

## 培養アプローチで切り拓く未知微生物の新機能

### Cultivation-Driven Discovery of Novel Microorganisms and Biological Functions

玉 木 秀 幸 \*

HIDEYUKI TAMAKI

国立研究開発法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門  
〒 305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 つくばセンター中央第 6-10  
\* TEL: 029-861-6592 FAX: 029-861-6587

\* E-mail: tamaki-hideyuki@aist.go.jp

Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),  
Tsukuba Central 6-10, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

キーワード: 未知微生物, 難培養微生物, 分離培養, 環境ゲノム

Key words: yet-to-be cultured microorganisms, cultivation, environmental omics

(原稿受付 2015 年 3 月 9 日 / 原稿受理 2015 年 3 月 15 日)

#### 1. はじめに

環境ゲノム解析研究全盛の時代である。次世代シーケンサーの登場とその革命的な進化によって、「遺伝子を読む」時代から「ゲノムから読み解く」時代へと移り変わり、今や、わずか 1 日でヒトゲノムの 100 倍以上を解読できる時代になった。この技術は環境微生物学の発展にも大きく貢献しており、今では仮に 1,000 種以上から成る複雑な微生物生態系であっても、未知微生物を含むその構成種のゲノムを一つ一つ解読してその代謝機能を推定したり (シングルセルゲノム解析やメタゲノム解析)、環境 RNA を網羅的に解読することで実際に機能している遺伝子や代謝機能を推定すること (メタトランスクリプトーム解析) が可能になってきており、これまで以上に深く環境中の未知微生物の実体に迫ることが可能になりつつある<sup>1,2)</sup>。このような環境ゲノム解析研究全盛の時代にあって、環境中から一つ一つ未知微生物を分離・培養して、その生理生態機能を明らかにしようとする未知微生物探索研究のアプローチは、ややもすると古典的とみなされがちであり、その煩雑さ、不確実さのために敬遠されがちで、ことによると環境微生物学において必ずしも必要ないのではないか、という声すら聞かれることも少なくない。果たしてそうだろうか。本稿では、この大規模シーケンス情報解析の時代の中で、未知微生物探索研究と新しい微生物分離培養技術の開発がどのような進展を遂げてきたのかについて、筆者らの取組みを交えながら概観するとともに、未知微生物探索研究の現状と課題を認識しつつ、その意義と今後の可能性について論じたい。

#### 2. 地球環境に膨大かつ多様に存在する未知微生物

微生物 (本稿では原核生物に限定する) は、川や池、湖や海、森や畑、土壌や底質、氷河や温泉はもちろん、ヒト、動物、昆虫の表皮やお腹の中 (腸内)、植物の根圏や葉圏、さらには大気圏から陸域の地下圏や深部海底下に至るまで、地球上のありとあらゆる環境に棲息しており、その数は  $10^{29}$ ~ $10^{30}$  個のオーダーに及ぶと言われている<sup>3,4)</sup>。では、地球上には一体どのくらいの微生物の種の数が存在し、そのうち、我々人類はどのくらいの微生物を培養できるようになったのだろうか。地球上に存在する微生物の種数を正確に推定することは今のところ困難であるが、わずか 1 グラムの土壌に 100 万もの種が存在するという報告がある<sup>5)</sup>。昆虫だけでも 100 万種存在すると言われており、また最新の知見では、真核生物全体で 870 万種存在すると推定されていることを考えても、地球環境に棲息する微生物の種数は 100 万~1000 万を優に超えるであろうことが容易に想像できる。一方で、我々人類が純粋分離に成功し、その生理性状を調べて学名を記載してきた微生物の種数は、およそ 1 万種、であり、どんなに多く見積もっても地球上の全微生物種のおよそ 0.1~1% 程度に過ぎないのである。実際に、様々な環境試料から微生物を培養してみると、顕微鏡で数えられる微生物の数の 0.01%~数% 程度しか培養できないケースがほとんどである。こうした事実から、環境中に存在する微生物の実に 99% 以上が、未だ培養されたことがない、あるいは培養の困難ないわゆる未知微生物であると言われており、地球環境中には、宇宙空間の星の数 (推定  $10^{21}$  個) よりも桁違いに多くの未知微生物が手つかずのまま眠っていることから、近年では未知微生物を宇宙物理学分野の暗黒物質問題になぞらえて、生物界の暗黒物質 (microbial dark matter) 等と表

されている。

さらに「門 (phylum)」という生物の分類を基準に培養可能な微生物について見てみよう (図1, 図2)。門とは、生物の系統分類体系において、ドメインの直下にあたる分類階級であり、バクテリアドメイン, アーキアドメインの実質的に最も上位の分類階級にあたる。16S rRNA 遺伝子に基づいた分子生態解析により, 現在, 原核生物には少なくとも 100 以上の門が存在しうることが明らかにされているが, そのうち純粋分離株が存在し, 正式に門として認定されているのはわずか 33 門に過ぎず, 残りの 70 近くの門が, 未だ培養株の存在しない門レベルの未培養系統群 (候補門) である<sup>9)</sup> (図1)。さらに言えば, これまで人類が純粋培養してきた微生物を門のレベルで整理すると, なんとその 90% 以上が,

*Proteobacteria* 門, *Actinobacteria* 門, *Firmicutes* 門, *Bacteroidetes* 門のわずか 4 つの門に集約されるのである (図2)。このことは, 環境中に存在しうる未知微生物の多様性がいかに高いかを明示すると同時に, 門のレベルでみると, 我々人類がいかに系統的に偏った微生物ばかりを純粋分離してきたかを如実に物語っている。

ここまで述べてきたように, 我々人類がこれまでに純粋分離してきた微生物というのは, 地球環境中存在する全微生物の極僅かであると同時に, 系統的にも非常に偏っていることは紛れも無い事実である。その一方で, 非常に偏ったこの僅か 1% 程度の純粋分離された微生物の中から, 人類は様々な新しい生理機能や代謝機能を見出して社会生活に役立ててきており, さらに環境中での微生物の役割を一步一步解明してきた, というのもまた事実である。

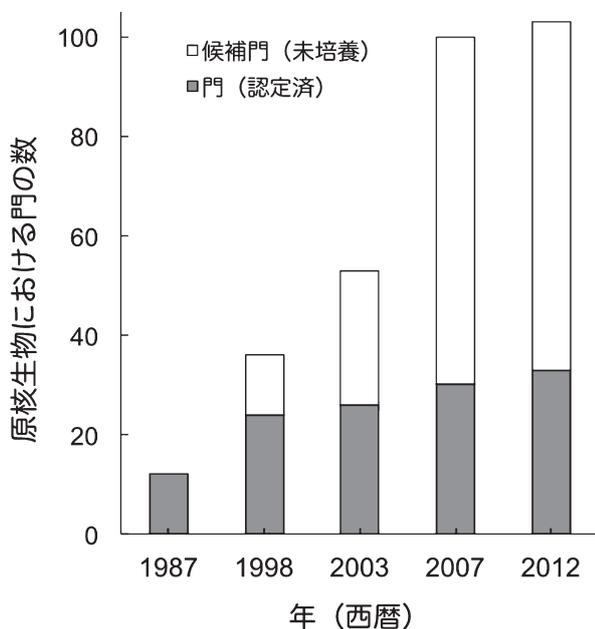


図1. 原核生物における門レベルの系統群の数の推移

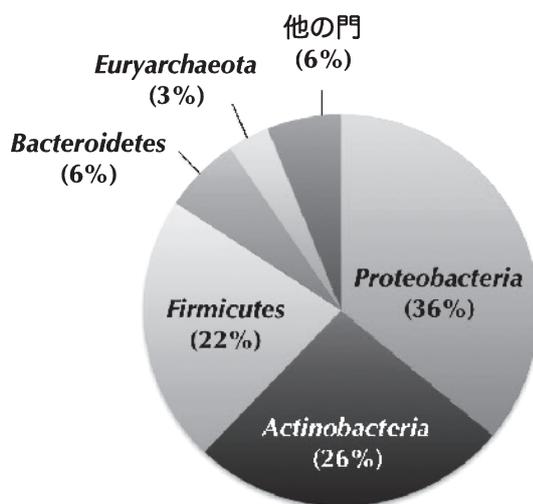


図2. 門レベルでみたときの培養可能な微生物  
グラフはこれまでに純粋分離されてきた全ての原核生物を門レベルで分類したときの割合 (%) で表している。

### 3. どのような未知微生物が培養されてきたのか ～未知微生物探索研究の歩み～

もし, 上述のような地球環境中に眠る膨大かつ多様な未知微生物を培養化する新しいアプローチを開発し, 培養可能な微生物の割合を, 現在の 1% から 10%, あるいは 20% へと高めることができれば, これまでにない新しい生物・遺伝子資源の獲得が可能となり, 新しい生物機能の発見や, 地球環境の保全修復に果たす環境微生物の生理生態学的役割の解明につながるのではないだろうか。こうした考えから, 筆者らはこれまで 10 年以上にわたって, 新たな分離培養技術の開発とともに未知微生物探索研究を継続的に実施してきた。その過程において, 筆者の所属グループ (産総研 生物資源情報基盤研究グループ) では, 多くの共同研究機関の方々と共同もしくは単独で, 土壌, 底質, 淡水, 海洋, 温泉, 深部地下圏, 活性汚泥等の様々な環境試料から, 新属新種の細菌はもとより, 科や目以上の高次分類基準で新しい微生物の純粋分離に成功してきている。実際に, これまでに (2000 年以降) 新種 55 種, 新属 33 属, 新科 10 科, 新目 8 目, 新綱 6 綱, 新門 2 門の学名提案を行ってきており, 国際細菌命名委員会により正式に認定されている (2015 年 4 月現在)。特に, 門レベルで新しい細菌を純粋分離し, 新門学名の提案を行った事例は世界的にも珍しく, 2000 年以降, 世界全体でも 6 つの新門提案しか行われていない (図3, 表1)。まず, 上記グループで学名提案したこの 2 つの新門 *Gemmatimonadetes* 門ならびに *Armatimonadetes* 門について概説する。

