

微生物の遺伝的類似度を測定する新しい方法論の作 成に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2008-03-12
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 江崎, 孝行
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/348

研究の目的と成果の概要

研究の背景

1990 年代になって約 40 億年の歴史を持つ地球上の生命が 16SrRNA の配列に もとずいて系統的に分類されるようになった. その結果, 原核生物は真生細菌と古 細菌に分割され、記載された 4500 種の細菌の約9割の 16SrRNA の配列が決定され、 系統的に再分類された、その結果、リボソーム RNA 配列の情報が生物の分類の下位 から上位まで幅広く利用できることがわかってきた. リボソーム RNA による系統分 類はこれまで蓄積されてきた細菌の分類体系と基本的なところでは一致知したが、 これまで形態や生化学的性状による分類体系の矛盾点も浮き彫りにした、系統分類 とは別に国際微生物連盟は"細菌の菌種の定義を全染色体 DNA のハイブリッド形成 実験(定量的 DNA/DNA ハイブリッド法)を行った際に 70%以上の安定したハイブ リッドを形成する菌株の集団を独立した菌種とする"という定義を公表した. 16SrRNA の全配列が3%以上違う菌種は全染色体の類似度を測定すると 70%以下 の類似度しかないことが明らかになり、リボソーム RNA 配列を使い系統分類学的位 置を決定するだけでなく、菌種の同定にこの配列情報を使おうという気運が高まっ てきた. ところが 16SrRNA の全配列が既存の菌種と 98%以上一致した場合, 分離 株が果たして記載された菌種と同一の種であると判断してよいかどうかが問われる ようになった.

蓄積されたデータでは 16SrRNA の配列が 98%以上類似している場合でも,定量的 DNA/DNA ハイブリッド法を行った結果,同一種である場合と異なった種である場合の両者が混在していることがわかってきた.特に配列に1-2%の違いがある場合は定量的 DNA/DNA ハイブリッド法ではほとんどが 70%以下の別の種であるが,違いが1%未満の場合,この情報だけでは判断が出来なくなり定量的 DNA/DNA ハイブリッド法による確認が必要であることがわかってきた.

菌種の定量的 DNA/DNA ハイブリッド法にはハイブリッドを液体で行う液相法と固相法の2種類がある。そのうち固相法は従来片方の DNA をフィルターに固定して標識 DNA を反応させるという membrane filter 法がよく使われてきたが、我々はこの方法を非アイソトープ標識 DNA を使い市販の96 欠マイクロプレートに DNA を固定する方法論を作成し使用してきた。ところがマイクロプレートに固定される DNA 量は微量なため固定する DNA に多糖体が多量に混入していると多糖体がプレートに固定してしまい、DNA が固定されないことがあることがわかってきた。 負に 素電した DNA と糖類を分別することは容易ではなく、この問題を解決し、容易に実験できる新しい方法論を作成することが課題となった。

そこでこの研究では下記の4点に焦点をあててハイブリッド形成実験方法の改良と 周辺技術の改良を試みた.

- 1. 種の概念の確認と問題点
- 1. 従来の DNA の純度を確認する手法に代わる新しい純度計測法の確立.
- 1. DNA ハイブリッド形成実験のための Tm の迅速測定法
- 1. 新しい DNA ハイブリッド形成実験

1. 種の概念の確認と問題点

菌種は遺伝学的には 1987 年の国際微生物連盟の特別委員会で 70%以上の染色体 DNA の類似度がある菌株の集団として定義されている. この定義に照らし合わせて既存の分類体系を見直してみると医学細菌学の分野では表 2 に示した菌群の分類体系に問題があることがわかった. 病原微生物の分類は今世紀の初めに確立され病原性のない菌種とヒト病原性菌種を区別することから分類体系が作られ始めた. ところが 1980 年代にはいると病原体の病原因子が詳細に解析され、病原因子は株ごとに違うことがわかってきた. 特定の菌種の病原因子は菌種に固有のものではなく、同一菌種と同定される菌株の中には病原因子を保有しないケースが多くあることが証明されるようになってきた.

たとえば *Vibrio cholerae* には 140 種類の血清型があり、その中で epidemic cholera をおこすのは O1 とO139 の 2 種類であり、しかもその中で下痢毒(CT)を産生する株が流行を引き起こす.このように病原性の有無で菌種を分類できないことは広く知られるようになってきた.

Salmonella の病原性は宿主特異性と O 抗原と鞭毛抗原の血清型で論じられてきた. 歴史的にこれらの血清型を菌種として区別する研究者と,これらはすべて同一種であるとする研究者の間で論争が繰り広げられてきた. ヒト病原性のある Salmonella のすべての血清型は遺伝学的には 70%以上の全染色体 DNA の類似度があり,16SrRNA 配列も 99%以上一致している. これまで発表されたデータでは標準になる株の類似度が詳細に記載されていないため本研究を通じて我々は全染色体の DNA/DNA ハイブリッド形成実験を行いその類似度を確認した.その結果として Salmonella 属菌種の歴史的問題点を整理し新しい提案を行ってた.この提案は国際細菌命名規約に従い,保存名と危険名の規約を遵守した提案であり,今後の国際命名委員会の対応を見守りたい.