Class *Actinobacteria* の分類指標と系統分類[†]

鈴木健一郎, 工藤卓二

(理化学研究所)

Key words: chemotaxonomy, phylogeny, 16S rRNA, peptidoglycan, actinomycetes

1. はじめに

現在, 細菌の分類体系は 16S rRNA の塩基配列に基づく系統分類がその骨格を形成している。これは, プローブによる特定の微生物の検出や, 部分塩基配列を用いた同定を可能とし, 日進月歩の関連技術と合わせて最もトレンドかつ普遍性の高い分類手法として定着しつつある。一方, 化学分類は系統分類に先行して普及し, 微生物の培養特性に依存しない細胞成分分析に基づく分類法として, 分析機器の進歩とともにその応用範囲を広げてきた。rRNA 遺伝子に基づく分類は, 生物間の距離を捉えるのに有効であるが, そこから直接的に, 形態はもちろん, その生物のもつ機能や生理的な特徴を明らかにするのは困難である。昔から, 生物にとって何が最も本質的な性状かを追いつけてきた分類学には時代を反映するものが見える。本稿では化学分類学的指標としてよく用いられている細胞壁ペプチドグリカン, 菌体脂肪酸, そしてイソプレノイドキノンの分類学的解析の例を挙げ, 系統分類との関係を考察する。

2. *Actinobacteria*

16S rRNA 遺伝子の塩基配列は, 特に細菌の高次分類群の体系化に重要な役割を果たしており, それによりグラム陽性細菌を高 GC 含量細菌群と低 GC 含量細菌群とに大別できることが知られている。Bacillus 属や乳酸菌を含む低 GC 含量細菌群はまだ分類群として命名されていないが, 放線菌といわゆるコリネフォルム細菌, Micrococcus 属などを含む高 GC 含量細菌群

に対して Stackebrandt らは *Actinobacteria* という Class (綱) を提案した^(1, 2)。以下 order (目), suborder (亜目), および family (科) についてはその分類群の定義を 16S rRNA 遺伝子の特徴的な塩基配列のみで記載することで客観性および普遍性を打ち出している。

16S rRNA による系統分類は客観的であり, その分類学的位置や生物間の距離を議論する上でひとつの尺度基準となりうる。そして地図を作って体系化するのに適していることも間違いない。しかし, それだけを絶対的なものとして分類体系を構築してよいのであろうか。現在, 科より下の階級である属と種は直接学名に現れる。これら属と種概念においては, 系統分類と化学分類の相互評価が重要な役割を果たしている。

3. 細胞壁ペプチドグリカン

グラム陽性細菌では, ペプチドグリカンタイプは最も基本的な分類指標のひとつである。すなわち網目構造のキーとなる二塩基性アミノ酸にはバリエーションがありながら, 一般に分類群内で均一となっている。ペプチドグリカンの二塩基性アミノ酸にはジアミノピメリン酸 (A₂pm) をはじめ, リジン, オルニチン, 2,4-ジアミノ酪酸 (DAB) などが知られている⁽³⁾。細菌のペプチドグリカンのアミノ酸は, ペプチド部分では D 体と L 体が交互に結合しているという特徴がある。ペプチドグリカンの二塩基性アミノ酸は, D 体と L 体のいずれか, 場合によっては両方が見いだされているが, それはその配列とも密接な関係がある。一般的な A 型の結合形式では, 架橋部分のアミノ酸は, すべて L 体である。ペプチドグリカン構造 (配列) は通常, アミノ酸組成からこれを推定するが, D-/L-アミノ酸が分別定量できると, 組成からの構造の推定がいっそう確実なものとなる。そこで著者らはアミノ酸をキラル誘導体として HPLC で分析するシステムの細菌分類への応用を試みた。その結果はすでに発表されている構造を反映し, 有効性が確かめられた。

[†] Taxonomic Criteria and Phylogeny of the Class *Actinobacteria*

Ken-ichiro SUZUKI and Takuji KUDO (Japan Collection of Microorganisms, the Institute of Physical and Chemical Research [RIKEN])

を有する放線菌では、その立体異性 (*meso*-A₂pm か LL-A₂pm か) は属内では均一とされてきた。それゆえその立体異性を全菌体加水分解物のセルロース TLC によって決定することは属を同定する際の第一段階のひとつとなっている。著者らはこれまで1属1種1株しか知られていなかった放線菌 *Kineosporia* 属に対し、形態的に類似した新たな分離株 11 株を加えて分類学的な検討を加えた⁽⁶⁾。その結果、形態、キノン組成、リン脂質、脂肪酸組成などはひとつの属としてまとまる結果を示し、16S rRNA 遺伝子による系統樹でも *Actinobacteria* の中で独立した系統枝を形成したにもかかわらず、細胞壁ペプチドグリカンの A₂pm の立体異性体組成は多様であった。すなわち、孢子部分はおもに *meso*-A₂pm を有することはすべてに共通であったが、菌糸部分は LL-A₂pm を主要とするものと *meso*-A₂pm を主要とするものに大別された。従来放線菌の分類においては A₂pm の立体異性は絶対視されてきた。しかし、本属の例はひとつの分類指標を重視しすぎることの危険性を示唆し、その生物のもつ本質（遺伝情報を含む）をトータルに判断する多相分類学 (polyphasic taxonomy) の重要性を示しているといえよう。

6. *Cryobacterium psychrophilum*

1975 年、Inoue & Komagata によって南極の土壌から分離されたグラム陽性桿菌 "*Curtobacterium psychrophilum*"⁽⁶⁾ に対して、最近著者らが分類学的再検討を加え、新属を提案した。この細菌は、4~12℃ で