*Gemmatimonadetes* 門は, 2003 年に認定された細菌門である<sup>7)</sup> (図3, 表1)。これは, 門レベルの新規細菌を純粋分離し, 新門学名を提案した初めての事例であり, その後の新門学名提案の指針を示したのものとして, 未知微生物探索研究のマイルストーン的な成果となっている。この門の基準菌株である *Gemmatimonas aurantiaca* は, リン除去廃水処理プロセスから純粋分離され, 実際に細胞内にポリリン酸を蓄積する能力があることが明らかにされている。一般的に, ポリリン酸蓄積細菌は増殖速度が非常に遅く, 典型的な難培養性の細菌の一つであることが知られている。例えば, 廃水処理プロセスにおいて最も主要なリン蓄積細菌と考えられている *Ca.*

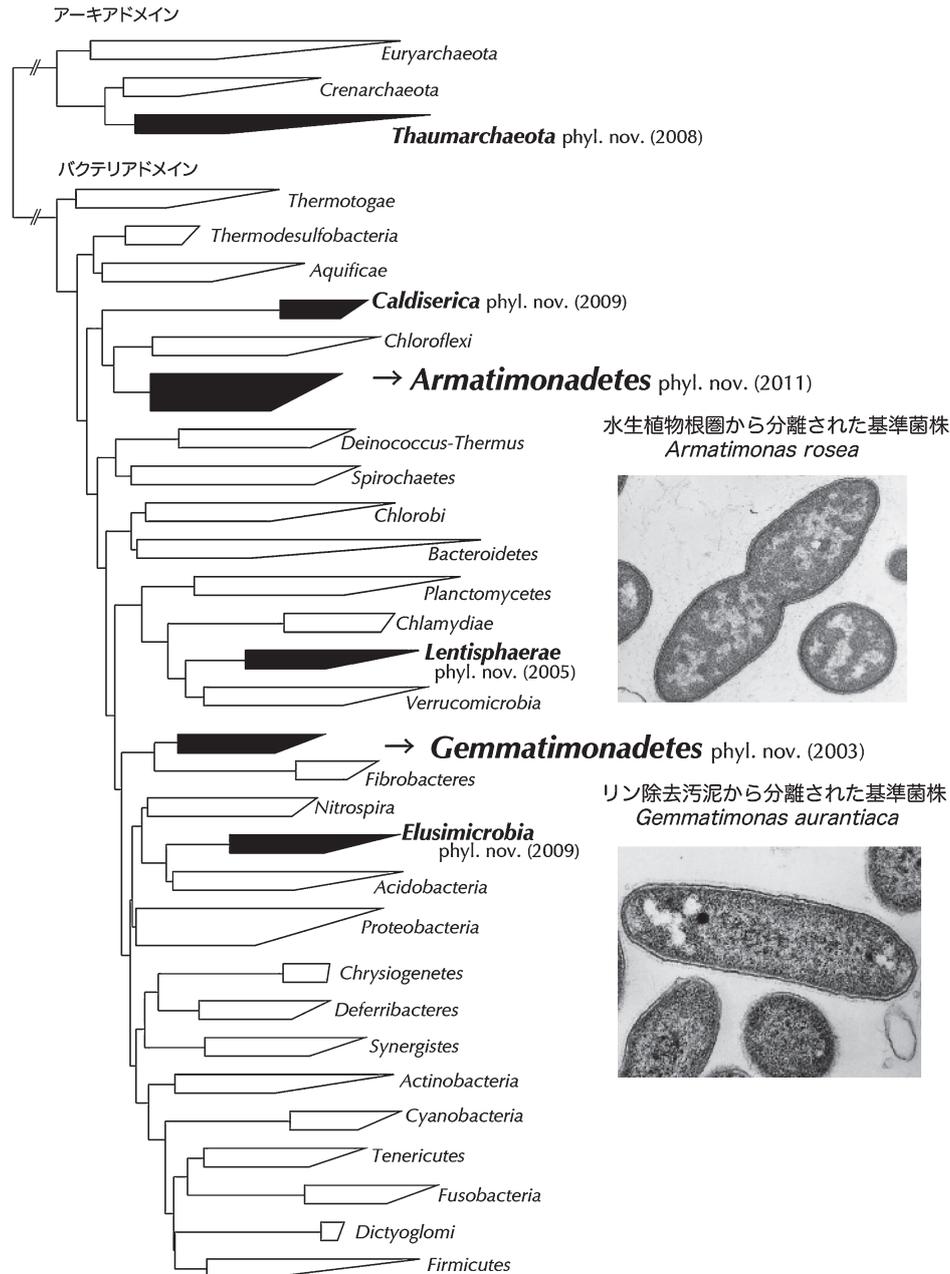


図3. 16S rRNA 遺伝子情報に基づいた原核生物の門レベルの分子系統樹  
2001年以降に登録された6つの新門を太字(黒枠)で示すとともに、筆者が所属する研究グループで提案し、正式に認定された2つの新門微生物については電子顕微鏡写真を付した。

*Accumulibacter* 属細菌は今もなお純粋分離がなされていない難培養性微生物の典型である。*G. aurantiaca* は、そうした増殖速度の遅いポリリン酸蓄積細菌を分離しようとする過程で得られたものであり、漫然と従来法を繰り返すだけでは恐らく分離されることはなかった細菌であろう。最近、この *Gemmatimonadetes* 門の分子生態学的研究が進められているが、本門は非常に多様な環境に分布しており、16S rRNA 遺伝子配列の多様性も高く、*Proteobacteria* 門に匹敵するとも言われている<sup>8)</sup>。にもかかわらず、*Gemmatimonadetes* 門の正式な学名記載種は未だに *G. aurantiaca* の1属1種のみであることは、本門がいかに培養頻度の低い難培養性の細菌門であるかを示していると言えよう。

*Armatimonadetes* 門は、筆者らが2011年に提案し、正式に認定された新しい細菌門である(図3, 表1)。世界的に最もよく知られた門レベルの未培養系統群に OP シリーズ(OP は米国イエローストーン国立公園にある *OpSIDian Pool* という温泉の略で、OP1~OP11まで存在する)があるが<sup>9)</sup>、*Armatimonadetes* 門はこの内の一つの OP10 候補門に該当する。この OP10 候補門もまた、多様な 16S rRNA 遺伝子配列で構成されており、土壌、河川、湖沼、海洋、底泥、植物根圏、温泉、動物腸内、堆肥、廃水処理プロセス等、好気的な環境から嫌気的な環境まで幅広く存在していることが比較的早くから知られており、その未知で多様な代謝機能や生態学的役割に高い関心が寄せられていた。筆者らは、水生植物の1種

