



遺伝子解析による微生物同定について

はじめに

近年、微生物の分類の指標として遺伝子が重視されるようになり、その研究成果から多くの微生物の遺伝子情報が利用できるようになりました。かつては表現形質が重視されていた菌類（カビ・酵母・キノコ）も現在では遺伝子が分類の指標として重視されています。

遺伝子の塩基配列を読む DNA シーケンシングは操作を習得すれば誰にでも出来る手軽な技術として普及しています。また、DNA シーケンサー（DNA 塩基配列解読装置）が無くても、DNA シーケンシングの受託サービスを通して DNA 配列を入手することができます。

本稿では、特定の遺伝子領域の塩基配列（DNA バーコード）を読むことで対象の微生物種が分かる DNA バーコーディングによる微生物同定についてご紹介致します。

細菌の分類・同定

微生物の分類における最小単位は「種」であり、その上位分類が「属」です（表-1）。細菌の「種」は“DNA-DNA Hybridization (DDH) 法により 70%以上の相同性を示すグループが同種である”と国際原核生物分類命名委員会により定義されています¹⁾。

未知の分離株を検査し、既知のどの種に含まれるかを決定することを「同定」といいます。「種」を同定するためには「種」の基準となる菌株（Type strain: 基準株）ごとに

相対的な DDH 法を行う必要がありますが、その手法は煩雑で熟練した技術を要します。

そこで、実用的には 16S rRNA 遺伝子塩基配列（16S rDNA）を分子マーカー（目印となる特異的な配列）として用いた同定が実施されています。16S rDNA による系統解析は、細菌の系統解析において最も普及している方法です。DDH 法と 16S rDNA 解析のデータの相関を見ると、16S rDNA の類似度が 98.7%以下であれば DDH 法での相同性が 70%を超えないことが知られ、16S rDNA の類似度が 98.7%以下であれば別種であると判断します²⁾。ただし、16S rDNA の類似度が 100%であっても DDH 法の相同性が 70%未満となることもあります。また、16S rDNA では種の識別が困難な場合もあります。食中毒菌として知られる *Bacillus cereus* や生物テロとして使用された *Bacillus anthracis*（炭疽菌）等が含まれる *Bacillus cereus* グループは、16S rDNA では識別できず（図-1 左）、性状試験や他の分子マーカー等で識別します。

表-1 細菌の分類階級と大腸菌の例

階級	<i>Escherichia coli</i> （大腸菌）
ドメイン	真正細菌
門	プロテオバクテリア門
綱	γプロテオバクテリア綱
目	腸内細菌目
科	腸内細菌科
属	<i>Escherichia</i>
種	<i>Escherichia coli</i>

