよそ 10^{30} 個のオーダーではないかと言われている¹⁾。これは地下圏掘削プロジェクトや多くのフィールドデータから推定した値である。この数字自身は通常感覚では量りがたいものだが、それだけの数の微生物に含まれる炭素量は地球上に繁茂している植物が固定している炭素量にほぼ匹敵すると言われれば多少の想像は可能になるであろう。

ところで今日性質が解明され、命名されている微生物は5,000種にも満たないほどである。昆虫の65万種に比べれば、いかにその数が少ないかがわかる。同時に、微生物の種の数が昆虫の種の数より少ないはずはないであろうと思うのは当然である。それでは一体微生物の種はどれくらいの数だけ存在するのであろうか?その答えはもちろん誰も持ち合わせてはいない。ただ1990年、16S rRNA 遺伝子による多様性解析とは一線を画した研究として森林土壌を対象に、複雑微生物系全体から抽出した全DNAの解離曲線の解析結果から微生物種数を割り出した結果がある。それによれば土壌1グラムには 10^9 個オーダーの原核生物がいて、種の数はおおよそ10,000のオーダーであると推定された²⁾。しかし、2005年になって10,000種というのはひとつひとつの種の微生物が同じような数だけ存在していると仮定した値であり、実際には優占種と希少種がいてその種の総数は1グラムの土あたり1,000,000種のオーダーではないか、という驚愕すべき報告がなされた³⁾。ある場所の森林土壌1グラムあたりの微生物種が1,000,000とすれば地球環境全体でいったい何種の微生物が存在するか、今日の我々の想像を大きく越えた値であることは間違いない。微生物の種とは何か、という本質的な点については今なお議論すべき問題は残しているが、仮に地球上の全微生物種をさらに3桁多い1,000,000,000種とするだけでも、現在正確に記述された微生物種は全体のわずか0.0005%ということになる。

ではこれらすべてが難培養微生物であるか、と問われれば、答えはもちろん否である。確かに未知種の微生物は膨大であるが、未知種の微生物はすなわち難培養微生物ではない。これまでに多くの研究者によって多くの微生物が分離されてきているが、その一つ一つが正確に同定されているわけではない。つまり、培養が可能でも分類や同定がなされていない微生物もまた膨大なはずである。

もし微生物が 1,000,000,000 種だけいたとして、一体どれくらいの微生物がいわゆる難培養微生物だろうか？この問いには答えはない。それに答えるだけの精緻かつ膨大な解析はまだ行われていない。またそもそも難培養微生物の定義自体はあいまいなものである。今日、難培養微生物は文字通り、通常の培養では容易に純粋培養や集積培養が困難な微生物という定義以上のものはない。では通常の培養とは何か？これは実験者が扱う微生物によって定義はまちまちである。世の中に現存する何千何万という培地の種類とそれに付帯する培養条件すべてを使ってなお培養できない微生物、というのがより厳密な“難培養性微生物”の定義であろう。

しかし、微生物の培養のための培地が何千何万あるにしても、それら大部分は微生物の生育に必要な無機塩類、窒素源、そしてエネルギー源かつ炭素源としての種々の有機物である点では共通であり、しかもそれらをひとところに混ぜて加えたバッチ式の培地であることは共通している。さらに純粋分離にあたってはこれを通常寒天で固めるという点において世界共通である。コッホの助手であるペトリが 1880 年代後半にガラスのプレート（いわゆるペトリ・ディッシュ）の中で、培地を寒天で固めさせたものをを用いたのが現代の微生物培養技術の始まりである⁴⁾。寒天培地の上で 1 個のコロニーを釣り上げ、あらためて新しい培地に画線塗抹すると一つの細胞が増殖して再びコロニーができる。こうして確立した純粋培養系を単クローンとして維持し、研究に用いてゆく。この手法の簡便さと確からしさに疑いを挟む余地はない。

しかし、この方法にはすべての微生物は単独で寒天の上でコロニーを作るという暗黙の前提が存在する。ところが、一定量の環境試料あたりに含まれている細胞数を計数しておき、それらを寒天培地で培養して得られるコロニー数と比較すると、歴然とした差があることが知られるようになった。例えば海水を例にとると、全菌数に対して実際に寒天培地の上で生えてくる微生物はわずか 0.1%にも満たない⁵⁾。