表 1. 2001 年以降に培養された系統的に新しく機能的に重要な未知微生物

年	系統分類	候補系統群名	基準菌株 / 分離株	系統や機能に関する特徴	文献
2002	<i>Alphaproteobacteria</i> 綱	SAR11	<i>Ca. Pelagibacter ubique</i>	少なくとも目レベルの系統群。地球上で最も多い細菌種として知られる。プロテオドロブソンによる光従属栄養細菌。ゲノムサイズは 1.3 Mbp 程度と自由生活型の単細胞としては最小レベル。	Rappe et al., Nature (2002) <sup>28)</sup> ; Giovannoni et al., Nature (2005) <sup>53)</sup>
2003	<i>Gemmatimonadetes</i> 門	BD or KS-B	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	新門学名提案。基準株はポリリン酸蓄積細菌であり、今もなお 1 門 1 属 1 種のみ。	Zhang et al., IJSEM (2003) <sup>7)</sup>
2004	<i>Lentisphaerae</i> 門	VadimBE97	<i>Lentisphaera araneosa</i>	新門学名提案。基準株は超低栄養性海洋細菌。	Cho et al., EM (2004) <sup>29)</sup>
2005	<i>Thaumarchaeota</i> 門	Marine Group I	<i>Ca. Nitrosopumilus maritimus</i>	新門学名提案。アンモニア酸化能をもつ初のアーキアの発見。海洋に豊富に存在するアーキアの 1 種。	Stahl et al., Nature (2005) <sup>14)</sup> ; Brochier et al., Nature Rev. Microbiol. (2008) <sup>17)</sup>
2007	<i>Methanocellales</i> 目	Rice Cluster I	<i>Methanocella paludicola</i>	水田土壌で最も豊富にメタン生成アーキア。長い間培養ができなかった難培養性アーキア。嫌気共生培養によりその純粋分離を実現。	Sakai et al., AEM (2007) <sup>54)</sup>
2007	<i>Verrucomicrobia</i> 門	—	<i>Ca. Acidimethylosilex fumarolicum</i> <i>Ca. Methylokorus inferorum</i>	門レベルで新規なメタン酸化細菌。pH 1 以下でも生育可能な高度好酸性細菌。	Pol et al., Nature (2007) <sup>21)</sup> ; Dunfield et al., Nature (2007) <sup>20)</sup>
2007	<i>Acidobacteria</i> 門	—	<i>Ca. Chloracidobacterium thermophilum</i>	門レベルで新規な光合成細菌。	Bryant et al., Science (2007) <sup>18)</sup>
2009	<i>Elusimicrobia</i> 門	Termite Group I	<i>Elusimicrobium minutum</i>	新門学名提案。基準株は昆虫腸環境から分離された。直径が 0.17–0.3 μm の極小細菌。	Geissinger et al., AEM (2009) <sup>55)</sup>
2009	<i>Caldiserica</i> 門	OP5	<i>Caldiserica exile</i>	新門学名提案。基準株は温泉環境から分離された好熱性チオ硫酸還元細菌。	Mori et al., IJSEM (2009) <sup>56)</sup>
2011	<i>Armatimonadetes</i> 門	OPI0	<i>Armatimonas rosea</i>	新門学名提案。基準株は水生植物の根圏から分離された。高分子化合物を好む従属栄養性細菌。	Tamaki et al., IJSEM (2011) <sup>11)</sup> ; Tanaka et al., Microbes Environ. (2011) <sup>10)</sup>
2013	<i>Methanomassiliicoccales</i> 目	E2 group	<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	綱レベルで新規なメタン生成アーキア。 <i>Thermoplasma</i> 綱にメタン生成細菌が見つかったことで話題となった。地下圏をはじめ無酸素環境下に広く分布。	Dridi et al., IJSEM (2012) <sup>22)</sup> ; Iino et al., Microbes Environ. (2013) <sup>25)</sup>
2014	<i>Gemmatimonadetes</i> 門	—	<i>Gemmatimonas</i> sp. AP64	門レベルで新規な光合成細菌。	Zeng et al., PNAS (2014) <sup>19)</sup>

であるヨシの根圏環境から、この OP10 候補門に属する新規細菌 *Armatimonas rosea* の純粋分離に成功するとともに新門学名の提案をしており、OP10 候補門の形態学的特徴や生理生化学的な性状の一端を明らかにした<sup>10,11</sup>。現在、筆者らは、本門の新しい機能として、*Armatimonadetes* 門細菌が水生植物の成長を促進する能力があることを突き止めており、現在、本細菌と水生植物との共生メカニズムの解明を進めているところである。また、これまでに、植物根圏環境だけでなく、地熱環境や土壌環境から、*Armatimonadetes* 門に属するが綱 (class) レベルで新しい高温性細菌<sup>12</sup> (*Chthonomonas calidirosea*) 及び中温性細菌<sup>13</sup> (*Fimbriimonas ginsengisoli*) が純粋分離され、新綱学名の提案もなされるなど、本門の系統学的かつ機能的な多様性が少しずつ明らかになってきている。

21 世紀以降、上述の新門細菌以外にも、系統的に新規性が高く、機能的にもユニークな新規微生物が分離されてきている (表 1)。その最たる例の一つが、アンモニア酸化アーキアの発見であろう。Stahl らの研究グループは、未培養アーキア系統群 Marine Group I (MG-I) に属する新規アーキア *Ca. Nitrosopumilus maritimus* の純粋分離に成功し、このアーキアが独立栄養性の生物で、アンモニアを酸化する能力をもつことを初めて明らかにした<sup>14</sup>。この発見の重要な点は、(1) それまで、アンモニア酸化反応は細菌 (バクテリア) が担っており、しかも細菌の中でも非常に限られた系統群 (*Betaproteobacteria* 綱と *Gammaproteobacteria* 綱のみ) の微生物だけが担う代謝反応であると考えられていたが、その常識と概念を大きく覆したこと、そして (2) MG-I は海洋環境で最も優占するアーキアとして知られており、この未知アーキアが、炭酸固定能をもつ一次生産者でありアンモニア酸化のキープレーヤーである、という決定的な証拠を提示し、同アーキアが地球規模での窒素循環と炭素循環に極めて大きな役割を果たすことを明らかにした点である。この発見の後、MG-I ならびにその近縁のアーキアが、海洋環境のみならず世界中の土壌環境や温泉環境、さらには廃水処理プロセスにも存在することが明らかにされ、実際に、土壌や温泉環境から新しいアンモニア酸化アーキアが分離培養される等<sup>15,16</sup>、アンモニア酸化アーキアの多様性の高さや棲息分布域の広がりが次第に明らかにされてきている。一連の重要な科学的知見に基づいて、MG-I を含むアンモニア酸化アーキア系統群に対して、*Thaumarchaeota* 門というアーキアドメインの新門学名が提案されている (図 3, 表 1)<sup>17</sup>。

また、光合成能をもつ細菌についても、従来の常識を覆す発見が相次いでいる (表 1)。というのも、光合成もまた、アンモニア酸化ほどではないが非常に系統的に限られた微生物のみ (*Proteobacteria* 門, *Firmicutes* 門, *Cyanobacteria* 門, *Chlorobi* 門, *Chloroflexi* 門の 5 門のみ) がもつ機能であると考えられていた。しかしながら、最近になって、培養頻度の低い難培養性の門として知られる *Acidobacteria* 門さらには前述の *Gemmatimonadetes* 門の中に光合成能をもつ新しい生物 (*Ca. Chloracidobacterium thermophilum*<sup>18</sup> および *Gemmatimonas* sp. AP64<sup>19</sup>) が存在することが、分離培養のアプローチに

よって初めて明らかにされたのである。前者は光化学系 I 型 (PS1) のみを、後者は逆に光化学系 II 型 (PS2) のみをもつこと等も明らかにされており、多様でユニークな光合成細菌の未知機能の実体が徐々に明らかにされつつある。

また、*Acidobacteria* 門や *Gemmatimonadetes* 門と同じく培養の困難な細菌門として知られる *Verrucomicrobia* 門についても、その新規細菌 (*Ca. Methylokorus infernorum* および *Ca. Acidimethylosilex fumarolicum*) がメタンを酸化する能力をもつという報告がなされた<sup>20,21</sup> (表 1)。前述のアンモニア酸化と同様に、この好気的なメタン酸化能もまた、この発見までは *Proteobacteria* 門のみでしかその機能が知られておらず、*Proteobacteria* 門以外で、しかも *Verrucomicrobia* 門から新規メタン酸化細菌が見つかったことは非常に驚くべき発見であった。さらに興味深いことに、*Ca. Methylokorus infernorum* のゲノムを解読してみると、既知の C1 代謝経路において鍵となるメタノールおよびホルムアルデヒド酸化酵素遺伝子群に相同性の高い配列が全く見つからず、従来とは異なる新たな C1 代謝経路の存在が示唆されている。さらに、環境中でのメタン酸化細菌の多様性、分布、量を分子生態学的に解析する際に常用されているマーカー機能遺伝子 (メタンモノオキシゲナーゼをコード *pmoA*) があるが、上記の *Verrucomicrobia* 門細菌は特徴的な *pmoA* 遺伝子配列をもつために、従来のユニバーサルプライマーでは検出できず、これまで研究対象とされてこなかったメタン酸化細菌群であることが分かっている<sup>20</sup>。

メタン酸化だけでなく、メタンを生成するプロセスにおいても、これまで全く知られていなかった新たなプレーヤーが見つかった (表 1)。ヒトの腸内環境から純粋分離されたこの微生物は、当初は単なる新属新種のメタン生成アーキア *Methanomassiliococcus luminyensis*<sup>22</sup> として記載されていたが、その後、昆虫の腸内やルーマン環境、さらには嫌気性廃水処理プロセスから同アーキアに近縁の微生物が集積培養され、メタン生成への関与が特定されるとともに、本アーキアが *Thermoplasmata* 綱という全くこれまでメタン生成菌を含まない系統群に属し<sup>23,24</sup>、しかも地下圏環境等の無酸素環境において高頻度に検出される目レベルの未知系統群 E2 に属する、ということが判明し大きな関心を集めた。2013 年、Iino らは、この系統群に新目 *Methanomassiliococcales* 目を提案し、メタン生成アーキアの 7 番目の目として正式に認定されている<sup>25</sup>。