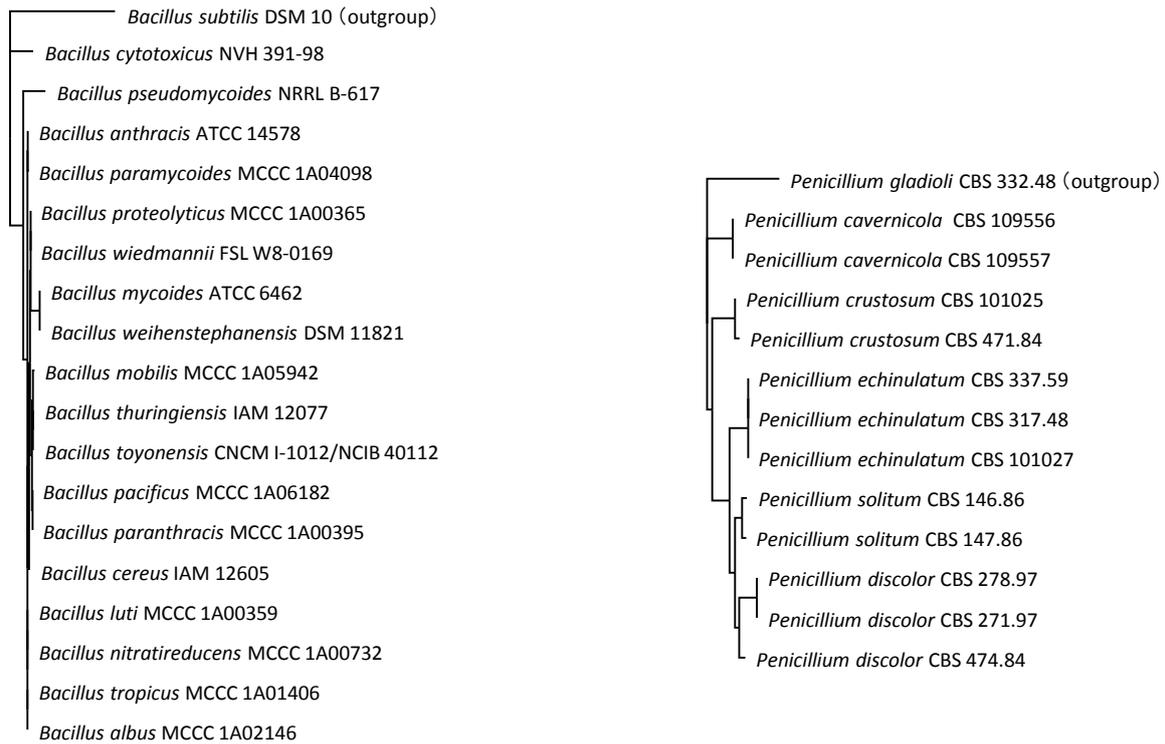


図-1 左：細菌の *Bacillus cereus* グループの 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹
 右：菌類（カビ）の *Penicillium* Section *Fasciculata* の一部の種の β -tubulin 遺伝子部分塩基配列に基づく系統樹

横軸の長さは塩基の違いを表しており、*Bacillus cereus* グループの 16S rRNA 遺伝子塩基配列は種間で塩基の違いがほとんど無いことがわかる。なお、2つの系統樹の横軸のスケールは同じである。

16S rDNA で識別できない分類群については、菌の生育に必須なハウスキーピング遺伝子の塩基配列を用いた Multilocus sequence analysis (MLSA) 法等の系統解析が推奨されています。また、次世代シーケンサーの普及により全ゲノム配列が容易に解読できるようになったことから、菌株間の全ゲノム配列の類似度をコンピューター上で計算して同定を行う、Average Nucleotide Identity (ANI) 法が DDH 法の代替法として注目されています。さらに、対象とする微生物種の全ての株が共通に持っている遺伝子を用いてタイプ分けを行う Core Genome Multilocus Sequence Typing (cgMLST) によりゲノムワイドな配列情報から菌株レベルでの識別が可能になり、散発食中毒の原因究明などにも利用されています。

さらに近年、遺伝子ではなくタンパク質を分析する MALDI-TOF/MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計) による微生物迅速同定が急速に普及しています。MALDI-TOF/MS は同定結果の不完全性が欠点とされていましたが、各微生物に特有のバイオマーカーに注目し、それを MALDI-TOF/MS で検出する手法が開発されています。この手法により、微生物の識別・同定の精度が向上し、16S rDNA では識別できない分類群の識別が可能となることが期待されます³⁾。

細菌の 16S rDNA を用いた同定

16S rDNA の V1 及び V3 と呼ばれる領域の間の可変領域を含む上流約 500 bp の塩基配列を解析することで簡易的な同定が可能です。より正確な同定を行う場合は、ほぼ全長の 1400 bp 以上の塩基配列を解析します。

同定する際は、決定した塩基配列と既知種の基準株 (Type strain) の塩基配列の比較が必要です。既知の細菌・古細菌の 16S rDNA は国際塩基配列データベース (International Nucleotide Sequence Databases ; INSD) に登録されています。米国立生物工学情報センター (NCBI) ⁴⁾等がウェブサイトで公開している相同性検索ツール (BLAST) を用いることで、近縁種を知ることが可能です。しかし、登録されているデータには誤登録・誤同定も存在し、無条件に検索結果を信用することは出来ません。また、種未同定株 (「sp.」として記載されます。) も多数登録されており、必要な情報が「sp.」の中に埋もれ、気付けないことに注意が必要です。

