



何から始めよう 微生物の同定 細菌・アーキア編

浜田 盛之・鈴木健一朗*

今も昔も微生物学者は研究の過程で、さまざまな微生物をいろいろな試料から分離している。微生物の分離の目的が分類学でなく生態学、生化学、あるいは生産物の利用であっても、結果をまとめ、論文や特許を書くには分離した微生物の同定をしなければならない。既知の微生物のどれにも当てはまらないことが結論づけられたら、それは少なくとも新種（あるいはそれ以上の新規分類群）として提案し、収まる場所を決めるべきである。面倒かもしれないが、研究材料の位置決めは研究の評価にもつながるので、ぜひ確実に行っていただきたい。微生物を新たに分離しない研究者であっても、自分が研究材料として用いている微生物を現在の分類体系に当てはめた場合に、入手したときと同じ名前ままでよいのか、さらに他の論文と比較するために近縁な微生物が何かを知っておく必要がある。微生物の分類・同定は、初めての方にとっては何から始めたらよいかわからないのではないと思われる。しかし、細菌・アーキアにとっては近年の分類学のパラダイムシフトともいえる遺伝子解析による体系化により、分類・同定がきわめて身近なものになり、研究の戦略にも大いに活用できるようになってきた。本編では、細菌とアーキアの分類・同定についてその手順と、結果の解釈について解説する。なお、ここでは放線菌も細菌に含めるものとする。

まず何をするか

未同定微生物の同定を試みる際、まず何から手を付けたらよいだろうか。前項のパラダイムシフトとはご存じの通り、16S rRNA 遺伝子の塩基配列による系統解析である。現在、細菌・アーキアはこれに基づいて分類体系が構築されているので、この塩基配列解析によって比較すべき分類群を一気に絞り込むことができるようになった。しかし、DNA 調製をする前にまず微生物を見てほしい。もっとも重要なのは、純粋培養物であるか、細菌・アーキアであるかを確認することで、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析を始める出発点となる。寒天平板培地上に生育するものはコロニーを観察し、さらに光学顕微鏡で細胞の形態を観察する。糸状菌や酵母でないことは、多くの場合細胞のサイズで見当がつく。16S rRNA 遺伝子が増幅されればよいなどと言わず、一度は検鏡しておいてほしい。できれば細胞形態の判定もかねてグラム染

色をすることを勧める。これで、「グラム陽性球菌」「グラム陰性桿菌」といった大雑把な特徴が押さえられる。

16S rRNA 遺伝子の塩基配列

いよいよ 16S rRNA 遺伝子の塩基配列決定である。まずは 16S rRNA 遺伝子を PCR 増幅させ、塩基配列を決定するのだが、詳しい実験手順は「微生物の分類・同定実験法」¹⁾や「放線菌の分類と同定」²⁾などを参考にさせていただきたい。ここではデータの解釈を中心に説明する。また、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析は、受託解析を行っている企業もあるので、塩基配列を解析する設備を有していない方は、解析を依頼することもできる。16S rRNA 遺伝子の場合、可変領域の多い上流の 500 bp 程度を解析するだけでも大まかな同定は可能であるが、より正確な同定を行うためには、ほぼ全長に近い 1400 bp 以上を解読することが望ましい。

既知の細菌・アーキアの 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank の国際塩基配列データベースに登録されている。同定したい株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列が得られたら、DDBJ の BLAST 検索³⁾を用いて検索をかければ、どの属種の細菌とどの程度の相同値を有しているかがすぐに分かる。しかしながらここで表示される学名は必ずしも正しいとは限らないことに注意が必要である。というのはデータベースへ配列を登録する際に、登録者がある程度自由に菌名を登録できるので、配列に対して適切な学名が付けられているとは限らないからである。また sp. の株、すなわち種レベルでは未同定の配列も数多くヒットしてくる点にも注意が必要である。あくまでも同定のために用いることができるのは、それぞれの既知種の基準株 (type strain) の配列との間の相同値だけである。16S rRNA 遺伝子の相同性検索で筆者がお勧めしたいデータベースは EzTaxon⁴⁾である。このデータベースは細菌・アーキアのほぼすべての種の基準株の適切な配列のみが登録されているため、迷うことなくどの種と一番近いのかを正確に知ることができる (図 1)。