メタンと言えば、貴重な天然ガスエネルギー資源であると同時に温室効果の極めて高いガス成分であり、当然、メタンの消費や生成のプロセスは地球温暖化や炭素循環に非常に大きな影響を及ぼすものである。また上述の光合成やアンモニア酸化もまた、地球規模の炭素循環、窒素循環に関わる重要な生物地球化学的プロセスであることは言うまでもない。ここで述べてきた一連の研究結果は、このように重要な生物地球化学プロセスですら、長い間、我々はそのキープレーヤーを見落としていた、そして今なお見落としている可能性がある、ということの意味している。同時に、上述のように純粋分離を経て、“活きた微生物”を手にし、未知微生物がもつ多様で新しい生理生態機能の決定的な証拠を掴むという

アプローチの重要性がここに示されていると言えよう。

#### 4. 未知微生物を分離・培養するための新しいアプローチ

ここからは、今世紀以降、未知微生物探索を目的としてどのような新しい分離培養のアプローチが開発されてきたのかについて焦点をあてて論じたい。特に、筆者らの研究グループも力を入れて取り組んでいる4つのアプローチ(1)古典的培養法の再考・改良,(2)水生植物-微生物間共生に着目したアプローチ,(3)微生物-微生物間共生に着目したアプローチ,(4)原位置培養法や環境を模擬した培養法,を中心に世界的な研究動向も含めて紹介する。

##### 4.1 古典的培養法の再考・改良

コッホ, パスツールの時代に確立された微生物の純粋分離手法は, 100年以上を経た今もなお有用な手法であることには変わりはない。実際に, 多くの研究者が, こうした古典的培養法を効果的に改良することにより, これまで難培養性とされてきた未知微生物の純粋分離に成功してきている。例えば, 古典的な液体培養法の改良法であるハイスループット限界希釈培養法(HTC法: high-throughput dilution-to-extinction cultivation method)を用いたアプローチはその代表的な成功例である<sup>26)</sup>。この方法は, (1)現場の環境水そのものを滅菌して培地として用いる, あるいは極めて低栄養な培地を用いて, (2)マイクロウェルプレートを活用して従来よりも微小なスケールで一度に多数の限界希釈培養をハイスループットに行い, (3)生育の判定を濁度に頼らず, DAPI等の蛍光染色により生育した細胞を顕微鏡下で直接計数することで, 従来なら未生育と捉えていたレベルの増殖を検出して継代培養する, といったアプローチで未知微生物の純粋分離を図るものである。このアプローチにより, 海洋表層環境で優占し(海洋表層細菌群集の25%を占め), 地球上で最も数の多い細菌種(約 $10^{28}$  cells存在)として知られていながらも<sup>27)</sup>, 従来法では全く分離ができなかったSAR11系統群細菌(*Ca. Plagibacter ubique*)や, 新門 *Lentishaerae* 門細菌をはじめ数々の海洋性, 淡

水性の未知微生物の純粋分離がなされてきている<sup>28,29)</sup>。

一方で, 我々が着目したのは古典的培養法の中でも, 寒天を用いた固体培養法の再考, 改良である。言うまでもなく, 寒天培養法はおそらく最も多くの微生物研究者が長きにわたって汎用している, 微生物の純粋分離のいわば常法である。我々はこの寒天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, 多様な未知微生物の純粋分離に成功してきている。特に効果の高いゲル化剤として, 微生物由来の多糖類である **Gellan gum** が挙げられる。実際に, 全く同一の環境試料(湖沼底質や活性汚泥等)を用いて同じ培養条件で比較した場合, 寒天を用いるよりも **Gellan gum** を用いた方が, コロニー形成率が最大で10倍以上高く, また系統的に新規な微生物の獲得率も2倍以上高くなることを明らかにしている<sup>30)</sup>。また, 前述の新門 *Gemmatimonadetes* 門の基準菌株である *Gemmatimonas aurantiaca* は, 寒天培地で培養した場合, コロニー形成に14~20日程度かかる難培養性細菌の一つであるが, これを **Gellan gum** 培地で培養すると3~5日程度でコロニーを形成するようになり, また同じ細胞数を接種しているにもかかわらず, 最大のコロニー形成数も, 寒天培地の50倍以上高い値を示すなど, **Gellan gum** 培養法の有効性が示されている<sup>31)</sup>(図4)。また, **Gellan gum** 培養法は, 好気性微生物の培養だけでなく, 絶対嫌気性微生物の培養にも効果的である。例えば, 絶対嫌気性微生物の純粋分離に用いられるロールチューブ法では, 多くのメタン生成アーキアや硫酸還元菌が, 寒天培地よりも **Gellan gum** 培地でより高いコロニー形成率を示すことが分かっている<sup>32)</sup>。何故, このように寒天よりも **Gellan gum** の方が微生物培養に有効なのだろうか。大別すると二つの理由が考えられる。一つは, 正の要因として, **Gellan gum** の物性等が微生物のコロニー形成に効果的に働く可能性であり, もう一つは負の要因として, **Gellan gum** そのものが効果的なのではなく, 寒天に含まれる微量の不純物が微生物の生育に対して阻害的に働く, という可能性である。最近になって, 後者を支持する成果が発表されている。*Hashidoko* らの研究グループは, 寒天に微量に含まれるフランカルボン酸が微生物の生育を

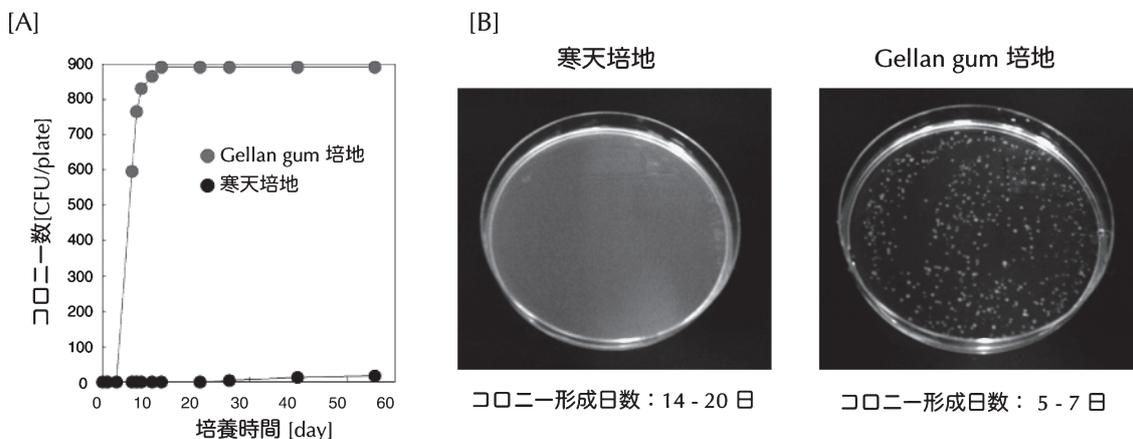


図4. 新門細菌 *Gemmatimonas aurantiaca* のコロニー形成に及ぼすゲル化剤の影響  
培養7日目の寒天培地ならびにジェランガム培地でのコロニー形成の様子を写真で示した。培養7日目では, 寒天培地ではほとんどコロニー形成が見られないが, ジェランガム培地では明瞭なコロニー形成が観察される。

著しく阻害すること、さらにその成分が **Gellan gum** には少ないか、あるいは含まれていないことを報告している<sup>33)</sup>。さらに、最近、寒天平板培養法の再考・改良を試みる中で、同培養法の想いもよらない決定的な問題点が明らかとなってきた。それは寒天平板培地の調整方法である。通常、寒天平板培地を調整する時は、“他の成分”と寒天と一緒にオートクレーブ滅菌する。この作業が決定的に微生物のコロニー形成を抑制するのである。正確に言えば、“他の成分”の中でも特にリン酸塩成分と寒天と一緒にオートクレーブすると、過酸化水素が生成し培地に留まるため、微生物のコロニー形成が著しく阻害される、という驚くべき事実が明らかにされた<sup>34)</sup>。これまでも、グルコース等の一部の有機物成分と寒天と一緒にオートクレーブをするとメーラード反応により着色し、微生物の培養に良くないことは知られており、それらを別々にオートクレーブするという作業は行われていた。しかしながら、リン酸塩と寒天をオートクレーブすることが、このように微生物を培養する上で極めて重大な落とし穴になりうる、とは誰も予想だにできなかったことである。この例に示されるように、古典的培養法の再考や改良という手法は一見地味ではあるが、今後も未知微生物探索に向けて大きな効果をもたらす余地のある重要なアプローチであると言える。