結果として得られた学名が細菌の命名規約に基づき承認されている学名か調べるためには LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) ⁵⁾が便利です。細菌の命名規約に則った原核生物の学名のリストが記載されており、菌名の変遷、基準株の番号、基準株の DNA 塩基配列等の情報を参照することが出来ます。

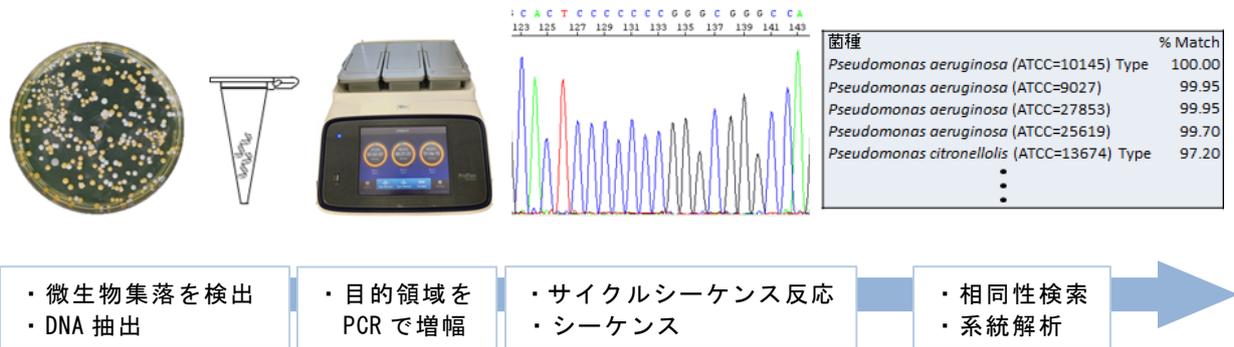


図-2 リボソーム DNA 塩基配列を用いた微生物同定

菌類 (カビ・酵母) の分類・同定

カビは基本的に「形態」によって分類されてきましたが、現在は遺伝子も分類の指標として重視されています。酵母も同様です。菌類の DNA バーコードとして使用される分子マーカーは ITS (internal transcribed spacer) 領域と 26/28S rRNA 遺伝子の D1/D2 領域が一般的です。しかし、これらの分子マーカーも万能ではなく、両方の分子マーカーを使用しても「種」が確定できない菌種もあります。そのような菌種は ITS や D1/D2 以外の分子マーカーが使用されて分類されています。*Aspergillus* 属 (コウジカビ) の分子マーカーとして Calmodulin, *Penicillium* 属 (アオカビ) であれば β -tubulin が同定には有効で (図-1 右), カビの種類によって使われる分子マーカーは異なります。そのため、カビの「種」の同定には形態的特徴から「属」などの分類群を特定し、それぞれの分類群に適した分子マーカーを用いて「種」を同定します。

DNA バーコーディングのシステムにおいてデータベースは重要です。前述の通り国際塩基配列データベースは誤同定・誤登録のデータも登録されており、分類学の知識なしには正しい結果にたどり着けないことがあります。別の有用な菌類のデータベースとして MycoBank⁶⁾が挙げられます。その他、フザリウム属では FUSARIUM-ID⁷⁾や *Fusarium MLST*⁸⁾等、分類群ごとにデータベースが作られており、それらを利用して同定することが可能です。

おわりに

特定の遺伝子領域の塩基配列による微生物同定は次世代シーケンサーを使用することにより、食品等に介在する微生物を短時間で網羅的に解析することが可能な時代になりました。

塩基配列を読むことは誰にでも出来る技術ではありますが、弊財団では分類の専門知識を持って同定結果を導き出し、微生物学的情報を提供することで微生物制御への貢献を目指して参ります。

参考文献

- 1) Tindall, B. J. et al. : Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **60**, 249-266(2010).
- 2) Stackebrandt, E. and Ebers, J. : Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*, **33**, 152-155(2006).
- 3) NITE “微生物の迅速同定” <https://www.nite.go.jp/nbric/industry/maldi/index.html>
- 4) NCBI “BLAST” <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- 5) LPSN <http://www.bacterio.net/>
- 6) MycoBank <http://www.mycobank.org/>
- 7) FUSARIUM-ID <http://isolate.fusariumdb.org/blast.php>
- 8) *Fusarium MLST* <http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium/>