

特集 複合微生物系の制御・有効利用の最前線

水処理やバイオレメディエーションをはじめとするバイオプロセスは雑多に存在する微生物の相互作用を巧みに制御することにより、目的である汚染物の効率的な分解を図ることができる。近年、このような複合微生物系によるバイオプロセスは、排水からのエネルギー・レアメタル回収技術やプロバイオティックスなどをはじめとする食品の健康機能性を高める技術へと応用されている。上述のように、自然界に存在する雑多な微生物を資源としてとらえ、環境修復技術や Quality of life の向上を目指す Microbial Resource Management (MRM) というコンセプトが近年提唱され注目を集めている。この MRM における微生物を用いたバイオプロセスの鍵となる点は、多種多様な微生物から構成される培養系を制御することであり、化学工学の特徴である俯瞰的なアプローチが複合微生物系のバイオプロセスの進展に大いに貢献できると期待されている。本特集では、複合微生物系のバイオプロセスの研究手法の進展とその応用例を見ることにより、複合微生物系バイオプロセス・バイオテクノロジーの最前線を紹介していきたい。

(編集担当：寺田昭彦・宮永一彦)†

純粋培養から集団としての微生物機能の解析・利用へ —21 世紀の応用微生物学の歩むべきひとつの道—

五十嵐 泰夫

はじめに

20 世紀、応用微生物学は自然界に生息する微生物を取り出して来て、その性質を詳細に調べ、必要であればその性質の一部を変え、予め他の微生物を皆殺しにしてから、一種類の微生物の持つ機能を最大限発揮させる条件の下で物質生産をおこなうという手法によって発展してきた。このような手法の発展の背景としては、一般に微生物の持つ、構造が簡単、生育が早く培養が簡単、遺伝情報が多くない、などの利点を最大限生かして、代謝生理、遺伝情報とその制御などの基盤分野が発展したことが挙げられる。

それでは 21 世紀の微生物学・応用微生物学はどのような方向に歩んでいくのであろうか。20 世紀末に花開いたゲノム情報解析技術により、既に千を優に超える微生物の全ゲノム情報が明らかになっている。21 世紀の応用微生物学

の進むひとつの道は、この膨大な微生物種の持つ遺伝情報から物質生産に有用なものを抽出し、それらを生物の生存にとって最低必要な遺伝情報のみを持つ微生物 (ミニマムゲノムファクトリー・MGF または人工合成微生物・SM) に導入することによって有用物質の効率的生産を図ることであろう。

一方で、自然界に生きる微生物の大部分は、自分ひとりまたは自分と同じ仲間だけで生きているわけではない。多くの種類の微生物が、食べ物を巡って競争しあったり、協力し合ったり、時として無視しあったりして、周囲と何らかの関係を持ちながら生きている。生育の速い微生物では、条件を整えばあっという間に数的に社会の中心を占めるといった状況もあり得る。一方で、生育は遅いが社会の中でひっそりと生きながらえている微生物もあり、最初から他の微生物が生き延びられないようなニッチな環境で生き続けている微生物もいる。

自然界がこのような多種多様な微生物から成り立っている以上、少なくとも自然環境を対象とした研究では、そのような微生物社会を研究対象とする必要がある。これが筆者がこの 10 年来提唱している社会微生物学 (Sociomicrobiology) である。土壌微生物、水棲微生物、腸内微生物、



From Pure Culture to Mixed Culture – Future Aspects of Applied Microbiology –
Yasuo IGARASHI

1970 年 東京大学大学院農学系研究科農芸化学専攻博士課程修了
現在 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

連絡先：〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1
E-mail aigara@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

2012 年 8 月 3 日 受理

† Terada, A. 平成 23, 24 年度化工誌編集委員 (11 号特集主査)
東京農工大学大学院工学研究院応用化学部門
Miyayama, K. 同上 東京工業大学大学院生命理工学研究科

