

## 複合微生物を拓く—窒素循環を駆動する硝化複合微生物系モデルの構築—

### Construction of Synthetic Nitrifying Microbial Consortia for the Nitrogen Cycle

安藤 晃規<sup>1,2\*</sup>, 小川 順<sup>1,2</sup>  
AKINORI ANDO<sup>1,2\*</sup> and JUN OGAWA<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学分野 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

<sup>2</sup> 京都大学学際融合教育推進センター生理化学研究ユニット 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

\* TEL: 075-753-6114 FAX: 075-753-6113

\* E-mail: ando.akinori.6n@kyoto-u.ac.jp

<sup>1</sup> Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University,  
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

<sup>2</sup> Research Unit for Physiological Chemistry, Kyoto University,  
Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

キーワード：応用微生物学，複合微生物，窒素循環，硝化菌，有機質肥料活用型養液栽培

Key words: applied microbiology, complex microbial communities, nitrogen cycle, nitrifying microorganisms, organic hydroponics

(原稿受付 2020年3月16日 / 原稿受理 2020年4月11日)

#### 1. はじめに

日本は「菌」の多様性という観点では資源国といえる。起伏が激しく南北に伸びる国土，広大な海洋域，四季の移ろい，温暖で多湿な気候など，多様な環境がこの特徴を生み出している。「菌」は我々の日々の生活と深い繋がりを持ち，風習，風俗，文化の一部をなしている。この背景を強みに，コッホに始まる微生物の分離培養技術を取り入れ，様々な産業分野で求められる選択的かつ高純度な物質生産に应运してきた（図1）<sup>1)</sup>。今もなおこの手法は強力であり，来るべき循環型社会に向け応用微生物学に寄せられる期待は大きく，日本が世界をリードすべき一つの分野となっている。

一方で，微生物が関わる産業をじっくり見渡すと，実は関連する多くの分野が複合微生物を基盤としていることがわかる（図1）。今後，微生物機能を積極的に産業に活用するには，個々の微生物機能開発に加えて，複合微生物をいかに制御し応用していくかが，応用微生物学の一つのフロンティアであり課題となる。

近年の分析技術の高度化に伴い微生物叢の全容を明らかにしつつあるが，どう理解し活用するかはまだ途上にあり試行錯誤の状況が続いている。本稿では，複合微生物の捉え方，応用に向け何をターゲットにすべきか，どう科学的にアプローチしうるかなど，その理解と応用の可能性を応用微生物学の観点から考察し，実際の事例として我々の取り組みを紹介する。

#### 2. 複合微生物を拓く

##### 2.1 複合微生物を捉える

総説等では，複合微生物と複雑微生物の用語がよく使われている。どちらも，微生物叢の全容や機能の解析，制御や予測を目標にしている点で変わりはない。明確な定義があるわけではなく，同じような意味で用いられることも多い。しかし，どのような文脈で「複合」と「複雑」が使われているのか，そのニュアンスの違いを少し掘り下げると，微生物叢に対する研究のモチベーションの差異がわかり，取り組み方のヒントが得られる。

「複合」微生物とはある目的のための2種以上の微生物が関与する微生物群に用いられ，一方で，「複雑」微生物は，環境下での微生物群の状態をあらゆる際に用いられることが多い（表1）。これはちょうど発酵と腐敗の違いに似ている。応用微生物学では，ある目的のために能動的に環境を整え微生物を制御しその機能を活用することを発酵と呼び，手を加えず微生物が成り行き状態にあることを腐敗と呼んでいる。すなわち，複合微生物系は目的を持って微生物叢を制御すること，一方で，複雑微生物系は，複雑な状態や関係性の理解に重きを置く点に違いを見出すことができる。この観点から，複合微生物系はこれまでの応用微生物学の枠組みで取り組むことができよう。

近年の分析技術の高度化に伴い微生物叢の全容や関係性の情報を得ることができるようになってきたが，すべての微生物を単離できるわけではなく，複合微生物系の再構成も現実的ではない。極論を言えば，メカニズムがブラックボックスでも目的が達成できれば，応用という