結果の判定と、次に何をするか

さて、ここで一番気になることは、相同値が何%以上であれば同種と同定し、何%以下なら新種なのかという

* 著者紹介 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (参事官) E-mail: suzuki-ken-ichiro@nite.go.jp

EzTaxon server 2.1
 // home / user / results / identify ::account:: ::logout:: ::how to cite:: ::q & a::

Analysis
 Identify
 SimTable

User
 Results

Utility
 Pairwise alignment
 Replace accession
 Others

Search at
 Euzebys_nomen Go
 Culture_Collection Go

Questions or Comments?
 Please email to
 jchun (at) snu.ac.kr

RESULT OF IDENTIFY ANALYSIS

Query: UserSeq

View all seq View(acc) View(z) NJ Tree Add query to cart Add to cart

Rank	Name/Title	Authors	Strain	Accession	Pairwise Similarity	Diff/Total nt	megaBLAST score	BLASTN score	Tasks
1	Cellulosimicrobium funkei	Brown et al. 2006	ATCC BAA-388 (T)	AY501364	99.792	3/1443	2831	2835	
2	Cellulosimicrobium cellulans	(Metcalf and Brown 1957) Schurmann et al. 2001	DSM 43879 (T)	X83809	99.372	9/1434	2771	2771	
3	Cellulosimicrobium terreum	Yoon et al. 2007	DS-01 (T)	EF076760	97.507	36/1444	2555	2529	
4	Luteimicrobium subarcticum	Hamada et al. 2010	R19-04 (T)	AB489904	96.953	44/1444	2517	2488	
5	Promicromonospora flava	Jiang et al. 2009	CC 0387 (T)	AM992980	96.545	50/1447	2452	2426	
6	Isoptricicola variabilis	(Bakalidou et al. 2002) Stackebrandt et al. 2004	MX5(T)	AJ298873	96.379	52/1436	2430	2403	

図1. EzTaxonの検索結果画面の例 (http://www.eztaxon.org/)

点ではないだろうか。この問いに対して明確な回答はないというのが実情である。なぜなら16S rRNA遺伝子は種の決定に用いるには解像度が低く、また属によって種の数や密度が異なるからである。しかし、おおむね属は決定できる。そこで属およびその属のそれぞれの種の記載 (description) にあるさまざまな性状を比較し、かつ近縁種の基準株とDNA-DNAハイブリダイゼーション試験(DNA-DNA分子交雑法)を行い、相同値70%をもって異種同種を判定するのが分類学的には正攻法である。新種発表をする際などは、既知種と異なることを証明するために欠かせないDNA-DNAハイブリダイゼーション試験だが、操作が難しく、かなりの手間がかかるため、16S rRNA遺伝子で、高い相同値の種が密集していたり、分類学的に厳密な同定が要求されていない限りこの試験は行われていないであろう。このDNA-DNAハイブリダイゼーション試験が必要な16S rRNA遺伝子の相同値について、StackebrandtとGoebel⁵⁾は、その閾値を97.0%と報告し、後に98.7-99.0%へとその値を更新した⁶⁾。すなわち、これはBLAST検索の結果、16S rRNA遺伝子の相同値が98.7%以上の種がない場合、ほぼ間違いなく新種であろうということを意味している。しかし、逆に98.7%以上の相同値を有していれば同種かというところではない。実際に16S rRNA遺伝子の相同値が100%の株であっても、他の表現性状とDNA-DNAハイブリダイゼーションの結果、別種となる例は多くある。たとえば抗生物質生産で有名な放線菌の*Streptomyces*属は既知種として500種以上が知られており、系統的に非常に近縁であっても別種となっているも

