

水圏微生物研究フォーラム 2016

(8月9日・10日@東京大学大気海洋研究所)

パネルディスカッション「水圏微生物研究を支える方法論の古今東西」

8月10日 11:20-12:30

司会：濱崎恒二（東京大学大気海洋研究所 准教授）

パネラー：

江口充（近畿大学農学部 教授）

緒方博之（京都大学化学研究所 教授）

桑田晃（水産研究・教育機構 グループ長）

木暮一啓（東京大学大気海洋研究所 教授）

高見英人（海洋研究開発機構 上席研究員）

中野伸一（京都大学生態学研究センター 教授）

横川太一（海洋研究開発機構 研究員）

吉澤晋（東京大学大気海洋研究所 特任研究員）

吉田天士（京都大学大学院農学研究科 准教授）

ダイジェスト

濱崎：本日のディスカッションでは、「水圏微生物研究を支える方法論の古今東西」と題して、これまでにブレークスルーをもたらした方法は？現状における課題（限界）は？これからどんな方向に進むのか？大きく飛躍しそうな方法論はあるのか？といった疑問を踏まえながら進めて行きたいと考えています。

【ブレークスルーをもたらした方法論について】

濱崎：まず、これまでにブレークスルーをもたらした方法についていかがでしょう。

木暮：やはり70年代80年代に顕微鏡計数法が出てきて、数の把握ができるようになったことや、ロイシン法、チミジン法による生産速度測定法の登場が、その後の微生物ループの概念につながるなどして、大きな影響を与えた。

中野：湖沼の研究についても同様にアクリジンオレンジ染色法は画期的だった。

江口：木暮法（DVC法）も外せないだろう。活性のあるものをいかに数えるかは重要で、その解決法をもたらした。

濱崎：活性という意味では、メタゲノム解析のように機能と結びつけて考えられるようになって来た点についてはいかがでしょう。

高見：実は、NGSが登場した初期、特に454シーケンサーでは100bp程度しか解析できなかったため、メタゲノムよりむしろメタトランスクリプトーム解析の論文が多かった印象がある。しかし、ゲノムのリファレンスが無い状況でトランスクリプトーム解析を行っても何を見ているのかわからないという課題があった。そうしたこともあり、まずはメタゲノム解析で機能ポテンシャルあるいはベースとなるゲノム情報を得ておいた上で、トランスクリプト

ーム解析に進むことが重要だろう。ある特定の菌だけでなく、群集としてコンソーシアムを形成して物質代謝を行っているという視点が重要だ。

緒方：全く同感だ。メタゲノム解析に関しては、生物間の相互作用を見ることが今後重要だろう。例えば、メタゲノム解析のデータをもとにした共起ネットワーク解析などによる生態系全体の相互関係を見るなど。そのためにはやはりサンプル数が必要

【サンプリングについて】

濱崎：サンプル数に関して言えば、現在は多くのサンプルの配列情報を得ることは難しくありませんが、むしろサンプリングの労力に限界があり、例えば自動抽出装置や自動採水装置、現場濾過装置といったサンプリング技術に関する改善の余地があると思うのですがいかがでしょうか？

横川：船でサンプルを集めることについては、限られた乗船人数を考えれば、現状のサンプル数でほぼ限界にきています。現状ではまさに家内手工業的な方法でサンプリングしていますが、こうした作業を自動化することが必要でしょう。

濱崎：フローカムの利用など、植物プランクトンや動物プランクトンでは、画像撮影による自動識別技術が進んでいるように思いますが、いかがでしょうか。

桑田：確かに、いくつか開発されているが、フローカムに関して言えばそれほど簡単ではないようで、信頼性を確保するには最終的には人が目で見て識別することになり、期待したほど省力化は進んでいないようです。しかし、将来的には識別技術が進歩すると期待されるので、画像をアーカイブしておくことは意味があるし重要だと考えます。

省力化という点では、きちんとした戦略を持って効率よくサンプリングすることが非常に重要です。例えば、限られたリソースの中で適当な海域やサンプリングポイントを選ぶ必要があります。日本には、気象庁や各地の水産試験場が古くから観測して来た観測ラインや観測点があり、そうした点を生かすのも良いかもしれません。