#### 4.2 微生物-微生物間共生に着目したアプローチ

「微生物が会話する」……もちろん実際には微生物が互いに話をするわけではないが、微生物細胞が低分子のシグナル物質を介して互いにコミュニケーションをとっているという事実（例：クオラムセンシングなど）が明らかとなり、環境中での微生物の生存戦略を考える上ではもちろんのこと、未知微生物を培養する上でも、微生物-微生物間相互作用の概念は非常に重要である。特に、筆者らは、これまで培養されていない難培養性・未知微生物の中には、「単独では生育できない」あるいは「単独では生育が著しく弱い」微生物が少なからず存在しているのではないかと考えている。そこで、このような「単独では培養の困難な未知微生物」を探索するため、環境中の培養可能な微生物をまず収集し、その培養

可能な微生物が生産する何らかの生育因子によって生育が支持されるような未知微生物を培養化するというアプローチを試みている。実際に、これまで活性汚泥や土壌試料等を対象として、*Sphingopyxis* 属や *Ensifer* 属細菌の生育因子によって著しく生育が促進されるような新属新種レベルの新規細菌（例：*Catellibacterium nectariphilum* など）を複数分離することに成功しており、現在、その異種微生物間共生のメカニズム解明を進めている（図5）。特に、*Sphingopyxis* 属細菌-*C. nectariphilum* の異種間相互作用に介在する生育因子の解析を進めてきており、これまでのところ、本生育因子は分子量が1 kDa 以下で、熱処理や酸アルカリ処理に安定な低分子の非ペプチド性有機物である可能性が示唆されている<sup>35)</sup>。また、これまで知られている様々な微生物生育因子やシグナル物質（ペプトンや酵母エキス等の有機性増殖因子、ビタミン類、アミノ酸類、アルコール類、短鎖脂肪酸類、アシルホモセリンラクトン類 (AHLs)、サイクリック AMP (cAMP)、dopamine, norepinephrine, triptamine, naphthoic acids 等々)を試してみても、未だ *C. nectariphilum* の生育因子に置き換えられるものが見つかっていないことから、*Sphingopyxis* 属細菌が何らかの未知の生育因子を生産している可能性があり、現在その大量精製と構造決定が進められている。近年、Epsteinらの研究チームもまた、別の細菌種によって生育が支持されるような未知の海洋細菌を発見しており、その生育因子がシデロフォアやペプチド性因子であることを明らかにしている<sup>36,37)</sup>。このように、異種間でやりとりされる物質の授受を介した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解明は、今後の未知微生物探索に向けて重要な鍵の一つになりえるのではないだろうか。

#### 4.3 水生植物-微生物間共生に着目したアプローチ

近年、我々は水生の植物と微生物との共生関係に着目して、未知微生物探索を精力的に進めている。植物と微生物の共生と言えば、窒素固定能をもつ根粒菌やアーバスキュラー菌根菌に代表されるように農業上の重要性から、陸生の植物、特に農作物を中心に盛んに研究されており、植物-微生物間共生の分子基盤まで詳細に明ら

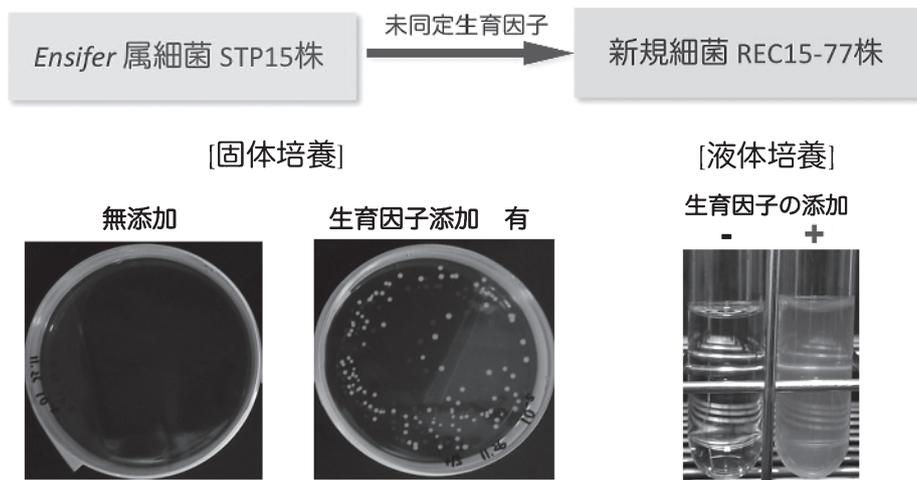


図5. 培養可能な他の微生物種 (*Ensifer* 属細菌) によって生育が支持される新規細菌

かにされてきている。一方で、水生の植物については、微生物との共生メカニズムはおろか、どのような微生物が水生植物に棲息しているのかすらほとんど明らかになっていない。水生植物は、湖や沼、池、河川等の多様な水圏環境に棲息しており、ウキクサ類やホテイアオイ等のような浮遊性のものから、ヨシ、ミソハギ等の抽水性のものまで幅広く存在し、水圏の環境保全に重要な役割を果たしていることが知られており、水生植物と共生する微生物の研究は重要である。そこで、まず我々は、水生植物の根圏環境に棲息する微生物の多様性解析を行ってみたところ、非常に興味深い二つの知見が得られた。その一つは、水生植物の根圏微生物の多様性が非常に高いことである。例えば、同じ池に棲息しているヨシ (学名 *Phragmites australis*) とミソハギ (学名 *Lythrum anceps*) の根圏微生物群集を 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリ法で調べてみると、植物体のすぐそばの水試料では *Proteobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門, *Actinobacteria* 門, *Fusobacteria* 門の 4 門しか検出されないのに対して、根圏環境からは *Proteobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門, *Actinobacteria* 門に加えて、培養頻度の非常に低い難培養性の細菌門として知られる *Verrucomicrobia* 門, *Acidobacteria* 門, *Planctomycetes* 門, *Nitrospirae* 門, *Spirochaetes* 門, さらに門レベルの未培養系統群である OP10 や GN-1 候補門等、少なくとも 7~8 の門が検出されており、水生植物の根圏環境の方が微生物の多様性が高く、未知微生物も多く内包していることが明らかとなった。また、同じ池に棲息している水生植物の種類ごとに異なる微生物群集構造を有しており、水生植物と微生物との間に緩やかな共生関係が築かれている可能性が示唆されている<sup>10,38)</sup>。

さらに興味深い知見は、他の環境に比べて、水生植物の根圏微生物は培養が容易である、ということである。例えば、16S rRNA 遺伝子クローンライブラリ法と培養法で得られる微生物群集の構造 (特に、種の組成) を比較解析してみると、通常環境試料の場合 5% も一致すれば高い値であり、通常は 1% 程度一致するかどうかというところであるが、水生植物の根圏環境の場合には 30% 以上も合致するのである。このことは、水生植物の根圏環境に存在する微生物種の実に 30% 以上が培養可能であることを示唆している。なぜ水生植物の根圏微生物はこのように培養が容易なのだろうか。その理由は未だ明らかにはなっていないが、植物体からは根を通じて様々な物質 (酸素, 栄養源, 生育因子等) が分泌されていることが知られており、それによって根圏微生物が活性化され、比較的培養されやすい状態で存在しているのではないかと、我々は考えている。

このような研究成果を踏まえて、我々はこれまでにウキクサ, ヨシ, ミソハギ, マコモ, アマゾンフロッグビット等の多様な水生の植物の根圏環境から、多くの未知微生物の純粋分離とその生理機能の解明に成功してきている。実際に、前述したように、新門 *Armatimonadetes* 門の基準菌株となった *Armatimonas rosea* もヨシの根圏環境から分離培養され、同門の形態情報, 生理生化学的情報が明らかになった<sup>10,11)</sup>。また、培養頻度が非常に低く、難培養性の細菌門として知られる *Verrucomicrobia* 門や *Acidobacteria* 門, *Planctomycetes* 門等に属する新規細菌

も次々と純粋分離されてきており、また *Proteobacteria* 門や *Actinobacteria* 門, *Bacteroidetes* 門等の培養頻度が高い門に属する細菌であっても系統的に非常に新規性の高いものが多数分離されてきている。またそのような新規細菌の中には、水生の植物の成長を著しく促進する根圏細菌 (PGPR: Plant growth promoting rhizobacteria) が存在していることを最近明らかにしており、これまでほとんど知られていない水生植物と微生物の共生メカニズムの解明に着手しているところである。