のが数多くある。*Streptomyces*属の分離株を得たとしてその配列をBLAST検索すると、相同値が99%以上の種が100種近くヒットしてくるということもある。したがって、16S rRNA遺伝子の相同値が99%以上であったとしても別種となる可能性は十分にあるということを確認しておくべきである。

系統樹の有用性

ここまで、16S rRNA遺伝子配列の相同値のみによる同定を述べてきたが、もう少し正確な同定を試みるのであれば系統解析を行い、近隣結合法 (NJ法) や最尤法 (ML法) などの複数のアルゴリズムを用いて系統樹を作成することをお勧めする。解析方法については前述の「微生物の分類・同定実験法」¹⁾や「放線菌の分類と同定」²⁾に詳しく載っているのをごらんいただきたい。前述の相同性検索によって属と近縁種が明らかとなっているはずなので、それらの近縁種に加えて近縁の属もある程度の数含めた系統樹を作成し、相同性検索で予想された属のクラスターに同定したい株が含まれることを確認することで、より正確な属レベルの同定ができる。特に16S rRNA遺伝子配列の相同値が97%に満たない場合などは新属になる可能性もあるため、系統樹を作成して既知の属のクラスターに含まれるのかどうかを慎重に確認したほうがよい。系統だけで新属を提案することは難しいが、近縁の属との関係を表現性状と組み合わせることによって新属提案の可能性を検討する。また同程度の高い相同値を得られた種が二つあったとした場合、系統樹を作成することでどちらの種とより近縁なのかを判断

することができる場合がある。一方の種とクラスターを形成するのであれば系統的にそちらの種により近縁であると考えられる。この場合、そのクラスターの枝のブートストラップ値(系統樹の各樹形の信頼性を意味する値)が最低でも70%以上ないとこのような議論はできない。また、稀なケースではあるが、どちらの種ともクラスターを形成せず、もっと相同値の低かった種とクラスターを形成することもある。その場合、そちらの種の方が系統的には近縁であると考えられるが、これもあくまで該当するクラスターが高いブートストラップ値で支持されていることが前提である。

多相分類学的アプローチ

系統分類で分類学的位置が絞り込まれ、比較の対象が明らかになってきたら、近縁の細菌・アーキアとの表現性状における比較も考えなければならない。細菌・アーキアはその性状が多様であり、酸素に対する挙動(好気性か嫌気性か)、各種炭素化合物や窒素化合物の資化性や酸の生成パターン、各種酵素活性の有無などの生理・生化学的性状などから調べるべき性状を選抜する。有機物が阻害的に働く独立栄養性や、光合成、窒素固定能など、特徴的な性状も重要であるが、DNAのG+C含量や、細胞成分分析による化学分類は広範囲の微生物を対象にできる汎用性の高い試験法として有用であることが多い。系統分類をベースにこれら生理・生化学的性状や化学分類学的性状などを解析し、総合的に分類学的考察を行うことを多相分類学的アプローチ(polyphasic approach)と呼び、新分類群の発表を含む分類学的研究の基本的な考え方となっている。どのような性状を試験するかは、比較すべき属、あるいは種の記載(description)にある性状が基本である。それ以外にも同定しようとする株に特徴的な性状があったら、それが既知の分類群の微生物でどうであるかを調べることも必要である。記載はそれぞれの属や種が発表された原著論文にあるが、その後に発表された分類群との関係、場合によってはその後の修正(emendation)などもあるので注意を要する。また、発表の古い分類群の記載では新しい情報がないので、Bergey's manual of systematic bacteriology^{7,8)}を参考にする。さらに、すでに発表されている分類群を確認するためには、正式発表されたすべての原核生物の学名リストのデータベースを利用する⁹⁾。細菌、アーキアおよび酵母の分類学的研究や新分類群の発表はInternational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology¹⁰⁾に掲載されているので、新分類群の提案はもちろん、同定の際にも何を調べたらよいか参考になる。