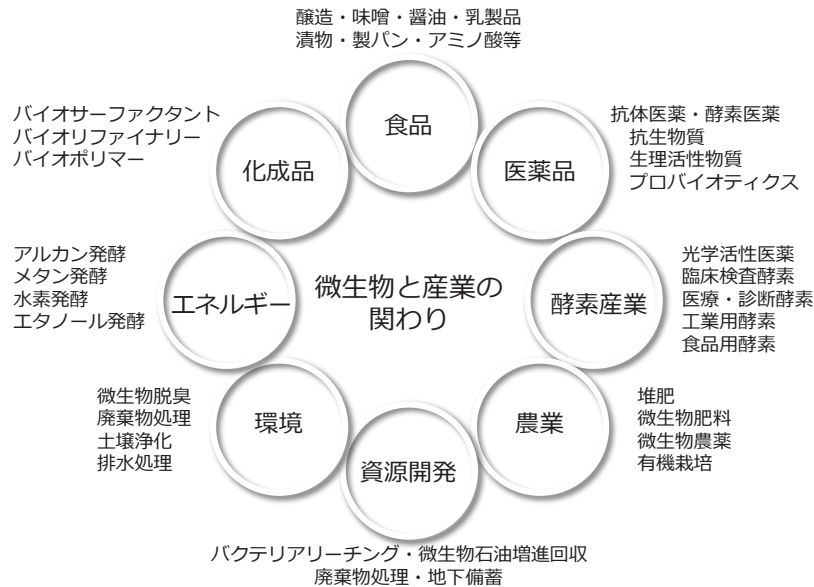


図1. 産業微生物利用の実際。

表1. 「複合」と「複雑」のニュアンスの違い

	複合微生物	複雑微生物
目的	制御	状態の理解
応用微生物	発酵	腐敗
出口	応用	基礎
分野	農学	理学
アプローチ	技術開発	解析

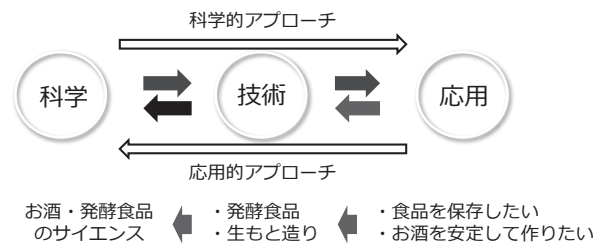


図2. 科学的アプローチと応用的アプローチの違い。

意味では一つの理解ともいえる。目的のために技術開発を行う従来の応用微生物学のアプローチは、複合微生物系にも比較的親和性が高く有効であろう。

## 2.2 なぜ複合微生物は科学では扱いづらいのか

科学的なアプローチは基本的には細分化，比較，再現で成り立つ。通常は，微生物叢の解析，機能と微生物の関係性を明らかにし，組み合わせによりその機能を再現するアプローチが取られる。しかし，複合微生物は科学的な解析対象として扱いづらいことがわかる。

1つには，機能を知るために細分化すると，相互作用下で顕在化していた特徴が消えてしまうこと。環境中では生育している微生物が単離困難な例もこれに当てはまる。2つ目は，科学的な解析に有効な比較や再現性を確認するためのモデル化が困難なこと。膨大な情報や微生物の無限の組み合わせなどの問題，また，単純化すると現実と離れてしまう点などの課題がある。3つ目は，複合微生物が示す機能と微生物の情報を繋げることが困難なこと。分析技術の高度化に伴って，微生物叢，代謝物など網羅的な解析ができつつあるが，機能と微生物の因果を明らかにするには様々なパラメーターの変化を追う必要がある。しかし，未だに連続的なセンシングは困難である。複合微生物はこのように科学では扱いにくい対象であるため，科学的なアプローチでは，理解や制御に限界がある。現状は応用・基礎の異なるモチベーションであっても，ピンポイントの微生物叢や代謝物の解析で足踏みすることが多い。複合微生物を理解し制御するに

は上記のような問題を回避するためにアプローチを変え，科学的・実験的な取り回しが可能な程度に情報を単純化する必要がある。

## 2.3 複合微生物へのアプローチ

ではどのようにアプローチすれば，科学的に理解し制御や予測へと展開しうるだろうか。応用の観点からは，必ずしも実際の状態を再現する必要はなく，機能を再現できるモデルが構築できれば，複雑度を抑え科学的にも扱えるようになる。これは，従来の科学的なアプローチである要素の分解と再構築とは異なり，応用のために必要な技術開発を行い，その技術を科学的に解析するアプローチを取る（図2）。これにより，従来の解析では，均一化された情報しか得られず取捨選択ができなかった情報が，機能という観点で取捨選択しうる。

## 2.4 複合微生物系の利点

複合微生物の活用には上述したようにボトルネックがあり，それを回避するため応用的なアプローチが有効である可能性を述べた。ボトルネックがある一方で，複合微生物を活用する利点とはなんだろうか。これまでの応用微生物学の単一発酵（モノ発酵）を踏まえて考えてみたい。

1つは，従来型のファインなものを生産する際の利点で，モノ発酵では難しい複数の微生物の共存が必要となる系，例えば，複合基質の変換，資化源をやり取りする

共生系、代謝を補完する系、反応のエネルギーを供給する系、生産、生育を阻害するものを分解する系など2種以上の微生物が協調して発酵生産する場合である。2つ目は、田代らの総説にまとめられていたものを改変し引用すると、環境の外乱に対して頑健性を示すことである。例えば、殺菌が不要なこと、雑菌の混入や温度変化に強い点などである(表2)<sup>2)</sup>。産業分野ではメタン消化や、コンポスト、下水処理などがこれにあたる。メタン消化において、ファインな有価物の生産に関して田代らの検討でうまくいった例もあるが、やはりその複雑性のため、解析や制御が困難なことがボトルネックとなっている。

そこで、従来の純粋発酵とメタ複合発酵の利点を併せ持った領域、すなわち、ちょっとファインなものをターゲットに、モデル化や科学的な解析も可能なちょっと複雑な複合系(メゾ複合発酵)というものを提案できないであろうか(表2)。ここで改めて日本の伝統的な発酵・醸造産業を複合微生物系の観点から考えてみたい。

### 2.5 日本の伝統的な発酵・醸造産業

我々は微生物とうまくつきあってきたように思えるが、付き合わざるを得なかったというところが正直なところであろう。日本の微生物多様性は応用微生物学を育んだ土壌ではあるが、歴史的には食品の腐敗との戦いであった。生存を脅かす危機を克服するために、微生物の概念も知識もない中、試行錯誤を繰り返し、オープンな環境下で多様な発酵・醸造産物を生み出した。この過程には、様々な複合系の制御のノウハウが蓄積されているといえよう(図3 複雑度は筆者の主観)。また、清酒、味噌、醤油など種々の発酵・醸造産物が科学的な解析の対象になりうることは、現在の発酵・醸造メーカーの研

究実績が証明している。この世界に類をみない多様な発酵醸造産業がメゾ複合発酵領域にあたることになる。

ちょっとファインなものをターゲットに、適度な複雑さでモデル化や科学的な解析も可能なメゾ複合発酵の様々なノウハウは、日本固有のものであり、我々はすでに活用する土壌を有しているといえる。その観点で、欧米的な科学のルールで、日本独自の新しい微生物機能活用の枠組みを提案できるのではないだろうか。複合微生物を活用する際には、従来の微生物機能を活用した高純度化合物の生産に加えて、複合系を利用するメリットを生かしたメゾ複合発酵領域をターゲットとすることも大事になろう。