#### 4.4 原位置培養法や環境を模擬した培養法

「環境中では生き活きとしていて、増殖も早いのに、なぜカラボに試料を持ち帰って培養をしかけてみても、標的となる微生物が一向に生育しない」……多くの環境微生物学分野の研究者がこうした経験をしているのではないだろうか。それならば原位置で培養しよう、現場環境をできるだけ再現して培養しよう、とする取組みが近年精力的になされてきている。

原位置培養法の代表的な例が diffusion chamber 法である<sup>39)</sup>。この diffusion chamber は、希釈した環境試料と寒天 (終濃度 0.7%) を混合して調整した軟寒天固環境試料を、孔径の非常に小さいメンブレンフィルター 2 枚の内部にサンドイッチして封じ込め、現場環境試料に戻してその中で培養することができる非常にシンプルな培養デバイスである。実際に本培養デバイスを海洋底泥表面や地下水中に設置して培養することで、従来法では培養の困難な新規微生物の培養化がなされている。Ferrari らも、メンブレンフィルターを用いてマイクロコロニーを形成させ、かつ微小な増殖を顕微鏡下で観察しながら単離する方法 (マイクロコロニー培養法) を考案し、実際に門レベルの未培養系統群である TM7 候補門細菌をはじめ未知の土壌細菌の培養化に成功している<sup>40-42)</sup>。Aoi らは、中空糸膜を利用した新しい原位置培養システムを開発しており、活性汚泥試料や海水試料等の培養実験において、従来法よりも高い培養効率を達成している<sup>43)</sup>。また、Epstein らの研究チームは、小型の培養デバイス (iChip) を開発し、その培養チップをなんとヒトの口腔内に置いて培養することによって、従来法よりも培養効率がかかなり高くなること、また従来法では培養されなかった未知の口腔内微生物の分離が可能になることを明らかにしており<sup>44,45)</sup>、原位置培養法の重要性を明示する成果を挙げている。

一方で、現場環境を模擬して培養するという試みについても近年報告が増えてきている。その一つがバッチ式培養法からの脱却である。試験管を用いた液体培養であろうとプレートを用いた固体培養であろうと、従来法のほとんどはバッチ式の培養であり、様々な物質のフローが起こりえる自然環境とは物理化学的にも大きく異なる環境で微生物を培養していることになる。そこで、Imachi らは、連続培養が可能なりアクターに着目し、特に廃水処理で用いられているバイオリアクター (下降流懸垂型スポンジ [Down-flow hanging sponge: DHS] リアクター) を難培養・未知微生物の培養システムとして活用することで、従来法では極度に培養が難しいとされている深部海底下のメタン生成アーキアや嫌氣的メタン酸化アーキアの集積培養に成功しており<sup>46,47)</sup>、一部の深

部海底下の未知細菌については既に純粋分離に至るなど<sup>48)</sup>、画期的な成果を挙げている。また、我々の研究チームは、連続培養法ではないが、環境を模擬したアプローチで、特に陸域の深部地下圏環境に棲息する難培養性微生物の培養を試みている。例えば、1,000 m よりも深い深部陸域地下圏環境は、一般に温度はもちろん圧力も高い高温高圧の環境である（例：50 気圧、50–70°C）。そのような高温高圧の環境を再現した培養システムを活用することによって、現在、現場環境の微生物コミュニティをそのまま数年以上にわたって安定して集積培養することが可能になってきている。このように、原位置培養法とともに環境をできるだけ模擬して培養をするというアプローチは、今後も未知微生物探索において大きな可能性をもつ効果的な培養法と言えよう。

### 5. 次世代型の未知微生物探索技術とは？

これまで述べてきたように、実環境中の難培養性微生物や未知微生物を分離・培養するための新しい技術の開発が進められてきており、実際に、系統的に新しく、機能的にも重要な環境微生物が分離培養化されるなど、未知微生物探索研究はその歩みは遅いものの着実に進展してきているのは間違いない。一方で、解決すべき大きな課題があるのもまた事実である。その一つは、培養技術の「スループットの低さ」である。次世代シーケンサーの革命的な進化によって、今や1日でヒトゲノムの10–100倍以上の塩基配列を解読できる時代にあって、微生物の分離培養のプロセスはあまりに煩雑で労力がかかり、また専門的な技量と経験が求められる等、培養技術のスループットは現状では極めて低いと言わざるを得ない。この問題を解決するには、やはりシャーレや試験管、バイアル瓶からの脱却が必要であり、微生物培養デバイスの革新が求められるところである。実際に、近年、ナノテクノロジーを活用して培養チップのような新しいマイクロデバイスを開発しようとする試みがなされている。Inghamらは、1万~10万個のミクロンスケールのウェルをもつ micro-Petri dish を作製している<sup>49)</sup>。具体的には、多孔質材料を用いて培養チップを作製しており、同チップを寒天平板培地上に置くと、拡散効果によって培地成分がチップの底から供給される仕組みになっている。この micro-Petri dish は、環境微生物の培養にも適用可能ではあるものの、どちらかと言えば遺伝子工学実験等において形質転換後のポジティブクローンの高効率スクリーニング等に威力を発揮しうるデバイスである。また、Epsteinらの研究チームも、前述の iChip と呼ばれる微生物チップを開発している<sup>49)</sup>。iChip は非常にシンプルで、micro-Petri dish ほど多くのウェルをもつ訳ではないが、その分より実用的な培養チップであり、これまでに海水や土壌環境、ヒトの口腔内環境に棲息する微生物の培養に適用され、従来法に比べて数倍~数十倍以上の高い培養効率が得られるなど、その有効性が示されている。また、Liuらは全く別の発想で、微生物培養用のマイクロ流体デバイスを提案している。本デバイスは、微小流体特性をうまく利用し、マイクロ流路内で環境試料中の微生物細胞を1つずつ小さなプラグ内に分離し、そのままマイクロ流路内で一定時間培養した

後、増殖したプラグを選別して物理的に2~4つにスプリットしてレプリカを作製するものである。このレプリカ作製は非常に重要で、プラグ内で増殖した未知微生物細胞試料を、凍結保存、継代培養、FISH (fluorescence in situ hybridization) 等による観察等、それぞれに目的に応じて使い分けることができるという点で非常に有用である<sup>50)</sup>。以上の方法はいずれもまだ重要ないくつかの問題点があるものの、今後、微生物培養の高効率化、自動化が期待でき、次世代型の培養デバイスの開発につながる大きな成果と言えるものである。

未知微生物探索研究のもう一つの大きな課題は、「不確実性」であり、言い換えれば「狙った微生物を、体系立てて培養する術がない」ということである。そんなことができればどんな未知微生物でも培養できるじゃないか、と思われる方もいるかもしれないが、ここで言いたいのは、環境中で圧倒的に優占して、顕微鏡で観察しても、大多数が標的の未知微生物という状況ですら培養できないケースが多い、という事実である。実際にこのような場合、対象環境の温度や pH 等の物理化学的なデータを参考にする以外は、ほぼ手探りの状態で、各々の研究者のある意味、経験と勘に依存して培養戦略を立てて、数多くの培養系を仕込んでいるのが実情である。この課題を克服する可能性のある一つのアプローチが、環境ゲノム情報の活用である。近年、次世代シーケンサーの革新とともに、バイオインフォマティクス技術も高度化してきており、数百種~数千種が共存するような複雑な微生物生態系であっても、またポピュレーションがわずかに数%程度のマイナーな構成種であったとしても、標的の未知微生物のゲノム情報をほぼ決定することが可能になってきている。この未知微生物のゲノム情報を活用して、標的微生物の代謝特性や重要な生理機能を推定し、最適な培養条件をデザインして、狙った微生物を体系的に培養する「テラーメード培養」の実現が、近い将来可能になるのではないかと筆者らは考えている。実際に、我々は現在、温泉環境や地下圏に棲息する未知微生物を対象にこのようなアプローチを試みている。例えば、高温の単純硫黄温泉では、硫黄芝とよばれる白色のバイオマットが頻繁に観察されるが、その硫黄芝には巨大な鎌状をした細菌 (uncultured large sausage shaped bacterium: LSSB) が優占しており、発見から100年以上経った今もなお培養できない難培養性細菌が棲息している<sup>51)</sup>。そこで、この未培養巨大鎌状細菌の生態機能の推定と培養化を目的として硫黄芝のメタゲノム解析を行い、未培養巨大鎌状細菌のゲノム情報を取得してその生理代謝機能を推定した。さらに、培養を行う際に重要なその他の機能情報 (例えば抗生物質耐性能など) に基づいて最適と考えられる培養系を設定して実際に集積培養を試みたところ、まだ純粋分離には至っておらず、継代培養も6回までしか成功しないものの、標的の巨大鎌状細菌をラボ内で培養化するに至っている。もちろん、この巨大鎌状細菌の培養化の背景には、多分にこれまでの経験や勘も活かされており、ゲノム情報の活用だけで培養化に辿り着いた訳ではないが、少なくともこのゲノム情報は、これまで手探りで行っていた培養系の設計と絞り込みに威力を発揮したことは間違いない。今後、こうした取組みをさらに進めてゆけば、環境中から

