

微生物ネットワーク解析から生態系設計へ

From Microbial Network Analyses to Ecosystem Design

東樹 宏和 *
HIROKAZU TOJU*

京大大学生態学センター 〒 520-2113 滋賀県大津市平野 2-509-3

* TEL: 077-549-8234 FAX: 077-549-8201

* E-mail: toju.hirokazu.4c@kyoto-u.ac.jp

Center for Ecological Research, Kyoto University, Hirano 2-509-3, Otsu, Shiga 520-2113, Japan

キーワード: 微生物叢, ネットワーク, 共生, 生態系設計, 次世代シーケンシング, コア微生物
Key words: microbiomes, networks, symbiosis, ecosystem design, next-generation sequencing, core microbes

(原稿受付 2020年1月27日/原稿受理 2020年2月17日)

1. はじめに

地球温暖化によって極端な気象イベントが頻発し、森林火災等によって広大な面積の自然生態系が地球上から失われつつある。また、塩害や有機物の損耗によって土壌が劣化した農地が世界中で拡大しており、世界人口が増え続ける中、持続可能な食糧供給のあり方が問われている。こうした地球レベルの環境劣化を背景として、自然生態系を再生し、資源利用効率の高い農業生態系を設計する新たな異分野融合科学が求められつつある¹⁾。

自然生態系であれ、農業生態系であれ、植物個体は無数の微生物種やその他の生物種に囲まれている(図1)。こうした生態系の中において、病害虫として植物に悪影響を及ぼす種の割合はそれほど高くはなく、残りの多くの種は、さまざまな生態系機能をもたらす構成員として、重要な役割を担っている。空気中の窒素を生態系内へと固定する根粒菌や、土壌中のリンや窒素を可溶化して植物へと供給する菌根菌、植物体内や体表面で病害虫の抑制やその他さまざまな生理的役割を担っている内生細菌・内生真菌類がその例である²⁻⁴⁾。

現在、こうした生物種たちが彩る種間相互作用のネットワークを解明することが可能となりつつあり、生物多様性に関する情報科学(インフォマティクス)が環境科学のみならず、工学・農学・医療の広範な分野に波及効果を及ぼす中核技術の土台が成立しつつある⁵⁾。本稿では、生態系再生や農業生態系の設計を見越した技術開発の例を示しながら、この新分野の将来性を議論したい。

2. DNA メタバーコーディング

Illumina 社のシーケンサーの登場によって膨大な DNA 配列データが得られるようになった現在、土壌や水といった環境サンプルや、植物・動物といった生物サ

ンプルから、生物多様性に関する情報を迅速に取り出すことが可能となってきた⁵⁾。こうした生物多様性データの取得においては、生物群ごとに研究者の間でおおまかなコンセンサスが得られている DNA バーコーディング領域(マーカー領域)を PCR 増幅し、データベースとの照合を行う。細菌やアーキアであれば 16S rRNA 領域、真菌であれば核 ITS 領域、といったように、種レベルでの分子同定が可能であるマーカーが使用される。QIIME や DADA2 といったデータ処理のパイプラインで処理することによって、生物の多様性情報を OTU (operational taxonomic units) や ASV (amplicon sequence variants) にまとめ、そうした OTU や ASV ごとにデータベースとの照合を行っていくのが一般的である。なお、一般的な DNA バーコーディング領域以外のゲノム領域を対象としてこうした DNA メタバーコーディングを行うことも可能であるが、その際は、特定のバーコーディング領域での分析に特化したパイプラインで処理することができない。対象生物群やバーコーディング領域に関する制約がないパイプラインとしては、Clident というものが存在する^{5,6)}。なお、OTU や ASV は、種といった生物の分類階層に必ずしも一致するものではなく、便宜的に「微生物種」を単位とした議論が展開されている際にも、慎重な解釈が必要である。

Illumina シーケンサーの 1 回のランによって、数百サンプル以上の生物組成を並列分析することが可能である。例えば、1つの森林において、植物根端のサンプルを数百個採集し、その個々のサンプルに共生する微生物種の組成を一挙に明らかにすることが可能である(図2)。また、形態だけでは宿主の同定が困難であったサンプルについて、植物側の DNA 配列から宿主の同定が可能となる。このように、数百のサンプルのそれぞれについて、共生する微生物の種組成と宿主植物に関する情報が手に入るため、こうした情報をまとめることにより、