### 2.6 複合微生物の制御

複合微生物を制御するためには、個々の微生物ではなく機能をベースとした全体の制御が必要になる。その際には、温度、pH、酸素濃度、酸化還元電位など環境を調整することが基本となる。また、従来の応用微生物学が得意とする資化性を選択圧とする方法、集積培養もあろう。炭素源や、窒素源を枯渇させた状態で特定の化合物や複合基質を添加し、分解もしくは変換する微生物群を集積する方法である。すなわち、足りない部分をあえて作り、足りない部分を補うような微生物叢の変化を促す制御方法である<sup>3)</sup>。また、高濃度基質、難分解性基質、代謝物アナログ、抗生物質などの選択圧も全体の制御に有効である。

これまで、集積した微生物群からさらに分離培養が必要であったが、集積した複合系をそのまま活用することになる。これまでの個別の微生物をスクリーニングすることと同様に、微生物群のスクリーニングや、機能を支持する環境のスクリーニングと後述する微生物叢の単

表2. モノ発酵, メゾ・メタ複合発酵の比較

	モノ発酵	メゾ複合発酵	メタ複合発酵
単一基質の変換	効率的	効率的	非効率的
複合基質の変換	非効率的	効率的	効率的
殺菌(加熱/除菌)	必要	適度に必要	不必要
雑菌混入に対する強さ	弱い	比較的強い	強い
設備/エネルギーコスト	高い	安い	安い
生成物	単純	比較的単純	複雑
微生物・代謝解析	容易	解析可能	複雑
発酵制御研究	蓄積あり	蓄積可能	困難

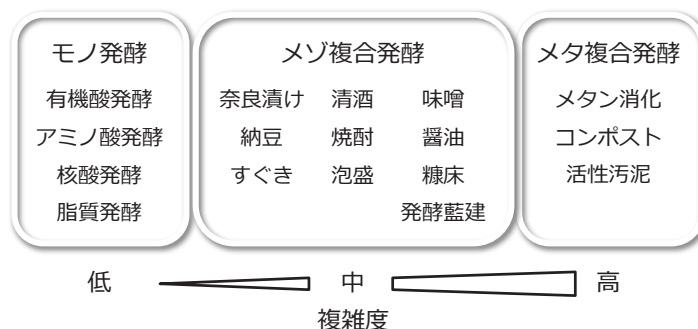


図3. モノ発酵, メゾ・メタ複合発酵の実際



純化により、同じ機能を示す様々な微生物で構成されたライブラリーを構築し、機能と単純化された微生物叢の情報からその関係性を解析することができる。

## 2.7 複合微生物を分ける

ある状態の微生物叢の膨大な解析情報から微生物を制御することは現実的ではなく、取り扱える程度に微生物叢を単純化する必要がある。そのためには、まず化合物の種類や、入力を一定にし、安定した機能を示す微生物叢を構築する。続いて微生物の単離の際に有用な限界希釈法と同様の方法にて、希釈しても目的の性質や機能が失われない程度に微生物叢の単純化を行う。この操作により同じ機能に基づいた異なる微生物叢情報から、本質的な機能を担う微生物の情報や、関連する代謝経路を推定することができる。また、機能に関わる微生物の単離の可能性の向上と、再構築により機能と菌群の因果関係が明らかにできる。

## 2.8 機能ベースの複合微生物系のモデル化

機能ベースの集積培養、経時的な菌叢解析、主要な機能に関連する菌の単離、再構築によるモデル化とそれぞれの菌の役割の解析に関して、春田らの先駆的な取り組みがある<sup>9)</sup>。稲わらを分解する微生物集団を集積し、安定した分解活性をもつ菌叢を構築し、さらに単離菌の組み合わせによりそれぞれの機能や役割を明らかにした。結果的に4種の菌で安定的に稲わらを分解できるモデルの構築に成功している。複合微生物をどう科学的に扱うのか上述したアプローチの実践例であろう。我々も、土壌における窒素循環を担う硝化微生物群を対象に、同様のアプローチで複合微生物の解析と制御に関して取り組んでいるので簡単に紹介する。

## 3. 窒素循環を駆動する硝化複合微生物系モデルの構築

### 3.1 土壌の窒素循環に関わる複合微生物

生態系における窒素循環の重要な過程の一つは、土壌における有機態窒素の無機態窒素への変換過程である。これまで、窒素を含む有機廃棄物は土壌微生物の潜在力を頼りに無機化され利用されてきた。これら窒素変換微生物群は、培養が困難であることや、複数の微生物が共同して代謝を行う複合系であることからその理解は進んでいない。一方で、生態系における物質循環、特に炭素循環における植物の役割は大きく、その生命活動を支える窒素循環を制御することにより健全な物質循環が見込める。したがって、未利用資源である有機廃棄物を循環的に活用し、植物の健全な生育を支援することが、今後、循環型社会システムを構築する上で重要な技術となる。

### 3.2 有機質肥料活用型養液栽培

水耕栽培系は、化学肥料を用いる無菌的な技術である。栽培系への有機質肥料の直接導入は、有機物の腐敗により根部障害の原因となっていた。篠原らは、清酒製造における並行複発酵をヒントに、土壌と同様に硝化活性を示す微生物群の集積法を開発するとともに、集積した硝化複合微生物群の活用により水耕栽培系への直接的

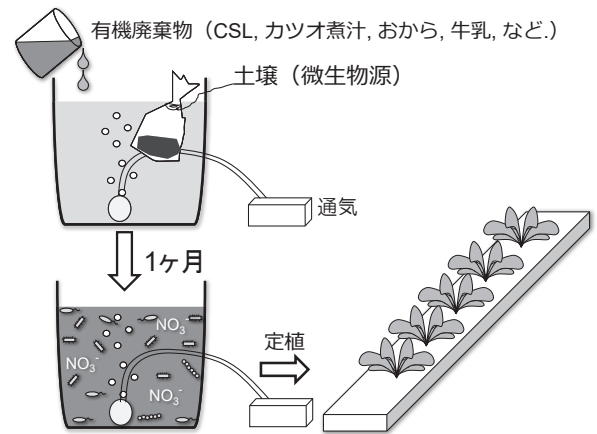


図4. 有機質肥料活用型養液栽培。

な有機物の導入に成功している (図4)<sup>5,6)</sup>。この時の成功のポイントは、土壌を微生物源として用いたこと、窒素含量が高い有機物を少量添加したこと、通気により脱窒を起りにくくしたことである (図4)。下水処理では、連続的な排水の流入があり、常時一定量の有機物が投入されるが、この方法はバッチ方式であり養液の有機成分が分解され、アンモニア、亜硝酸イオン、硝酸イオンへの推移とともに、内部の菌叢が変遷することが特徴である。