標的となる未知微生物のゲノム配列をまず取得し、コンピュータにその情報を入力して解析すると、培養のレシピが作成され、そのレシピに沿って培養すると、標的の未知微生物が培養できる……そんな時代が近い将来やってくるかもしれない。

ここで紹介した (1) 培養デバイスの革新と (2) 環境ゲノム情報に基づいたテラメード培養法は、いずれも発展途上のアプローチであり、未だ汎用性のある、実行性の高い技術では全くないが、今後の未知微生物探索研究を一変させるような次世代型の培養技術開発の基軸になってゆく可能性がある。今後の展開に期待したい。

## 6. おわりに

「環境ゲノム解析研究全盛のこの時代において、環境中から一つ一つ微生物を分離してその機能を明らかにしようとする未知微生物探索研究は必ずしも必要なのではないか？」……改めて、本稿の冒頭の問いかけである。もちろん、筆者に限らず多くの環境微生物学者が「否」と答えるのではないだろうか。一方で、未知微生物探索研究のアプローチは煩雑で、手間がかかり、スループットも低い、そして明確な青写真もなく不確定、という現状を考えると、今、環境ゲノム解析技術で明らかにできる研究を徹底してやる方が効率的で、環境微生物学分野をより進展させるという考えは至極全うであり、その方向性は全くもって間違っていない。実際に、筆者らのグループも、環境ゲノム解析技術を積極的に活用して未知微生物の機能解明を進めているところである。しかしながら、だからといって、環境中から未知微生物をどうにかして培養して、純粋分離にこぎつけて、一つ一つ丹念にその知られざる生物機能を調べあげてその知見を紡いでゆく……という未知微生物探索研究をなおざりにしてよいということはないだろう。むしろこのような時代だからこそ粘り強く継続してゆく必要があると、筆者は考えている。というのも、環境ゲノム解析研究のボトルネックがまさにそこにあるからである。

環境ゲノム解析研究の強みを考えてみよう。それはやはり実環境中の微生物の実態解明技術としての強みであろう。つまり、環境中の全 DNA や全 RNA を丸ごと次世代シーケンズ解析することで、環境微生物コミュニティ（あるいはその遺伝子やゲノム）の多様性、量、分布、動態、活性を極めて迅速かつ網羅的に調べ上げることができる点である。また、極めて多様な多くの環境試料を一度に解析して、微生物生態系の構成種や遺伝子・ゲノムの多様性の違い等を横並びに一斉に比較解析できる技術としては、右に出るものは他にはないと言っても過言ではない。また仮に、解析の対象が既知の微生物であれば、その環境中での振る舞いや実際に機能している代謝機能等をかなり高精度に明らかにできるだろう。また解析対象が未知の微生物であったとしても、現在、メタゲノム解析やシングルセルゲノム解析によってそのゲノムをほぼ決定することが可能になってきており、その未知微生物のゲノム上の遺伝子配列が、機能の既に分かっている遺伝子配列とある程度相同性がありさえすれば、どのような基幹代謝機能を有しているかが把握でき、同時に環境中での未知微生物の生理生態機能を

明らかにできる。しかし、逆に言えば、未知微生物が既知の配列とは全く異なる遺伝子をもっている場合や、未知微生物が全く知られていないような代謝、機能を有している場合、環境ゲノム解析技術は無力である。もちろん、そうした未知の遺伝子群であっても、それが環境中でどのくらい多様性があって、どのくらい量があって、どのように地理的に分布して、そして実際に発現しているかどうか、そこまでは分かる。しかし、環境中でこういった機能を担っているのかを明らかにすることはほぼ不可能である。その理由は言うまでもなく、環境ゲノム技術は、これまでに純粋分離がなされたわずか1%以下の培養可能な微生物の遺伝子情報・機能情報データベースに依存しているからである。このことが環境ゲノム解析研究の最大のボトルネックとなっている。どんなに非効率であろうと、やはりここだけは未知微生物を培養して機能を明らかにしない限り解決できない、環境ゲノム解析研究ではアクセスできない研究領域であると言えよう。

未知微生物を分離培養する意味は、何もこの微生物遺伝子機能データベースの拡張だけではない。未知微生物を分離培養する、ということはこれまで全く手つかずの新しいバイオリソースを開拓することでもある。つい最近、ノースイースタン大学の Lewis 博士らのチームは、独自の工夫を凝らした培養法を開発して未知微生物を純粋分離し、その中から全く新しい抗生物質を発見するとともに、その抗生物質が従来よりも耐性菌の出現しにくい新しい化合物であることを Nature 誌 (2015 年 1 月 21 号) に報告した<sup>52)</sup>。同博士は、この論文の中で、これまでの抗生物質の開発は、効果の期待できる土壌微生物のスクリーニングや化学合成手法が用いられてきており、新たな抗生物質が見つかりにくくなっている現状に触れながら、これまで全く手つかずの未知微生物資源を開拓して新たな抗生物質探索を行うことの意義と重要性を説いている。このように、未知微生物探索研究の過程で得られる多様で新規な微生物資源は大きな可能性を秘めており、今後も我々人類の生活をより豊かに、そして環境に調和した持続可能な社会の構築に大きく貢献するものと期待される。

そして最後に、未知微生物を分離培養するもう一つの大きな意味に触れたい。それは、環境中から未知な微生物を分離培養できたときにはじめて、「環境中のこれほど多くの微生物が培養できないのは何故か？」といういわば微生物学・環境微生物学における根源的で最大の謎の答えに一步近づける……ということではないだろうか。筆者らはそう信じて、今後も、未知微生物探索研究と環境ゲノム解析研究の両方のアプローチを相互補完的に活用しながら、環境中の深遠な未知微生物の実態の解明に取り組んでゆきたいと考えている。

## 謝 辞

本稿において紹介した研究の多くは、山梨大学生命環境学部環境科学科の田中靖浩博士、松澤宏朗博士、同大学医学工学総合研究部の遠山忠博士、森一博博士、大阪大学大学院工学研究科の池道彦博士、北海道大学大学院地球環境科学研究院の森川正章博士、ならびに産業技術

総合研究所の眞弓大介博士，持丸華子博士，坂田将博士，また同研究所の生物資源情報基盤研究グループに在籍されていたか現在も在籍されている皆様（特に，村松瑞穂氏，孟憲英氏，秋庭綾氏，牧野彩花氏，田川雅弘氏，平田直哉氏，吉田淳氏，三宅拓氏，高崎一人博士，玉澤聡博士，関口勇地博士，花田智博士，中村和憲博士，鎌形洋一博士）をはじめとする多くの共同研究者の方々とともに実施したものであり，心から感謝いたします。なお，本稿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 及び 26710012），新学術領域研究冥王代生命学の創成（課題番号：26106004），科学研究費補助金基盤研究（B）（課題番号：25289333）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 JST-ALCA（課題番号：11102938）の支援を受けて実施したものです。ここの謝意を表します。

