



## 原核生物分類学に関する最近の動向

鈴木 誠

協和発酵バイオ株式会社ヘルスケア商品開発センター 〒305-0841 茨城県つくば市御幸が丘2

### Recent trend in the prokaryotic taxonomy

Makoto Suzuki

Healthcare Products Development Center, Kyowa Hakko Bio Co., Ltd.  
2, Miyukigaoka, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0841, Japan

The past 20 years have seen great progress in prokaryotic systematics. Application of genetic information such as 16S rDNA sequencing has been the greatest driving force behind these achievements. DNA-DNA hybridization is still considered a gold standard for species delineation, but phenotypic characterization (including characterization of cultural behavior characteristics) is still required for bacterial species description. In contrast, molecular approaches have brought great progress in microbial ecology. One of these advances is the analysis of microbial consortia without the need for culture. As a result, some taxonomic discordance has arisen between microbial taxonomy and microbial ecology. From this perspective, microbial ecologists have put forward suggestions for prokaryotic taxonomy. Furthermore, recent advances in sequencing technology have resulted in easy access to genomic information on microbes, even in the environment. The application of advanced bioinformatics techniques to genome sequencing now allows for a genotype-to-phenotype approach, which can reveal phenotypic information on microbes of interest without the need for culture. These amazing advances in molecular biology and informatics will provide a paradigm shift in prokaryotic taxonomy and the concept of species in the near future.

Key words: prokaryote, species concept, meta-genome, genome analysis, bioinformatics

#### はじめに

大学院生の時代、初めて細菌分類学に触れた時、分類学には3つの大切な要素があると教えられた。1つは分類体系そのもの、2つ目は命名規約、3つ目は同定法である。命名規約については、各種関連生物群の命名規約との整合性を取ることを含めて、整備されてきている。本誌にも最近の変更が解説されており(仲田, 2012)、詳しくはそちらを参照して頂きたい。ここでは、分類体系と同定に関して触れてみたいと思う。

筆者は、発酵工業を行う企業の研究者として微生物、特に細菌の分類同定に関わってきた。具体的には、有用菌株の特許出願に関わる同定、有用活性のスクリーニング源としての菌株コレクションの作成、様々な規

制対応の必要性からの同定、あるいは製品や工程の汚染菌株の同定等、様々な場面で微生物の“同定”である。そのため、上述の3つの要素のうちの前2つ、分類体系そのものと命名に深く関わることはなく、それぞれの成果を“同定”を行う立場で利用させて頂いてきた。

この20年ほどの間に、微生物同定のための手法は飛躍的に進化した。その代表は、遺伝子配列に基づく系統解析の手法の応用であろう。それまで間接的に評価されてきた微生物間の遺伝距離が、一定のものさしによって評価・比較ができるようになった。さらに、PCR法による遺伝子増幅とサイクルシーケンス法による配列決定の簡便・迅速化によって、日常の作業手段として菌株同定に十分に適用できる方法になってきた。遺伝子を用いる方法以外にも、菌体成分等の機

E-mail: makoto.suzuki@kyowa-kirin.co.jp

器分析に基盤を置く、いわゆる fingerprint 法が発達してきた。主なものとしては、全菌体脂肪酸組成や MALDI TOF-MS による菌体タンパク質の比較、RFLP 等ゲノム情報を用いた方法等である。これら fingerprint 法は、実用的には、解像度が高く、迅速な方法であるため、診断のための特定菌の検出など迅速性が求められる場面や群集構造の動態解析などでは利用価値が高い方法である。しかし、それぞれの手法において参照すべきデータベースを構築する必要がある点、直接系統距離をあらわすようなデータが得られるわけではないこと、等の欠点があり、その利用は限定的である。

細菌の種の定義については、Ad Hoc committee の報告として 1987 年に Wayne *et al.* によって、DNA/DNA 交雑実験の再会合率あるいは再会合 DNA の  $\Delta T_m$  値の基準が示され、以降細菌の種分類の gold standard として用いられてきている。さらに 16S rRNA 遺伝子配列の相同性が、同種の細菌菌株間では少なくとも 98.7% 以上という報告もされており (Stackebrandt & Ebers, 2006)、同定のためのひとつの基準として用いられるようになってきた。また、各分類群の記載には、近縁菌種との鑑別性状が記載されるので、菌株の同定を行う立場から見ると、合理的できれいに整理された分類体系であるように思われた。実際、対象とする菌株が、既存菌種に属して典型的な表現形質を示す場合、迷うことなく同定を行うことができ、非常にありがたかった。

