

微生物分類学

— 細菌分類学における分類指標の評価について —

鈴木健一郎

理化学研究所・微生物系統保存施設

微生物は形態的特徴に乏しく、高等生物と同様の分類指標の適用は困難である。そこで、いろいろな基質に対する生育や反応、細胞成分の化学分析の結果を表現形質として分類体系を構築してきた。一方、最近の分子生物学の進歩は細胞の遺伝情報を直接読み取ることを可能にし、それに基づいて生物間の進化距離が計算できるようになった。特にリボソームRNAの塩基配列に基づく系統分類は、細菌を中心に広く調べられ、高次分類群の体系の構築に寄与している。定性的な表現性状は、生物を識別するのに有用な指標であるが、それらだけで分類学的重要性を判断するのはむずかしい。そこで、表現性状をそれと全く独立した系統分類で評価することは、分類体系の客観性を高め、同時に系統分類をも評価することになるが、実用上検討すべき問題も少なくない。

MICROBIAL TAXONOMY

— EVALUATION OF CRITERIA IN BACTERIAL TAXONOMY —

Ken-ichiro Suzuki

Japan Collection of Microorganisms, RIKEN

Wako-shi, Saitama 351-01 Japan

Microorganisms present a poor information on their morphology, and it is difficult to apply similar taxonomic system to higher organisms. Therefore, microbial taxonomy has been constructed on the basis of their growth and reaction to various kinds of substrates. On the other hand, recent progress of molecular biology enables us to estimate the evolutionary distance between organisms. Particularly phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of ribosomal ribonucleic acid has been extensively carried out among bacteria and has contributed to the definition of higher taxa. Qualitative phenotypic characteristics are considered as useful criteria to differentiate organisms, while it is difficult to evaluate their taxonomic significance each other.

1. はじめに

微生物とは、大雑把に定義すれば肉眼では見ることのできない生物の総称である。細菌、ウイルス、酵母、糸状菌、藻類、原虫などがこの中に含まれるが、それぞれ分類学的アプローチは異なり、さまざまな分類学的問題をかかえている。ここでは、演者がかもっぱら研究対象としている細菌 (bacteria) を材料としてその分類学の現状と問題点を紹介したい。

細菌は、独立して生長、増殖できる生物としては最小のものである。高等生物ではその認識の第一手段である形態学的情報は、細菌ではきわめて貧困で、有効な指標とはなっていない。細菌は、ほとんどの場合単細胞で、形態とは球状とか棒状といった単純なものでしかないからである。しかも、最近になって、遺伝子の分子進化的見地から、形態が類似しているのに非常に遠い関係であるとか、さらには形態は異なっても実際はかなり近縁であるという例がいくつも報告されてきている。

生物の活動を細胞レベルで考えると、図1のように要約できる。染色体DNAに記録された情報はRNAに転写され、構造タンパク質や酵素となる。生体内では酵素による高度な化学反応の制御機構により、外界に対する適応、外部から栄養の取り込みを行ない、これらは細胞の構築、自己の複製という生命の本質的な活動に帰結する。この生命活動の個々のプロセスを生物間で比較し、共通の部分でまとめ、異なる部分で区別することにより分類体系が構築されるわけである。このとき、重要な性質から順に調べていくのは当然であるが、“重要さ”をどう評価するかが常に分類学上の“重要な”問題となっている。生物を同定する場合、2分法 (dichotomy) の考え方で進み、目的の分類群 (学名) に到達するのが一般的である。しかし、生物の分類指標となる性質が不安定であったり、分類体系が十分に確立されていない場合、この考え方は誤った結論に導かれる危険性が高くなり、総合的なデータ解析を要求されることになる。

