



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

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: jpn 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	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/348">http://hdl.handle.net/20.500.12099/348</a>

## 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穴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。負に帯電した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  $T_m$  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ってくるようになってきた。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* 属菌種の歴史的な問題点を整理し新しい提案を行った。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。