しかし、一方、培養可能であり、その性質を詳細に調べられた微生物は、ほんの一部であり、自然界には未知の微生物が数多く存在していること、また、それらの多くが、現在の技術では培養できないことは、広く知られた事実である。そのため、それら未知の微生物までを射程に入れた場合、現在の原核生物の分類体系がうまく機能する保証はない。前述した細菌における種の定義 (gold standard) は、経験的に決められている。DNA/DNA 交雑値が 70% 以上というのは、ひとつの遺伝的にまとまった集団というものを規定することはできるが (16S rDNA 類似度 98.7% 以上でも同様)、その定義は、その種の多様性の限界を示しているのであって、なぜその細菌菌株群が種として認識できるのか? という点に関しては、何の情報も与えてくれない。今後、原核生物の分類体系を考えていく上で、種分化がなぜ起こるのか、といった観点を導入していくことは重要になっていくことと思われる。

## 微生物生態学からの提言

生命の基本情報である遺伝子配列を用いることで、試料中に検出された微生物や環境中の微生物の認識・識別の精度が飛躍的に向上した。また、特異的プライマーを用いた PCR による目的配列の増幅を行うことによって、検出感度も大きく向上したことから、培養を経ずに目的とする微生物の検出・同定が行えるようになってきた。さらに標的配列特異的なプローブを用いた *in site* ハイブリダイゼーションの手法により、顕微鏡下で直接対象微生物を検出することも可能となっている。

また、ゲノム解析技術を直接環境試料に適用することで、分離・培養等を経ることなく環境中の微生物群衆の遺伝子情報を直接取得することが可能となった。このような環境試料の遺伝子情報はメタゲノムと呼ばれ、環境中には極めて多様な微生物が存在していることが示された。

このように大量の分子遺伝学的あるいは、分子生態学的なデータが得られるようになってきた 2000 年代中頃には、その多量の遺伝子配列データから微生物、特に細菌の“種”というものや種分化のモデルについての考察がなされている。そのような議論は *Philosophical transactions of the Royal Society. B, Biological sciences* volume 361 issue 1475 (2006) に掲載されている一連の論文や Cohan & Perry (2007) 等で報告されている。

それらの議論が起こった背景には、細菌分類学における種定義のあいまいさがあるように思われる。前述したように、現在の細菌分類学においては、“種”というものの厳密な論理的定義は存在せず、種記載を行う時に、同種と考えるべき範囲が示されているだけである。言い換えると現在の細菌分類学においては、種は進化の過程をある時点 (現時点) で断面化し、それぞれの生物群の間の関連性を論じ、グルーピングを行っているということであろう。その際に“種”という集団の範囲を規定する値 (DNA/DNA 交雑値が 70% 以上や 16S rDNA 類似度 98.7% 以上) は一定の値である。一方、それぞれの細菌種が実際にその棲息場所において受けている選択圧は異なるであろうし、突然変異率、集団のサイズ、世代時間も変動があるように思われる。極めて感覚的な話ではあるが、このように多様な状況下にある生物群に対して、一定の閾値をもって分類の基準として良いものであろうか? といった疑問が出てくるのは理解できる。一方、進化の過程そのものから、種分化の機構を見つけ出すことが

できれば、より明確な種の定義が可能となり、環境中の微生物群衆に対しても、それらの分類学的な面からの解析できる可能性が出てくるとの考えが、これら2000年代中頃の試みや提案の意図であると思われる。

Hanage *et al.* (2006) はモデル配列群を用いて、中立的な状況での経時的な genotype 形成に対する変異と相同組換えの影響のシミュレーションを行い、その結果、集団のサイズと相同組換え率によっては、中立的な状況下でも個別の genotype 形成が見られること、相同組換えの機構そのものは群集内の種内の均質化に貢献していること、を示した。また、Falush *et al.* (2006) は 207 株の *Salmonella* 属菌株における multilocus sequence typing の結果を解析して、上記の考え方が成り立つ可能性を示した。