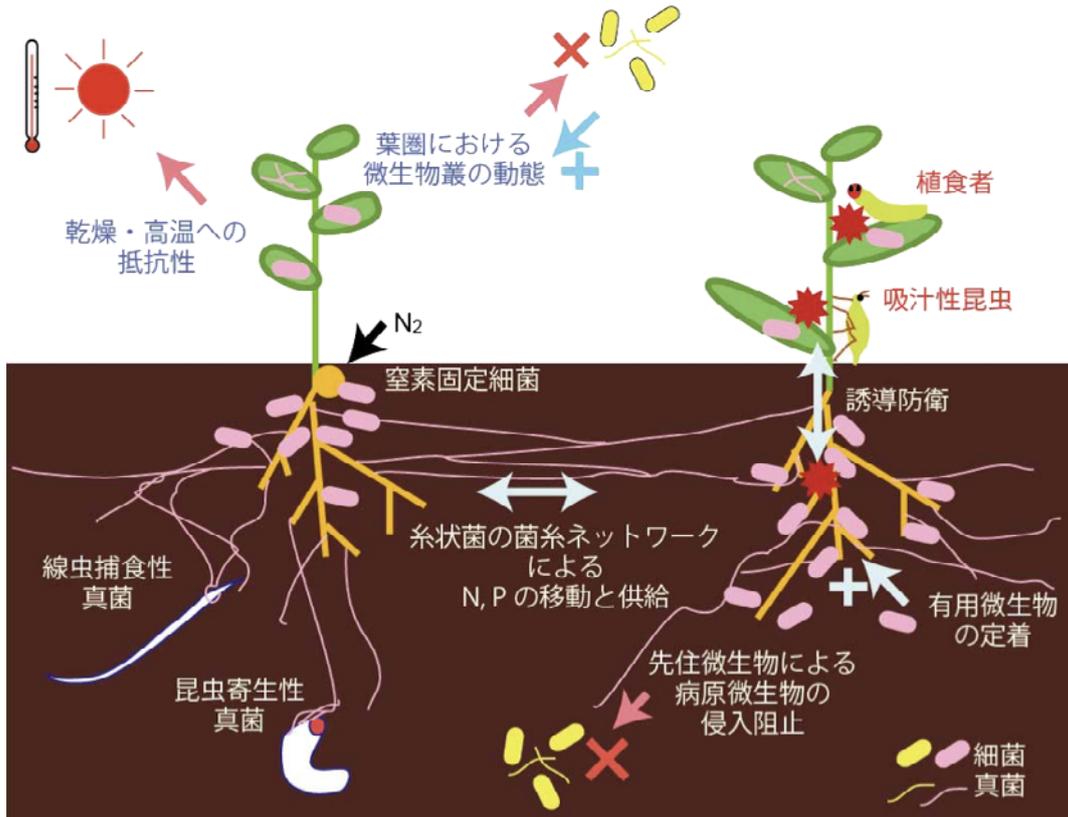
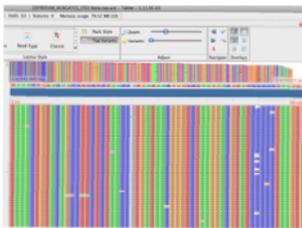


図1. 植物を取り巻く生物叢。さまざまな微生物，土壤動物，昆虫類が屋外環境において植物の生存と生長に影響を及ぼす。

どの植物種にどの真菌が共生しているか？

DNA配列情報





サンプル = 菌根



宿主 = 植物



共生者 = 真菌

植物と真菌の共生行列

植物

Quercus glauca
Quercus serrata
Pinus densiflora
Lyonia ovalifolia
Ilex pedunculosa
Prunus grayana
Prunus jamasakura
Cinnamomum camphora
Ilex macropoda
Pleioblastus chino

真菌

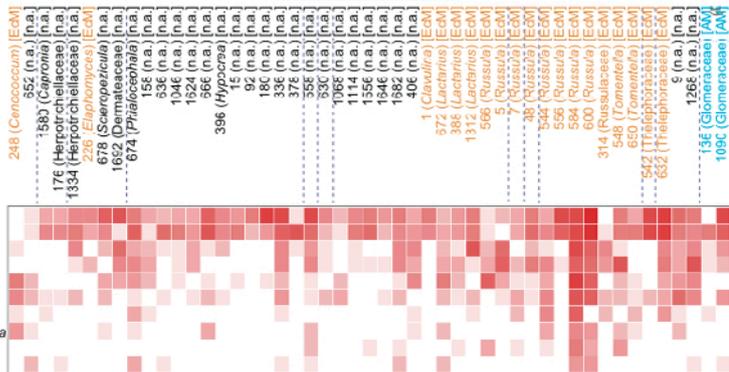


図2. DNA メタバーコーディングによる植物と微生物の関係性分析。数百サンプルのそれぞれを Illumina シーケンサー等で並列分析し，植物と微生物の広義の共生関係を生態系レベルで明らかにする。

対象となる森林や草原の地下において、どの植物種とどの微生物種が関わっているのか、その全体像を解明することができる^{7,8)} (図3)。

こうした宿主-共生微生物系の解析においては、「どの宿主種からどの微生物種が検出されたか」という単純な一次情報を集約して、ネットワークの形で表現されることが多い⁹⁾。そのため、相利的・搾取的な作用を及ぼす微生物だけでなく、宿主に対して特に大きな影響を与えない共生者も、こうしたネットワーク図に含まれることになる。分析手法によるこの特性は、慎重に考慮される必要がある。そもそも、相利共生から中立的関係、寄生までの間に隔絶があるわけではない。そのため、連続軸のなかでそれぞれの宿主-共生微生物間相互作用が位置づけられるべきである。さらに、個々の共生者による宿主への効果は、環境条件の影響を受けつつ時々刻々と変化していると予想され^{10,11)}、相互作用を単純化して分類するのは原理的に不可能である。

以上を考慮すると、上記の植物-共生真菌系で分析されたようなネットワーク図は、宿主と共生者の間であり得る多様な関係性をひとつにまとめた「白地図」のようなものとして捉える必要がある。白地図は白地図として認識し、群集や生態系の全体像を俯瞰することで、重点的に研究すべき宿主-共生者系を絞り込んでいけばよいであろう。こうした俯瞰作業により、思わぬ微生物機能の発見につながるかもしれない。

