

大水深淡水湖のユニークな微生物生態系

岡崎友輔*

地球上には全宇宙の星の数の100万倍を上回る 10^{30} オーダーの細菌が生息すると推測されており(Whitman et al., 1998), 地球上で植物に次いで多い12.8%の生物量を占めると見積もられている(Bar-On et al., 2018). 水圏においては, 生物量の9割を微生物が占めると推定され(Cavicchioli et al., 2019), 一次生産の最大50%が溶存態有機物として細菌に消費されると考えられている(Carlson et al., 2011). 湖においても, 栄養条件によるものの, 湖水1 mLあたり 10^5 - 10^7 個の細菌と, その10倍程度のウイルス粒子が存在する. 例えば琵琶湖沖の水コップ1杯の中には, 日本の人口を超える細菌と, 世界の人口に匹敵するウイルス粒子が存在する. その生き様の解明は, 生態系や物質循環の基盤を理解するうえで不可欠である.

微生物生態学において長年の障壁となっていたのが, 環境中の微生物の大多数が培養困難であるという事実である. 例えば淡水環境では平均で全細菌の89%が未培養系統で占められると推定されている(Lloyd et al., 2018). この障壁を打開したのが, 近年の分子生物学およびDNAシーケンス解析技術の飛躍である. すなわち, Fluorescent in situ hybridization (FISH) 法や16S rRNA遺伝子アンプリコンシーケンス解析といった, 環境微生物の多様性を培養を経ることなく直接的に観測する手法が確立された. これにより, 環境中で大多数を占める未培養細菌の多様性が紐解かれ, 微生物の多様性をとりまく我々の理解は大転換を迎えている.

こうした状況を背景に, 湖沼においても微生物多様性に関する知見の蓄積が進んでいる. 湖沼は, その成因や気候, 栄養条件等に応じ, 多様な物理

化学的性質を有するが, 淡水湖の細菌群集は世界共通の系統で占められることが分かってきた. 例えば, AlphaproteobacteriaのLD12系統およびActinobacteriaのacI-B1系統は世界中の淡水湖の沖合表層の比較的貧栄養の環境で優占し, FISH法による定量で全細菌のそれぞれ20%(Salcher et al., 2011)および30%(Neuenschwander et al., 2018)を超える現存量が報告されている. しかし, これらの知見は主に調査が容易な湖沼の表水層からの報告にとどまっており, 水温躍層以下の無光・低温の深水層の微生物多様性に関してはほとんど研究が無く, 全体像は明らかになっていない. 海洋では, 表層と深層で異なる細菌系統の優占が報告されており(Yilmaz et al., 2016), 湖沼においても深水層にユニークな細菌系統群が存在する可能性がある. 琵琶湖をはじめとする, 水深50mを超えるような大水深の湖においては, 深水層は容積の過半を占め, 有機物や栄養塩の貯蔵やリサイクルの場として機能する. そこに生息する微生物の多様性や生態の解明は, 湖全体の生態系や物質循環を理解するうえで重要な研究課題である.

火山や地殻の活動が活発な日本は, 構造湖・カルデラ湖・堰き止め湖に代表される大水深の淡水湖に恵まれている. 筆者らは, 琵琶湖をはじめとする国内の大水深淡水湖の深水層の横断的調査を行い(図1), その微生物多様性の解明を試みてきた. これまでの研究で, 淡水湖の深水層には, 表水層とは系統的に大きく異なるユニークな細菌群集が生息することを明らかになってきた. その中でも特にChloroflexi門のCL500-11系統は, 深水層における最優占系統として検出された(Okazaki et al., 2013, 2017). 本系統は2001年に