今日の微生物学、特に分子遺伝学は大腸菌に代表されるような容易に寒天で培養できるような微生物によってその基礎が築かれた。しかし、大腸菌は“微生物は培養しやすく研究に便利な生物”という明らかに誤った固定観念を植え続けてきたことは否めない。私たちのような微生物生態学に携わる者から見れば、大腸菌は例外的な微生物である。もちろん、大腸菌のようにコロニーをたやすく形成する微生物は多数いるが、複雑微生物系全体から見ればごく少数である。

3. 難培養性微生物の実体とは

以下にこれまでの研究から見えてきた“難培養微生物

の姿”について概観したいと思う。もちろん別にさまざまな考え方や分類の仕方があることはご了解いただきたい。筆者は難培養微生物を分類するとおおよそ以下のようになると考えている。

(i) 生育速度が著しく遅い微生物：生育の遅い微生物は平均世代時間が長い上に生育開始までに要する時間（いわゆる lag time）が長いという特徴を持つものが多い。大腸菌の実験室での平均世代時間は 30 分である。筆者らの常識ではこの世代時間はいわば“非常識な”速さである。これまでに筆者らが扱ってきた微生物では平均世代時間が 4 日、5 日というのが当たり前である。また生育開始までの lag が数週間に及ぶものも多い（図 1）^{6,7)}。このような微生物では（基質濃度など培養条件によるが）液体培養で静止期に達するまで 3 ヶ月近くを要する。実際の環境を考えると、多くの場合、有機物濃度が常に律速になっているが、それでも少しずつ供給されているような場であれば増殖が速くなければならない必然性はない。また、他の微生物が資化できないような基質を使うものであれば競合者はいないわけだから“慌てて”生育する必要もない。さらに嫌気性微生物にありがちだが、モル基質あたりの獲得エネルギーが非常に低いものは生育も遅い。典型的な例はメタン発酵系に圧倒的な優占種として存在する *Methanosaeta* 属である（図 2）。*Methanosaeta* は酢酸資化性のメタン生成古細菌であるが、酢酸からのモルあたりのエネルギー獲得量は非常に低く、生育も遅い。それにもかかわらず、メタン発酵系の中で優占化しているのは基質をめぐる競合者がほとんどいないからである。この菌種は酢酸を基質とする培地で気長に待てば、集積は比較的容易である。しかし、後述するように寒天でコロニーを形成しない典型的な菌種のひとつであり、純粋培養はきわめて難しい。

(ii) 寒天でコロニーを形成しない微生物：上述のメタン生成古細菌に限らず、そもそも寒天という“物理化学的な足場”の上でコロニーを作る微生物のほうが圧倒的に少ないと考えるべきである。自然界における微生物の生育の場は多様であり、寒天というのはたったその一つにすぎない。ゲル化剤を変えることによって生育する微

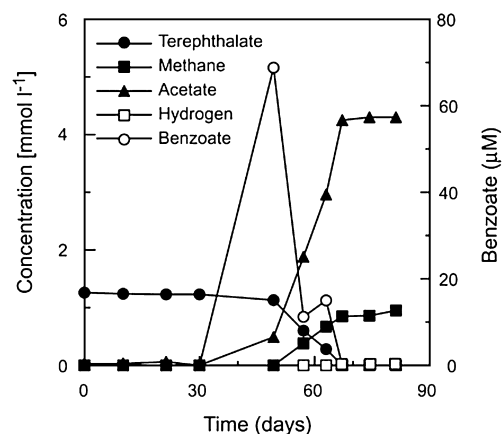


図 1. 生育の遅い典型的な微生物の例。嫌気的条件下でテレフタル酸を分解する共生微生物であるが生育を開始するまでに少なくとも一ヶ月間ほどの lag time が認められる。詳細は文献 6 を参照されたい。

生物もあるが⁸⁾、基本的にこのようなゲル化剤を好まない微生物は多い。一つの細胞から得たコロニーをもってクローンとして扱うのが微生物学の基本であるが、コロニーを作らない微生物については液体培養による限界希釈によって純化する方法がとられる。コロニーも形成しない、液体培養もできない微生物はもはや一筋縄ではいかない難培養微生物であると言わざるを得ない。