3. 共生者どうしの関係性ネットワーク

どのサンプルからどの微生物種が検出されたか、というデータがあれば、微生物種間の潜在的な関係性を探る統計分析を行うことが可能である (図4)。腸内細菌叢や植物共生微生物叢に関する研究でよく行われるこうした解析では、微生物 OTU (もしくは ASV) どうしが同じサンプルの中で共存 (もしくは非共存) する傾向が統計的に処理される¹²⁻¹⁵⁾。基本的に、微生物 OTU どうしのサンプル内における共存・非共存に着目し、観察されたパターンがランダムに期待されるパターンからどれだけずれているか、という点を評価する。使用する統計解析の手法にもよるが、反復 (レプリケート) サンプルを 100 以上準備した上で適用しないと、偽陽性ばかりを拾ってしまう恐れがあり、適用には注意が必要である。

こうした手法は、「共存」というパターンの分析であり、同居 (共存) している傾向が強いからと言って、必ずしもお互いにプラスの働きをしている微生物どうしであるとは限らない点にも注意が必要である。共存関係が推定された微生物どうしは、お互いにプラスとなる効果を及ぼしあっている可能性がある一方、単に宿主や環境に対する選好性が似ている種どうしであるだけかもしれない。そのため、微生物間の直接的な相互作用だけでなく、生態的地位 (ニッチ) の類似性に起因する効果も含んだ関係性のネットワークが推定されていることに気を

生態系の中で、個々の種の「立ち位置」を推定

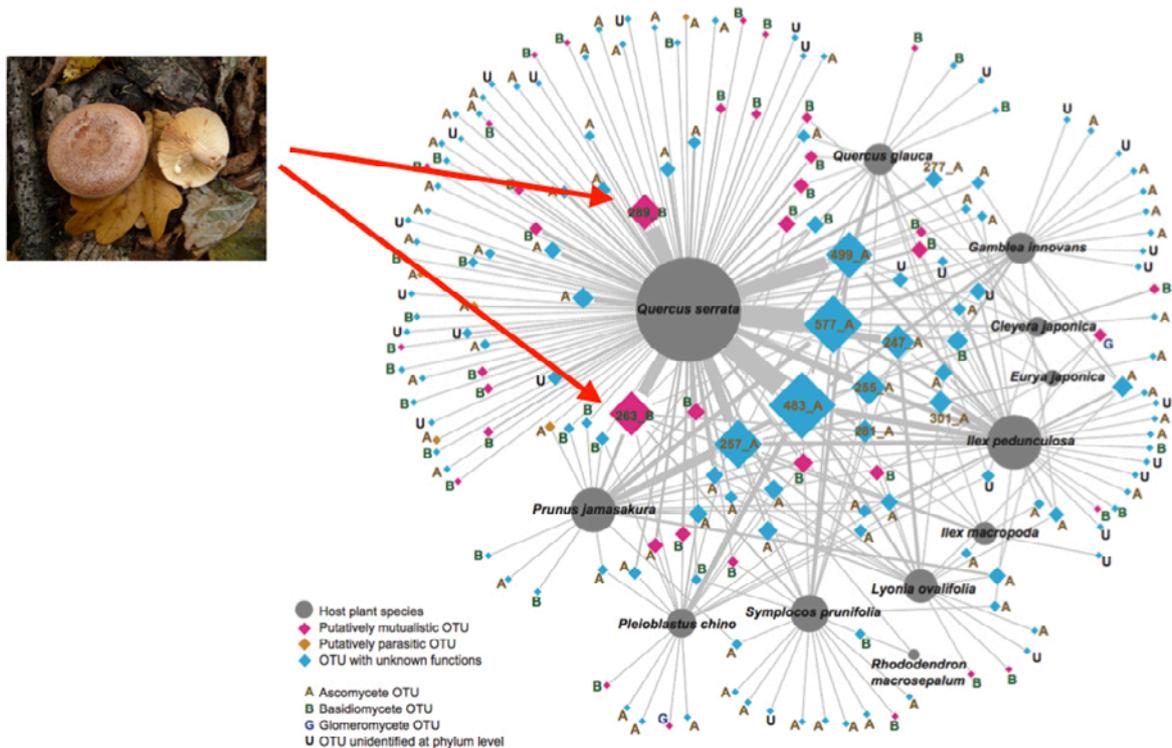


図3. 植物と微生物の共生ネットワーク。図2で得られた情報をもとに、植物と微生物の共生関係をネットワークとして図示することができる。マーカー領域の DNA 配列で分子同定できた種について、どの植物との関わりが強いのか大まかに把握することができる。Toju et al. (2013) Ecology & Evolution を改変。

配る必要がある。

微生物間の直接的な相互作用のみを検出することを目指すのであれば、「潜在変数モデル」を用いた方法の利用を検討するとよいかも知れない。生態学で最近登場したこの手法では、個々のサンプルに関する環境データを投入することで、各生物種による環境選好性を推定する¹⁶⁾。その上で、環境に対する選好性で説明できない群集データ上の構造を、生物間の相互作用を含めた要因で説明する。しかし、アルゴリズムの実装において、並列化が難しく、多くの種を含むデータには適用が困難な手法といえる。