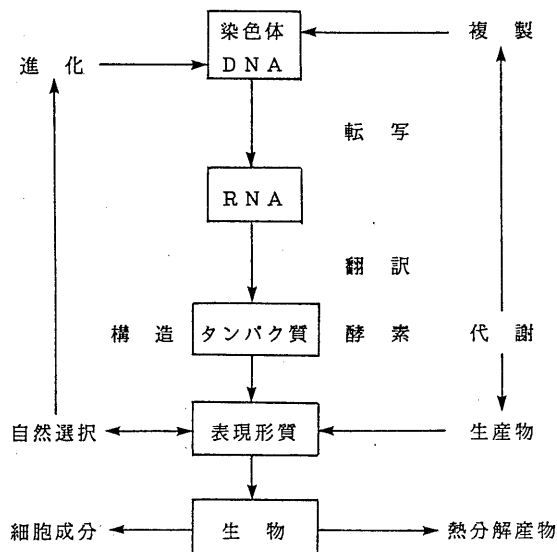


図1. 細胞における情報高分子を中心とした物質情報の流れ¹⁾

生物から得られる分類学的情報は、データの処理法に基づき、大きく3つに分けられると考えられる。すなわち、われわれが直接生物の持つ性質として得られる情報は表現性状 (phenotypic characteristics) として総括することができる。また、生物自身が持つ情報源である遺伝子上の情報も最近では直接利用できるようになり、情報高分子 (semantides) 解析という名称でまとめられる。そして、生物の表現性状を材料とするが、それを直接解釈せず、データ解析によりクラスタリングを行ったり、確率的同定を行なう技術を数値解析 (numerical taxonomy) と総称している。ここではこれらの3つの側面から細菌における分類学的アプローチを紹介することにする。

2. 表現性状 (Phenotypic characters)

表現性状とは生物が実体として持つ性質のことである。すなわち、形態学的特徴、細胞構成成分、代謝パターンなど、生命活動を観察することによって得られる情報がすべて含まれる。現在の分類体系は生物の種類に関係なく、すべて表現性状によって特徴づけられ、それぞれの分類群の概念を構成している。また、細菌の分類は学問としてだけではなく、実際の人間の生活と深く関わっている。人類の直面した最初の細菌分類学は、病原細菌の認識であった。そして産業上の有用細菌は、その物質生産能力や分解力が利用されている。これらはすべて表現性状との関わりであるから、その評価を細菌分類学は避けて通ることはできない。

表現性状は、次の4つに大別される。それぞれに含まれる代表的な項目を示す。

① 形態学的性状 (含 染色反応) .

細胞の形態、鞭毛の有無と着性、孢子形成、細胞内顆粒、グラム染色、抗酸性染色など。

② 培養性状 .

生育温度、pH 範囲、食塩濃度耐性、酸素に対する挙動など。

③ 生理・生化学的性状

糖から酸の生成 (表1に例を示す)、各種炭素化合物に対する生育、硝酸塩の還元能カタラーゼ、オキシダーゼ、特定基質の分解能、生成乳酸の旋光性など。

④ 化学分類学的性状

細胞壁のアミノ酸組成、菌体脂肪酸組成、イソプレノイド・キノン、タンパク質・酵素の電気泳動パターン、DNAのGC含量など。

形態学的性状は一般に培養条件によって変動する。培養時間と共に細胞長が短くなる細菌、孢子形成に適した培地の選択などを考慮しなければならない。培養性状は、細菌の多様性を最も表しているといえる。10°C以上では生育しない絶対低温細菌、90°C以上でないと生育しない高度好熱細菌、pH 10 を生育至適とする好アルカリ細菌など、他の生物では見られないバリエーションがある。生理・生化学的性状は、各種の化合物を炭素源やエネルギー源として利用できるかどうかといった性状であるが、生育速度の違い

表1. 生理・生化学的性状の一例²⁾

(*Pseudomonas maltophilia* の各種糖から酸の生成試験)

Sugar or sugar alcohol ^a	Acid production by strain: ^b													
	KS 0001	KS 0002	KS 0053	KS 0129	KS 0130	KS 0131	KS 0132	KS 0186	KS 0189	KS 0193	KS 0194	KS 0195	KS 0196	KS 0197
Glucose	+	+ ^w	+	+	+	+	-	+	+	+ ^w	+	+ ^w	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+ ^w	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose (open)	+	+	+	+	+	+	+ ^w	+	+	+	+	+	+	+
Maltose (closed)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	+	-	-	-	-	-	-	+ ^w	+ ^w	+ ^w	+	-	+ ^w	+
Lactose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	+ ^w	+ ^w	-	-	-	-	-	-	+ ^w	-	+ ^w	+ ^w
Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Incorporated into the medium of Hugh and Leifson

^b Symbols: +, acid produced; +^w, weak production of acid; -, acid not produced.

