医学細菌の分類命名の情報

8. 遺伝学的な種の決定方法の有効性と限界

岐阜大学医学部微生物学講座

江 崎 孝 行

1. はじめに

細菌の検出同定をおこなっていると様々な問題に直面する。その代表的な問題は

1. 分離された菌株が特定の菌種に近いが記載されている生化学的性状が少し違う。

2. DNA プローブで同定したが、生化学的性状が一致せずどちらを信用すればいいのか判断できない。

3. 生化学的性状で既存の菌種と同定されたのに DNA プローブや PCR で陽性にならない。

これらの疑問にはいずれも細菌の菌種の定義と分類法を正確に理解していなければ解答は得られない。遺伝子検査が普及し、上記のような場面に遭遇し疑問をしばしば投げかけられるので、分類学的な細菌の種の定義と菌種の分類法について理解を深めていただきたい。

2. 種の遺伝学的定義と同定

細菌の菌種を同定する手段として長い間、形態的特徴と生化学的性状が使われ、病原細菌の多くが 20 世紀の全般にこれらの表現形質の特徴をもとに分類され、現在もその分類体系に依存した分類方法が生き残っている。ところが 1980 年代から始まった細菌の遺伝学的な分類方法に照らし合わせると従来からの分類法に多くの問題点があることが分かってきた。

細菌の菌種 Species の遺伝学的な定義は“種 species は遺伝学的に 70% 以上の DNA の類似度を持つ菌株の集団”として定義されている¹⁾。一つ一つの株の全染色体のシーケンスをみることは現実には無理であるので、どうやって遺伝子配列

の類似性を測定するのかといぶかる人もいるだろう。ゲノム配列を菌株ごとに測定するのは実用的ではないので、DNA/DNA ハイブリッド法を使用する²⁾³⁾。二つの菌株間の染色体 DNA 配列が類似しておれば、各々の菌株の染色体 DNA をランダムに物理的に切断し、一本鎖にしたあとハイブリッドを形成させると、配列が類似しているほどハイブリッドの形成率が向上する。基準株 type strain の自分自身の DNA を一本鎖にして再び二鎖を作らせた時の再結合率を 100% とした場合、他の菌株の DNA とハイブリッドを形成させたときの再結合率を計算することで類似度が計算できる。この実験をおこなうには標準になる基準株の DNA を一本鎖にして DNA を標識しておく。基準株の未標識 DNA、同定しようとする菌株の未標識 DNA 液にそれぞれ等量の標識 DNA を添加してハイブリッドの形成率を計算する。未知の菌株のハイブリッド形成率が基準株を 100% としたとき、70% 以上の相対的な結合率を示せばその株は基準株と同じ菌種であると判断できる。

この方法を利用して抗酸菌やレジオネラの同定が DDH 法として実用化されている⁴⁾⁵⁾。最近、我々はこの方法をスライドグラスを使った DNA マイクロアレイ上で実施し、マイクロプレートで実施する方法でも同等の結果を得ている⁶⁾。

この方法で野生株を同定すると様々な事実が見つかってきた。例えば *Mycobacterium tuberculosis* と *Mycobacterium bovis* が 90% 以上の DNA の類似度があり分類学的には同一種であることがわかった。類縁の *M. microti*, *M. africanum* も *M. tu-*

berculosis と 70% 以上の類似度があることから, *M. tuberculosis* 以外の 3 菌種は分類学的に *M. tuberculosis* に統一できることが明らかになっている. 同様の事例は *Shigella* 属の菌種と大腸菌についても言える. *Shigella* 属の 4 つの菌種は *Escherichia coli* と DNA の類似度が 70% 以上あり, 種の分類学的な定義にあてはめれば同一種である.

ボツリヌス毒素を生産する *Clostridium botulinum* は *Clostridium putrificum*, *Clostridium sporogenes* と遺伝学的に同じであることが証明された⁷⁾. A, B, C, D, E, F 型といった異なった毒素を生産する *C. botulinum* 菌株が毒素を生産しない *C. sporogenes* に遺伝学的に同じであり, 命名の優先権からすると *C. putrificum* が生き残り, 他の二菌種は消滅することになる. これによる危険を回避するために国際命名規約にのっとり, *C. botulinum* と *C. sporogenes* を保存名にするという意見が国際微生物連盟の裁定委員会に提出されている⁸⁾. このように既に確立している菌種の分類が新しい遺伝学的基準に照らすと分類体系に不備があることが次々と見つかっている. しかし 20 世紀のはじめに確立し長く使われてきた表現形質の分類同定方法を変えるのは容易ではなく, 遺伝学的なデータにもとづいた分類の再編成は徐々に進捗しつつある. このように従来から使用されてきた分類の不備がみつかったが, 一気に分類命名方法をかえようとすると微生物名を使用する一般の人に大きな混乱がおこる.