生態的地位の共有に起因する効果を除外した種間関係の推定手法としては、時系列サンプリングをもとにしたものの利用が今後広がるかもしれない。sparse S-map法をもとにマウス腸内細菌間の相互作用を推定した先駆的事例では、若齢マウスと高齢マウスの間で、腸内細菌間の相互作用ネットワークの構造が大きく変化することが推測された¹⁷⁾。sparse S-map法以外にも、convergent cross mapping法をはじめとするempirical dynamic modelingなど、微生物間相互作用の解析に大きな力を発揮し得る手法が開発されて来ている¹⁸⁻²⁰⁾。潜在的に強力な武器となる解析手法であるが、その適用には数十時間点以上に渡る時系列データの収集が必要であり、まだ利用

が広がっていない。今後、微生物叢分析におけるサンプリングの自動化や、DNAシーケンシングコストのさらなる低減によって、empirical dynamic modeling等の実装が進んでいくと期待される。

4. 微生物叢の設計

微生物叢の構造や微生物叢内における種間相互作用に関する情報が蓄積され続ける中、そうした基盤情報を活かして機能性や安定性の高い生態系を設計していく道が切り拓かれつつある。従来の生物工学においては、遺伝子を単位とした生物個体/生物種レベルにおける機能最適化が中心的課題であった。しかし、もし「生物種や生物の系統を単位として生態系レベルでの機能と安定性を最大化する」科学的な基盤が構築されれば、その効能は計り知れない。微生物は菌株としての管理が容易であるものが多い。この微生物種/系統を適時、最適な組み合わせで混ぜ合わせることで生物機能をカスタマイズすることができれば、迅速かつ低コストに、目的に応じた工学的な応用が可能であろう。また、そもそも、遺伝子間相互作用におけるトレード・オフなどの制約により、1個体の生命体(ゲノム)に盛り込める生物機能には限りがあることが予想されるだけでなく、そもそも無

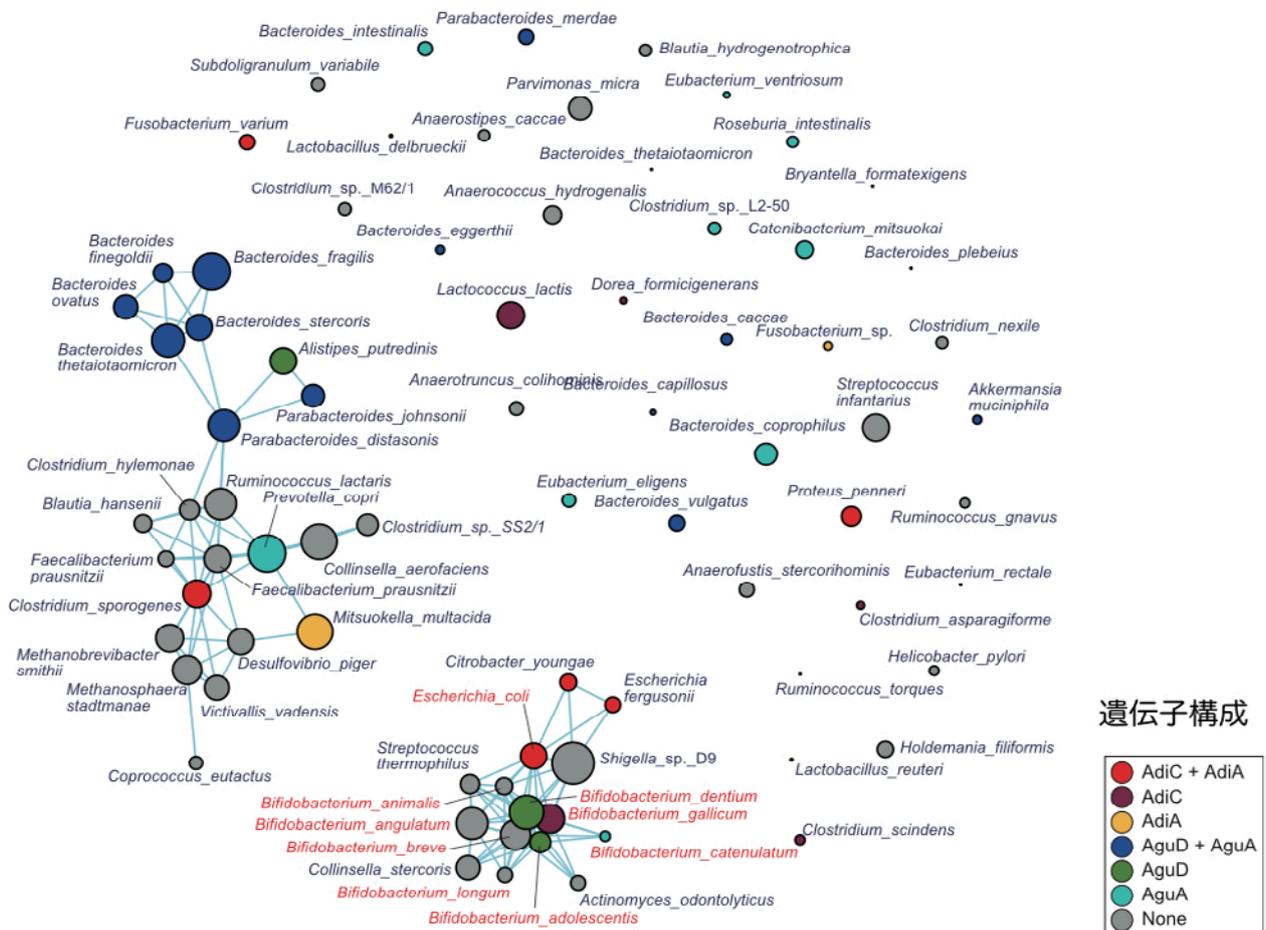


図4. ヒト腸内細菌の共起ネットワーク。宿主個体の中でしばしば共存する微生物どうしを統計解析によってあぶり出す。宿主体内で共存する傾向の強い微生物をつなぐことで、ネットワーク・モジュールとして微生物叢内の構造を把握することができる。Kitada et al. (2018) Science Advances を改変。