さらには完全に自然環境とはいえないが、排水処理槽中の微生物、コンポスト化に関わる微生物、さらには伝統的発酵食品に関わる微生物の研究などが例として挙げられる。筆者は、これらの微生物社会を理解すること、そして可能であればこれを制御して望ましい働きを効率的にさせることが、21世紀の応用微生物学の向かう一つの方向であると考える。また微生物社会の理解は、自然環境の理解や物質循環の効率化に留まることなく、例えば発酵食品の品質や安全性の向上、さらには複数の微生物の持つ機能を同時に有効に働かせる、または複数の微生物間の相互作用を用いた新しい発酵生産にも繋がる微生物利用技術と考えている。将来展望としては、21世紀の応用微生物学は、種々の遺伝情報を一匹の微生物(MGFやSM)に集めて徹底して効率的な機能発現を極める道と、複数の微生物からなる微生物社会を理解、さらに制御することによって安定的かつ効率的な機能発現を図る道の2方向があり得ると考えている¹⁾。

上記2通りの手法が、20世紀後半に大きく発展した核酸の解析技術に依存していることは偶然ではないが、筆者は現在そのどちらもが大きな壁に当たっていると認識している。一匹のスーパー微生物を造るほうは、今回の特集から離れるので詳しくは述べないが、生育必須遺伝子とは何かという問題がある。生育必須遺伝子は培養条件及び培地成分で大きく異なるはずであり、一方、発酵生産のためには特別な培地・培養条件が要求される場合が多い。一方、微生物の集団機能の利用または微生物相互作用・干渉作用の利用については、近年のDNA解析手法、特にDGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)、T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)、メタゲノムによる16S-rRNA遺伝子解析などによる集団を構成する微生物種の同定、定量PCR(Polymerase Chain Reaction)やFISH(Fluorescence *in situ* Hybridization)による微生物数の定量、FISHによる固体上や中における存在位置の確認、SIP(Stable Isotope Probing)などによる集団中の働きの解明などができるようになってきた²⁾。すなわち、微生物の社会というものがどんな微生物から成り立ち、誰が何をしているらしく、誰と誰がどんな関係で、誰がどこに居を構えている、などと言った「微生物社会の構造」については近年急速に解析可能となっている。またメタゲノム解析によって、ある微生物集団に少なくとも潜在的にはどのような機能が備わっているかも推定できるようになってきた。

いくつか例を見てみよう。有機性廃棄物のコンポスト化(堆肥化)は、農畜産廃棄物の再利用・循環システムとして古くから使われてきた技術である。現在では、その装置も一部近代化・大型化・高速化され、比較的安定な製品が造られるようになっている。代表的なプラントでは、全長約100 m、入り口から投入した有機廃棄物を攪拌を加えなが

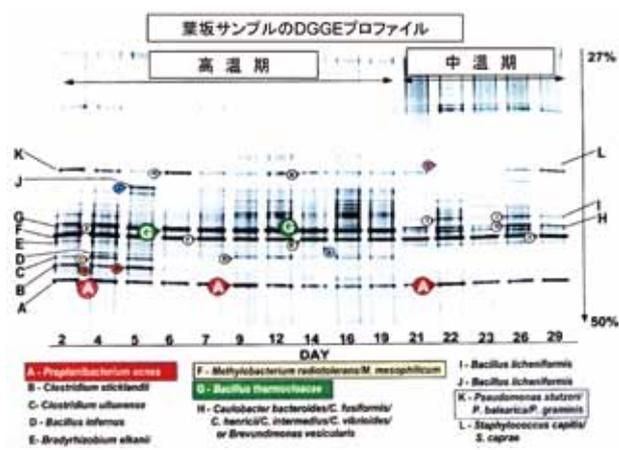


図1 コンポストプラントのDGGE解析の例

ら一日4 m程度前方に移動させつつ、途中、下部からの通気により醗酵を早めている。なお、このシステムでは、出口から出てきた堆肥の一部(廃棄物投入量の20~30%程度)を入りに戻す(戻し堆肥)という方法をとっている。

