

マイクロバイオームの利用と理解

Understanding the Cooperation of Microbiomes and Environments

鈴木 市郎*
ICHIRO SUZUKI*

横浜国立大学大学院理工学府, リスク共生社会創造センター 〒240-8501 神奈川県横浜市保土ヶ谷区常盤台 79-5

* TEL: 045-330-4266 FAX: 045-339-4267

* E-mail: suzuki-ichiro-db@ynu.ac.jp

Graduate School of Engineering Science, & Center for Creation of Symbiosis Society with Risk,
Yokohama National University, 79-5 Tokiwa-dai, Hodogaya, Yokohama, Kanagawa 240-8501

キーワード: 環境マイクロバイオーム, 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析, 動態解析, クラスタ解析

Key words: Environmental Microbiome, 16S rRNA Gene Amplicon Sequencing, Population Dynamics, Cluster Analysis

(原稿受付 2019年3月25日/原稿受理 2019年4月19日)

1. はじめに

土壌や水圏などの自然環境から、ヒトの腸内や皮膚などの常在細菌叢,あるいは伝統的発酵食品や排水処理の活性汚泥のような人工環境に至るまで,我々の身の周りは複数の微生物から成る複雑系に満ち溢れている。人類はこの様々な微生物が有する機能を,純粋培養の技術が確立するよりもはるか昔より巧みに操り,発酵による食品の長期保存や高機能化などに利用してきた。一方,純粋培養技術の開発とその発展は現在のバイオテクノロジーの発達に大きく寄与してきたが,この純粋培養の技術はまだ不完全であり,環境中に存在する微生物のほとんどは研究室での純粋培養法が確立できていない「未培養微生物」あるいは「難培養微生物」¹⁾である。従って,純粋培養の技術だけで自然環境や人工環境中の複数の微生物による相互作用のしくみを理解することは,未だ困難である。このような複数の微生物から成る共同体のことを,我々研究者は「複合微生物系」あるいは「微生物叢」「微生物群集」(英語であれば *complex microbial community* や *microbial consortia*)などの用語で呼び表し,研究対象としてきた。このような用語は1990年代ごろより注目された「複雑系 (*complex system*)」の科学を意識したものであるが,研究者の間ではともかく一般の人々にまで浸透しているとは言い難い。一方,最近さまざまなメディアで取り上げられ市民権を得つつあるのが,「マイクロバイオーム (*microbiome*)」という用語である。

この「マイクロバイオーム」とは「ゲノム」などと同様に,微生物 (*microbe*) と総体・全体を表す “-ome” が組み合わされた造語である。Joshua Lederberg が示した「生物は宿主と共生微生物の各ゲノムがキメラとなった *super organism* である」²⁾ という概念から広まったと

言われる^{3,4)} このマイクロバイオームという用語は,ポストヒトゲノム計画としての新たな標的を探す研究者らに歓迎され,2008年頃より欧州・中国の *Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT)*⁵⁾ や米国の *The Human Microbiome Project (HMP)*⁶⁾ など,国際的なヒトマイクロバイオーム研究が相次いで実施された。その結果,生活習慣病や癌,精神疾患など,さまざまな疾病とヒトマイクロバイオームとの関係が明らかとなるに従い,「マイクロバイオーム」という用語は研究者だけでなくメディアを通じて一般の人々にも浸透しつつある。また,ヒトに限らず地球上のありとあらゆる環境における微生物による複雑系が,「マイクロバイオーム」研究の分野として捉えられてきている。

2. 「マイクロバイオーム」の概念

「マイクロバイオーム」という用語は,いわゆる「バズワード (*buzzword*)」^{3,7)} の一種である。「バズワード」とは,明確な定義がなされないままに用いられる業界用語などのことであり,「マイクロバイオーム」と同様に先に述べた「複雑系」もバズワードのひとつである。しかし,明確な定義がなされないというものの,「マイクロバイオーム」は「複合微生物系」や「微生物叢」などと全く同じ意味というわけではない。先に述べたように,対象となるものの全体,総体などを示す “-ome” がついた「オミクス」研究³⁾ であることから,解析対象とする微生物叢の存在する環境が必然的に限定される。また,解析対象は微生物叢の総体であるので,解析手段としては次世代シーケンス (*next generation sequencing: NGS*) 技術を基にしたメタゲノム解析や16S リボソーム RNA (16S rRNA) 遺伝子アンプリコン解析などの網羅的解析が用いられることになる。

すなわち、「複合微生物系」や「微生物叢」が複数の微生物から成る共同体そのものを意味するのに対し、「マイクロバイオーム」とは“ある環境の影響のもとで存在する微生物叢”を意味すると言える。NGS解析を利用した微生物生態学研究が進展するに従い、微生物については地理的・空間的分布が存在しないという Lourens Bass Becking の仮説“Everything is everywhere, but, the environment selects (原文はオランダ語 ‘alles is overal: maar het milieu selecteert’)”^{8,9)}が、微生物生態学研究者の共通概念として受け入れられるようになった。つまり、ある環境下で検出される微生物叢の組成はその環境による選択圧を受けた結果であり、それぞれの環境におけるマイクロバイオームを単に *genotype* として捉えるだけではなく、その環境による物理・化学的な影響を受けた *phenotype* として認識する必要があるといえる⁷⁾。そしてそのような認識は、それぞれの環境におけるマイクロバイオームの仕組みを理解し、そしてその環境を制御することでマイクロバイオームをコントロールする、という新たな“microbiome engineering”の確立に繋がる可能性がある。そのためには、自然環境におけるマイクロバイオーム、そして発酵食品や排水処理など、すでに人類が環境を制御し応用法を確立してきた人工環境におけるマイクロバイオームの組成や機能を詳細に解析し、理解することが求められる。

