

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻
平成 16 年度博士課程 入学
氏 名 安 善 榮
指導教員名 横田 明

論文題目

Phylogenetic and taxonomic studies on the families *Microbacteriaceae* and *Bacillaceae*

(*Microbacteriaceae* 科および *Bacillaceae* 科細菌の系統分類に関する研究)

はじめに

微生物が持っている様々な情報を整理し、グループ化することを分類 (Classification) と言い、その分類された菌に対して名を付けることを命名 (Nomenclature) と言う。微生物を自然界から分離した時、その微生物を体系化された分類システムに基づいて検索すればそれが既に知られているどの菌種に属するのかを正確に決めることができるようになる。このような手段を同定 (Identification) と言う。さらに微生物の分類、命名及び同定を含んだ生物学の分野を微生物分類学 (Microbial Taxonomy) と言う。この微生物分類学は微生物学研究の基礎になる重要な分野で生物科学及び関連分野の進歩と共に発展し、また進化系統学 (Phylogeny) が反映された分類体系に改革されている。このような微生物の分類、同定、系統関係の解明は微生物を理解するうえで最も基本であり重要である。

本研究では微生物の分類、同定、系統関係の理解の為

1. 16S rRNA 遺伝子と機能タンパク質をコードする 3 つの遺伝子 (*gyrB*, *rpoA*, *recA*) を用いて *Microbacteriaceae* 科細菌の系統関係を明らかにする比較研究を行った。
2. *Bacillaceae* 科の分離株の同定試験を通じた分類、同定を行い新属及び新種を提案した。

Microbacteriaceae 科細菌の系統分類に関する研究

Microbacteriaceae 科は *Actinobacteria* 門に属し、主な特徴としてグラム陽性、高 G+C、好気性、B タイプの細胞壁ペプチドグリカンを有する。現在までに 22 属が 16S rRNA 遺伝子の系統解析に基づいて分類されているが 16S rRNA 遺伝子は塩基置換率が低いため、*Microbacteriaceae* 科の属内の近縁種の識別が困難であり、属以下の種・亜種レベルの分類や検出・識別においても解像度が不十分な問題点がある。さらに、16S rRNA 遺伝子による系統解析で *Salinibacterium*、*Leifsonia*、*Rhodoglobus* 属が同じクラスタを、また *Zimmermannella*、*Pseudoclavibacter*、*Gulosibacter* 属が同じクラスタを組んでいるが、1 つの遺伝子の解析結果でこれらの属の分類学的な位置を明らかにするのは困難である。本研究では 16S rRNA 遺伝子よりも進化速度が速く、生物全体に広く存在する機能タンパク質をコードする遺伝子に着目した。これらの遺伝子を用いて系統解析を行い 16S rRNA 遺伝子の結果と比較検討することで *Microbacteriaceae* 科細菌の系統関係をより明らかにすることを目的として研究を行った。本研究で利用した機能タンパク質をコードする遺伝子は、DNA ジャイレースサブユニット B 遺伝子 (*gyrB*) と RNA ポリメラーゼの α サブユニット遺伝子 (*rpoA*) とリコンビナーゼ A 遺伝子 (*recA*) である。

3 つの遺伝子断片を増幅するために各機能タンパク質のアミノ酸配列の保存領域からプライマーを設計した。IAM、JCM、DSM、CIP、LMG、MTCC、KCTC などの様々なカルチャーコレクションから取得した菌株を培養し DNA を抽出した後、設計したプライマーを利用して目的領域を増幅した。各遺伝子の増幅産物の塩基配列を決定後、系統樹を作成し、既知の 16S rRNA 遺伝子による系統樹と比較検討した。

以上分析の結果、*recA* に基づいた系統解析では、各属のなかの種のまとまりが見られなかったことより、分子マーカーとして適当ではないと考えられたが、*gyrB* と *rpoA* は *Microbacteriaceae* 科に属する細菌の系統関係をより明らかにする有用な分子マーカーであることが判明した。また、*gyrB* と *rpoA* の塩基置換率は 16S rRNA 遺伝子のものより早いことから、近縁種での識別に高い解像度を持っていることが判明した。16S rRNA 遺伝子のみでの解析では分類学的位置が混乱していた *Salinibacterium*、*Leifsonia*、*Rhodoglobus* 属と *Zimmermannella*、*Pseudoclavibacter*、*Gulosibacter* 属は *gyrB* と *rpoA* の解析結果からこれらの属の再整理が必要であることがより明らかにされた。