化学分類

化学分類は表現性状である。分類・同定に使われる多くの生理・生化学的性状が微生物の代謝能力に依存して

おり、再現性が問題になりやすいのに対し、化学分類は細胞成分を分析することによってデータが得られるので、データの安定度は高く、手法の汎用性が高い¹⁾。細胞膜の構成成分である菌体脂肪酸やリン脂質、呼吸系の補酵素であるイソプレノイドキノン、細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸の組成や配列など、その局在性や機能が重要であることが明らかであるとともに、分類群と関連のある多様性が存在するため、分類指標として重視されている。アーキアの細胞膜ではグリセロエーテルが脂肪酸にとって代わっており、グラム陰性細菌はグラム陽性細菌のような厚いペプチドグリカン層を持たないなど、大きな分類にも重要である。生理試験のように同時に比較しながら実施する必要はないが、一定の方向性をもって培養条件などの影響も受ける点には注意を要する。具体的な手法については参考書を参照されたい^{1,2)}。

その他の同定ツール

生理・生化学性状試験は自ら培地を調製し、比較の対象も同時に実施しなければならない^{11,12)}。しかし、腸内細菌群や乳酸菌など、体系化されているものにはキットなどの微生物同定ツールとして市販されているものが便利である。APIシリーズ(バイオメリュウ社)やBIOLOG(Biolog社)は特定の細菌群に対して、糖の資化性や酵素活性を調べるキットを出しており、既存のデータブックで同定することができるほか、新たな体系化や研究開発にも利用できる。また、菌体脂肪酸分析において世界的に広く普及しているMIDIシステム(MIDI社)も、脂肪酸による微生物の同定システムとして標準化されたものである。さらに近年では、MALDI-TOF MSを用いて菌体中のリボソームタンパクを分析し、そのパターンで種の同定をするシステムが複数のメーカーで開発されている。

新分類群の提案と高次分類群

未同定の微生物株を手にしたとき、分類・同定をするということはその微生物株に学名を与えることである。そのためには属名と種形容名が決定できれば目的は達成される。そのとき、既知の種に該当するものがなく、新種を提案することになったら、それは命名規約という世界共通のルールの下で行われなければならない¹³⁾。この手順については本講座別項で紹介されている¹⁴⁾。新分類群の提案では、微生物の十分な特徴づけ(characterization)、比較を行い、種の記載に書く性状についても、その種に同定するための必要にして十分な項目を吟味しなければならない。また、種の基準株を公的な保存機関に預けることも必要である¹⁵⁾。さらに、新属を提案するときにはその属する高次分類群(すなわち科以上)についても言及しなければならないが、それには前述の系統分類の結果が反映される。

分類と同定の手法は共通するものがほとんどであるため混同されがちであるが、分類は微生物群の定義づけによる体系化が主目的であり、同定は個々の微生物株を既知の分類体系へ帰属させることが主目的となる。「種」や「属」のような分類学的な単位というのは概念的なものであるため、境界線をきちんと定義してその概念を誰もが共有できるようになって初めて、個々の微生物の識別（同定）が可能となるのである。

おわりに

細菌・アーキアの分類・同定では、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統解析がそのバックボーンになっている。現在正式に発表されている10,000以上あるほぼすべての種について16S rRNA 遺伝子配列が決定されており、高次分類階級もそれによって構築されているので、非常に客観性の高い分類・同定が実施できる。しかも高い相同値がヒットしなければ新規分類群といえることを可能にしているのは、学名の発表や基準株の寄託などのルールの徹底と先人たちの努力によるところが大きい。しかし、なぜ16S rRNAの遺伝子配列にここまで依存しなければならないのかということに対する科学的な疑問や、実用性とのギャップも多く指摘されている。臨床の現場で、種レベルで区別されていた *Salmonella typhi* (チフス菌) と *Salmonella choleraesuis* (豚コレラ菌) や *Salmonella typhimurium* (ネズミチフス菌) などが、前述の分類学的なアプローチではすべて亜種レベルまで同じ *Salmonella enterica* subsp. *enterica* に収められ、以前の種レベルの識別には亜種内の血清型を用いなければならなくなっている。このような変更は医療の現場ではなかなかなじみにくく、学名を見るときには十分注意しなければならない。とは言うても、今まで医学微生物学、食品微生物学、応用微生物学、土壤微生物学、植物病理学というように異なる分野で別々の分類体系が構築され、同じ種となるべきものがまったく別の属に入れられ、比較もされてこなかったことを考えると、世界が一つの分類体系で結ばれたことは長足の進歩である。たとえば、植物由来の *Erwinia herbicola* が臨床由来の *Enterobacter agglomerans* と種が同一であることが明らかとなったことなどがその例である。このような整理が進んで、本種はさらに *Enterobacter* 属から独立した *Pantoea* 属に分類されて現在では *Pantoea agglomerans* となっている。