吉澤：長期観測の結果、その観測点が適当ではないことが明らかとなったとして、変更することができるのでしょうか？

桑田：実際には非常に難しいでしょうね。

江口：水産養殖場などをフィールドにする場合には、漁業者の了解のもとに実施する必要があります。そうした点で調査の頻度やタイミングなどに制約が生じることがありますので、日頃のコミュニケーションも重要です。

横川：基本的には多くの人々が協同して、それぞれで役割を分担しながらやる必要があると思います。

吉田：大型観測船などを使って大掛かりにやらなくても、私たちが大阪湾でやっているように、もっと簡単にやるだけでも十分に新しい知見が得られるのではないのでしょうか。

高見：全国の臨海実習施設などと協力してサンプルを集めるといったやり方もありますね。

緒方：Tara Oceans Project の場合は、最初から巨大なプロジェクトで予算がついていたわけではなくて、コアメンバーと全体計画のもとに、参加した科学者がそれぞれに個別の予算を獲得することにより実施した。そうしたやり方もあります。

高見：Earth Microbiome プロジェクトでは、最初は1億円程度の予算だったが、結局200億円の予算を獲得するに至りました。

【研究のゴールについて】

濱崎：例えば、日本周辺海域の微生物群集をウイルスから原生生物までのメタゲノム情報を完全カタログ化するといった場合に、多くの人の協力を得るためには、魅力的な研究課題やゴールの設定が必要ですが、メタゲノム解析は全体を網羅的に見ることに特徴があり、解析してみて初めて何が面白いかがわかるというアプローチのため、最初から魅力的なゴールを設定することが難しいように思います。その点はどうでしょう。

緒方：炭素循環や食料生産、資源などマクロな現象と微生物との関わりを示すことが重要で、社会に対するわかりやすい説明にもつながります。

中野：生物多様性を把握しようとする国際的な動きの中で微生物は取り残されています。こうした動きに積極的にコミットして行って、そうした流れの中で、微生物多様性の価値を示すことができれば良いと考えています。

高見：微生物研究のゴールとして大きな成功を納めつつあるのは、腸内細菌研究の分野でしょう。人の健康や寿命と密接に関わっていることが明らかとなってきた、非常な盛り上がりを見せています。

濱崎：そうすると、まずは環境微生物の重要性をアピールできるような証拠を示せるパイロットプロジェクトから初めて、そこから大規模な展開を模索するというアプローチが良さそうですね。

濱崎：魚の腸内細菌についてはいかがでしょう？

江口：実際にマグロの養殖に役に立つことが示せればそれは歓迎されるでしょう。

濱崎：ヒト腸内細菌のように、免疫系や神経系、行動に影響を及ぼすということが魚でも実際にあるのでしょうか？

江口：魚とヒトでは免疫系も大分違うでしょうし何とも言えないですね。

【方法論の現状と課題について】

濱崎：研究の出口の話になりましたが、少し方法論にもどってみたいと思います。最初に細菌数の計数の話が出ましたが、計数法に関してその後の発展はあったのでしょうか。

横川：計数に関しては、その後フローサイトや画像解析などによる省力化が進みましたが、

基本的な方法は現在も変わっていません。

桑田：スペインのグループは、FISH法のプレパラートを作成した後に、顕微鏡にセットすれば自動で計数してくれるシステムを使っていますね。

濱崎：ウイルス計数についても、直接計数法がありますが、それについてはいかがでしょう。

横川：そうですね。少なくとも細菌の計数値に関しては、今後の計数法の発展によって大きく変わることはないと思いますが、ウイルス計数に関しては現状の蛍光色素では二本鎖DNAウイルスのみを染色しているため、計数法の工夫次第ではさらに一桁くらい変化する可能性があるのではないかと考えています。また、巨大ウイルスは完全に細菌フラクシオンに入っていますので、計数できていません。

濱崎：原生生物についてはいかがでしょう？

中野：そうですね。蛍光顕微鏡計数に関しては大きく変わることはないと思います。別の観点から申し上げますと、やはり生物を扱う研究者として、染色した粒子として見るだけでなく、生き物として直接観察することは非常に重要だと考えていて、そこは大事にしたいです。