数の生物種が存在する実際の環境下においては、常に予期せぬ生物動態が起こり得る。はじめから他種で構成されるシステム全体を設計対象とし、その生態系全体における機能性と動態の頑健性を考慮していく視点が、本質的な技術基盤の構築につながると考えられる。

こうした観点から、筆者の研究室では、微生物学・生態学・情報科学・植物学等を融合しながら、微生物叢の設計という新領域の開拓を進めている。特に注目しているのが、陸上生態系の要となる植物とその根圏・葉圏に生息する細菌・真菌類である。これまで、北海道から沖縄にかけての日本列島全域で数百種の植物を調査し、根や葉に共生する細菌・真菌の多様性を DNA メタバーコーディングで解明してきた^{21,22)} (図 5)。また、農業生態系を対象として、植物の種内系統や植物体の健康状態と微生物叢の関連性について、統計的な分析を行ってきた。

こうした膨大な情報を土台として、現在、野外環境下において植物をとりまく微生物叢を最適化する手段の構築を進めている。農地では、それぞれの土地の土壌や気候環境に適応した微生物叢が成立している。こうした微生物叢の中には、植物に病徴を生じさせるものも含まれているため、従来、土着の微生物叢は、「リスク要因」として、殺菌剤等で「リセット」すべき対象として認識されることが多かった。しかし、植物の生存や生育に害を及ぼすごく一部の微生物を除外するために、他の大多数の有用な微生物が有する生物機能を犠牲にしてしまう

やり方は、効率的な農地管理とは言えない。その土地の物理・化学・生物的プロセスの中で自然選択を受け、適応してきた微生物の機能を引き出してこそ、資源・エネルギー効率の高い農業生産が可能であろう。また、「菌をもって菌を制する」戦略によって、病害の発生リスクも低減できる可能性がある。

種構成をカスタマイズ設計して生態系レベルでの機能性と頑健性を最大化するためには、戦略と技術への着実な落とし込みが必要である。そもそも、野外環境において私たちが直面する微生物の多様性はすさまじい。1つの草原や森林であっても、その土壌中には、それぞれ数万種の細菌と真菌が生息しているであろう。また、1個体の植物を考えてみても、体内や体表面で活動する微生物種数は、数百を下らないと考えられる。こうした状況下においては、1個体の植物を取り巻く微生物叢に関して、膨大な種の組み合わせがあり得る。少なく見積もって、細菌と真菌があわせて1万種存在し、そのうち100種が植物と密接に関わると仮定しても、あり得る微生物叢の種構成は、全宇宙に存在する星の数よりも遙かに多い (図 6)。実際には宿主特異性といった要因によって潜在的な共生者の数が絞り込まれるわけであるが²³⁾、宿主範囲の極めて広い (シダ植物にも被子植物にも共生できる内生真菌など) 真菌類の存在も明らかになりつつある^{7,22)}。