*京都大学化学研究所附属バイオインフォマティクスセンター助教

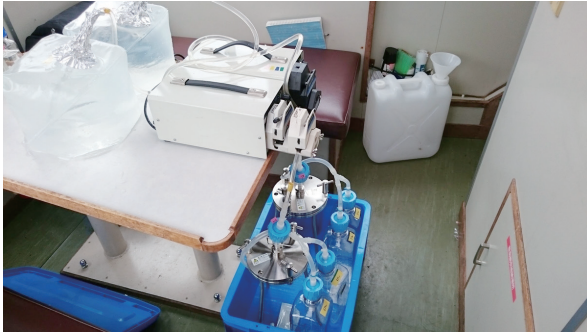


図1. 琵琶湖沖で採水した深水層の湖水を船上で濾過している様子。同一流路内で200 μm 、5 μm 、0.2 μm のフィルターにて順次湖水を濾過することで、複数のサイズ画分の微生物サンプルを同時に採集できる。

アメリカの Crater Lake の水深 500 m より得られた細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列として初めて報告されたものであるが (Urbach et al., 2001), その後の筆者らの調査により, 国内のみならず, アルプスの氷河湖やアメリカの五大湖をはじめとする, 世界中の大水深淡水湖で優占することが明らかとなった (Okazaki et al., 2018). CL500-11 は深水層の全細菌数の 25% 以上を占めることもあり, その比較的大型の細胞 (図2) や, 湖に占める深水層の容積の大きさも相まって, 多くの大水深湖で最も生物量が多い細菌であると考えられている。

「誰がいるのか?」が明らかになれば, 次に明らかにすべきは「何をしているのか?」である。細菌の生理や生態を理解するためには, 単離培養

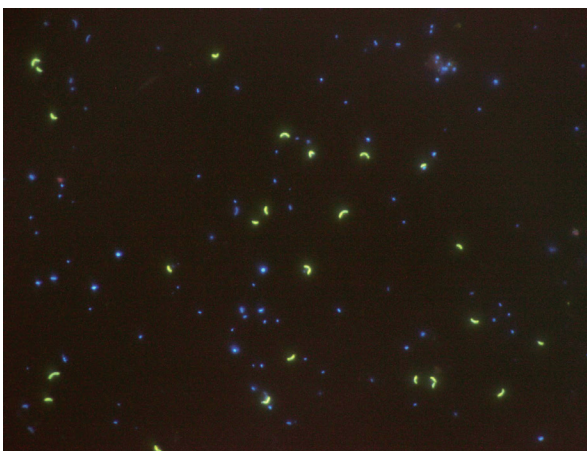


図2. 琵琶湖深水層の細菌の蛍光顕微鏡写真。黄色いカーブ型の細胞が FISH 法で染色された CL500-11 細菌。青色に染色されている他の細菌よりも細胞サイズが一回り大きい。

株を用いた実験的検証が望まれるが, 多くの環境微生物と同様, 深水層で優占する細菌系統は難培養性であり, 最優占系統である CL500-11 についても未だ単離培養は報告されていない。近年, 培養非依存的に細菌の生理・生態に迫るアプローチとして, ショットガンメタゲノム解析が微生物生態学で広く用いられるようになった。これは, ハイスループットシーケンサーを用いて, 環境中の細菌群集の DNA をまるごと網羅的にシーケンスし, ゲノムアセンブリやビニングといった生物情報学的な解析を経て, サンプル中の各細菌の全ゲノム情報を構築する手法である。筆者らは本手法を琵琶湖沖の細菌群集から得られた DNA サンプルに用いることで, 琵琶湖に生息する主要な 57 の細菌系統の全ゲノム情報を構築した (Okazaki et al., 2019)。これらには上述した深水層特異的な細菌系統も含まれ, CL500-11 のゲノムの解析からは他の細菌の死細胞等に由来する有機物を資源としている可能性が示唆された。一方で, 光の届かない深水層に生息するにも関わらず光受容に用いられるロドプシンの遺伝子を有するなど, ゲノム情報から新たに炙り出された謎もあった。現在, 引き続き CL500-11 の単離培養株の確立に向けた試行錯誤を行いながら, 並行して環境中の微生物群集の RNA の網羅的シーケンス (メタトランスクリプトーム解析) を行い, 「いつ, どこで, どの遺伝子が, どのくらい発現しているのか?」を明らかにすることで, これらの課題へのアプローチを進めている。