3. ヒトマイクロバイオーム解析の概要

ここではマイクロバイオーム研究の基礎となる、ヒトマイクロバイオームの解析方法について概要を述べる。ヒトマイクロバイオームの解析は、被験者の糞便などの試料を対象に、細菌叢の組成を調べる 16S rRNA 遺伝子アンプリコン解析 (16S アンプリコン解析) と、細菌ゲノムの遺伝子全体を調べるメタゲノム解析、さらには試料から分離した培養株の解析などと、被験者の健康に関するデータ解析を総合して行われる¹⁰⁾。膨大なメタゲノム配列がどの微生物のどの遺伝子に対応するかを効率よく調べるために、ヒトマイクロバイオーム解析では健常者の常在細菌分離株のゲノム配列から成るリファレンスゲノム¹¹⁾が構築されている。

ヒトマイクロバイオーム研究では、人種ごと、地域ごとのマイクロバイオームの違い、そして健常者と疾病を持つ患者とのマイクロバイオームの違いなどが判明しているが、これらの解析には集団を対象とした統計学、すなわち疫学的手法が用いられる。健常者群と患者群のマイクロバイオームの比較は、各人の細菌叢の組成を主成分分析等で比較することでも可能であるが、それでは系統的に近縁で性質のよく似た細菌もそうでない細菌も一律に評価されてしまう。そこで、マイクロバイオーム中の細菌の系統的類似度を評価し比較する方法として、それぞれの細菌叢の系統関係より作成した系統樹を利用して主座標分析を行う UniFrac 解析¹²⁾が用いられる。また、系統的には離れていても機能の類似する微生物同士を評価するため、微生物叢に含まれる各微生物の分類情報から既知の微生物群のゲノム情報を参考にその微生物が有するゲノム上の機能遺伝子を推定し、その類似度を比較する PICRUSt¹³⁾などの「機能予測解析」と呼ばれ

る手法も用いられることがある。

これら一連の解析手法を用いることによりヒトマイクロバイオームの研究は、生活習慣病など様々な疾患の診断での利用をはじめ、医療や創薬、サプリメントや香粧品の開発などに応用され始めている。

4. マイクロバイオーム研究の産業利用

上述したように、ヒトマイクロバイオーム研究の医療や創薬などの分野での産業利用は着実に進行しつつある。さらにこのマイクロバイオーム研究は、複合微生物系を利用している他の産業分野、すなわち水処理や環境浄化における効率化や高機能化、伝統的発酵食品製造を含む食品産業での品質管理や機能性食品開発、あるいは農業における根圏微生物の制御による高収量化や病害対策など、様々な分野での応用が期待されている。

しかし、ヒトマイクロバイオームがヒトとの共生という限定された環境に特有の微生物叢であるのに対し、自然環境あるいは排水処理などの人工環境におけるマイクロバイオームはその環境ごとに異なる微生物叢を有し、その中には膨大な種類の微生物を含む。ヒトのマイクロバイオームで検出される主な細菌のほとんどはドメイン・バクテリアの門 (*phylum*) のうち *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* の4つの門で構成され、腸内、皮膚、口腔などの細菌叢においてこの4つの優占性は変わらない¹⁰⁾ (なお、現在提唱されているドメイン・バクテリアの門は 33 *phyla*^{14,15)}である)。一方、他の環境マイクロバイオームにおいてもほとんどの細菌群はわずかに数種類の門に属していることは変わりないが、どの細菌門が優占的であるかはその環境ごとに異なる。さらに、優占種だけに着目するのでは不十分であり、全体の1%にも満たない希少種の中に、その環境における重要な働きを有する細菌が含まれることがある。例えば、トリクロロエチレン (TCE) など揮発性有機塩素化合物のバイオレメディエーションにおいて、嫌氣的脱塩素化を担う *Dehalococcoides* 属細菌の割合は、全体のわずか0.1%程度しかないことがある。このような、質・量ともに多様性に富む自然環境や人工環境のマイクロバイオームに対して、ヒトマイクロバイオームと同様の集団に対する統計学をベースとした解析方法を適用することは、マイクロバイオーム解析を様々な産業分野において簡便に利用することへの障壁となるかもしれない。ある排水処理場の通常時とバルキング時の細菌叢を比較し、有意差のある細菌群を探そうとする場合、そのために、どれだけの回数の試料の採取が必要となるのか。また、その細菌叢は、水質や水温等の異なる他の地域の排水処理場のものと容易に比較できるのか。ある農場においてある作物の収率を上げる根圏微生物群は、異なる作物、異なる農場でも有効なのか。それを調べるためには、どれだけの集団を解析しなければならないのか。実は、そのような疫学的手法によるマイクロバイオーム解析を用いなくても、環境マイクロバイオームではその環境の変化に呼応する細菌群の発見をより容易に行う方法がある。それは、バイオプロセスの研究者・技術者が従来用いてきた手法、つまり、経時的なサンプリングを行って微生物の増殖曲線を描き、微生物の増殖