植物が利用できる窒素形態は主に硝酸であり、有機態窒素から硝酸への変換を担う微生物群の解析と制御が重要となる。

### 3.3 有機質肥料活用型養液栽培に有用な複合微生物源のスクリーニング

有機質肥料活用型養液栽培は、スターターとして少量の土壌を水中に浸漬し、有機物の硝化反応を行う複合微生物系を構築する過程と、作物を栽培する過程とで構成される。まず、通常の微生物のスクリーニングと同様に、効率的な硝化反応を示す土壌 (微生物源) の探索を行った。硝化反応中は、pHの推移、有機物の分解に伴うアンモニウムイオン、亜硝酸イオン、硝酸イオンの増加をモニターし、亜硝酸が完全に硝酸へと変換された時点で硝化完了とした。約100種類の様々な市販の土壌や堆肥を用い硝化完了までの日数を基準にスクリーニングを行った。結果、一般的な土壌よりも硝化過程を短縮できる微生物源を選抜し、多様な有機物源 (牛乳、おから、野菜ジュース、ヨーグルトなど) を用いた際も硝化が可能であることを確認した。

### 3.4 硝化反応に適した複合微生物の集積化と栽培試験

硝化終了後の微生物群を回収し、スターターとして用い、再度硝化反応を40世代繰り返しても安定した硝化反応を示した。また、その際も初回集積時と同様の窒素代謝物の推移を示すことを確認した。

本検討での複合微生物系の目的は、有機物の硝化と併せて、実際に複合微生物を活用して作物を栽培することである。硝化過程終了後、回収した複合微生物群を用い、各県の農業試験場と共同で、葉菜類や、果菜類の試験栽培を行い、土壌栽培と遜色のない健全な植物の生育

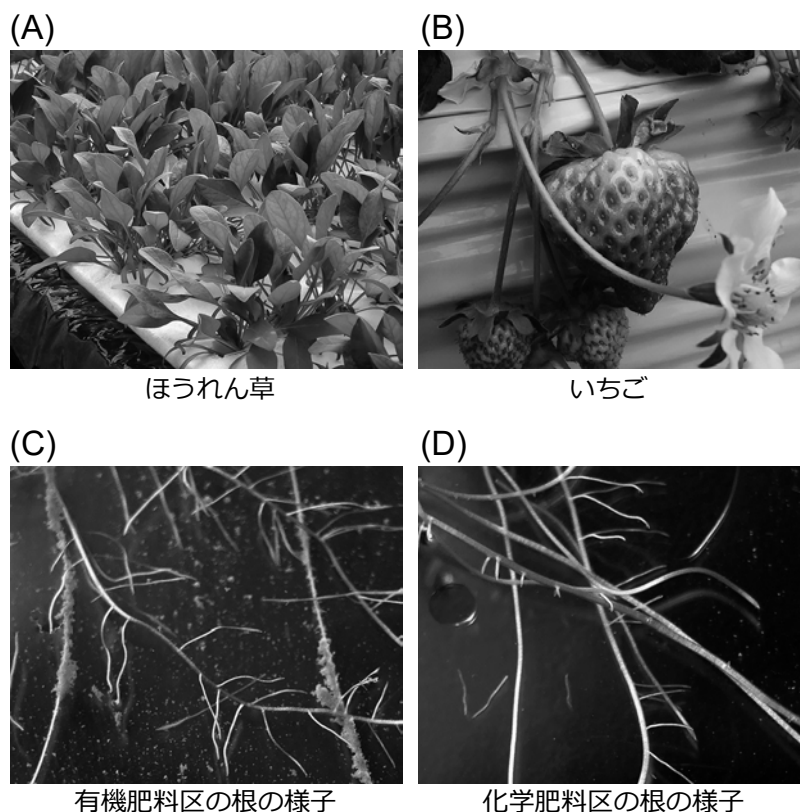


図5. 集積した硝化微生物群を活用した可食作物の栽培。

(A) ほうれん草, (B) いちごの栽培の様子。(C) 有機肥料区では根毛とバイオフィルムの発達が確認できる。(D) 化学肥料区では根毛が発達しない。

を確認した(図5A, B)。その際、葉菜類の栽培では化学肥料区に比べ、植物体の含有硝酸量の低減が観察できた。また、有機肥料区では土壌用の根毛やバイオフィルムの発達も確認できた(図5C, D)。さらには、植物病原菌を硝化反応中や栽培系に接種した場合に、時間の経過と共に病原菌が検出限界以下になる現象が観察された<sup>7,8)</sup>。現在、これらの特徴に関してメカニズムの解明を進めている。

### 3.5 窒素動態に伴う硝化複合微生物の菌叢推移

試験管スケールで硝化反応を行い、経時的に菌群を回収し、窒素化合物の動態と、PCR-DGGE解析により菌叢推移を解析した<sup>9)</sup>。図6Aに示すように、硝化反応は2日目よりアンモニウムイオンが検出できたが、およそ80 ppmで一定の値を示し、増減は観察されなかった。12日目には、亜硝酸イオンが検出され、16日目には160 ppmを示した。亜硝酸イオンが減少しはじめると同時に硝酸が検出され、硝化20日目には亜硝酸イオンは検出されなくなった。このアンモニウムイオンの推移と、16日から19日までの亜硝酸イオンの増減と硝酸イオンの増加はこの系の特徴の一つである。