ここまでは湖沼に生息する細菌に焦点を当てた。一方で細菌はウイルス (ファージ) の感染を受けており, 1日あたり細菌の生物量の 20% 程度がウイルス感染によって失われていると推定されている (Suttle, 2007)。すなわち, 微生物生態系の機能を理解するためには, ウイルスの多様性や生態の理解も不可欠である。上述したメタゲノム解析はウイルスにも適用可能であり, 環境中のウイルスのゲノムを培養非依存的に決定することが可能である。しかし大水深淡水湖において同手法を用

いてウイルスゲノム多様性を網羅的に明らかにした研究は存在しなかった。そこで筆者らは細菌同様に、琵琶湖沖のウイルス群集を対象としたメタゲノム解析を実施した (Okazaki et al., 2019)。その結果 183 個の完全長ウイルスゲノムが得られ、そのほぼ全て (179 個) が単離培養された系統との相同性を示さない、未培養ウイルスのゲノムであった。また細菌同様に、それに感染するウイルスも、表水層と深水層で群集組成が大きく異なることが示された。ゲノム情報に基づきこれらのウイルスの宿主を予測したところ、Actinobacteriaをはじめとする、淡水湖沼において優占的な系統に感染するウイルスの存在が明らかとなった。さらにこれらのウイルスゲノムの遺伝子機能解析により、宿主の代謝改変に資すると考えられる遺伝子 (補助代謝遺伝子) を有するウイルスを多数特定し、特に同化的硫黄還元に関する遺伝子が海洋と比較して多く見つかった。湖沼の優占細菌の多くがこの遺伝子を欠くことが知られており、海洋と比較し硫黄分が少ない淡水環境ではウイルス由来の遺伝子が宿主の硫黄代謝において重要な機能を果たしている可能性が示唆された。

以上をまとめると、琵琶湖をフィールドとした網羅的・培養非依存的な環境ゲノム解析によって、深水層では表水層とは異なる独自の微生物生態系が駆動していることを明らかにし、その中で重要な機能を担うとみられる細菌・ウイルス系統群を特定した。さらに現在、同様の解析を他の湖へと展開し、湖横断的な比較が可能な「湖沼微生物環境ゲノム情報基盤」の整備を進めている。湖は互いに物理的に隔離されており、それぞれが独自かつ独立した生態系を擁している。すなわち、異なる湖で網羅的環境ゲノム解析を行うことで、それぞれの湖の微生物生態系を理解できるのみならず、その結果を湖間比較することで、各湖を生態系の control や replicate とみなし、仮説の構築や検証を効率的に行える利点がある。筆者はこうした展望のもと、湖沼微生物生態学のみならず、それを取りまく微生物学・生態学・進化学・ゲノミクス

に関連する多様な研究課題に答える情報基盤の構築を目指して研究に取り組んでいる。

環境ゲノム解析技術は、その研究対象の小ささが故に技術的・手法的な制約に苦しめられてきた微生物生態学の弱みを強みに変えた。すなわち、研究対象が小さいからこそ、生態系を構成する各系統の全ゲノムを丸ごとデジタル情報化し、網羅的・横断的な解析が可能となった。今後もシーケンズコストのさらなる低減や、ロングリードシーケンサーをはじめとする新技術の台頭を背景に、環境ゲノム解析を基盤とした微生物生態学の勢いは続くと考えられ、動植物を含む生態学・進化学全般をリードする研究分野としての飛躍が期待される。その一方で、莫大なゲノム・遺伝子情報がいとも簡単に取得できるようになったことで、「無限に存在するデータ、未知系統、未知遺伝子にどう向き合うか?」が新たな課題として炙り出されている。すなわち、大規模データを活かす多様な視点と鋭い切り口の重要性が高まっている。こうした状況を背景に、微生物生態学は、多様な視点を持つ多様な分野の研究者と連携した、学際的な研究アプローチを推進すべき時を迎えている。それは地球化学との連携においても例外ではない。これまでは地球化学で得られた知見に対し、それに対応する微生物生態系の機能はブラックボックスとして理解せざるをえない点が多かったが、今や微生物機能を系統や遺伝子のレベルで高解像度に理解することが可能である。すなわち、微生物生態学と地球化学の間のギャップを埋め、両者を繋ぐ研究が実現可能になりつつある。筆者自身も、微生物生態学を基盤としながら、地球化学分野との情報共有や共同研究を積極的に進め、微生物生態学の可能性を最大限に引き出す方法を模索していきたいと考えている。