に対する環境の変化による影響を調べる手法である。

5. マイクロバイオームの経時的データ解析

5.1 マイクロバイオーム中の各微生物の増殖曲線

純粋培養でのバイオプロセスでは、細胞の増殖曲線を描き、比増殖速度や基質消費速度、比生産速度などのパラメータを取得することによってプロセスの制御が行われる。一方、酒造りや排水処理における活性汚泥などの複合微生物系でのバイオプロセスは個々の微生物の増減を測定することが困難なブラックボックスとなっており、そこでのプロセスの制御は技術者の経験的知見に頼るしかなかった。しかし、複合微生物系のバイオプロセスでもマイクロバイオーム解析によって個々の微生物の細胞濃度の経時変化を疑似的な増殖曲線として可視化できれば、どの代謝産物がどの微生物に由来するか、温度や pH などの培養環境の変化による影響を受けるのはどの微生物か、などの判断が容易になるのではないかと (図 1)。なお、ここでは“疑似的な増殖曲線”と述べたが、実際に描かれるのは細胞濃度ではなく、16S アンプリコン解析より得られる各細菌の 16S rRNA 遺伝子の濃度 (単位体積当たりの 16S rRNA 遺伝子のコピー数) 変化である。16S アンプリコン解析で得られるのは試料中の各細菌の割合であるため、これを濃度に換算するには後述するリアルタイム PCR などのデータを用いる必要がある。

16S アンプリコンで一つの試料から検出される細菌の種類は、試料当たりのリード数が 5~10 万程度の場合で数千~数万種類程度となる。但し、これらのほとんどは、経時的に採取した試料において 1~数回しか検出されない、疑似増殖曲線が描けないものである。経時的に採取した試料中の半数以上の頻度で検出されるものに絞れば、その数は数百~数千種類に収まる。では、数百~数千種類の細菌の増殖曲線を描いて、個々の細菌の動態が把握できるのだろうか。それぞれが全くバラバラの挙動を示すのであれば動態の把握は困難であるが、実際に経時的データの解析を行うと、非常に興味深い結果が得られる。これら数百~数千の細菌群はバラバラな動態を示すのではなく、経時的な増減のパターンが類似するおよそ 10~20 程度のグループに分けることができる。そして、グループごとに作成した疑似増殖曲線を温度など

培養時の環境の変化と照合することで、各グループがどのように環境の変化の影響を受けるのかを容易に観察することが可能である。

このようなマイクロバイオームの経時的データの解析を用いれば、ヒトマイクロバイオーム解析のような集団を対象とした統計解析を行う必要はなく、試料採取時間ごとの試料数も少なく済む。むしろ、ヒトの疾病に関連する細菌群の解析を行う場合に、ある健康者が疾病を発症するまで経時的に試料を採取する、というような研究は長期間にわたる個人の追跡調査を行わない限りは困難であるため、ヒトマイクロバイオーム解析では集団を対象とした統計学を利用せざるを得ないとも言える。

以降に、マイクロバイオーム中の各細菌の疑似増殖曲線を解析する手法の手順を述べる。

5.2 マイクロバイオームの経時的解析用データの取得

解析に必要な試料数が比較的少なくなるとはいえ、あるバイオプロセスでのマイクロバイオームの経時変化を見るためにはそれなりの試料数の採取が必要である。例えば、二種類の異なる培養条件についてそれぞれ初期値を含めて経時的に 4 点、合計 8 サンプルを採取すれば、そのマイクロバイオームに含まれる各微生物の増減を比較し培養条件の違いに応答する微生物群の有無を観察することは可能である。16S アンプリコン解析では、16S rRNA 遺伝子を増幅するときのプライマーに試料ごとに異なるバーコード配列 (またはインデックス配列) を含ませることで、一度の解析で複数の試料を同時に解析することができる (マルチプレックス解析)¹⁶⁾。16S アンプリコンの受託解析ではマルチプレックス解析として 1 解析あたり 8 サンプルまで、16 サンプルまで、などの解析プランを提供しているところがあるので、このような受託解析プランに合わせれば試料の経時的な採取の計画が立てやすい。

16S アンプリコンのマルチプレックス解析で得られるデータのうち、疑似増殖曲線の作成には、各微生物の系統分類結果と試料ごとでの検出数 (リード数) をまとめた表 (OTU テーブル) のファイルを使用する。この表ファイルは、NGS 解析で得られた 16S アンプリコンの各 DNA 断片の塩基配列より、PCR 断片長が長すぎたり短すぎたりするものや複数の細菌の 16S rRNA 遺伝子のキメラ配列となったものなどを除外し、それぞれの配