## 文 献

- Rinke, C. et al. 2013. Insights into the phylogeny and coding potential of microbial dark matter. *Nature*. 499: 431–437.
- McCalley, C.K. et al. 2014. Methane dynamics regulated by microbial community response to permafrost thaw. *Nature*. 514: 478–481.
- Whitman, W.B., D.C. Coleman, and W.J. Wiebe. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95: 6578–6583.
- Kallmeyer, J., R. Pockalny, R.R. Adhikari, D.C. Smith, and S. D'Hondt. 2012. Global distribution of microbial abundance and biomass in seafloor sediment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 109: 16213–16216.
- Gans, J., M. Wolinsky, and J. Dunbar. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* 309: 1387–1390.
- Achtman, M. and M. Wagner. 2008. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 431–440.
- Zhang, H., Y. Sekiguchi, S. Hanada, P. Hugenholz, H. Kim, Y. Kamagata, and K. Nakamura. 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum *Gemmatimonadetes* phyl. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1155–1163.
- DeBruyn, J.M., L.T. Nixon, M.N. Fawaz, A.M. Johnson, and M. Radosevich. 2011. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of *Gemmatimonadetes* in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 6295–6300.
- Hugenholz, P., C. Pituille, K.L. Hershberger, and N.R. Pace. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* 180: 366–376.
- Tanaka, Y., H. Tamaki, H. Matsuzawa, M. Nigaya, K. Mori, and Y. Kamagata. 2012. Microbial community analysis in the roots of aquatic plants and isolation of novel microbes including an organism of the candidate phylum OP10. *Microbes Environ.* 27: 149–157.
- Tamaki, H., Y. Tanaka, H. Matsuzawa, M. Muramatsu, X.Y. Meng, S. Hanada, K. Mori, and Y. Kamagata. 2011. *Armatimonas rosea* gen. nov., sp. nov., of a novel bacterial phylum, *Armatimonadetes* phyl. nov., formally called the candidate phylum OP10. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 1442–1447.
- Lee, K.C. et al. 2011. *Chthonomonas calidirosea* gen. nov., sp. nov., an aerobic, pigmented, thermophilic micro-organism of a novel bacterial class, *Chthonomonadetes* classis nov., of the newly described phylum *Armatimonadetes* originally designated candidate division OP10. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61: 2482–2490.
- Im, W.T., Z.Y. Hu, K.H. Kim, S.K. Rhee, H. Meng, S.T. Lee, and Z.X. Quan. 2012. Description of *Fimbriimonas ginsengisoli* gen. nov., sp. nov. within the *Fimbriimonadia* class nov., of the phylum *Armatimonadetes*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 102: 307–317.
- Konneke, M., A.E. Bernhard, J.R. de la Torre, C.B. Walker, J.B. Waterbury, and D.A. Stahl. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature*. 437: 543–546.
- Hatzenpichler, R., E.V. Lebedeva, E. Spieck, K. Stoecker, A. Richter, H. Daims, and M. Wagner. 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 105: 2134–2139.
- Tourna, M. et al. 2011. *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108: 8420–8425.
- Brochier-Armanet, C., B. Boussau, S. Gribaldo, and P. Forterre. 2008. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the *Thaumarchaeota*. *Nat. Rev. Microbiol.* 6: 245–252.
- Bryant, D.A. et al. 2007. *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic *Acidobacterium*. *Science*. 317: 523–526.
- Zeng, Y., F. Feng, H. Medova, J. Dean, and M. Koblizek. 2014. Functional type 2 photosynthetic reaction centers found in the rare bacterial phylum *Gemmatimonadetes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111: 7795–7800.
- Dunfield, P.F. et al. 2007. Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the phylum *Verrucomicrobia*. *Nature*. 450: 879–882.
- Pol, A., K. Heijmans, H.R. Harhangi, D. Tedesco, M.S. Jetten, and H.J. Op den Camp. 2007. Methanotrophy below pH 1 by a new *Verrucomicrobia* species. *Nature*. 450: 874–878.
- Dridi, B., M.L. Fardeau, B. Ollivier, D. Raoult, and M. Drancourt. 2012. *Methanomassiliococcus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 1902–1907.
- Paul, K., J.O. Nonoh, L. Mikulski, and A. Brune. 2012. “Methanoplasmatales,” *Thermoplasmatales*-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 8245–8253.
- Poulsen, M. et al. 2013. Methylophilic methanogenic *Thermoplasmata* implicated in reduced methane emissions from bovine rumen. *Nature Communications*. 4: 1428.
- Iino, T., H. Tamaki, S. Tamazawa, Y. Ueno, M. Ohkuma, K. Suzuki, Y. Igarashi, and S. Haruta. 2013. *Candidatus Methanogram caenicola*: a novel methanogen from the anaerobic digested sludge, and proposal of *Methanomassiliococcaceae* fam. nov. and *Methanomassiliococcales* ord. nov., for a methanogenic lineage of the class *Thermoplasmata*. *Microbes Environ.* 28: 244–250.
- Connon, S.A. and S.J. Giovannoni. 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3878–3885.
- Morris, R.M., M.S. Rappe, S.A. Connon, K.L. Vergin, W.A. Siebold, C.A. Carlson, and S.J. Giovannoni. 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature*. 420: 806–810.
- Rappe, M.S., S.A. Connon, K.L. Vergin, and S.J. Giovannoni. 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*. 418: 630–633.
- Cho, J.C., K.L. Vergin, R.M. Morris, and S.J. Giovannoni. 2004. *Lentisphaera araneosa* gen. nov., sp. nov., a transparent exopolymer producing marine bacterium, and the description of a novel bacterial phylum, *Lentisphaerae*. *Environ. Microbiol.* 6: 611–621.
- 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 by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2162–2169.
- 31) Tamaki, H., S. Hanada, Y. Sekiguchi, Y. Tanaka, and Y. Kamagata. 2009. Effect of gelling agent on colony formation in solid cultivation of microbial community in lake sediment. *Environ. Microbiol.* 11: 1827–1834.
  - 32) Nakamura, K., H. Tamaki, M.S. Kang, H. Mochimaru, S.T. Lee, K. Nakamura, and Y. Kamagata. 2011. A six-well plate method: less laborious and effective method for cultivation of obligate anaerobic microorganisms. *Microbes Environ.* 26: 301–306.
  - 33) Hara, S., R. Isoda, T. Tahvanainen, and Y. Hashidoko. 2012. Trace amounts of furan-2-carboxylic acids determine the quality of solid agar plates for bacterial culture. *PLoS One.* 7: e41142.
  - 34) Tanaka, T., K. Kawasaki, S. Daimon, W. Kitagawa, K. Yamamoto, H. Tamaki, M. Tanaka, C.H. Nakatsu, and Y. Kamagata. 2014. A hidden pitfall in the preparation of agar media undermines microorganism cultivability. *Appl. Environ. Microbiol.* 80: 7659–7666.
  - 35) 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 AST4. *Microbes Environ.* 20: 110–116.
  - 36) Nichols, D. et al. 2008. Short peptide induces an “uncultivable” microorganism to grow in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 4889–4897.
  - 37) Epstein, S.S. 2009. Microbial awakenings. *Nature.* 457: 1083.
  - 38) Matsuzawa, H., Y. Tanaka, H. Tamaki, Y. Kamagata, and K. Mori. 2010. Culture-dependent and independent analyses of the microbial communities inhabiting the giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza*) rhizoplane and isolation of a variety of rarely cultivated organisms within the phylum *Verrucomicrobia*. *Microbes Environ.* 25: 302–308.
  - 39) Kaeberlein, T., K. Lewis, and S.S. Epstein. 2002. Isolating “uncultivable” microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science.* 296: 1127–1129.
  - 40) Ferrari, B.C., S.J. Binnerup, and M. Gillings. 2005. Microcolony cultivation on a soil substrate membrane system selects for previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8714–8720.
  - 41) Ferrari, B.C., T. Winsley, M. Gillings, and S. Binnerup. 2008. Cultivating previously uncultured soil bacteria using a soil substrate membrane system. *Nat. Protoc.* 3: 1261–1269.
  - 42) Ferrari, B.C. and M.R. Gillings. 2009. Cultivation of fastidious bacteria by viability staining and micromanipulation in a soil substrate membrane system. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3352–3354.
  - 43) Aoi, Y., T. Kinoshita, T. Hata, H. Ohta, H. Obokata, and S. Tsuneda. 2009. Hollow-fiber membrane chamber as a device for in situ environmental cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3826–3833.
  - 44) Nichols, D., N. Cahoon, E.M. Trakhtenberg, L. Pham, A. Mehta, A. Belanger, T. Kanigan, K. Lewis, and S.S. Epstein. 2010. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 2445–2450.
  - 45) Sizova, M.V., T. Hohmann, A. Hazen, B.J. Paster, S.R. Halem, C.M. Murphy, N.S. Panikov, and S.S. Epstein. 2012. New approaches for isolation of previously uncultivated oral bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 194–203.
  - 46) Imachi, H. et al. 2011. Cultivation of methanogenic community from seafloor sediments using a continuous-flow bioreactor. *The ISME J.* 5: 1913–1925.
  - 47) Aoki, M. et al. 2014. A long-term cultivation of an anaerobic methane-oxidizing microbial community from deep-sea methane-seep sediment using a continuous-flow bioreactor. *PLoS One.* 9: e105356.
  - 48) Imachi, H., S. Sakai, J.S. Lipp, M. Miyazaki, Y. Saito, Y. Yamanaka, K.U. Hinrichs, F. Inagaki, and K. Takai. 2014. *Pelolinea submarina* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, filamentous bacterium of the phylum *Chloroflexi* isolated from seafloor sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64: 812–818.
  - 49) Ingham, C.J., A. Sprengels, J. Bomer, D. Molenaar, A. van den Berg, J.E. van Hylckama Vlieg, and W.M. de Vos. 2007. The micro-Petri dish, a million-well growth chip for the culture and high-throughput screening of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 18217–18222.
  - 50) Liu, W., H.J. Kim, E.M. Lucchetta, W. Du, and R.F. Ismagilov. 2009. Isolation, incubation, and parallel functional testing and identification by FISH of rare microbial single-copy cells from multi-species mixtures using the combination of chemistride and stochastic confinement. *Lab Chip.* 9: 2153–2162.
  - 51) Tamazawa, S., K. Takasaki, H. Tamaki, Y. Kamagata, and S. Hanada. 2012. Metagenomic and biochemical characterizations of sulfur oxidation metabolism in uncultured large sausage-shaped bacterium in hot spring microbial mats. *PLoS One.* 7: e49793.
  - 52) Ling, L.L. et al. 2015. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature.* 517: 455–459.