(iii) 生育に一定以上の細胞濃度を必要とする微生物：微生物学の基礎は上述のように細胞一つからの生育を前提としている。したがって寒天培養同様に液体培養においても理論的には一つの生きた細胞を接種すれば生育は開始するはずである。しかしながら、筆者らの経験では 10^3 から 10^5 以上の初期接種量が絶対必要な微生物が確かに存在する。これは *N*-アシルホモセリンラクトンによるクオラムセンシングと同様の効果を持つ生育因子あるいは近年 bacterial cytokine と呼ばれる Resuscitation promoting factor (Rpf) のような物質の存在を示唆するものである。

(iv) 濁度として検知できない細胞数レベルで静止期を迎えてしまう微生物：このような微生物の代表例はアンモニア酸化細菌、亜硝酸酸化細菌、鉄還元細菌、硫黄還元菌などである。基質、電子受容体あるいは生成物の毒性などにより高い基質濃度を用いて培養できない微生物にその傾向が強い。また、海洋環境に多いといわれる oligotroph と称される微生物も同様である。我々は微生物の増殖を濁度でもって目視で判断することが多いが、濁度が認められるほどに生育しない微生物は基質や生成物の濃度を測定するか、あるいは微生物をフィルター上で濃縮するなどの方法をとらなければ、生育の確認は困難である。換言すれば、“濁度”が認められないからと言って、それは“生育しない難培養微生物”と判断することは誤りかもしれない。

(v) 他の微生物が生産する生育因子を必要とする微生物：異種微生物間のクロストークと呼べるような現象について精緻な解明が成されている例は少ないが、あらゆる環境が複雑微生物系によって成立している以上、異種微生物間のコミュニケーションや生育因子のやりとりはおそらく普遍的な現象ではないかと思われる。このよう

な微生物は生育に必要な因子を供給する微生物が見つからない限り培養は困難である。我が国で古くから行われている研究の代表例は *Symbiobacterium thermophilum* と名づけられた微生物についてのものである⁹⁾。この菌の生育は、*Bacillus* や他の細菌の培養上清を添加すると著しく促進する。その後の研究から本微生物は少なくとも、ペプチド性因子、 NH_4^+ で代替できるカチオン、炭酸ガスの少なくとも 3 種の因子を要求することが明らかにされている。また、筆者らは最近、ある種の微生物 (A) (*Catellatibacterium nectariphilum*) が別種の微生物 (B) (*Sphingomonas* に類縁の細菌) の生産する物質によって生育が著しく助長されることを見いだした^{10,11)}。さらに微生物 (B) の生産物は微生物 (A) のみならず、種や属を越えた他の微生物 (C) や微生物 (D) の生育を促進すること、さらに微生物 (C) は属種の異なる微生物 (G, F, I, J, K) の生産物によっても生育促進を受けることを明らかにした。これらのことは微生物間での物質のやり取りは我々が想像する以上に複雑多様であり、さまざまな微生物間のクロストークが行われていることを強く示唆するものである。

(vi) 種間水素伝達を行う共生微生物：嫌気性微生物においては種間で主にやりとりされる分子は水素である。図 3 に示すように、多くの嫌気性微生物は物質の分解過程で水素を発生する(水素発生型発酵微生物)。しかし、水素は一定以上の濃度まで蓄積すると、物質の嫌氣的酸化反応そのものを阻害してしまう。水素発生型嫌気性微生物群はこれを回避するために、発生する水素を速やかに除去する微生物を必要とする。特に脂肪酸や低級アルコール、芳香族化合物を分解する微生物にその傾向が顕著である。“水素除去者”は多くの場合、水素を用いて炭酸ガスを還元しメタンを作るメタン生成古細菌である。実際の複雑系を *in situ* hybridization などの手法で観察すると、水素発生を行う微生物を取り囲むように水素資化性メタン生成古細菌が存在している^{12,13)}。このような水素発生型嫌気性微生物(嫌気共生細菌と呼ばれている)はほとんど例外なく分離培養が難しい。筆者らはこのような微生物の分離を試みてきたが、分離にあたっては、水素を消費するメタン生成古細菌を共存させた共培養を行う。生育が非常に遅いものも多く、分離までに