続いて、16S rRNAのV6-V8領域を対象にDGGE解析を行った(図6B, C, D)。土壌細菌叢と土壌抽出物の菌叢は高い類似性を示したが、硝化反応中は比較的単純な菌叢に収斂していた。また、静菌作用を示す亜硝酸イオンの産生と同時に菌叢の多様性が極端に減少する傾向が観察できた。

特徴的なバンドを切り出し、配列の相同性から簡易的な菌種の同定を行った結果を示す。それぞれ *Bacillus cereus* (図6 A1), *Bacillus cereus* (図6 A2), *Bacillus* sp. (図6 A3), *Bacillus* sp. (図6 A4), *Lysobacter* sp. (図6 A5), *Pseudomonas* sp. (図6 A6), *Pseudomonas montelii* (図6 A7), *Pseudomonas* sp. (図6 A8), *Pseudomonas putida* (図6 A9), *Pseudomonas* sp. (図6 A10), *Acinetobacter* sp. (図6 A11)であった。*Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属が硝化反応中一様に観察される一方で、*Acinetobacter* sp. (図6 A11)など、亜硝酸の蓄積と同時に消失していく菌種も観察できた。これらの結果から、硝化反応中の細菌叢は、一般的な土壌細菌である *Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属が大部分を占め、土壌細菌叢と比べその他の菌種も極めて単純化されていることが明らかになった。

続いて、*amoA* (ammonia monooxygenase) を対象にDGGE解析を行い、アンモニア酸化細菌の推移を解析した(図6C)。結果、アンモニウムイオンの検出と同時に特徴的なバンドが検出され、亜硝酸イオンが検出されるまでは大きな変化は認められなかった。また、特徴的なバンドを切り出し解析したところ、*Nitrosomonas nitrosa* (図6 B1), Uncultured ammonia oxidizing bacterium (図6 B2), *Nitrosomonas nitrosa* (図6 B3), *Nitrosomonas nitrosa* (図6 B4), *Nitrosomonas nitrosa* (図6 B5), Uncultured *Nitrosomonas* sp. (図6 B6)であった。アンモニウム酸化は主に *Nitrosomonas* 属が担っていることが示唆された。続いて、亜硝酸酸化菌群の推移を *nxrA*

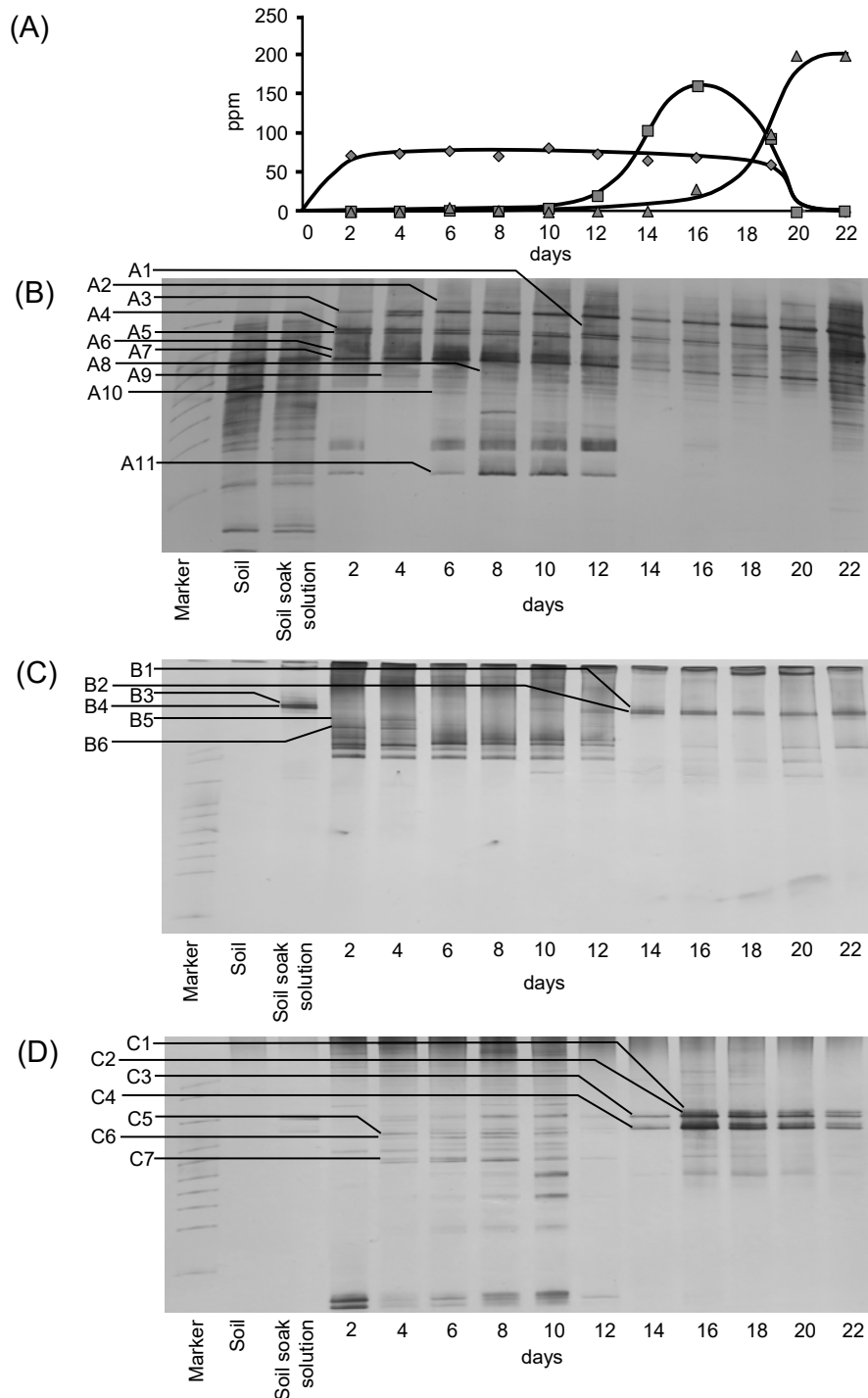


図 6. 硝化過程における窒素動態と微生物群の PCR-DGGE 解析。

(A) 窒素動態 ◆  $\text{NH}_4^+$ , ■  $\text{NO}_2^-$ , ▲  $\text{NO}_3^-$ , (B) DGGE 解析による一般細菌の動態, (C) アンモニア酸化菌の動態, (D) 亜硝酸酸化菌の動態。

