

環境中の細菌群集を知る新技術と課題

田代 幸寛

地球には、多種多様の生物が存在している。その中でも細菌は人類が地球に誕生するかなり前（38～39億年前）から存在し、活発に活動していたことが認められている。また、あらゆる環境に生息する細菌はそれぞれの代謝を利用して、種々の物質循環（窒素、硫黄、酸素、炭素など）や物質分解、浄化などの役割を担う。したがって、ある環境に生息する細菌群集構造（細菌相、細菌叢とも呼ばれる）は生態系の変化や機構を調べる上で重要な生物学的因子の一つである。

分子生物学が発展する以前の手法（1980年代まで）と言えば、プレート上に形成したコロニーの同定・性状解析を行う培養法が主であった。ところが、1990年代以降の細菌群集構造解析には、分子生物学的手法が主流となり、特に16S rRNA 遺伝子をターゲットとするさまざまな方法が開発・利用されている。その理由として、①全細菌が16S rRNA 遺伝子を保有していること、②塩基配列解読に適した長さ（約1500 bp）であること、③遺伝子配列の置換速度（進化速度）が遅く、系統分類に利用できること、④ユニバーサルプライマーが開発されていること、⑤データベースが構築されていること、などが挙げられる¹⁾。また、培養法では、存在する細菌のわずか1～10%程度しか分離できない（コロニーを形成しない）ことから、分子生物学的手法が現在の細菌群集構造解析研究に欠かせない手法となっている。

これまでに、分子生物学的手法を用いたさまざまな解析技術が開発されている²⁾。細菌群集構造の定性解析を目的とした研究には、古くから、クローンライブラリー法、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（DGGE法）などが使われてきた。クローンライブラリー法では、16S rRNA 遺伝子の全長を解読でき、種レベルの決定が可能であるが、一つの環境中から100クローンを解析するだけでも多大な労力とコストがかかる。一方、DGGE法では、各環境中の細菌群集構造を視覚的に捉えられることが最大の特長であるが、得られる配列が200 bp程度であるので、データベースで相同性検索しても“Uncultured bacterium”や“Unclassified bacterium”の情報しか得られないことがしばしばある。

近年では、いわゆる次世代シーケンサーを活用する解析技術が注目されている。ピロシーケンス法（Pyrosequencing）はロシュ社製に適用されている。2013年1月時点で『Pyrosequencing』をキーワードとして検索ツール“Scopus”で検索すると、2009年334報、2010年515報、2011年774報、2012年1182報と右肩上がりとなっている（注：それらには、ゲノム解析、メ

タゲノム解析などの幅広い分野を含む）。ピロシーケンス法では、1度のランで約100万リード数、1リード長あたり約600 bpが得られ、ピロシーケンス法を適用しない他社製と比較すると、リード数が劣るものの、リード長は圧倒している²⁾。さらに、プライマーの上流部分に各環境サンプルを区別する10 bp程度のタグ（バーコード）を付与することにより、一度のランで複数の環境サンプルを解析することが可能となる³⁾。現在までに、さまざまな環境における細菌群集構造がピロシーケンス法により解析された。たとえば森林土壌⁴⁾、湖沼⁵⁾、コンポストプロセス⁶⁾、糠床⁷⁾などの生態・環境・バイオプロセス・食品が対象となっており、今後ますます拡大していくだろう。

また、分子生物学的手法を用いた解析技術の中で、PCRを介する方法（クローンライブラリー法、DGGE法、ピロシーケンス法は含まれる）では、キメラDNA配列が形成されることが問題となっている¹⁾。多くのジャーナルでは、論文発表に遺伝子配列の登録とAccession Numberの記述を義務付けられている。すなわち、ますます増加するキメラDNA配列がデータベースに蓄積され、他の研究者が相同性検索をした場合にキメラDNA配列とヒットする危険性も考えられる。近年、多数の塩基配列をターゲットとした場合にも誰でも容易かつ無料で利用できるキメラチェック用ソフトBlack Box Chimera Check (B2C2) がGontcharovaらにより公開されている⁸⁾。ところが、次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造解析研究に関する論文には、キメラチェックを行っていない場合もある。

上記のように、次世代シーケンサーを用いた細菌群集構造解析では、1990年代では考えられなかった膨大な遺伝子配列を1ランで得ることができる一方で、膨大な遺伝子配列の解析手法についてはいまだ改良の余地があるといえる。今後、改良を重ねながら、生物工学分野を含む広範な分野で活用されることが期待できる。

- 1) 中村, 関口: 微生物相解析技術, 米田出版 (2009).
- 2) http://catalog.takara-bio.co.jp/jutaku/basic_info.asp?unitid=U100005162
- 3) Nakayama, J.: *Biosci. Microflora*, **29**, 83 (2010).
- 4) Kuffner, M. et al.: *FEMS Microbiol. Ecol.*, **82**, 551 (2012).
- 5) Edberg, F. et al.: *Microb. Ecol.*, **64**, 870 (2012).
- 6) Bidy, K. et al.: *Water Res.*, **44**, 4252 (2010).
- 7) Sakamoto, N.: *Int. J. Food Microbiol.*, **144**, 352 (2011).
- 8) Gontcharova, V.: *Open Microbiol. J.*, **4**, 47 (2010).