引用文献

Bar-On, Y.M., Phillips, R., and Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115,

6506–6511.

- Carlson, C.A., Hansell, D.A., Tamburini, C. (2011) Microbial Carbon Pump in the Ocean; DOC persistence and its fate after export within the ocean interior; American Association for the Advancement of Science. pp. 57–59
- Cavicchioli, R., Ripple, W.J., Timmis, K.N., Azam, F., Bakken, L.R., Baylis, M., Behrenfeld, M.J., Boetius, A., Boyd, P.W., Classen, A.T., et al. (2019). Scientists' warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nature Reviews Microbiology* *17*, 569–586.
- Lloyd, K.G., Steen, A.D., Ladau, J., Yin, J., and Crosby, L. (2018). Phylogenetically Novel Uncultured Microbial Cells Dominate Earth Microbiomes. *MSystems* *3*, e00055-18.
- Neuenschwander, S.M., Ghai, R., Pernthaler, J., and Salcher, M.M. (2018). Microdiversification in genome-streamlined ubiquitous freshwater Actinobacteria. *The ISME Journal* *12*, 185–198.
- Okazaki, Y., Hodoki, Y., and Nakano, S.I. (2013). Seasonal dominance of CL500-11 bacterioplankton (phylum Chloroflexi) in the oxygenated hypolimnion of Lake Biwa, Japan. *FEMS Microbiology Ecology* *83*, 82–92.
- Okazaki, Y., Fujinaga, S., Tanaka, A., Kohzu, A., Oyagi, H., and Nakano, S. (2017). Ubiquity and quantitative significance of bacterioplankton lineages inhabiting the oxygenated hypolimnion of deep freshwater lakes. *The ISME Journal* *11*, 2279–2293.
- Okazaki, Y., Salcher, M.M., Callieri, C., and Nakano, S. (2018). The Broad Habitat Spectrum of the CL500-11 Lineage (Phylum Chloroflexi), a Dominant Bacterioplankton in Oxygenated Hypolimnia of Deep Freshwater Lakes. *Frontiers in Microbiology* *9*, 2891.
- Okazaki, Y., Nishimura, Y., Yoshida, T., Ogata, H., and Nakano, S. (2019). Genome - resolved viral and cellular metagenomes revealed potential key virus-host interactions in a deep freshwater lake. *Environmental Microbiology* *21*, 4740–4754.
- Salcher, M.M., Pernthaler, J., and Posch, T. (2011). Seasonal bloom dynamics and ecophysiology of the freshwater sister clade of SAR11 bacteria “that rule the waves” (LD12). *The ISME Journal* *5*, 1242–1252.
- Suttle, C.A. (2007). Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nature Reviews Microbiology* *5*, 801–812.
- Urbach, E., Vergin, K.L., Young, L., Morse, A., Larson, G.L., and Giovannoni, S.J. (2001). Unusual bacterioplankton community structure in ultra-oligotrophic Crater Lake. *Limnology and Oceanography* *46*, 557–572.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 6578–6583.
- Yilmaz, P., Yarza, P., Rapp, J.Z., and Glöckner, F.O. (2016). Expanding the World of Marine Bacterial and Archaeal Clades. *Frontiers in Microbiology* *6*, 1–29.