良好に生育し、18℃ 以上では生育しない絶対的な好低温性を示す。化学分類学的には細胞壁に DAB を含むこと、キノンタイプがメナキノン-10 (MK-10) であることなど、family *Microbacteriaceae* の特徴を満たしており、16S rRNA による系統樹もこの科に入ることとを支持していたが、その中に帰属する属は見いだされなかった。化学分類学的には、菌体脂肪酸組成がその好低温性を裏づけていた。この family の細菌はこの種を除き、中温性細菌であり、菌体脂肪酸としてアンテイスおよびイソ分枝の脂肪酸を主成分としている。アンテイスの奇数脂肪酸は、融点が低く、不飽和脂肪酸の代替となりうるので、これらの中温性細菌は不飽和脂肪酸をほとんど含まない。これは多くの *Bacillus* 属細菌や *Streptomyces* 属放線菌と同様の組成である。それに対し、*C. psychrophilum* はモノ不飽和のアンテイス分枝酸を著量含む特異な組成を有しており、この組成は近縁の中温性細菌を同程度の低温で培養しても得られなかった (表)。これは、本細菌が中温以上で生育できないことを説明しているわけではないが、低温での生育に適応している点では合理的である。この特異な脂肪酸組成と、系統樹において属レベルで独立していることから、著者らは本菌種に対して新属 *Cryobacterium* を提案した⁽⁷⁾。これは化学分類学的指標が識別のためだけではなく、生理的な性質と分離源の環境を議論できることを示すとともに、系統分類の客観性を示す好例である。

表 菌体脂肪酸組成への培養温度の影響

微生物	培養温度 (℃)	脂肪酸組成 (%)					
		モノ不飽和酸		飽和酸			
		a-15:1	i-15:1	a-15:0	a-17:0	i-15:0	i-15:0
好低温性細菌							
<i>Cryobacterium psychrophilum</i>	17	4	1	51	15	17	9
JCM 1463 ^T	10	20	2	34	13	18	10
	8	22	2	34	15	17	8
	4	26	2	31	11	19	8
中温性細菌							
<i>Curtobacterium albidum</i>	30			33	46	2	10
JCM 1344 ^T	17	2		67	21	2	8
	10	6		67	14	2	

^a a, アンテイス分枝酸; i, イソ分枝酸; ch, ω-シクロヘキシル酸; tr, trace amount.

太字は生育至適温度における組成

7. 無意味なものほど重要な表現性状

経験的には、環境への適応や代謝機能などのように生命活動に本質的であるもののほど系統分類との相関性が低いように思われる。細菌の系統樹で光合成能や窒素固定能などの分布がそれを示唆している。細胞壁のペプチドグリカンが細胞の形態を外界に対して堅固に保つための構造であるので、網目構造のつながりになるアミノ酸がアミノ基を二つもつ必要はあるものの、その種類は生命活動に対して決定的であるとはいえない。また、キノンについてみると、キノン部分は酸化還元電位を決定し、生育環境との関連は極めて深い。そのイソプレノ側鎖の長さや飽和度はその点で本質的とは考えにくい。16S rRNA 遺伝子の塩基配列も環境による選択圧に影響されることなく、時間だけを変数として変化していったとすればペプチドグリカンのアミノ酸やイソプレノイドキノンの側鎖のように環境による選択圧に対し、影響を受けにくい部分の多様性ほど系統分類と相関性の高い表現性状なのではないだろうか。菌体脂肪酸では基本的な炭素骨格については系統分類との相関性が見いだされるが、*Cryobacterium* のような例では、単純に組成だけで類縁性を論じるのはむずかしい。一方、*Bifidobacterium* の細胞壁では、リジンとオルニチンが混在するケースがみられ、図2の *Microbacterium* 属は、かつて細胞壁にリジンをもつものだけとされた *Microbacterium* 属とオルニチンをもつことで定義された *Aureobacterium* 属が系統樹上で混在する結果となり、統合されたものである。ペプチドグリカンの二塩基性アミノ酸はその合成に関与する酵素の特異性に依存するため、このよう

な結果も現れると考えられる。*Kineosporia* 属の例では細胞の分化とペプチドグリカンの生合成の関係が今後のテーマとして興味深い。

8. ま と め

表現性状は直接的に汎用性や系統分類との相関性だけで評価されるべきものではなく、いくつかの性状の組み合わせや、生育環境、細胞成分の生合成系との関連、遺伝子の発現の制御など、他の因子と併せて議論することで新しい知見が生まれる可能性も存在する。一方で、系統的な類縁性とは異なる分布を示す性状が、実用的な細菌の識別に有効である例も少なくない。このようなところに細菌分類学の新しい方向が見え隠れしているのではないだろうか。

- (1) E. Stackebrandt, F. A. Rainey, and N. L. Ward-Rainey: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 479-491 (1997).
- (2) 横田 明: 生物工学会誌, **76**, 59-65 (1998).
- (3) K. H. Schleifer and O. Kandler: *Bacteriol. Rev.*, **36**, 407-477 (1972).
- (4) J. Sasaki, M. Chijimatsu, and K. Suzuki: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 403-410 (1998).
- (5) T. Kudo, K. Matsushima, T. Itoh, J. Sasaki, and K. Suzuki: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 1245-1255 (1998).
- (6) K. Inoue and K. Komagata: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **22**, 165-176 (1976).
- (7) K. Suzuki, J. Sasaki, M. Uramoto, T. Nakase, and K. Komagata: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **47**, 479-491 (1997).
- (8) W. P. Hammes, R. Neukam, and O. Kandler: *Arch. Microbiol.*, **115**, 95-102 (1977).
- (9) M. Takeuchi and K. Hatano: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 739-747 (1998).