こうした「次元の呪い」とも言える組み合わせの問題に立ち向かうには、生態系や生物群集全体を俯瞰する

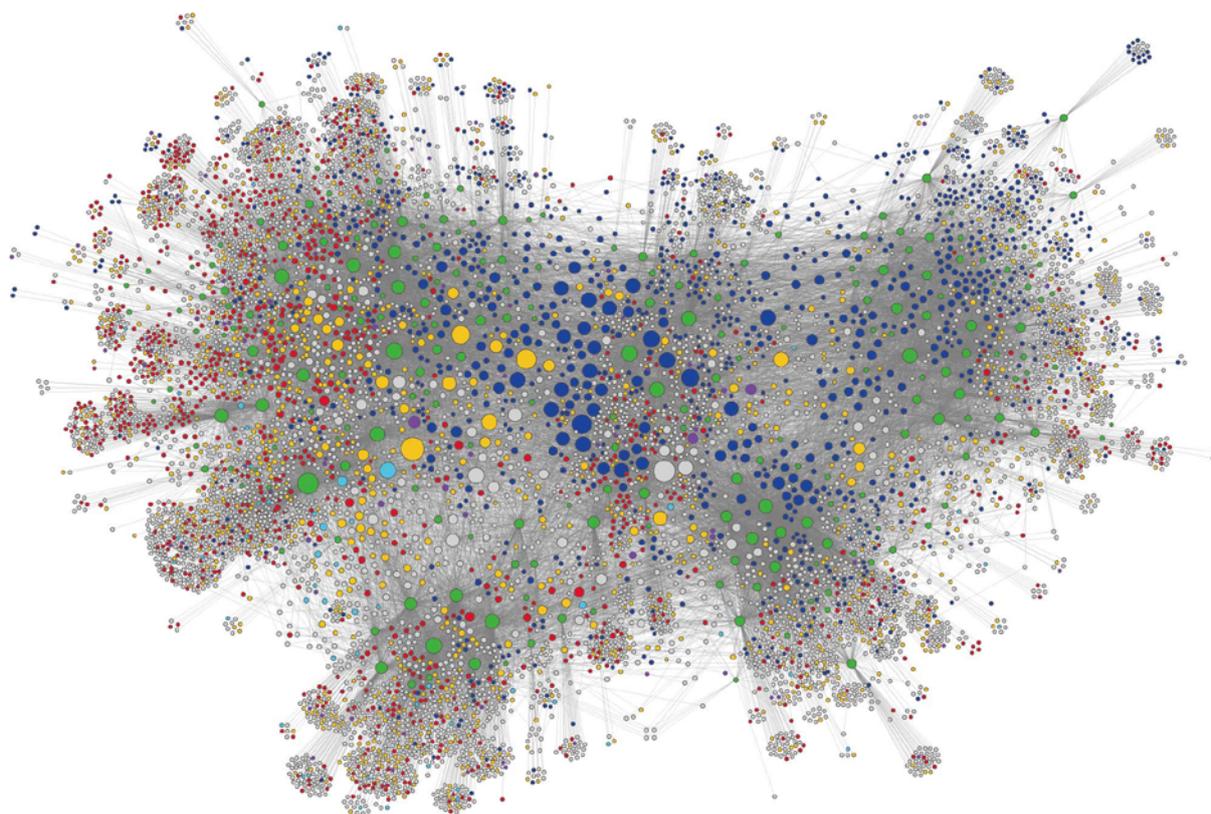
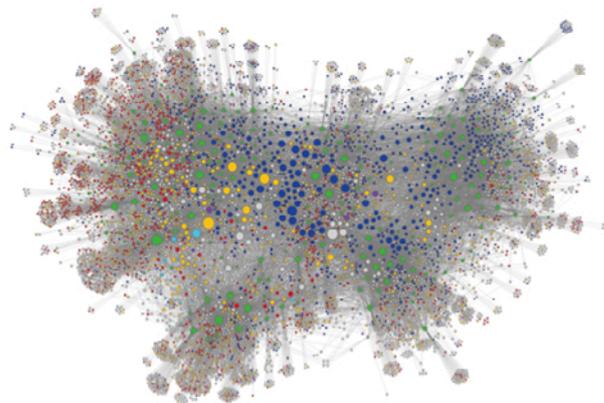


図 5. 日本列島全域にわたる植物と真菌の共生ネットワーク。北海道から沖縄の 8 箇所の森林それぞれで 30 種ほどの植物種の根を採集し、共生する真菌類を DNA メタバーコーディングによって明らかにした。その上で、複数の森林に出現する真菌によって植物個体群を結び、メタ群集レベルにおけるネットワークとして表現した。150 種の植物と 8080 の真菌 OTU がこの図に含まれる。Toju et al. (2018) *Microbiome* を改変。

微生物叢設計：次元の呪い



環境中の10000菌種のうち100種が植物体に侵入する組み合わせ：

10²⁴¹個

(宇宙に存在する星の数： 10²²個)

俯瞰的解析で微生物叢全体の機能性を最大化する 「コア微生物」を特定し、システムに埋め込む

図6. 微生物叢設計における次元の呪い。野外環境中には、無数の微生物種が息し、その中から、多数の種が植物個体の体内や体表面に共生する。そのため、植物個体を取りまく微生物叢の構造には、無限とも言えるパターンがあり得る。しかし、微生物叢の構造を俯瞰的に眺めることで、無限の組み合わせ候補の中から、成立しやすい安定なものを選び出し、微生物叢を設計することができるかもしれない。

データを最大限活用するアプローチが欠かせない。こうした観点から、微生物種の多様性や、微生物種間の関係性ネットワーク、宿主生物のパフォーマンス等に関する情報を統合し、土着の微生物叢がもつ機能を引き出す微生物（「コア微生物」）を探索する戦略を提案した¹⁾。このスコアリング手法は、1) 機能的な土着微生物のリクルート、2) 病原生物の侵入阻止、3) コア微生物どうしの相性、の3つのステップ（基準）に分けることができる（図7）。この手法で選んだ菌を、「先住者」として植物の種子や実生に接種し、微生物叢成立の初期過程を植物の生育にとって有利な方向へと誘導することができる。植物に共生する微生物種どうしとの関係性に関して実施された生態学的な実験から、競争能力における微生物種間の優劣よりも、どの微生物種が宿主植物の体内・体表面に先に侵入したかという順序のほうが、より重要であることがわかってきている。生物種間の関係性ネットワークを俯瞰した上で、選び出されたコア微生物を「先住者効果」（priority effects）によって導入し、野外環境下において植物周辺に展開する微生物叢を制御できるかもしれない¹⁾（図8）。

従来、「コア微生物」（core microbes）という用語が使われる際、単純に検出頻度の高い菌を指し示していることが多かったが、上記の基準で選ばれてくる菌は、生態系全体での機能を最大化させる、という観点で評価され

る（以下、「機能コア微生物」）。さらに、生態系内におけるこうした役割を基準に選んだ複数の機能コア微生物を組み合わせた「コア微生物叢」（core microbiomes）を設計し、育苗の段階において導入することで、先住者効果による微生物叢の動態と機能性の制御を目指すことができるであろう¹⁾。現在、植物の根圏に生息する微生物叢を中心に、コア微生物叢の設計や菌株の単離・コレクション化を行うとともに、植物への接種試験を進めている。