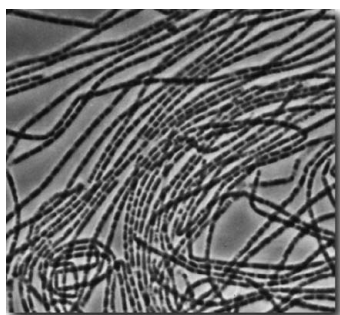


図 2. *Methanosaeta* 属メタン生成古細菌。酢酸資化性メタン菌として圧倒的な優占種として存在する。生育の遅い典型的な難培養微生物。

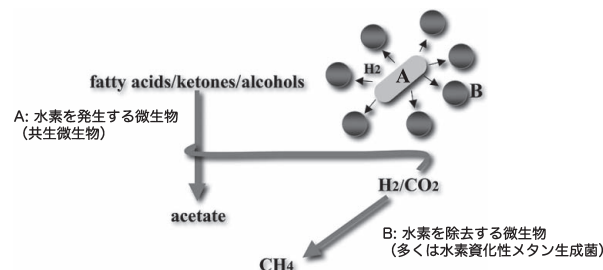


図 3. 嫌気性微生物を特徴づける共生関係。多くの絶対嫌気性微生物 (A) は物質酸化にともなって水素を生成するが、水素が一定以上の濃度に達すると自らの生体反応を停止させてしまう。代謝および生育が進行するためには水素除去者としての第二の微生物 (B) を必要とする。この関係を嫌気性微生物共生系と呼ぶ。

長い年月を要するものが多い¹⁴⁾。

(vii) 昆虫や動物などに共生する微生物：昆虫の体内にはさまざまな微生物が共生しているのはよく知られた事実である。通常一種の昆虫に一種の微生物が共生しているが、時として複数種の微生物を共生させていることもある。最もよく研究されているもののひとつとしてはアブラムシの体細胞に共生している *Buchnera* と呼ばれる大腸菌と遠縁の微生物である。似たような細菌はカメムシを初めとする他の多くの昆虫にも見いだされている。数ある難培養微生物の中でこれらの微生物群はおそらく最も培養が難しい微生物であると考えられる。その最大の理由はこれらの微生物は宿主昆虫に極度に依存した生活環を持ち、宿主とともに共進化したため、単独で生きてゆくために必要な多くの遺伝子を欠損させている¹⁵⁾。極言すればミトコンドリアのような運命をたどろうとしている微生物であり、もはや細胞の一器官の様相を呈しているものも多い。嫌気性原生動物の細胞質にもメタン生成古細菌やある種の細菌が共生していることが知られているが、これらは宿主の生存に非常に重要な役割を果たしていると考えられる¹⁶⁾。

(viii) そもそも環境中で非優占的な微生物：これは基本的かつ重要な点であるが、集団において一定の割合以下しか存在しない微生物は（ある選択圧をかけない限り）、そもそも原理的に分離培養が困難だけでなく、PCRによる遺伝子の検出すら困難である。例えば 10^9 の微生物数が存在する1グラムの土壌の小宇宙を想定しよう。ここに 10^7 個ずつ存在する99の優占種と 10^2 個ずつ存在する100,000種類の微生物がいると仮定する。99の優占種すべてが液体培養あるいは固体培養が可能な微生物だとすると、100,000種類の非優占種は（特別な選択圧をかけることによってすべての優占種が排除できる場合を除いて）通常の微生物培養手法では培養ができないばかりでなく、PCRでの検出も、メタゲノムアプローチでも検出が困難である。一方で、もしある抗生物質耐性微生物が 10^2 個存在していたとする。それ以外のすべての微生物がその抗生物質に感受性ならば、その 10^2 個はたやすく分離することができるであろう。実は、何気ない普通の栄養源を含む培地で出現するコロニーというのはごく特定の非優占種である場合が多い。これはその“何気ない普通の培地”が立派な選択圧として働いていることを意味しており、逆に言えば99種の優占種にとっては不都合な培地であると言える。ここで強調したいのは、幅広い微生物を捕捉しようと思って意図した培地と培養条件そのものが実は決定的な選択圧になっていることがあるという点である。