図1は、この装置の最初から最後までを4 m(一日分)毎にサンプリングし、そこに存在する微生物(バクテリア)をDGGEで解析したものである³⁾。初期に外部から持ち込まれたもの、中期の醗酵温度の高い時期に現れるもの、後期の安定期に多く見られるものなど、DGGEで検出できるバンドだけでも50本を超えている。その中で、最初から最後まで常時存在していると考えられる2株を単離しその性質を調べたが、特別な機能によって生き残っているとは考えられなかった⁴⁾。別のコンポスト化装置の実験でも、最優先種には特別な機能は見つからず、ただコンポスト化と同様な条件である弱アルカリ性、塩濃度、高温に耐性を示した⁵⁾。すなわち、コンポスト化の優先種は、何か特別な能力を有している訳ではなく、与えられた環境条件で生き延びるといった耐性が重要なのかも知れない。

しかし、このような手法によって微生物社会の構造が必ずしも完全に理解されるわけではない。現実の微生物社会の多くは堆肥化で見られるように多くの微生物種からなり、その全てが検出されている訳ではない。また各種微生物の菌数の変動も多く、全体の構造を理解することは困難である。このような場合、数理モデル化またはモデル生態系(人工生態系)の構築という手法が用いられる。数理モデルについては、本特集中で別に議論されるので、ここではモデル生態系の構築と解析について述べる。

筆者らは、無処理の稲わらを効率的に分解する安定な微生物集団を構築した⁶⁾。このままでも人工生態系と言えなくもないが、さらにこの集団から主要な微生物を単離し^{7,8)}、その単離菌の組み合わせによって、5種類の微生物からなる人工生態系(モデル生態系)を構築した。ただしこのモデル系は当初の人工生態系ほど安定ではない。このモデル系から

1種類ずつ微生物種を除いた集団を培養しその挙動を追うことにより（ノックアウト実験、図2）、稲ワラ分解における各微生物の役割および相互関係を解析した。その結果が図3である⁹⁾。

上述の例からもわかるように、今の微生物学では、まだ集団中の微生物を一匹、一匹単離してその性質を調べるといった古典的ともいえる解析が強力な手段となっている。しかし集団中の微生物のあるものは培養が極めて困難であり（難培養微生物）、また集団中の生菌数の極めて少ないものの単離も容易ではない場合がある。このような場合、DGGEなどにより目的微生物が多く存在するタイミングを知ること、FISHやその他染色法により目的微生物の存在場所や細胞形態を知る方法、さらにそれらの情報をもとにフローサイトメトリーなどで物理的に単離する方法などが試みられているが、まだいずれも完全ではなく、存在は明らかなのに単離することのできていない微生物も多い。今後の課題のひとつであろう。

おわりに

最後に、このような微生物集団による機能はどのようにして制御されまた効率化され得るのであろう。現在のところ、微生物集団の構造と機能を制御する方法は殆どが培養法に関わるものであって、積極的に微生物機能を制御するものではない。前述の堆肥化の例では、微生物叢の安定化に最も寄与しているのは「戻し堆肥」という作業であり、効率化については、途中の工程における通気攪拌や水分条件のコントロールなどに頼っている。

目的とする微生物集団の機能が高分子または難分解物質の分解である場合、その第一段階の物質分解に携わる微生物を添加することが効率化に繋がる場合が多い。安定した生態系では第一段階の分解活性より次段階以降の活性が高いことが一般的と考えられるからである。セルロース分解メタン発酵において、第一段階のセルロース分解菌を添加することによりメタン発生量の増加を試みた例がある¹⁰⁾。