最も代表的な例は *Salmonella* でこの属の分類命名法は今世紀のはじめから大きな混乱を引きずっている. *Salmonella* の命名の混乱は血清型の分類と種の分類が分類学者の間でも歴史の中でゆれ動いていたことを物語っている⁹⁾. その解決のために新たな提案がいくつかなされているが^{10)~13)}, この結論は 2002 年パリで開催される国際微生物連盟の会合の中の裁定委員会で結論が出されることになっている.

3. リボゾーム RNA 配列を使った系統的 同定方法の有効性と限界

細菌の 16S ribosomal RNA のデータの蓄積は

Fig. 1 Species Identification

1980 年代のなかばから始まった. 15 年を経過し記載された 5000 種の細菌のほぼ 95% のデータが蓄積されている. 毎年数百種類の細菌が発見されているが, 新しい菌種の発表には 16S rRNA の配列を決定することが要求されているので, 今後は 16S rRNA のデータは継続される. 現在の細菌の分類体系は 16S rRNA のデータを中心に蓄積されたデータをもとに整理され, 新しい Bergey's manual of Systematic Bacteriology 第二編もこの体系にそって編集が行われている. データの蓄積と分類体系が整理されると新しく分離された菌株が系統的にどこに所属するかを迅速に調べるには 16S ribosomal RNA は強力な手段になる. 細菌の 16S rDNA は Capillary sequencer を使用すれば 2 時間で決定できるので, 菌の集落から実験を開始して一日で系統的な位置を推測できる. 蓄積されたデータから現在, 分類学者は Fig. 1 のような考え方で菌種の同定をおこなっている.

16S rDNA の塩基配列配列を測定し, 既存の菌種のどの配列に最も近いかを internet 上で Blast もしくは Fasta program を使用し選択する. 候補になった菌種のリストが数分で表示されるのでこの操作で菌株が所属する属が決定できる. 属が決定されればその属の全菌種の 16S rDNA のデー

タセットと clustal W program を使用し多重アラインメントを行い最も近い菌種とのシーケンスの類似度を計算する。

現在、シーケンスの値が3%以上既存の菌種と異なっておればその株は分類学的には新しい菌種と判断しても差し支えないとされている¹⁴⁾。一方、最も近い菌種と2%以内の配列の違いしかなかった場合は、配列のデータだけでは結論を出すことはできない。先に述べた染色体DNAの類似度を測定する実験が必要になってくる。16S rDNA 配列が100%一致しても染色体DNAの類似度は70%以下であるケースも報告されているからである。例えば *Mycobacterium kansasii* と *Mycobacterium gastri* は16S rDNA 配列は同じであるが、全染色体DNAの類似度は50~60%ほどしかない。16S rDNA は精々1500塩基であり、全染色体の数百万塩基あるため、16S rDNA の配列より、他の部分の進化が多彩であることになる。

このように16S rDNA だけで菌種の同定はできない。しかし16S rDNA 配列が既存の菌種に100%一致すれば、その株は既存のその菌種菌種の限り無く近いことは明白であり同定の手助けになることに間違いはない。

最近、16S rDNA 配列を使ったPCR法やDNAプローブ法が菌種の検出や同定に使用されるようになった。しかし上記の例のように16S rDNA だけを標的に検出同定系を作成すると大きな落とし穴にはまる場合が出てくる。また細菌のリボソームRNAを標的にしたDNAプローブをデザインする場合も株によるvariationがあることを忘れてはならない。

4. 病原因子を使った同定方法の有用性と限界

医学細菌では菌種の同定の他に菌種の特定の株が保有する病原因子が問題になることがしばしばある。そこで病原菌の検出同定に病原因子の遺伝子を使用する方法がある。たとえば *Vibrio cholerae* は cholera toxin (CT) を生産する株が典型的なコレラ症をひきおこす。毒素を生産しないコレラ菌もたくさん存在するため分離株が毒素を生産するかどうかは重要な意味を持つ。