さらに、Cohan & Perry (2007) は生態学な観点から、ecotype-based systematics を提唱している。この分類体系は、その生物の機能的及び生態学的な側面に着目して、群集を分別し、それぞれに名前をつけることで、その生物の生理学、生化学、生態学的性質を明らかにすることを目的にしている。そのため、すべての生物を記載するというよりも、生態学的な位置づけが明らかなものに対してアプローチすることを提案している。

これらの提案や検討については、この時点では必ずしも十分な結果が得られているわけではなく、さらなるデータ収集や解析手法の開発の必要性が指摘されていた。

### 分子生態学の最近の進展と原核生物分類学への提案

上述した生態学からの細菌分類学に対する提案がなされてからほぼ10年が経過しているが、分子生態学に対する旺盛な興味は衰えることなく、むしろ増加してきている。それに伴い、ゲノム配列から有益な生物学的情報を抽出するための、いわゆるバイオインフォマティクスの技術の発達や、遺伝子データベースに登録されている配列数の急激な増加が見られた。その結果、遺伝子データベースにおける未記載種の配列登録は、膨大な数に上っている。2012年時点の数字であるが、16S rDNA 配列データベースでは、98.7%の相同性を種の切り分け規準とした場合、24万種の多様性に相当する配列データが登録されている。一方、同時点で、有効に記載されている生物種は1万である。さらに高次分類群になると、より記載されている比率は下がり、29の記載のある門に対して遺伝子レベルでの多様性(75.0%)は1356(約47倍)が報告され

ている (Konstantinidis & Rosselló-Móra, 2015)。

これらの発展の原動力は、配列決定技術や大量配列を扱うための情報処理技術の進展等によって、遺伝子配列決定にかかるコストが大幅に低下したことやその迅速化にある。さらに、今後実用化されてくる第3世代シーケンサーが現れると、さらなる圧倒的なコストダウンと効率化がもたらされることになる。このような時代においては、菌株の全ゲノムシーケンスも汎用的な技術となってくるであろう。このような背景から、昨年から今年にかけて、再度、分子生態学の分野から原核生物分類学に対する提言が多数なされている。以下に、そのいくつかを紹介したいと思う。

Konstantinidis & Rosselló-Móra は、Candidatus taxa の現状と将来展望について論じ、Candidatus taxa に対して正式な分類階級を与えることを提案している。環境中に確認されている微生物のうち、大多数を占める培養されていない微生物に対しては、現在の細菌命名規約では正式な分類階級は与えられないが、暫定的な仮のカテゴリーとして Candidatas というステータスが与えられる (Murray & Stackebrandt, 1995)。現在、約360の Candidatus taxa が記載されている。実際に記載されている Candidatus taxa は、巨大なサイズをもつ硝酸酸化細菌である *Candidatus Thiomargarita joergensenii* や磁性体をもつ *Candidatus Magnetobacterium bavaricum*、鉱山地下水に棲息する化学合成無機独立栄養で硫酸還元能をもつ真正細菌である *Candidatus Desulforudis audaxviator* のように、何らかの特徴的な形質や生態学的な地位をもち、それぞれを明確に認識できるものに限られている。しかし、環境中に見出される未培養の微生物の多くでは、それぞれを見分けることができる明確な形質を見出すことは困難であるため、そのような、大多数の微生物に対して Candidatus taxa を与えることはできない。この点が、Candidatus taxa を分類体系の単位として用いることの欠点であるが、average nucleotide identity (ANI) や genome-to-genome distance (GGD) といったゲノム情報の比較解析ツールや各種オミックスツールの利用がその解決策となる可能性が示されている。そして、Candidatus taxa の命名上の混乱を避けることと、体系的な情報蓄積を行うために、Candidatus taxonomic unit の記載上のルールを整備する必要性が Konstantinidis & Rosselló-Móra によって指摘されている。具体的には、質の高いゲノム配列情報の添付(少なくともカバー率95%以上)、そのゲノム配列のタイプマテリアル化、