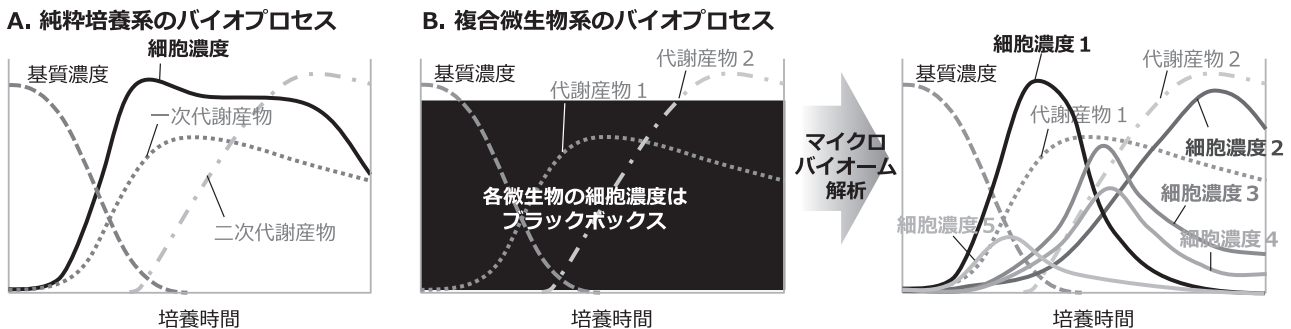


図 1. (A) 純粋培養系と (B) 複合微生物系のバイオプロセスにおける、細胞、基質、代謝産物等の濃度の経時変化のイメージ。複合微生物系によるバイオプロセスでは各微生物の細胞濃度はブラックボックスとなりがちであるが、マイクロバイオーム解析により各微生物の細胞濃度の経時変化を視覚化することで、各微生物の増減と代謝産物の増減などの相関を把握することが可能となる。

列の類似度を基に仕分けしてリード数をまとめ、それぞれの代表配列 (representative sequence) について細菌分類用のデータベースを参照して簡易分類を行うことで作成される。各 DNA 断片の塩基配列を仕分ける配列類似度 (sequence similarity) の閾値は、一般的な受託解析では 97% が用いられるが、自己で Qiime¹⁷⁾ や mothur¹⁸⁾ などの微生物群集解析ソフトウェアを用いてデータを解析する場合は任意の閾値を設定することができる。我々の通常の解析では、97% あるいは 96% を用いている。この設定した配列類似度の閾値に従って仕分けされた各断片の代表配列は、細菌の簡易分類・同定に用いられる Greengenes や RDP, SILVA などの 16S rRNA 遺伝子データベースの抜粋版¹⁹⁾ を参照して、細菌の属 (genus) あるいは種 (species) レベルまで分類される。このようにして分類が帰属された各配列は、操作的分類単位 (operational taxonomic unit: OTU) と呼ばれる。これは厳密な細菌の分類とは異なり上述の仕分け操作に従った「ゆるい」分類単位であり、例えば配列類似性の閾値が 97% であれば、一つの OTU には代表配列と最大 3% もの塩基配列が異なるものが含まれている、ということに留意しなければならない。

5.3 解析に用いる OTU の選択

上記の操作で得られた OTU テーブルには、数千~数万種類の OTUs が記載されている。しかし、これらの OTU のうちほとんどは、経時的に採取した試料中では 1 回~数回しか出現しないため、増殖曲線を描く対象として用いるには不適當である。そこで、この中から増殖曲線を描く OTU の選抜を行う。まず、OTU テーブル上のそれぞれの試料における各 OTU のリード数を試料ごとの総リード数で割った、相対優占度 (relative abundance) を計算する。そして、経時的に採取した試料での検出頻度が少ない OTU、例えば全試料中の半数未満の試料でしか検出されない OTU を除外する。この段階で、OTU の数は数百~数千までに減っている。さらに OTU を選抜するには、各 OTU の相対優占度の試料ごとの平均値を求め、その平均値の高い順に積算して、その累積相対優占度の値を閾値とすることで、希少種の OTU をどの範囲まで解析に加えるかを選抜することができる。累積相対優占度が 90% 以内のものに比べ、92.5%、95% と閾値を上げるに従い希少種の OTU 数は急激に増える。後述するクラスター解析に供する OTU の数は 150~300 程度が適當であるが、嫌気バイオレメディエーションの土壌サンプルで希少種をターゲットとする場合では 2,000 OTUs 程度を選抜することもある。このようにして選抜した OTUs を、次に述べるクラスター解析に供する。

5.4 各 OTU の経時変化のクラスター解析

選抜した OTU の経時的な変動パターンの比較は、生態学で用いられる類似性評価指数を使用して行い、選抜した OTU 同士の各試料での相対優占度の類似度の距離を計算する。類似性の評価方法としてユークリッド距離を用いることもできるが、その場合は、各 OTU が優占種か希少種か (相対優占度の高低) にかかわらず増減のパターンのみの類似度を比較できるように、それぞれの