ところがCT毒素を使用して検出系を作成する

とO1やO139以外のコレラ菌でも陽性になる場合がある。さらに毒素生産性は種をこえて *Vibrio mimicus* にも分布している。従ってCT毒素のみを使用すると *V. mimicus* を間違えて *V. cholerae* と同定したり、*V. cholerae* の毒素非生産株を見のがしてしまう。このように16S rDNA, CT毒素の単独の検出系ではいずれも医学にとっては情報不足である。両方を併用した検出方法を作らなければ正しい検出系はつくれない。

おわりに

種の定義が染色体DNAの類似度できめられているので、それ以外の病原性因子やribosomal RNAを使用して同定や検出系を作成すれば厳密には矛盾が生じてくる。しかし多くの場合は種の同定に病原因子やribosomal RNAが使われている。病原因子が一つの種のなかで20%の菌株にしか存在しないのにその因子をつかって種を同定しようとすれば80%の菌株を見のがしてしまう。検出に使用する遺伝子が種にどの程度分布しているのか、特定の配列を検出につかう場合、その配列が種の中の菌株にどの程度普遍的に存在するのかといった基本的なデータをあつめてから使用しなければ信頼できる遺伝子検査にはならない。

文 献

- 1) Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, *et al.* : Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 1987 ; 37 : 463—4.
- 2) Brenner DJ, Fanning GR, Rake AV, Johnson KE : Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxylapatite. *Analyt Chem* 1969 ; 28 : 447—59.
- 3) Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E : Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int J Syst Bacteriol* 1989 ; 39 : 224—9.
- 4) Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, Hatanaka Y, Asano K, Hashimoto Y, *et al.* : Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol* 1991 ; 29 : 1596—603.

- 5) Ezaki T, Dejsirilert S, Yamamoto H, Takeuchi N, Liu SL, Yabuuchi E : Simple and rapid genetic identification of *Legionella* species with photo-biotin-labeled DNA. J Gen Appl Microbiol 1988 ; 34 : 191—9.
- 6) 波多宏幸, 江崎孝行 : DNA マイクロアレイによる抗酸菌同定法の基礎検討 第12回日本臨床微生物学会, 岐阜 日本臨床微生物学会誌 2000 ; 10 : 4, 136.
- 7) Lee WH, Riemann H : The Genetic relatedness of proteolytic *Clostridium botulinum* strains. J Gen Microbiol 1970 ; 64 : 85—90.
- 8) Olesn I, Johnson JL, Moore WHC, Moore WEC : Rejection of *Clostridium putrificum* and conservation of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. Request for an opinion. Int J Syst Bacteriol 1995 ; 45 : 415—7.
- 9) Kaufmann F : The species definition in the *Enterobacteriaceae*. Int J Syst Bacteriol 1961 ; 11 : 5—6
- 10) Ezaki T, Kawamura Y, Yabuuchi E : Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi*, *S. enteritidis*, and *S. typhimurium*, and conservation of the specific epithets enteritidis and typhimurium. Int J Syst Bacteriol 2000 ; 50 : 945—47.
- 11) Ezaki T, Amano M, Kawamura Y, Yabuuchi E : Proposal of *Salmonella paratyphi* sp. Nov., nom. Rev., and request for an opinion to conserve the specific epithet paratyphi in the binary combination *Salmonella paratyphi*. Int J Syst Evol Microbiol 2000 ; 50 : 941—4
- 12) Yabuuchi E, Ezaki T : Arguments against the replacement of type species of the genus *Salmonella* from *S. choleraesuis* to “*S. enterica*” and the creation of word “neotype species”, and for conservation of *S. choleraesuis*. Int J Syst Evol Microbiol 2000 ; 50 : 1693—4.
- 13) 江崎孝行 : サルモネラの命名の歴史と正式名称. 日本細菌学雑誌 1998 ; 53 (4), 629—33.
- 14) Stackebrandt E, Goebel BM : Taxonomic note : A place for DNA/DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species identification in Bacteriology. Int J Syst Bacteriol 1994 ; 44 : 846—9.

Current Topics on Classification and Nomenclature of Bacteria

8. Validity and Limitation of Genetic Methods to Determine Species

Takayuki EZAKI

Department of Microbiology Gifu University School of Medicine

[J.J.A. Inf. D. 75 : 833~836, 2001]