5. ま と め

本稿では、植物と微生物の共生ネットワークや共生者どうしとの関係性ネットワークを俯瞰する試みについて、その概要を述べた。また、そうした群集や生態系全体を俯瞰するデータをもとにして野外環境中において微生物叢をいかに制御できるのか、特に微生物叢の設計という観点から議論した。農作物を取り巻く生物的・非生物的環境が過酷化する中、植物ゲノムの改良だけでは対処しきれない複合的な問題に対し、植物以外の生物ゲノムをうまく利用した解決策を模索していく必要が生じて来るであろう。4億5000万年にわたる陸上植物の進化史の中で、植物を取りまく微生物たちが宿主の環境適応に果たしてきた役割は極めて大きい。その微生物叢がもつ本

3つの基準で数千・数万の候補の中から コア微生物を特定

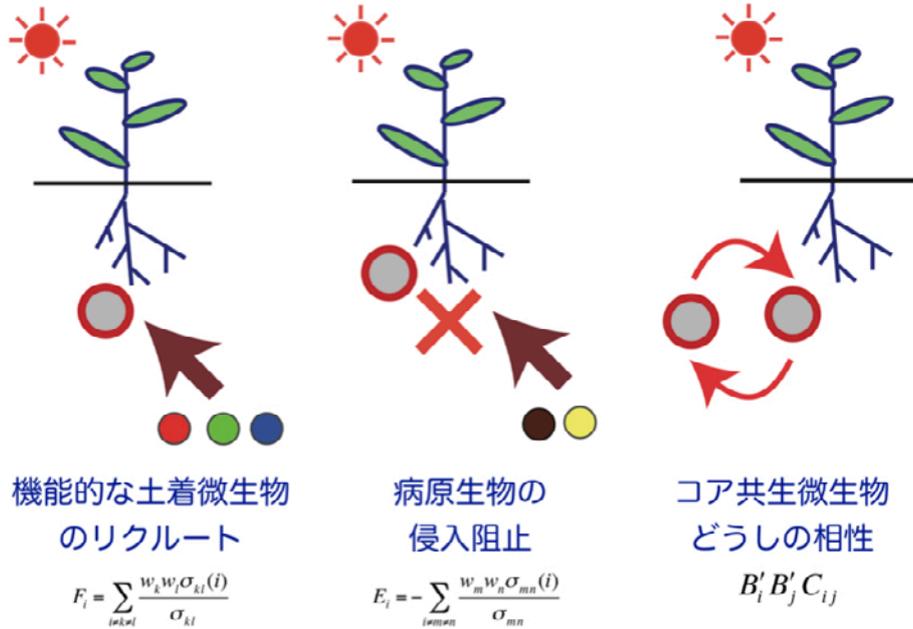


図7. 微生物叢を設計する際の3つの基準。1) 機能的な土着微生物をリクルートする効果, 2) 病原生物が植物に侵入するのを阻む効果, 3) 埋め込む植物どうしの相性, の3つを基準として, 微生物種や微生物種の組み合わせを評価する。