や、基礎培地成分などの培養条件の違いがあると判定や比較を非常にむずかしくなる。したがって、これらの条件をそろえられる比較的狭い範囲の細菌群に対して調べる方が効果的である。それに対し、化学分類学的性状は、細胞を化学的に物質の集合と見なし、それを分析することによって得たデータを解析して得られる。この最大の特徴は、生物はそれぞれの最適な条件で培養することができ、それ以降はすべて分析（機器）に依存するので、データの持つ誤差の検討や、データの自動解析が容易となり、判定に主観の入る余地を最小限にできることである。また、同一の基準では生理・生化学的性状が調べられないような、培養条件の全く異なる生物間でも表現性状の比較が行なえることも、同一手法の適用範囲が極めて広いという点で大きな長所である。

3. 情報高分子 (semantides) 解析

生物はすべて遺伝子による情報に基づいて形成されるといえる。その過程で外的要因が与える影響も小さくはないが、生物を認識する上で、そのような要因はむしろ排除した方が、より客観的で絶対的な立場をとれるという考えのもとになりたっている。表現性状に対し、独立した情報を得られるという点で、多様な表現性状を評価するのに最も有効な手法と考えられている。具体的には次のような手法が実際に使われている。

- ① DNA-DNA ホモロジー
- ② rRNA-DNA ホモロジー
- ③ rRNA カタログ法
- ④ rRNA 塩基配列
- ⑤ チトクローム蛋白のアミノ酸配列

ホモロジーとは、遺伝子が2重ラセンを形成している性質を利用して試験管内で異種間交雑反応 (hybridization) を行ない、その会合率で類縁性の程度をみる方法である。DNA 同士の方がより特異的で、同一属内など近縁な生物間を調べるのに効果的である。リボソーム RNA (rRNA) は、塩基置換速度が遅く、保存性が高い部位といわれている。そこで rRNA レベルでの比較はより距離のある生物間でも比較することができる。ホモロジーでは全体的な類似度をひとつの数値 (index) として実験的に得るので、塩基配列データの間接的解析といえることができる。が、現在では塩基配列が容易に決定できるようになったのでこれを用いて生物間距離を相対的に算出できるようになった。最もよく使われている情報高分子は rRNA、特に 16S rRNA である。

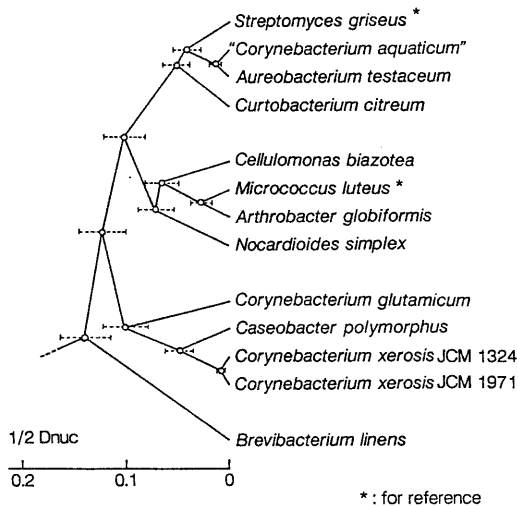


図2. 5S rRNA の塩基配列に基づくコリネフォルム細菌の分子系統樹³⁾

RNA は AGCU 4 種の塩基が約 1600 連続してできている。塩基の置換速度から、生物間距離を時間をパラメータとして表すこともできる。このためには分子内はかなり多くの配列を決めなければならないが、同定を行なうレベルであれば、その分類群にとって有効な小さな部位を用いることによって効率的に分類学的位置を求めることができる。GC 含量で表される DNA の塩基組成は、情報高分子から得られる知見であり、その差が大きいときは類縁性も低いと考えられるが、“情報”を直接利用していないので、ここでは化学分類の 1 項目として扱った。