(nitrite oxidoreductase) を対象に DGGE 解析を行った (図 6D)。亜硝酸イオンが蓄積すると同時に特徴的なバンドの出現が確認できたバンドを中心に切り出し簡易同定を行った。結果, それぞれ *Nitrobacter vulgaris* (図 6 C1), *Nitrobacter winogradskyi* (図 6 C2), *Nitrobacter winogradskyi* (図 6 C3), *Nitrobacter winogradskyi* (図 6 C4), *Nitrobacter winogradskyi* (図 6 C5), *Nitrobacter winogradskyi* (図 6 C6), Uncultured *Nitrobacter* sp.

(図 6 C7) であった。亜硝酸酸化は主に *Nitrobacter winogradskyi* が担っていることが示唆された。硝化反応中の主な硝化菌も, 土壌に比べ特徴的な菌が優先していることが明らかになった。

### 3.6 硝化複合微生物系モデル構築のための共培養を活用したスクリーニング

硝化反応時の菌叢の推移を DGGE により解析した結

表 3. 共培養培地

	成分 (g/L)		
	培地 type 1 (無機培地)	培地 type 2 (高負荷有機培地)	培地 type 3 (低負荷有機培地)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.78	—	—
Peptone	—	10.0	1.0
Yeast extract	—	1.0	0.1
Glucose	1.0	10.0	1.0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0	2.0	2.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	0.1	0.1
Total nitrogen	0.165	1.65	0.165
C/N ratio	2.4	2.4	2.4

表 4. 15 日培養後の無機態窒素の蓄積

Strain	培地 type 1 (ppm) (無機培地)			培地 type 2 (ppm) (高負荷有機培地)			培地 type 3 (ppm) (低負荷有機培地)		
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<i>Arthrobacter globiformis</i>	60	0	400	5	5	22.5	2.5	1	40
<i>Arthrobacter oxydans</i>	75	125	225	20	45	0	0	145	175
<i>Arthrobacter oxydans</i>	60	0	400	2.5	3.5	22.5	0	0	55
<i>Arthrobacter sulfureus</i>	75	10.5	65	20	0	20	0	100	225
<i>Arthrobacter ureafaciens</i>	70	1	30	20	0	20	2.5	1	40
<i>Bacillus badius</i>	65	0	400	20	40	22.5	0	0	400
<i>Citricoccus sp.</i>	75	0	400	60	0	20	2.5	50	35
<i>Kocuria rhizophila</i>	60	0	300	60	0	20	2.5	22.5	30
<i>Micrococcus luteus</i>	75	325	200	0	6	20	20	35	40
<i>Micrococcus luteus</i>	75	35	200	70	2	20	2.5	135	65
<i>Micrococcus luteus</i>	70	0	400	60	0	20	0	25	40
<i>Pimelobacter simplex</i>	100	0	27.5	0	0	20	5	3.5	25
Control <i>N. europaea</i> and <i>N. winogradskyi</i>	100	100	250	0	5	15	0	0	40

同名の菌は異なる株を示す。

果、土壌に比べ単純な菌叢に収斂し、特徴的な菌が優先していることが明らかになった。土壌では、多様な微生物が相互作用し、有機物の分解と無機化に関わっていることが予想できる。一方で、アンモニア化成と硝酸化成の機能に着目すると、有機物の分解、アンモニア酸化、亜硝酸酸化の3つの機能で硝化反応は成り立つ。DGGE解析の結果は、それらの反応を担う菌を組み合わせることで、機能を再現できる可能性があることを示唆していた。

そこで、市販のアンモニア酸化菌 (*Nitrosomonas europaea*)、亜硝酸酸化菌 (*Nitrobacter winogradskyi*) をそれぞれ入手し、硝化菌と多様な従属栄養細菌の3菌の共培養を行い、硝化活性を基準に従属栄養細菌のスクリーニングを行った。また、その際、表3の無機栄養培地、高負荷有機培地、低負荷有機培地を用いた。

### 3.7 硝化複合微生物系モデルの構築

様々な従属栄養細菌とアンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌の3菌にて硝化反応を検討した結果の一部を表4に示す。低負荷有機培地において、*Bacillus badius* と硝化菌の3菌系において効率的な硝化が実現できることが明らか

かになった。この3菌系は、市販の培地だけでなく様々な有機物も硝化できることを確認している。*Bacillus badius* は、一般的な細菌ではあるが、硝化菌と共存したときに硝化反応を協調して実現できるという特徴は、単離解析では見えてこない複合微生物系のおもしろさであろう。また、細菌培養時の一般的な有機培地 (培地 type 2) で硝化が確認できず、有機物負荷が1/10程度の特異な組成の培地で硝化反応が確認でき、それであっても定植には十分な硝酸イオン濃度を与えることも、環境下で顕在化している現象に関して大事な視点を与えてくれる。

### 3.8 有機培地中での硝化菌の生育の評価

独立栄養細菌である硝化菌は、一般的には好気環境下で従属栄養細菌用の有機成分を資化することができず、無機培地でのみ培養することができる。ここでは、有機物培地条件下で実際に硝化菌が増殖しているのか Real-time PCR にてアンモニア酸化菌と亜硝酸酸化菌の増加を確認した。結果、亜硝酸、硝酸の立ち上がりと並行してアンモニア酸化菌、亜硝酸酸化菌が増殖していることが確認できた (図7)。