OTU について各試料の相対優占度を更に各試料の相対優占度の総和で割るという「正規化」の作業が必要となる。このような作業は煩雑であることから、我々はオープンソースの統計解析プログラムである R の vegan パッケージに含まれる類似性評価指数をひと通り試した結果、良好なグループ分けの結果が簡便に得られる Morisita-Horn の重複度指数 C_H を利用している。

$$\text{Morisita-Horn の重複度指数 } C_H = \frac{2\sum_i(n_{Ai} \cdot n_{Bi})}{(\lambda_A + \lambda_B)\sum_i n_{Ai} \cdot \sum_i n_{Bi}}$$

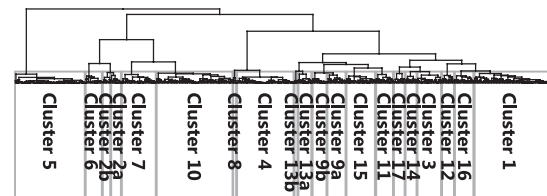
$$\lambda_A = \frac{\sum_i(n_{Ai})^2}{(\sum_i n_{Ai})^2}, \quad \lambda_B = \frac{\sum_i(n_{Bi})^2}{(\sum_i n_{Bi})^2}$$

n_{Ai} : サンプル A での i 番目の種の個数

(ここでは、OTU A での i 番目のサンプルの相対優占度)

重複度指数 C_H で求めた距離に従って、Ward 法での階層的クラスタリングで増減のパターンが類似する OTU ごとにクラスターに分ける (図 2A)。なお、生態学の解析では非階層的クラスタリングもよく用いられるが、非計量多次元尺度構成法 (NMDS) と K-means 法の組み合わせによる非階層的クラスタリングでは、残念ながら我々が試した環境マイクロバイオームの多くは K-means 法で分けられるような明確なクラスターを生じなかった (図 2B) ことから、現在は使用していない。階層的クラスタリングはクラスター内をさらに細分化するなどの操作が行いやすいという利点があるが、一方で

A. 階層的クラスタリング(Ward法)



B. 非階層的クラスタリング(NMDS)

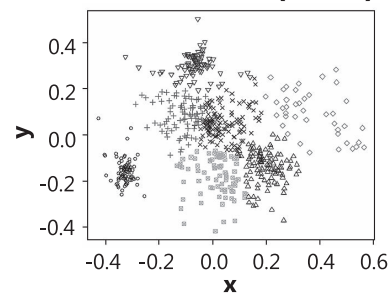


図 2. 16S アンプリコン解析で得られた各 OTU の経時変化の類似度に基づくクラスター解析結果 (未発表データ)。(A) Ward 法による階層的クラスタリング、(B) 非計量多次元尺度構成法 (NMDS) による非階層的クラスタリング。嫌気バイオレメディエーションで得られた 597 種類の OTUs を、重複度指数 C_H で比較しクラスタリングした。(A) は 17 クラスターに分けられ、クラスター 2, 9, 13 をさらに細分化した。(B) に示すように、多くの環境中のマイクロバイオームでは、非階層的クラスタリングを用いて明瞭に細かくクラスター分割するのは困難である (ここでは K-means 法で 7 つのクラスターに分割している)。

クラスターの分割数をいくつにするかは解析者の主観に任されるため、クラスター分割の客観性を担保することが課題となる。一般的な分割方法はクラスターの分岐となる「ノード」間の距離が大きい部分での分割であるが、結局はそのようにして分割した各クラスターについてそれぞれの疑似増殖曲線を描き、納得できるか、より細分化した方がよいか、という解析者の主観による試行錯誤を行うしかないのが現状である。まずクラスターを10~15程度に分割し、各クラスターのグラフを作成して、必要に応じてさらに細かく分け、最大20程度に分ける、というのが実際の作業である(図3)。クラス

ター分割を行う際の目安の一つとして、良好なクラスター分割ができたときは、各 OTU の増減パターンの違いだけでクラスター分けをしたにもかかわらず、それぞれのクラスターには系統的に近縁、あるいは生育上の性質が類似する OTU が集まっている、という結果を得られることが挙げられる。このようなクラスターに含まれる OTU 群は、優占度の高いものから低いものまで、優占種の 1/100, 1/1,000 の希少種であっても、片対数グラフ上で優占種とよく似た疑似増殖曲線を示す。つまり、16S アンプリコンの経時的データ解析では、希少種であってもその増減を詳しく追跡することが可能である。