4. 数値分類学 (numerical taxonomy)

元来は、客観的な分類体系の構築が自然分類の理想に近づくという考え方から、できるだけ多くの表現性状を集めて、すべての項目を等価に処理するという原理で開発された手法で、Adansonian classification と呼ばれた。現在では、この考え方で解析しなくても、与えられたデータを一定のルールで処理して、類似度で生物間の相互関係を表すことを一般に数値分類学と呼んでいる。いずれにせよ分類学では多量のデータを取り扱うので、コンピュータを有効に活用する方法の普及は著しい。表1. のようなデータは、0-1 データのマトリックスとして処理することができる。他に、クロマトグラムのパターン解析、定量的データの主成分分析など、多変量解析によるクラスタリングで興味深い知見を得ることも多い。ここで得られた生物相互の関係は、用いられた性状の範囲での類似の程度を表すもので、分子進化を考慮した系統的な関係を示すものでないことに注意しなくてはならない。しかし、それは全く無意味なものというわけではなく、表現性状による識別の明瞭さを示すことで実用的な分類体系の構築に大きく貢献している。

5. まとめ

生物分類学は、異なる生物同士を識別し、その概念を共有して相互のコミュニケーションを円滑にするということ、生物学において重要な役割を担っている。ただし、それは単なる手段であるというだけでなく、生物分類学として自然科学の理にかなったものでなくてはならない。表2は、いくつかの指標の組み合わせによって分類群（ここでは属）の概念が形成されていることを示している。単独で属を規定できる有効な指標もない。同じ境界線を持つことで互いに支持しあい、属内はほぼ均一に保たれている。一方、図3は表2のデータを基に作成した細菌の同定のための流れ図である。ただし、新しい組み合わせの性質を持つ細菌を見過ごす危険が残されている。

生物集団に境界線を引くことはかなり人為的であり、主観の排除は非常にむずかしい。とりわけ細菌は、表現性状に基づく分布が連続的ともいえるため、分類群内において許容される変動の幅の設定は容易でない。このような場合、既存の分類群に収めるべきか、新しい分類群を設立するべきかの判断は、対象とする細菌群だけでなく、他の分類群の動向も考慮しなければならない。分類群の評価は同時に分類指標の評価でもあり、他に及ぼす影響も少なくない。

分類体系はいつも新しい生物学によって動き続けてきた。それはいまでも同様で、今後もまた変わっていくものであることを理解しなくてはならない。さらに微生物の場合、未知の生物がまだ限りなく存在し、それらの発見によって既存の分類体系が改められることも十分に考えられる。データがどんどん膨張してゆく中で、独立した事象間に相関性を見出し、あるいは一見しただけでは全く意味が読み取れないデータからクラスタリングのイメージを出現させるために、常に新たな手法と材料の出会いが求められている。演者は、生物を分類学的に正確に認識できるシステムを追求することは、生命のメカニズムの根源を追求するのにほとんど等しい、生物学の本質的なテーマであると考えている。

表2. 化学分類学的性状に基づくコリネフォルム細菌の属の概念4)

Group by Yamada & Komagata	Corresponding genus	Cell wall peptidoglycan		Glycolate test	DNA G+C content (mol%)	Menaquinone system	Cellular fatty acid type	
		Type	Principal amino acid					
6	<i>Pimelobacter</i>	A	LL-DAP + Glycine	Acetyl	70-73	MK-8(H ₄)	IV	
1	<i>Corynebacterium</i>		meso-DAP		Arabino-galactan	53-55	MK-9(H ₂)	I-A
						55-63		I-B
						52	MK-8(H ₂)	I-C
						64-69	MK8(H ₂)/MK9(H ₂)	I-D
2	<i>Brevibacterium</i>					Glycolyl	66-70	MK-8(H ₂)
				65-67			I-F	
3	<i>Arthrobacter</i>		B	L Lysine	Acetyl	60-63	MK9(H ₂)/MK8,9	II
4	<i>Cellulomonas</i>			15 variations		58-66		
5	<i>Curtobacterium</i>			Ornithine		A215		
		B5	67-72		MK-9			
			69-71					
	<i>Aureobacterium</i>	B6	Glycolyl	69-70	MK11~13	II		
	<i>Microbacterium</i>	L-Lysine		B1 or B2			71-72	
7		DAB	B7	Acetyl	69-73	MK 9/MK 10:43		