次に問題となるのが、DNA-DNAハイブリダイゼーション実験への依存度である。前述のように、種の異同を調べる方法として、全ゲノムDNAを用いて微生物株間の類縁関係を示すのもっとも実績があり、新種提案で強く勧められている方法であるが、実験手法の困難さと、データが微生物株間の相対値として表されることから他の実験との比較が難しく、代替となる実験法が模索されているが、いまだ決定的な代替法は確立していない。

分類学的研究は、既存の体系に当てはめ、比較しなければならぬことから、新しい手法を導入し、普及させることが難しい。しかし、最近では16S rRNA 遺伝子配列解析の次のステップとしてハウスキーピング遺伝子を用いた解像度の高い解析 (multilocus sequence typing, MLST) を行う例が増えている¹⁶⁾。具体的には *dnaJ*, *gyrB*, *recA*, *rpoB* などの遺伝子が用いられているが、それらの有用性は分類群によって異なっている。この手法が確立すれば種レベルの同定に大きく貢献するものと期待される。

前述のような16S rRNA 遺伝子配列の基準であるとして、新規分離株の同定をするための研究をして、新種提案にいたる可能性はかなり高い。そのとき、既存の体系に当てはめるための試験をするだけではなく、あらたに分離した微生物株の持つ特徴が既知の類縁菌ではどうか考えていただきたい。なぜなら分類学は体系も指標も確立され、固定されたものではなく、適用と評価の繰り返しによって新たな有用な手法が生まれてくるからである。

文 献

- 1) 鈴木健一朗ら(編): 微生物の分類・同定実験法, シュブリンガー・フェアラク東京 (2001).
- 2) 日本放線菌学会(編): 放線菌の分類と同定, 日本学会事務センター (2001).
- 3) BLAST v 2.2.24: <http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>
- 4) EzTaxon server 2.1: <http://www.eztaxon.org/>
- 5) Stackebrandt, E. and Goebel, B. M.: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **44**, 846 (1994).
- 6) Stackebrandt, E. and Goebel, B. M.: *Microbiol. Today*, **33**, 152 (2006).
- 7) Garrity, G. M. *et al.* (ed.): *Bergey's manual of systematic bacteriology* 2nd ed. Vol. 1 and 2, Springer (2001 and 2005).
- 8) Whitman W. B. *et al.* (ed.): *Bergey's manual of systematic bacteriology* 2nd ed. Vol. 3 and 4, Springer (2009 and 2010).
- 9) List of prokaryotic names with standing in nomenclature: <http://www.bacterio.cict.fr/>
- 10) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (ed): <http://ijs.sgmjournals.org/>
- 11) Barrow G. I. and Feltham, R. K. A.: *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria* 3rd ed. Cambridge Univ. Press (1991).
- 12) Versalovic, J. *et al.* (ed) *Manual of Clinical Microbiology* 10th Ed. American Soc. Microbiol. (2011).
- 13) Lapage, S. P. *et al.* (ed): *International code of nomenclature of bacteria, Bacteriological code 1990 revision*, American Soc. Microbiol. (1992).
- 14) 森 浩二, 中川恭好: *生物工学*, **89**, 336 (2011).
- 15) *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (ed): *IJSEM Information for authors*, <http://ijs.sgmjournals.org/site/misc/ifora.xhtml/>
- 16) Shah, M. M. *et al.*: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 25 (2007).