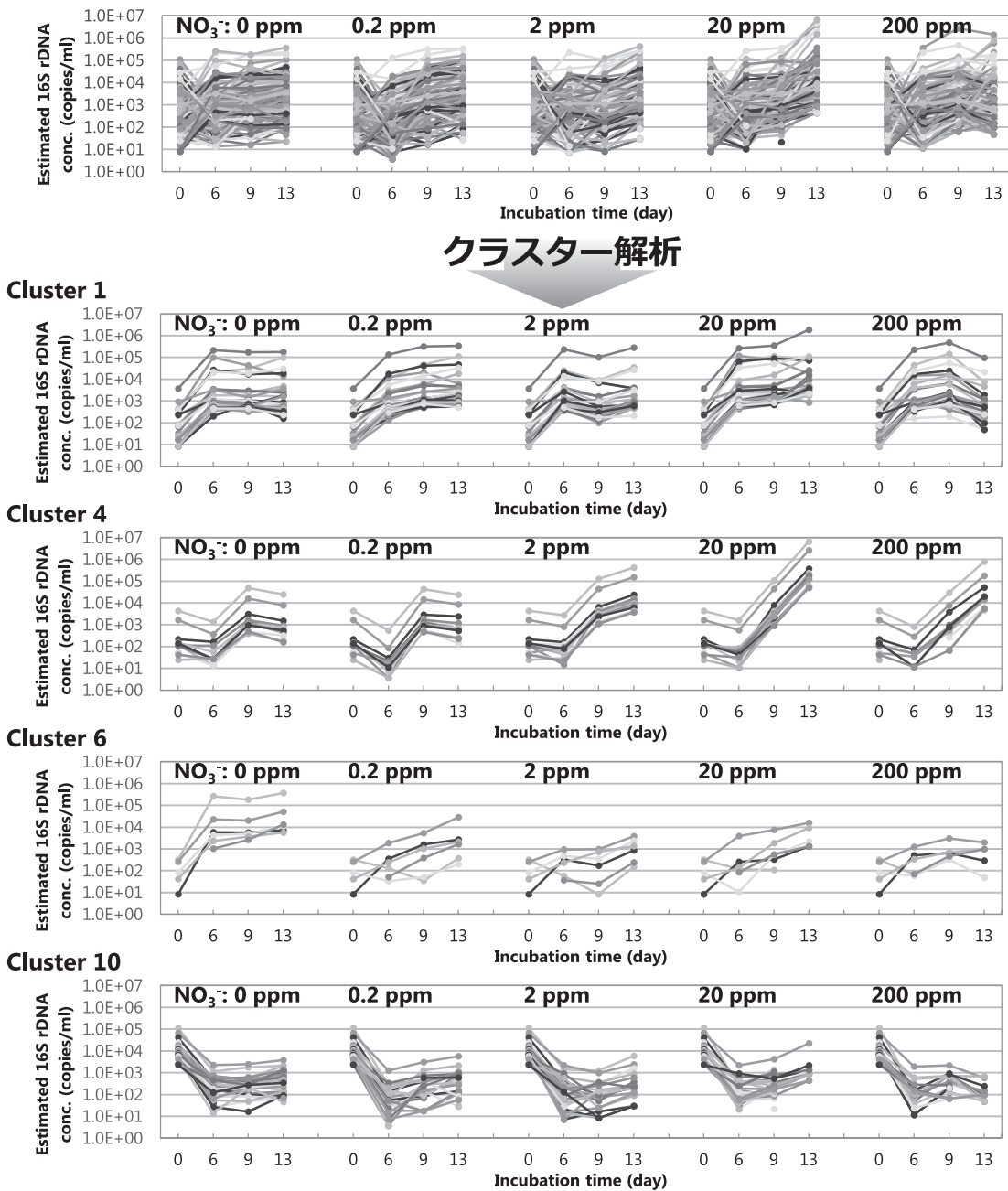


図3. クラスター分割前後の各 OTU の推定 16S rRNA 遺伝子濃度の経時変化 (未発表データ)。水処理に係る細菌叢の増殖への硝酸濃度による影響をグラフ化した。上はクラスター解析前の優占度上位 100 OTUs のグラフ、下の4つはクラスター解析後の代表例。クラスター 1 は硝酸濃度による影響は少なく、クラスター 4 は硝酸濃度が高いほどよく増殖し、クラスター 6 はその逆。クラスター 10 はこの培養条件では植種時ほどに増殖しない。

5.5 各 OTU の 16S rRNA 遺伝子濃度の推定

上記の各 OTU の量的な経時変化の片対数グラフ化では、グラフの縦軸の値は相対優占度であり、各 OTU に相当するそれぞれの細菌の濃度ではない。この相対優占度を濃度に代えるには、試料ごとに全細菌の 16S rRNA 遺伝子濃度をリアルタイム PCR で求めて各 OTU の濃度に換算する、あるいは 16S アンプリコンの NGS 解析の際にあらかじめ内部標準となる濃度既知の人工 DNA 断片を添加して、その値から各 OTU の濃度を算出する²⁰⁾ という方法などが考えられる。但し、各細菌のゲノム上に存在する 16S rRNA 遺伝子はたいていの場合複数個あり、その数は細菌ごとに異なるため、16S rRNA 遺伝子の濃度を各細菌の細胞濃度に直接換算することは困難である。ここで算出されるのは、あくまでその OTU の 16S rRNA 遺伝子の濃度（単位体積当たりのコピー数）である。さらに、この値は DNA 抽出の効率や PCR、シーケンス反応などにおける様々なバイアスを有する可能性がある。我々の研究でも、嫌気バイオレメディエーションにおける *Dehalococcoides* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子の濃度は、リアルタイム PCR で直接 *Dehalococcoides* の 16S rRNA 遺伝子を測定した時よりもアンプリコン全体からの換算では 1桁ほど低い値となる（未発表）。これは恐らく、アンプリコン解析の際の他の OTU の 16S rRNA 遺伝子配列との競合によるものだろうと考えている。従って、この方法で推定できるのはそれぞれの OTU についての経時的な増減に過ぎず、絶対的な定量とはならない。とはいえ、この方法で各 OTU の相対優占度を濃度に換算してみると、相対優占度では経時的に減少していても濃度では増加している OTU などの存在が判明し、環境の変化や物質生産と各 OTU の増減との相関がはっきりする。従って、このような簡易法であっても、各 OTU の濃度変化を可視化することはマイクロバイオームを理解し利用するために必要である。なお、生菌の生育を見るには rRNA 遺伝子すなわち DNA よりも RNA そのものの方が良いのでは、という考え方もあるが、培養中の指数関数的な増殖をみるのであれば DNA を対象にしても十分に解析は可能である。