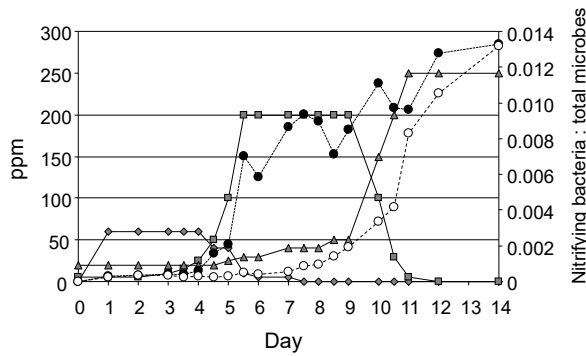


図7. 3菌系共培養時の窒素動態とアンモニア酸化菌と亜硝酸酸化菌の推移。

◆  $\text{NH}_4^+$ , ■  $\text{NO}_2^-$ , ▲  $\text{NO}_3^-$ , ● *Nitrosomonas europaea*, ○ *Nitrobacter winogradskyi*.

これまで土壌の潜在力を頼りとしていた有機物の無機化を、初めて既知の菌だけで再現し、かつ環境下と同様に硝化菌の増殖を確認できた。独立栄養細菌である硝化菌は大量培養が困難であり、無機培地の調製も煩雑である。共培養系を活用し有機培地で大量培養が可能になれば、応用の範囲は格段に広がる。歴史的には、土壌喪失が数々の都市や文明など社会の終焉の一因となってきたことが知られている<sup>10</sup>。現代においても土壌を消費し同じ過ちを繰り返しつつある。土壌創生は、環境に負荷をかけない持続的な食料生産や、さらには、来るべき宇宙時代の人類の飛躍には不可欠の技術となろう。

### 3.9 硝化複合微生物モデルを活用した土壌制御への展開

最後に本稿の硝化複合微生物の取り組みを踏まえて、植物の視点から土壌の微生物機能を考えてみたい。自然環境下での植物の生育の基盤は、土壌の窒素循環を担う硝化機能といえよう。しかし、通常土壌の硝化に関わる菌の割合はその他のものに比べ極めて低く、その組成は1%を下回る。また、硝化反応は複数の菌が関与する多段階の反応であり、脱窒を起こさず、アンモニア化成、硝酸化成がバランス良く進行する必要がある。植物成長を支持する土壌硝化機能は、菌叢解析からは評価しづらいことが分かる。こういった背景から、土壌肥沃度の指標の一つとして、微生物多様性が評価されている。土壌の微生物多様性が高ければ、様々な有機物の無機化や病原菌の抑制など菌の情報からは捉えがたい土壌機能を担保でき、一定レベルの作物栽培が期待できる。

一方で、今回、土壌の硝化機能を3菌のみで再現できたことから、土壌の硝化機能に関しては、多様性で担保しなくても単純な菌叢で実現できることがわかる。この事実はより能動的な土壌の制御を可能にする。例えば、3菌系や単純化した菌叢で植物の生育に必要な硝化機能を担保し、併せて植物の安定した生育を支持する微生物群の探索や、病害抑制や生育促進などの新たな機能性微生物群の活用などである。そのような試みから土壌の肥沃度も多様性の評価に加えて一步踏み込んだ新たな評価軸を提案できる可能性がある。また、硝化複合微生物モデルの構築時の情報は、現場での土作りにも活かせる。硝化複合微生物群の構築は、炭素含量が高いものや、多

量の有機物を投入すると硝化がうまくいかなくなる。上述のように、通常の培地の1/10程度の有機物濃度でも植物の生育には十分であり硝化菌も増殖することを踏まえ、目的により有機物の組成、投入量、回数など調製する必要があることがわかる。このように様々な機能モデルの情報を活用し、土壌の管理も微生物機能を意識した合理的な土作りが可能となろう。

機能をベースに複合系を捉えると、科学的なアプローチとは少し異なる景色を見ることが出来る。菌の取り回しが可能になり、これまで一様だった環境下の微生物の情報が意味を持ち、取捨選択が可能になる。本稿の取り組みにおいても、今後植物や微生物のそれぞれの視点の時間スケールで、相互作用下の生命活動などを垣間見ることが期待できよう。

## 4. あとがき

本稿では、応用微生物学の観点から複合微生物を機能ベースに単純化し、取り回し可能な複雑度へと落とし込むことで、科学的な解析の対象となるモデルを構築しよう一つの可能性を提案した。

現在進行形で急速に進歩している分析技術は、膨大な情報を提供してくれる。しかし、機能に関連する微生物を見出し取り扱うことは難しく、ひとつのメカニズムを解析するために多大な時間が必要となり応用展開を阻む一因となる。現場からは、何がわかったよりも何ができるかが求められることが多い。機能ベースの単純化は、情報を単純化できる他、不必要なことをしなくてもよい点もメリットとしてあげられる。すなわち、何をやるかを決めるのではなく、やらないことを決められる点で最短距離で応用を実現できる。

一方で、複合微生物系には、従来の応用微生物にはない新たな課題も見えてくる。本稿では、菌叢の単純化の一つの方法として限界希釈法を提案したが、菌の存在量と機能が相関しない場合があること、もともと菌の存在比が大きく異なれば、希釈しても機能に関係しない菌が常にいる、もしくは、必要な菌が消失すること、初期植菌量がばらつくこと、構造的な情報を失っていること、アーケア・真核生物も考慮する必要があることなど注意点や課題は多い。今後のウェット系の研究者の工夫やセンスが問われるところであり、面白いところでもある。

今回、複合系のモデル化の事例として3菌による土壌の硝化機能のモデル化を紹介したが、本系は外部から雑菌が混入しない閉鎖系において実現できた。外部から雑菌が混入した場合には、窒素成分がすべて増殖に使われてしまい系が破綻し硝化反応がうまく進まないことがあったためである。表4でも一部の3菌系ではこの傾向が窺える。この旺盛な増殖機能はこれまでの応用微生物学が成功した理由の一つでもあるが、バランスが大事な系ではむしろ系の安定性を阻害することになる。土壌から集積した約1万種の菌で構成されている硝化複合微生物系では、開放系で少々の雑菌の混入があっても、そういったことはおこらず安定して硝化が進行する。この結果は、1万種から3種への単純化に伴い、外乱に対しての硝化反応の安定性を失っていることを意味する。すな