メタゲノムデータに基づいて Candidatus taxonomic unit を提案する場合には、環境中での優占度、形態的特徴やゲノムのインフォマティクス解析から得られる代謝的特徴の記載を行うこと、が提唱されている。

上述した Konstantinidis & Rosselló-Móra の提案は、Candidatus taxa に対しての規準作りであり、Candidatus taxa を細菌命名規約上の正式な分類群として認めることを提唱しているわけではない。一方、Whitman (2015) は、細菌命名規約の規則を改訂して、ゲノム配列をタイプマテリアルとできるようにすることを提案している。ゲノム配列をタイプマテリアルとして扱うことが可能になれば、未培養の Candidatus taxa についてもタイプ標本を設定することができ、細菌命名規約の中で管理できるようになる、という提案である。

また、Thompson *et al.* (2015) は、Archives of Microbiology に投稿した opinion paper の中で、微生物分類学へのより積極的なゲノム情報の利用を提唱している。具体的には、現在、新たな細菌種を記載しようとする場合必要となる DNA/DNA 交雑実験、rDNA 配列類似度、DNA の GC 含量、化学組成と表現形質上の鑑別性状の情報を得る手段として、ゲノム情報を用いるべきである、との内容である。DNA/DNA 交雑実験や GC 含量については、実験的に測定するよりもゲノム情報を直接利用した方が迅速かつ正確である。しかしながら、現状はゲノム情報を全面的に利用できるような場合であっても、DNA/DNA 交雑実験等の実施を要求されてしまう。また、代謝上の性質についても、ゲノムインフォマティクスの手法 (genotype-to-phenotype strategy) を用いることで、広範囲で包括的な情報を利用できること、他の微生物群との比較が簡便にできること、生息域での生態学的な地位に関する考察ができること、実際に代謝反応を調べるよりも圧倒的に安価で迅速である等から、ゲノム情報を利用することを提案している。このゲノム微生物分類学を有効なものにするためには、今後、ゲノム配列情報の比較や系統関係の推定のためのツール、ゲノム情報から代謝上の特徴を抽出するためのツールを早急に整備すること、また、それらのツールを利用して得られる、ゲノム微生物分類学情報を集積し、新たな生物群との比較や同定に利用できるようなデータベースを構築することの必要性が提起されている。

上記で提案されているような微生物分類体系の大転換というのは困難なことのようと思われる。しかし、

16s rDNA 配列登録数の増加速度と新規分類群発見確率から推定した原核微生物種の数が  $5 \times 10^5$  から  $2 \times 10^6$  となること (Yarza *et al.*, 2014)、また、それらの原核微生物種のほんの一部しか培養できないことを考えると、分離株の培養を伴った手法を基盤とする polyphasic taxonomy のアプローチでは、自然界の原核微生物界の全体像を明らかにすることは不可能であると思われる。現在、新たに記載される原核生物の種は年間 600 程度である。仮に自然界に存在するすべての原核生物が培養できたとしても、現在のペースではすべての原核生物の記載を行うには、千年世紀に近い時間がかかってしまう。一方、これまでどの程度の数になるかの予想もつかなかった原核生物の種数が、 $10^7$  を超えないと予想されたことは、ゲノム微生物分類の手法であれば、原核微生物全体の分類体系を構築しうる可能性を感じさせる。実際、第3世代のシーケンサーが稼働してくると、比較的サイズの小さい細菌のゲノムの配列決定のコストは数セント、要する時間は数時間になるとのことである。DNA 抽出やライブラリーの準備とバイオインフォマティクスに必要な付加的なコストと時間を考慮する必要はあるが、コストや手間がゲノム情報を微生物分類に利用することによっての障害にはならないであろう。

一方で、Thompson *et al.* は、ゲノム微生物分類学にしる、他の新たなアプローチを取るにしる、新しい原核生物の種概念を構築するには時間がかかるであろうと予想している。拙速は避け、微生物分類学者だけでなく、生態学者、進化学者あるいは情報処理学者等、新たな分野からの参画者を迎え、十分に議論を尽くし、論理的にも実践の上でも有効かつ妥当な原核生物の種概念と分類体系を作る必要があることが強調されている。