5.6 マイクロバイオームの経時的解析の応用例

このマイクロバイオームの経時変化解析法を筆者らが最初に実施したのは、TCE などの揮発性有機塩素化合物の嫌気バイオレメディエーションにおける、微生物叢への加温の影響についての研究である。*Dehalococcoides* 属を含む集積培養系を 15°C と 30°C でそれぞれ植え継ぎ、経時的に採取した試料の 16S アンプリコン解析で検出された各 OTU の増減のパターンについてクラスター解析を実施したところ、*Dehalococcoides* に帰属された OTU がすべて同じクラスターに含まれていた。これはとて、そこから解析方法をブラッシュアップしたのが、本稿で紹介した解析法である。現在、この *Dehalococcoides* 属を含む細菌叢の生育への地下水の加温の影響の解析、排水処理における細菌叢の構造の経時変化、上水処理場の生物処理に用いられる細菌叢の生育への硝酸濃度の影響の解析などに、この経時的データ解析を使用している。また、伝統的発酵食品（コチュジャ

ン）の製造工程において、製品に含まれる様々な細菌が原料や工程のどこから侵入するのかという細菌の混入経路を特定する解析では、製造工程を経時的に捉えたグラフ上でどのような細菌がどの経路から製品に入ってくるのかが一目瞭然となった。諸事情によりこれらの研究結果はまだ学会発表に留まっており学術論文としては未発表であるが、本稿で紹介したマイクロバイオームの経時的データ解析法については受託解析サービスでの解析データの提供などが計画されており、様々な研究、技術開発において広く利用して頂くことを目指している。

6. おわりに：マイクロバイオームの経時的解析の利点

マイクロバイオームの解析は、受託解析などでの低価格化により、医学分野以外の研究者や技術者にとっても身近なものとなった。しかし、ひとたび解析を実施すると一つの試料から膨大な種類の微生物（すなわち OTUs）が検出されることになり、そのデータをどう解釈すればよいのか、マイクロバイオームの解析に慣れない者には全く見当がつかない。解析結果として得られるのは各 OTU のその系統分類名とせいぜいその論文情報などへのリンクであり、微生物を扱う研究者であっても自身の専門外の微生物については、逐一文献などを調べなければその微生物の機能はわからない。さらに、解析結果として得られた各微生物の系統分類上の帰属についても問題がある。16S アンプリコン解析では莫大な数の OTUs の塩基配列を高速で分類できるよう、5-2 で述べたように参照データ数を限定した“抜粋版”の系統分類データベースが用いられる。従って、抜粋版データベースで帰属された OTU の分類名は、たとえ種レベルまで帰属されていたとしても、必ずしもベストなものではない。（そのうえに、種レベルまでの分類が可能なおープンソースの分類データベースファイルとしてよく利用される Greengenes は、2013 年以降は更新されていない¹⁹⁾）であるので、各 OTU の代表配列を GenBank などのより詳細なデータベースを対象として BLAST を用いて再検索するなど詳細な同定を行えば、より近縁の種が提示されることが多い。同様に、簡易同定による解析結果では種レベルまで分類されなかった配列、該当するデータが抜粋版データベース上になく「unassigned」となった配列でも、詳細に再検索すれば近縁種が判明することがある。つまり、16S アンプリコン解析の結果として提示される簡易同定の結果は、“この OTU はこの微生物の近縁種です”という目安に過ぎない。

このように、16S アンプリコン解析で得られた莫大な数の OTUs について、全ての配列に詳細な再解析を施し、それぞれの微生物について文献情報にあたるのは非効率的である。そこで、経時的データの解析によって興味深い動態を示すクラスターに含まれる OTUs のみにフォーカスし、詳細な再解析を実施すれば、微生物叢と環境との関係を理解しその機能を利用するための作業を、多少は効率化することができるだろう。

本稿で述べた 16S アンプリコンの経時的データ解析では、興味深いことに、クラスタリングの際に用いているのは各 OTU の試料ごとの増減の情報だけで系統分類学上の情報を含めないにもかかわらず、各クラスターに