わち、機能を評価する際には従来の応用微生物学にはなかった新しい安定性や頑健性という尺度で、旺盛な増殖を示す菌を抑制する菌や、多様な環境に対応できる菌群を活用するデザインが求められる。現在の科学的アプローチであるビッグデータを用いた菌叢解析も、全体像や菌の関係性を徐々に明らかにしつつあるが、こういった応用的なアプローチにおいても、安定性や頑健性の評価、デザインに有用な菌、菌叢制御のための環境パラメーターなど有用な情報を提供してくれるであろう。

また、避けて通れない難培養性菌の課題もある。様々な取り組みが進められ、難培養性菌の単離もできつつあるが、現状は菌群のデザインにも取り回し可能なものを扱う以外に手段はなく新たな単離技術の開発を進める必要がある。本研究の環境下の現象の機能的モデルは、そういった新たな単離技術開発にも有用な情報を提供しうる。難培養性菌の中には自然環境下では生育している菌も多い。実際、今回の硝化菌も有機培地中では通常生育できないが、従属栄養細菌と共存することにより生育が確認できた。単純な菌叢で機能的モデルを構築するなかで、難培養性菌が生育できる環境条件を見いだせることが期待できる。その際も代謝物や菌のビッグデータを活用することで難培養性菌の生育の鍵となる環境因子の特定が可能になろう。

一方で、難培養性という性質は、扱いづらさをイメージさせるが複合微生物系の視点で考えると違った捉え方もできる。栽培の現場では開放系で培養することになるので他の雑菌の混入はさけられないが、難培養性の菌であれば、増殖しすぎず系を破壊させるとはならない。難培養であることがむしろ、系の安定性においては利点となっている。難培養性菌は、環境下においては旺盛な増殖をせず存在しているが、彼らにとって増殖することは一つのリスクなのかもしれない。生えないことは彼らにとって生存戦略であり、能力の一つと考えることもできよう。また、こういった難培養性の菌が系の安定化に寄与していることも十分にありうるので、単離を経ずに限界希釈法などで難培養性菌を担保しつつ、安定性や頑健性の評価を行うなどの展開もあろう。

近年、植物根圏、腸内細菌など複合系を対象とした取り組みが欧米で盛んに行われている。彼らと同じ枠組みでは、競争は激しく新しいことの提案はむずかしい。日本がこれまでに発酵・醸造産業で蓄積してきたノウハウや概念を今後の応用微生物学の拡張に利用していく「枯れた技術の水平思考」<sup>11)</sup>により欧米とは異なる枠組みで日本にしかできない強みを生かした発酵を提案できるのではないだろうか。コッホの単離・純粋培養法が限界を示しているわけではなく、パスツールが見出した単離を

経ない発酵も併せて活用する姿勢が大事になろう。

我々は、複合微生物が関与する様々な分野のモデル化を進めている。今後も応用微生物学のフロンティアに挑戦していきたい。

## 謝 辞

本研究は、京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻発酵生理及び醸造学分野において行ったものであり、多くの学生、共同研究者の協力によって推進されました。こころより感謝申し上げます。また、本研究は先端的低炭素化技術開発 (ALCA) 事業 JPMJAL1606 と JSPS 科研費 JP16KT0146 の助成を受けたものです。

## 文 献

- 1) 横田 篤, 大西康夫, 小川 順. 2016. 応用微生物学 第3版. 文永堂出版.
- 2) 田代幸寛, 酒井謙二. 2014. 複合微生物系を用いたメタ発酵による有価物生産プロセスの開発と制御. バイオサイエンスとインダストリー. 72: 486-487.
- 3) 篠原 信. 2014. 「渾沌 (カオス)」の制御法…複合培養系を制御するコツ. 生物工学会誌. 92: 372-374.
- 4) 春田 伸, 五十嵐泰夫. 2004. 有機性廃棄物を分解・再資源化する微生物集団機能の解析と開発. 環境バイオテクノロジー学会誌. 4: 29-39.
- 5) Shinohara, M., C. Aoyama, K. Fujiwara, A. Watanabe, H. Ohmori, Y. Uehara, and M. Takano. 2011. Microbial mineralization of organic nitrogen into nitrate to allow the use of organic fertilizer in hydroponics. *Soil Science and Plant Nutrition*. 57: 190-203.
- 6) Aoyama, C.K., K. Fujiwara, M. Shinohara, and M. Takano. 2014. Study on the hydroponic culture of lettuce with microbially degraded solid food waste as a nitrate source. *JARQ*. 48: 71-76.
- 7) Fujiwara, K., C. Aoyama, M. Takano, and M. Shinohara. 2012. Suppression of *Ralstonia solanacearum* bacterial wilt disease by an organic hydroponic system. *J. Gen. Plant. Pathol.* 78: 217-220.
- 8) Fujiwara, K., Y. Iida, T. Iwai, C. Aoyama, R. Inukai, A. Ando, J. Ogawa, J. Ohnishi, F. Terami, M. Takano, and M. Shinohara. 2013. The rhizosphere microbial community in a multiple parallel mineralization system suppresses the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *MicrobiologyOpen*. 2: 997-1009.
- 9) Saijai, S., A. Ando, R. Inukai, M. Shinohara, and J. Ogawa. 2016. Analysis of microbial community and nitrogen transition with enriched nitrifying soil microbes for organic hydroponics. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80: 2247-2254.
- 10) デイビッド・モントゴメリー (著), 片岡夏実 (訳). 2010. 土の文明史. 築地書館.
- 11) 横井軍平, 牧野武文. 2015. 横井軍平ゲーム館: 「世界の任天堂」を築いた発想力. ちくま文庫.