これまで機能タンパク質をコードする遺伝子を利用して属レベルで又は属を代表する菌

株を対象にした科レベルでの系統研究は数多く報告されているが、一つの科全般を対象にした研究は少ない。また本研究で *Microbacteriaceae* 科細菌の全般にわたって有用な 2 つの分子マーカー (*gyrB* と *rpoA*) の塩基配列を明らかにしたことで、今後 *Microbacteriaceae* 科細菌で 16S rRNA 遺伝子と共に *gyrB* と *rpoA* を利用した系統解析も活発になることが期待される。さらに 16S rRNA 遺伝子のみならず *gyrB* と *rpoA* を共に利用する研究によって *Microbacteriaceae* 科細菌の系統関係がより明らかになり、より正確で充実した新属及び新種の提案ができるものと考えられる。

Bacillaceae 科細菌の系統分類に関する研究

Bacillaceae 科は *Firmicutes* 門に属し、芽胞を形成する特徴を持つ絶対好気性もしくは通性嫌気性のグラム陽性桿菌である。水圏や土壌など自然環境に広く分布し非常によく増殖する。また、高 pH や低温、高塩濃度、高圧といった様々な極限環境にも適応したのものあり、非常に多くの属や種が存在する。この科の代表的な属はグラム陽性桿菌のモデル生物として重要である *Bacillus subtilis* (枯草菌) や生活にも密接に関連している病原菌の *Bacillus anthracis* (炭疽菌) や *Bacillus cereus*、*Bacillus thuringiensis* などの種を含む *Bacillus* 属がある。この科の細菌は微生物学や分子生物学分野などの基礎研究のみならず食品産業、下水処理、農業などの様々な分野で広く用いられている。

本研究では多方面で利用されている有用な微生物資源であるこれら *Bacillaceae* 科の細菌の確保及び応用研究の基盤構築を目的として水圏及び土壌由来の好気性有芽胞子菌の分離株について分類学的な研究を行い、新種提案を行った。

水圏由来の 12 株と土壌由来の 10 株、総計 22 株について 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析を行った結果、*Bacillaceae* 科の既知属あるいは新属であると推定された。これら分離株について HPLC による DNA G+C 含量と細胞壁アミノ酸組成の測定及びキノン分子種の決定、MIDI 法での菌体脂肪酸組成の分析、フォトビオチンを用いたマイクロプレート法による DNA-DNA ハイブリダイゼーションを行った。さらに光学顕微鏡による栄養細胞と孢子の形態観察、生育温度、pH 範囲、耐塩性、API 20E、API 50CHB などによる生理・生化学的性状も調べた。

以上の試験結果より、分離株 1 株は *Bacillus* 属の既知菌種と同定されたが、分離株 21 株は新種であることが明らかになった。21 分離株中、3 株は *Bacillaceae* 科の新属

(*Terribacillus*) の新種 (2 種)、6 株は *Bacillus* 属の 6 新種、2 株は *Virgibacillus* 属の 1 新種、1 株は *Halobacillus* 属の新種、1 株は *Amphibacillus* 属の新種、8 株は *Sporosarcina* 属の 3 新種と同定した。

Bacillaceae 科細菌の再分類が活発に進んでいるなかで *Bacillus* 属の 5 新種は *Sphaericus*-type *Bacillus* 周辺菌の系統関係を明らかにする重要な役目が期待される。また、*Bacillaceae* 科の中でも中度好塩性グループに入る新属 *Terribacillus* の提案、及び *Virgibacillus*、*Halobacillus*、*Amphibacillus* 属の新種提案はこれら属の種の多様性を広げることで意味があると考えられる。

まとめ

Microbacteriaceae 科細菌の全般を 16S rRNA 遺伝子と機能タンパク質をコードする 3 つの遺伝子 (*gyrB*、*rpoA*、*recA*) を用いて系統解析を行った結果、*Microbacteriaceae* 科に属する細菌の系統関係がより明らかなものとなった。また、本研究で利用した機能タンパク質をコードする 3 つの遺伝子のうち *gyrB* と *rpoA* は新たな分子マーカーとしての可能性を示すと共に、16S rRNA 遺伝子では困難であった近縁種の識別を明確にした。このように多数の遺伝子を利用した系統解析は *Microbacteriaceae* 科細菌の系統研究において、非常に有用であると考えられる。

水圏と土壌からの 22 分離株について 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統解析、化学分類、顕微鏡による孢子や形態観察、生理生化学試験を含む多相分類を行って、*Bacillaceae* 科の 1 つの新属に属する 2 つの新種、5 つの既知属に属する 12 の新種を提案した。