濱崎：フローアから何かありますでしょうか？

発言者未詳：バイオフィルムの研究に携わって来た者です。海底堆積物の微生物群集の中には休眠している細胞もあると思いますが、そうしたものはメタゲノム解析で識別できるのでしょうか？

高見：ただメタゲノムを見ただけでは識別できないと思います。もし、休眠期間のみ発現する遺伝子があれば、それをマーカーにして識別できるかもしれませんが。

濱崎：休眠細胞を染色剤などで選択的にソートした後に、それぞれのフラクシオンをメタゲノム解析するというアプローチをとれば、技術的には可能ではないかと思います。

高見：実際には堆積物サンプルから微生物細胞をソートするのは非常に難しいでしょう。

【今後の進展と方向性について】

濱崎：そろそろ時間なので終わりにしようかと思いますが、最後にパネラーのみなさまから今後の方法論の発展や方向性についてお考えをお聞かせいただければと思います。

木暮：個人的には、微生物の生理特にエネルギー代謝に興味があるので、生態系内のエネルギー流を明らかにして行きたい。現時点では方法論的に難しく、方法論的な進展の余地があると考えています。また、これまでの議論の中で色々な方向性が出ましたが、どこに独自性（ユニークさ）を見いだしてゆくのかを考えなければ、いつまでたっても欧米の研究に対して後塵を拝することになります。

濱崎：PRフラボバクテリアの保有数では世界一の吉澤さんとしては、独自性という観点あるいは培養という観点から何かコメントありませんか？

吉澤：独自性という点については、地の利を生かすことが一つかと考えます。例えば、温泉であるとか、日本にしかないユニークな生態系や海域を対象とするのが良いのではないのでしょうか。

桑田：藻類に関しては、日本人の器用さは上手に培養することにつながっていると思うので、培養（を強みとする）のは一つかもしれません。

濱崎：例えば FISH などのように固定してから染色するのではなく、生きたままマーキングする技術があれば、フローソーティングしてから培養というアプローチもありますね。

桑田：確かに、フランスのロスコフ研究所のグループなどは、藻類細胞をとにかくランダムにフローソーティングしてから培養するというのを日常的に行っているみたいです。

高見：他に注目すべき技術として、シングルセルでのゲノム解析技術があります。真核細胞ではかなりできるようになってきましたが、原核細胞ではシングルセルからゲノムをコンプリートした例は未だありません。どんなに増幅しても、コンプリートするには至らないようで、一つの問題は細胞を完全に壊してゲノム DNA を完全に取り出すのが難しいと聞いています。もし、そうした解析が可能になれば、コンソーシアの複数の細胞からそれぞれゲノムを解析して、代謝的にどんな協力関係にあるのかといった情報や、培養にはどんな基質が必要か、あるいはそもそも培養は不可能、といった情報が得られるかもしれません。

横川：実際の海水中の細菌数から考えると、多くの場合は希薄系なので、そうした環境でどうやって相互作用しうるのかを考える必要があります。

濱崎：コンソーシアを調べる前に、まずはそのコンソーシアがどんな形で作られているかを調べるということですね。

高見：マリンスノーなどの粒子が一つでしょう。

中野：植物プランクトンが増殖すると、その周辺に細菌や原生動物が集まってきていわゆるホットスポットを作ることが、以前から指摘されています。

濱崎：そうすると、自然の藻類ブルームを解析することも一つですが、人為的な栄養塩添加によって容器内でのブルームを観察するアプローチも有効ですね。

桑田：メソコズム実験でしょうか。

濱崎：はい、これまで様々なサイズのメソコズム実験が行われていると思いますが、今ある新しい技術を使って解析すれば、まだまだ新しい知見が得られるように思います。

このあたりで終了したいと思います。パネラーの皆様すばらしい講演とディスカッションをありがとうございました。フロアーのみなさま 2 日間参加いただきありがとうございました。次回のシンポジウム開催の折にはご協力よろしく申し上げます。