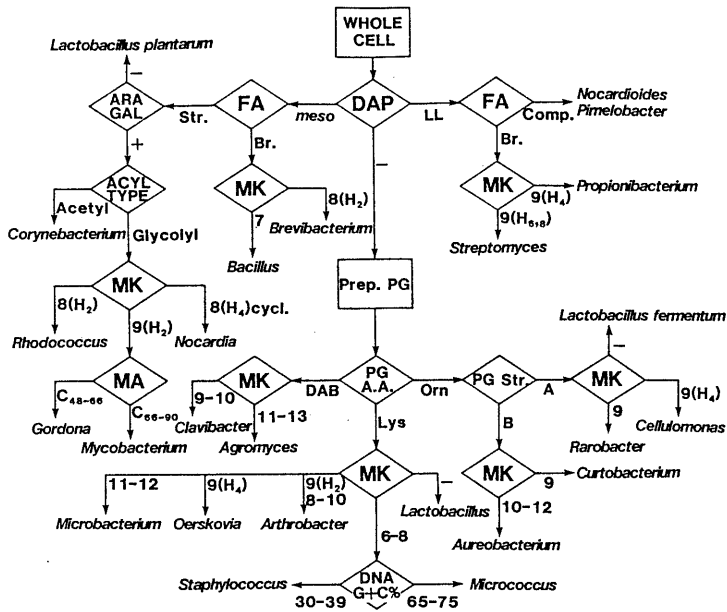


図 3 . 化学分類学的性状を中心とした、グラム陽性菌同定の流れ図⁵⁾。

引用文献

- 1) M. Goodfellow and D. E. Minnikin (1985). Chemical Methods in Bacterial Systematics. Academic Press Inc., London.
- 2) Ikemoto, S., Suzuki, K., Kaneko, T. and Komagata, K. (1980). Characterization of strains of *Pseudomonas maltophilia* which do not require methionine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30, 437-447.
- 3) Park, Y-H., Hori, H., Suzuki, K., Osawa, S. and Komagata, K. (1987). Phylogenetic analysis of the coryneform bacteria by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* 169, 1801-1806.
- 4) 駒形和男、鈴木健一郎 (1987). コリネフォルム細菌の分類. 発酵と工業 45, 944-963.
- 5) 鈴木健一郎 (1988). 微生物分類学の新しい流れ 2. 化学分類. 化学と生物 26, 858-864.

参 考 文 献

【細菌分類の実験書】

1. 長谷川武治編 (1984・1985)
微生物の分類と同定(上・下). 学会出版センター.
2. 駒形和男編 (1982)
微生物の化学分類実験法. 学会出版センター.
3. G. Gottschalk (ed) (1985)
Methods in Microbiology Vol.18. Academic Press Inc., London.
4. R. R. Colwell and R. Grigorova (eds) (1987)
Methods in Microbiology Vol.19. Academic Press Inc., London.

【細菌の分類書】

1. N. R. Krieg and J. G. Holt (Eds) (1984)
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1.
Williams & Wilkins, Baltimore
2. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (Eds) (1986)
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2
Williams & Wilkins, Baltimore
3. N. R. Krieg and J. G. Holt (Eds) (1989)
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 3.
Williams & Wilkins, Baltimore
4. S. T. Williams, M. E. Sharpe and J. G. Holt (Eds) (1989)
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 4.
Williams & Wilkins, Baltimore

【数値分類に関するもの】

1. P. H. A. Sneath and R. R. Sokal (1973)
Numerical taxonomy. W. H. Freeman and Co., San Francisco
2. G. Dunn and B. S. Everitt (1982)
An introduction to mathematical taxonomy.
Cambridge University Press, Cambridge
3. 菅原秀明 (1989)
微生物分類学の新しい流れ 3. コンピュータの利用. 化学と生物 27, 59-65.