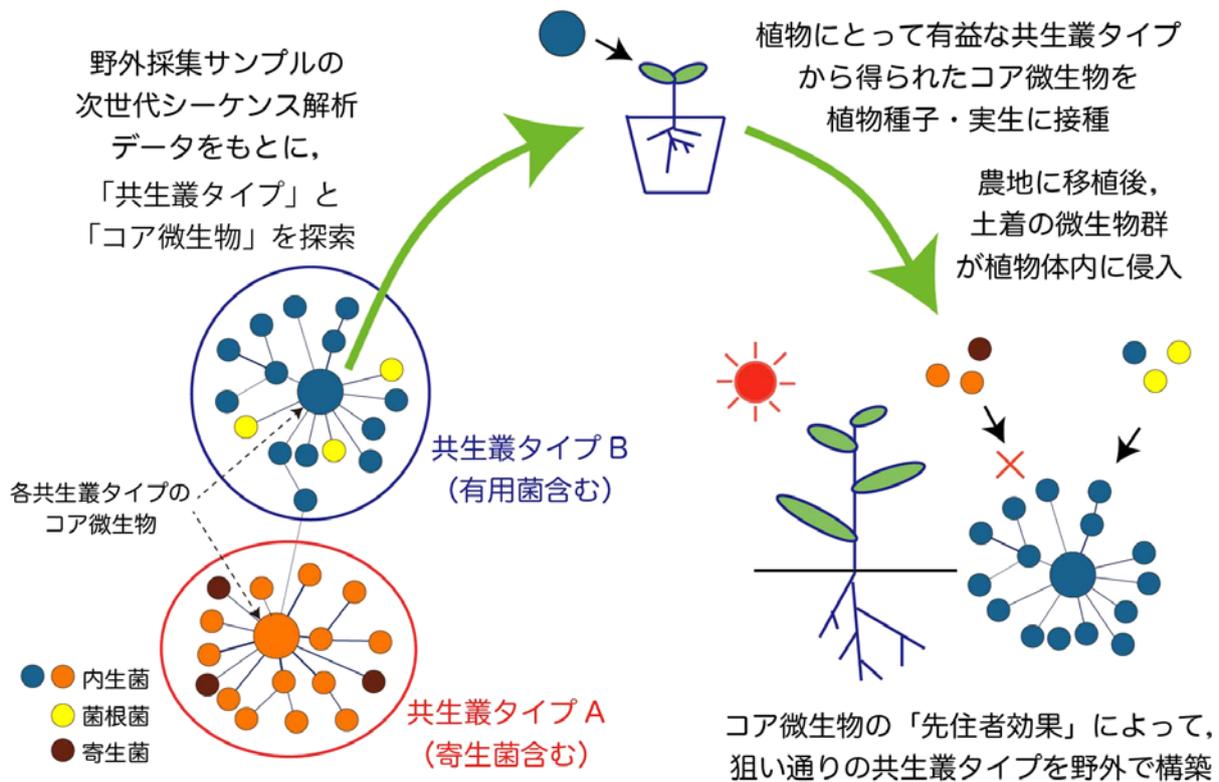


図8. 機能コア微生物の先住者効果による微生物叢の制御。健康な植物個体に特有の共生菌叢（共生叢タイプ）を把握した上で、図7のような基準で選び出された機能コア微生物の候補を無菌状態の種子や苗に導入する。この苗を野外圃場に移植後、先住者として埋め込まれた機能コア微生物がその後の微生物叢の動態を制御することができれば、資源利用効率が高く、生物的・非生物的環境変動に対して頑健な農業が可能となるかもしれない。

来の機能を再現可能な形で活かすことができれば、持続可能な農業だけでなく、自然生態系の再生や植物を使った環境浄化（ファイトレメディエーション）といった広範な分野に新たな展開が訪れるであろう。

文 献

- 1) Toju, H. *et al.* 2018. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. *Nat. Plants*. 4: 247–257.
- 2) Peay, K.G., P.G. Kennedy, and J.M. Talbot. 2016. Dimensions of biodiversity in the Earth mycobiome. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 434–447.
- 3) Porras-Alfaro, A. and P. Bayman. 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Ann. Rev. Phytopathol.* 49: 291–315.
- 4) Santoyo, G., G. Moreno-Hagelsieb, M. del Carmen Orozco-Mosqueda, and B.R. Glick. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 183: 92–99.
- 5) 東樹宏和. 2016. DNA 情報で生態系を読み解く：環境 DNA・網羅的群集調査・生態ネットワーク. 共立出版.
- 6) Tanabe, A.S. and H. Toju. 2013. Two new computational methods for universal DNA barcoding: a benchmark using barcode sequences of bacteria, archaea, animals, fungi, and land plants. *PLOS ONE*. 8: e76910.
- 7) Toju, H., P.R. Guimarães, J.M. Olesen, and J.N. Thompson. 2014. Assembly of complex plant–fungus networks. *Nature Commun.* 5: 5273.
- 8) Toju, H. *et al.* 2013. How are plant and fungal communities linked to each other in belowground ecosystems? A massively parallel pyrosequencing analysis of the association specificity of root-associated fungi and their host plants. *Ecol. Evol.* 3: 3112–3124.
- 9) Toju, H. 2015. High-throughput DNA barcoding for ecological network studies. *Popul. Ecol.* 57: 37–51.
- 10) Kiers, E.T. and M.G. Van Der Heijden. 2006. Mutualistic stability in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: exploring hypotheses of evolutionary cooperation. *Ecology*. 87: 1627–1636.
- 11) Verbruggen, E. and E. Toby Kiers. 2010. Evolutionary ecology of mycorrhizal functional diversity in agricultural systems. *Evol. Appl.* 3: 547–560.
- 12) Kitada, Y. *et al.* 2018. Bioactive polyamine production by a novel hybrid system comprising multiple indigenous gut bacterial strategies. *Sci. Adv.* 4: eaat0062.
- 13) Toju, H., S. Yamamoto, A.S. Tanabe, T. Hayakawa, and H.S. Ishii. 2016. Network modules and hubs in plant-root fungal biomes. *J. R. Soc. Interface.* 13: 20151097.
- 14) Faust, K. and J. Raes. 2012. Microbial interactions: from networks to models. *Nature Rev. Microbiol.* 10: 538–550.
- 15) Toju, H. and Y. Tanaka. 2019. Consortia of anti-nematode fungi and bacteria in the rhizosphere of soybean plants attacked by root-knot nematodes. *Royal Society Open Science*. 6: 181693.
- 16) Letten, A.D., D.A. Keith, M.G. Tozer, and F.K. Hui. 2015. Fine-scale hydrological niche differentiation through the lens of multi-species co-occurrence models. *J. Ecol.* 103: 1264–1275.
- 17) Suzuki, K., K. Yoshida, Y. Nakanishi, and S. Fukuda. 2017. An equation-free method reveals the ecological interaction networks within complex microbial ecosystems. *Methods Ecol. Evol.*
- 18) Deyle, E.R., R.M. May, S.B. Munch, and G. Sugihara. 2016. Tracking and forecasting ecosystem interactions in real time. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* 283: 20152258.
- 19) Sugihara, G. *et al.* 2012. Detecting causality in complex ecosystems. *Science*. 338: 496–500.
- 20) Ushio, M. *et al.* 2018. Fluctuating interaction network and time-varying stability of a natural fish community. *Nature*. 554: 360–363.
- 21) Toju, H., H. Kurokawa, and K. Tanaka. 2019. Factors influencing leaf-and root-associated communities of bacteria and fungi across 33 plant orders in a grassland. *Frontiers Microbiol.* 10: 241.
- 22) Toju, H., A.S. Tanabe, and H. Sato. 2018. Network hubs in root-associated fungal metacommunities. *Microbiome*. 6: 116.
- 23) Toju, H., A. Tanabe, and H. Ishii. 2016. Ericaceous plant-fungus network in a harsh alpine-subalpine environment. *Mol. Ecol.* 25: 3242–3257.