4. 再び難培養性微生物とは

上述のように“難培養微生物の姿”について概観してきたが、実際のところここで紹介した微生物は(a)結果的には何らかの方法で集積・分離・培養が可能だったもの(b)分離も培養もできないが、昆虫の共生体のように昆虫そのものが純粋培養器として機能し、ゲノム解析を含めた機能推定が可能だったもの(c)さまざまな

手を尽くしたが分離・培養、機能推定もできなかったものの、の3つに集約できる。本当に培養困難な微生物については、なぜ培養困難なのか、その答えは未だ持ち合せていない。本稿で述べた“難培養微生物の実体”というのは、培養できた微生物や培養ができなくても機能推定が可能であった微生物の研究を通して、帰納法的に推定したものに過ぎない。微生物というあらゆる生命の源流である生物群の沃野を鳥瞰するにはなお多くの研究課題が残されているが、“微生物を培養する”という作業は実は生物学にとって最も根源的な課題と対峙していることにほかならない。

文 献

- Whitman, W.B., D.C. Coleman, and W.J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6578–6583.
- Torsvik, V., J. Goksøyr, and F.L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 782–787.
- Gans, J., M. Wolinsky, and J. Dunbar. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387–1389.
- Bullock, W. 天児和暢訳：細菌学の歴史 医学書院（2005）。
- Amann, R.L., W. Ludwig, K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169.
- Qiu, Y.-L., Y. Sekiguchi, H. Imachi, Y. Kamagata, I.-C. Tseng, S.-S. Cheng, A. Ohashi, and H. Harada. 2004. Identification and isolation of anaerobic, syntrophic *p*-phthalate isomers-degrading microbes from methanogenic sludges treating wastewater from terephthalate manufacturing. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1617–1626.
- Sakai, S., H. Imachi, Y. Sekiguchi, A. Ohashi, H. Harada, and Y. Kamagata. 2007. Isolation of key methanogens for global methane emission from rice paddy field: a novel isolate affiliated with a clone cluster, the Rice Cluster I. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4326–4331.
- Tamaki, H., Y. Sekiguchi, S. Hanada, K. Nakamura, N. Nomura, M. Matsumura, and Y. Kamagata. 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake as revealed by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2162–2169.
- Ohno, M., H. Shiratori, M.J. Park, Y. Saitoh, Y. Kumon, N. Yamashita, A. Hirata, H. Nishida, K. Ueda, and T. Beppu. 2000. *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a symbiotic thermophile that depends on co-culture with a *Bacillus* strain for growth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1829–1832.
- Tanaka, Y., S. Hanada, A. Manome, T. Tsuchida, R. Kurane, K. Nakamura, and Y. Kamagata. 2004. *Catellibacterium nectariphilum* gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 955–959.
- Tanaka, Y., S. Hanada, H. Tamaki, K. Nakamura, and Y. Kamagata. 2005. Isolation and identification of bacterial strains producing diffusible growth factor(s) for *Catellibacterium nectariphilum* strain AST4T. *Microb. Environ.* 20: 110–116.
- Sekiguchi, Y., Y. Kamagata, K. Nakamura, A. Ohashi, and H. Harada. 1999. Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1280–1288.
- Imachi, H., Y. Sekiguchi, Y. Kamagata, A. Ohashi, and H. Harada. 2000. Cultivation and in situ detection of a thermo-

- philic bacterium capable of oxidizing propionate in syntrophic association with hydrogenotrophic methanogens in a thermophilic methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3608–3615.
- 14) Kamagata, Y., and H. Tamaki. 2005. Cultivation of uncultured fastidious microorganisms. *Microb. Environ.* 20: 85–91.
- 15) Shigenobu, S., H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki, and H. Ishikawa. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature* 407: 81–86.
- 16) Shinzato, N., I. Watanabe, X-Y. Meng, Y. Sekiguchi, H. Tamaki, T. Matsui, and Y. Kamagata. 2007. Phylogenetic analysis and fluorescence in situ hybridization detection of archaeal and bacterial endosymbionts in the anaerobic ciliate *Trimyema compressum*. *Microbial Ecol.* (in press).