は系統分類上,あるいは生育上の性質のよく似た細菌群が,優占度の高低にかかわらずまとまる傾向にある。もっとも,系統的に近い,同一の栄養源を利用する細菌群であれば類似する増殖パターンを示すことに不思議はなく,その中で個々の OTU 量の多寡が出るのは,おそらくエネルギー源として利用する基質に対する親和性の違いなどによるものだろうと推察される。このような現象を解析することは,環境における微生物群集の棲み分けや,微生物群集におけるヒエラルキーの有無というような基礎的研究にも繋がるのが期待される。また,経時的なマイクロバイオームデータの解析は, quorum sensing のような微生物間のネットワークの存在を調べるような研究においても有用であろう。さらに,この解析法は複合微生物系を用いたバイオプロセスにおいて,系の中のマイノリティにすぎない微生物群が深く関与していることを浮かび上がらせてくれる。以上のように,16S アンプリコンの経時的データ解析は,基礎,応用の分野を問わず,マイクロバイオームの機能をより深く理解しさらに効率よく利用するための,強力なツールとなると考えている。

文 献

- 青井謙輝. 2016. 培養できない微生物とは? どうしたら培養できるのか?—培養手法の革新—. 環境バイオテクノロジー学会誌. 16: 59–64.
- Lederberg, J. 2000. Infectious history. *Science*. 288: 287–293.
- Lederberg, J. and A.T. McCray. 2001. 'Ome sweet 'Omics—A genealogical treasury of words. *The Scientist*. 15: 8.
- Relman, D.A., M.A. Hamburg, E.R. Choffnes, and A. Mack (eds.). 2009. Microbial evolution and co-adaptation: A tribute to the life and scientific legacies of Joshua Lederberg: Workshop summary. The National Academies Press, Washington, D.C., U.S.
- Ehrlich, S.D. and MetaHIT Consortium. 2011. MetaHIT: The European Union Project on metagenomics of the human intestinal tract. pp. 307–316. In K. Nelson (ed.), *Metagenomics of the human body*. Springer, New York, NY, U.S.
- Turnbaugh, P.J., R.E. Ley, M. Hamady, C.M. Fraser-Liggett, R. Knight, and J.I. Gordon. 2007. The human microbiome project. *Nature*. 449: 804–810.
- De Vrieze, J., N. Boon, and W. Verstraete. 2018. Taking the technical microbiome into the next decade. *Environ. Microbiol.* 20: 1991–2000.
- Baas Becking, L.G.M. 1934. Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. W.P. Van Stockum and N.V. Zoon. Den Haag, The Netherlands.
- de Wit, R. and T. Bouvier. 2006. 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; What did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environ. Microbiol.* 8: 755–758.
- 服部正平. 2014. ヒト腸内マイクロバイオーム解析のための最新技術. 日本臨床免疫学会会誌. 37: 412–422.
- The Human Microbiome Project Consortium. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 486: 207–214.
- Lozupone, C. and R. Knight. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8228–8235.
- Langille, M.G.I., J. Zaneveld, J.G. Caporaso, D. McDonald, D. Knights, J.A. Reyes, J.C. Clemente, D.E. Burkepille, R.L. Vega Thurber, R. Knight, R.G. Beiko, and C. Huttenhower. 2013. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat. Biotechnol.* 31: 814–821.
- Oren, A., M.S. da Costa, G.M. Garrity, F.A. Rainey, R. Rosselló-Móra, B. Schink, I. Sutcliffe, M.E. Trujillo, and W.B. Whitman. 2015. Proposal to include the rank of phylum in the International Code of Nomenclature of Prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 4284–4287.
- Parte, A.C. 2018. LPSN-List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio. net), 20 years on. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 68: 1825–1829.
- Hamady, M., J.J. Walker, J.K. Harris, N.J. Gold, and R. Knight. 2008. Error-correcting barcoded primers allow hundreds of samples to be pyrosequenced in multiplex. *Nat. Methods*. 5: 235–237.
- Caporaso, J.G., J. Kuczynski, J. Stombaugh, K. Bittinger, F.D. Bushman, E.K. Costello, N. Fierer, A.G. Peña, J.K. Goodrich, J.I. Gordon, G.A. Huttley, S.T. Kelley, D. Knights, J.E. Koenig, R.E. Ley, C.A. Lozupone, D. McDonald, B.D. Muegge, M. Pirrung, J. Reeder, J.R. Sevinsky, P.J. Turnbaugh, W.A. Walters, J. Widmann, T. Yatsunenko, J. Zaneveld, and R. Knight. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*. 7: 335–336.
- Schloss, P.D., S.L. Westcott, T. Ryabin, J.R. Hall, M. Hartmann, E.B. Hollister, R.A. Lesniewski, B.B. Oakley, D.H. Parks, C.J. Robinson, J.W. Sahl, B. Stres, G.G. Thallinger, D.J. Van Horn, and C.F. Weber. 2009. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7537–7541.
- Balvočiūtė, M. and D.H. Huson. 2017. SILVA, RDP, Greengenes, NCBI and OTT—how do these taxonomies compare? *BMC Genomics*. 18(Suppl. 2): 114.
- Tourlousse, D.M., S. Yoshiike, A. Ohashi, S. Matsukura, N. Noda, and Y. Sekiguchi. 2017. Synthetic spike-in standards for high-throughput 16S rRNA gene amplicon sequencing. *Nucl. Acids Res.* 45: e23.