## 終わりに

大変雑駁な話で、申し訳ない限りではあるが、最後に、微生物を産業利用する企業の立場から、少し述べさせていただきます。

筆者は、“はじめに”でも書いたように、微生物の同定という業務に多く関わってきた。入社した時期が、ちょうど DNA/DNA 交雑実験が gold standard となってきた時期に重なっていたため、この手技を社内に導入すること、さらに簡便な方法へ改良することに大きな労力と時間を費やした。Thompson *et al.* も指摘していることであるが、DNA/DNA 交雑実験は極めて特殊な手法であり、非常に多くの手間がかかる。振返っ

てみると、筆者も十分に使えるようなプロトコルを整えるのに数年はかかっていた。一方、この方法を用いて“同定”あるいは“新種記載”を行った菌株数は、おそらく100前後であろう。より簡便でより正確な方法で同じ評価ができるのであれば、その方法を分類学のスタンダードとしてどんどん採用していくべきだと考える。

微生物の産業利用においても、群集としての微生物利用や微生物叢解析情報の利用等が行われるようになってきている。排水の微生物処理やバイオレメディエーションがその代表的な例であろう。また、約60兆の細胞からなるヒトの腸内で100兆を超える細菌が構成している腸内細菌叢と宿主であるヒトの健康状態の関連性の研究が活発に行われており、その成果が今後、応用に向かうものと思われる。

このような技術が産業上応用される際には、その製品あるいはサービスの知的財産権確保や製品品質保証をする上で、細菌叢の評価を行う必要が出てくるのが考えられる。構成微生物の分類学的情報は、そのような微生物叢評価の基盤情報となるであろう。また、それら産業上の応用に対する規制の枠組み作りや規制を実施するためにも必要な情報となるものと思われる。このような観点からいうと、微生物の産業応用の現場では、その微生物が培養できる、できないに関わらず、関与する微生物の分類体系が合理的で信頼できるということは、極めて実務的な要求事項である。微生物の産業利用を推進していく立場としては、これからゲノム情報を有効に利用し尽くすことで大きく発展していく微生物分類学が、新たに興隆してくるであろう微生物利用産業の科学的基盤となることを大いに期待したいと思う。

## 文 献

Cohan, F.M. & Perry, E.B. 2007. A systematics for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Curr. Biol.* **17**: R373-R386.

Falush, D., Torpdahl, M., Didelot, X., Conrad, D.F., Wilson, D.J. & Achtman, M. 2006. Mismatch induced speciation in *Salmonella*: model and data. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **361**: 2045-

2053.

Hanage, W.P., Spratt, B.G., Turner, K.M. & Fraser, C. 2006. Modelling bacterial speciation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **361**: 2039-2044.

Konstantinidis, K.T. & Rosselló-Móra, R. 2015. Classifying the uncultivated microbial majority: A place for metagenomic data in the Candidatus proposal. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**: 223-230.

Murray, R.G.E. & Stackebrandt, E. 1995. Taxonomic note: implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described prokaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 186-187.

仲田崇志 2012. 国際細菌命名規約（1990年版）からの規約改訂と、国際原核生物命名規約への規約名称変更。日本微生物資源学会誌 **28**: 135-147.

Stackebrandt, E. & Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today* **33**: 152-155.

Thompson, C.C., Amaral, G.R., Campeão, M., Edwards, R.A., Polz, M.F., Dutilh, B.E., Ussery, D.W., Sawabe, T., Swings, J. & Thompson, F.L. 2015. Microbial taxonomy in the post-genomic era: rebuilding from scratch? *Arch. Microbiol.* **197**: 359-370.

Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Stackebrandt, E., Starr, M.P. & Trüper, H.G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 463-464.

Whitman, W.B. 2015. Genome sequences as the type material for taxonomic descriptions of prokaryotes. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**: 217-222.

Yarza, P., Yilmaz, P., Pruesse, E., Glöckner, F.O., Ludwig, W., Schleifer, K.H., Whitman, W.B., Euzéby, J., Amann, R. & Rosselló-Móra, R. 2014. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**: 635-645.