ただし、このような場合、添加した分解微生物の菌数はいずれまた元に戻ると考えられ、菌を継続的に添加しなければならない可能性が高い。

一方、メタン発酵のような嫌気醗酵においては、各微生物およびシステム全体の酸化還元バランスを保つために、微生物間で直接または間接的に電子をやり取りしていることが知られている。このような場合、発酵槽内または壁に電極を設置し、槽内に電子を供給するか引き抜くことにより、微生物集団の酸化還元活性を制御できることが知られている。メタン発酵槽内に電極を設置することにより、メタン発酵や水素醗酵を効率化させた例が報告されている^{11,12)}。

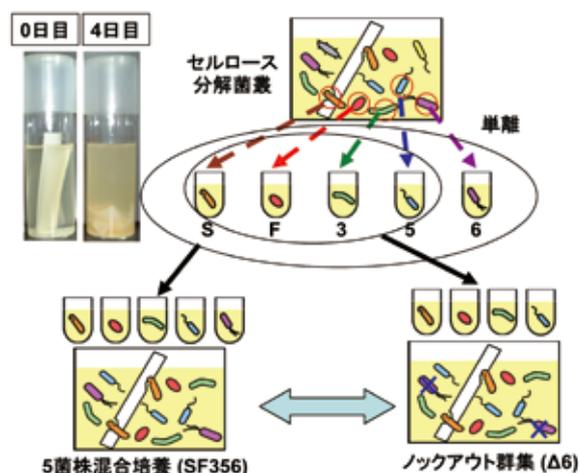


図2 セルロース分解微生物集団の再構成とノックアウト実験の概要

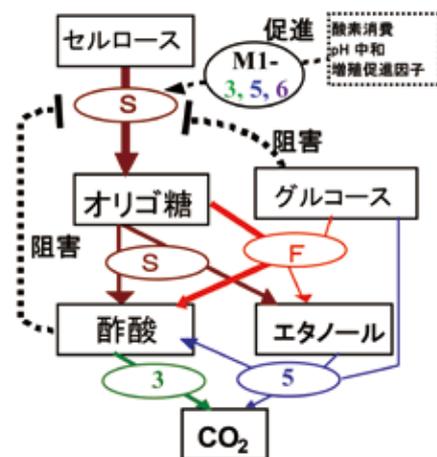


図3 セルロース分解微生物集団の種間相関関係

ただし、この方法は好気培養には適用が困難であり、その場合、生理活性物質（クォラムセンシング物質、抗生物質等）の添加による制御が試みられている。

以上、本稿をまとめると、解析技術の進歩により自然界の微生物集団の構成メンバーはかなり覗けるようになってきたが、その構造と機能の関係はようやく本格的に研究が始まり、さらにその機能の制御・効率化についてはやっとな手が付けられ始めたというのが実情であり、今後、環境技術としてだけでなく、モノづくりの面からも、微生物集団の制御技術の発展が大いに期待される場所である。

引用文献

- 1) 原島俊, 2011年度タイバイオテクノロジー学会基調講演より, 2011年10月27日, バンコク.
- 2) 倉根隆一郎編: 複合微生物系の研究開発と産業応用, シーエムシー出版(2011)
- 3) Pedro, M. S. et al. : *J. Biosci. Bioeng.*, **91** (2), 159-165 (2001)
- 4) Pedro, M. S. et al. : *J. Biosci. Bioeng.*, **95** (4), 368-373 (2003)
- 5) Nakamura, K. et al. : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 1063-1069 (2004)
- 6) Haruta, S. et al. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59** (4-5), 529-534 (2002)
- 7) Kato, S. et al. : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **54**, 2043-2047 (2004)
- 8) Kato, S. et al. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **71** (11), 7099-7106 (2005)
- 9) Kato, S. et al. : *Microb. Ecol.*, **56** (3), 403-411 (2008)
- 10) Narisawa, N. et al. : *J. Biosci. Bioeng.*, **104** (5), 432-434 (2007)
- 11) Sasaki, K. et al. : *Bioresour. Technol.*, **101**, 3415-3422 (2010)
- 12) Sasaki, K. et al. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **89**, 449-455 (2011)