

日本の微生物分類 この20年

微生物分類研究会20周年記念誌

2000

微生物分類研究会

微生物分類研究会 20周年記念誌

日本の微生物分類学 この20年

微生物分類研究会

微生物分類研究会創立 20 周年記念事業

組織

実行委員会	委員長	杉山純多
	副委員長	渡辺 信
		横田 明
	委員	江崎孝行
		中瀬 崇
		関 達治
	内村 泰	

アドバイザー・ボード

長谷川武治および歴代の世話人

プログラム委員会

委員長	渡辺 信
委員	中瀬 崇
	杉山純多
	横田 明

出版委員会

委員長	駒形和男
副委員長	関 達治
細菌・Archaea	横田 明
酵母	中瀬 崇
カビ	杉山純多
微細藻類	渡辺 信

記念誌執筆者一覧

駒形和男	東京農業大学応用生物科学部
江崎孝行	岐阜大学医学部
鈴木健一朗	理化学研究所微生物系統保存施設
山田雄三	東京農業大学応用生物科学部
横田 明	東京大学分子細胞生物学研究所
杉山純多	(株) エヌシーアイエムビー・ジャパン 東京大学総合研究博物館
山崎真司	東京都立向島工業高等学校
田村美貴	千葉大学真菌医学研究センター
信太 治	ヒゲタ醤油 (株) 研究開発部
小柳津広志	東京大学大学院農学生命科学研究科
中川恭好	(財) 発酵研究所
波多野和徳	(財) 発酵研究所
伊藤 隆	理化学研究所微生物系統保存施設
中瀬 崇	東京農業大学応用生物科学部
鈴木基文	理化学研究所微生物系統保存施設
浜本牧子	理化学研究所微生物系統保存施設
高島昌子	理化学研究所微生物系統保存施設
三川 隆	三菱化学 (株) 横浜総合研究所
西田洋巳	東京大学分子細胞生物学研究所
小川裕由	(株) エヌシーアイエムビー・ジャパン
渡辺 信	国立環境研究所生物圏環境部
井上 勲	筑波大学生物科学系研究科
菅原秀明	国立遺伝学研究所
藪内英子	愛知医科大学

(執筆順)

発刊の辞

微生物分類研究会創立 20 周年記念事業実行委員会 委員長 杉山純多

微生物分類研究会 (Japan Society for Microbial Systematics) は、昭和 55 年 (1980 年) 10 月 9 日箱根姥子温泉で「微生物の化学分類の勉強会」として産声をあげてから、本年 (2000 年) で 20 年の成人式を迎え、10 月 27, 28 日の両日、東京大学山上会館においてシンポジウム形式の記念研究会を開催することになりました。わたくし自身の過去 20 年の人生と重ね合わせたとき、第 1 回研究会から参加し、ときには世話人として研究会を主宰した一人として、本研究会 20 年の歴史を振り返ると実に感慨深いものがあります。本研究会誕生からこれまでの軌跡については、本研究会の生みの親であり、育ての親でもある駒形和男先生執筆の「分類研究会の 20 年の歩み」に凝縮されています。従ってこの小文では 20 周年記念事業の展開について、多少の所感も交えながら紙幅の許す範囲で述べることにします。

上述のように本研究会が誕生したのは 1980 年のことですから、今世紀末の 2000 年が丁度 20 年の誕生年に当たることは必然でしたが、そこには神のいたずら以上の何かがあると常々感じていました。この誕生年をどのようにして迎えるかについて、本研究会参加者にはじめてご相談したのは第 18 回 (平成 10 年 10 月、河口湖富士桜荘) のときでした。そのときわたくしに何かアイデアを考えよ、というご下問がありました。いろいろ考えましたが、正統派の企画を踏襲することにしました。そして、

昨年 (1999 年) の第 19 回 (大阪、コスモスクエア国際交流センター) において、二つの記念事業を提案申し上げ、記念事業実行委員会の下にプログラム委員会、記念誌の出版委員会の設置と委員をお認めいただきました (委員の名簿については次頁をご覧ください)。

記念事業の一つは、駒形教授の基調講演、3 名の外国人招聘者 (Prillinger, H. 教授, Rippka, R. 博士, Vandamme, P. A. R. 博士) の特別講演を核にして、それに対応する三つのセッション (酵母・カビ, 微細藻類, 細菌・アーケア) を組み、国内からは新進気鋭の 21 世紀の微生物系統分類学を背負っていただかねばならない 19 名の諸氏に演者をお願いしました。招聘外国人研究者と積極的に意見交換するために、使用言語は英語としました。第 20 回が実りある研究会となり、そして国際交流の場 (懇親会) ともなることを大いに期待しています。

もう一つの事業は、この記念誌「日本の微生物分類学、この 20 年」の刊行です。本研究会 20 年の歴史を活字と写真によって記録として残すことにしました。過去 20 年間の本研究会の活動ならびに周辺の研究を回顧し、過去の研究会で発表された研究成果ならびに関連の研究業績が微生物分類学に与えたインパクトについて記述することを、本記念誌の基調としました。短時間の執筆にもかかわらず、15 編 22 名の方々の玉稿、個人的なコメント、関係資料、そしてカラーの集合写真によって、本研究会

の足跡，分類手法の進歩，微生物系統分類学への寄与についておおかた描き切れたのではないかと編集過程の原稿の拾い読みからも実感しました。

この二つの事業を礎にして本研究会がさらに発展することを祈念しつつ，本記念誌

の執筆者をはじめ，編集出版ならびに関連事業に携わった委員諸氏の努力に心から敬意と謝意を表します。

平成 12 年 9 月 30 日

目 次

発刊の辞	杉山純多	iii
1. 分類研究会の20年の歩み	駒形和男	1
2. 分類手法の20年の歩み		
DNAの塩基組成とDNA類似度	江崎孝行	12
脂肪酸・ミコール酸・極性脂質	鈴木健一朗	17
ユビキノンとメナキノン	山田雄三	25
細胞壁組成	横田 明	33
酵素電気泳動パターン解析	杉山純多, 山崎真司, 田村美貴	40
タンパク質	信太 治	53
分類研究会の歩みと微生物系統学の進歩	小柳津広志	61
3. 微生物分類学の20年の歩み		
グラム陰性細菌	中川恭好	68
グラム陽性細菌	鈴木健一朗	81
放線菌	波多野和徳	90
Archaea	伊藤 隆	99
酵母	中瀬 崇, 鈴木基文, 浜本牧子, 高島昌子	105
カビ	杉山純多, 三川 隆, 西田洋巳, 小川裕由	116
微細藻類	渡辺 信, 井上 勲	131
4. これからの微生物系統分類学		139
5. 資料		
研究会開催記録		142
第1回から第20回までの発表論文		143
写真		159
編集後記		163

1 分類研究会の 20 年の歩み

駒形和男

はじめに

分類研究会の前身、微生物の化学分類の勉強会が発足してから 20 年の年月が流れた。この冊子に資料として添付されている研究会の開催記録、発表演題記録から、いかに多くの方々が多様な微生物の分類の研究をしてきたかを知ることが出来る。研究会の発足当時からかかわってきたものの一人として感慨深いものがある。この機会にこの研究会の設立の背景と発展の経緯について述べてみたい。なお、私の個人的なことにわたる点があることをお許し願いたい。

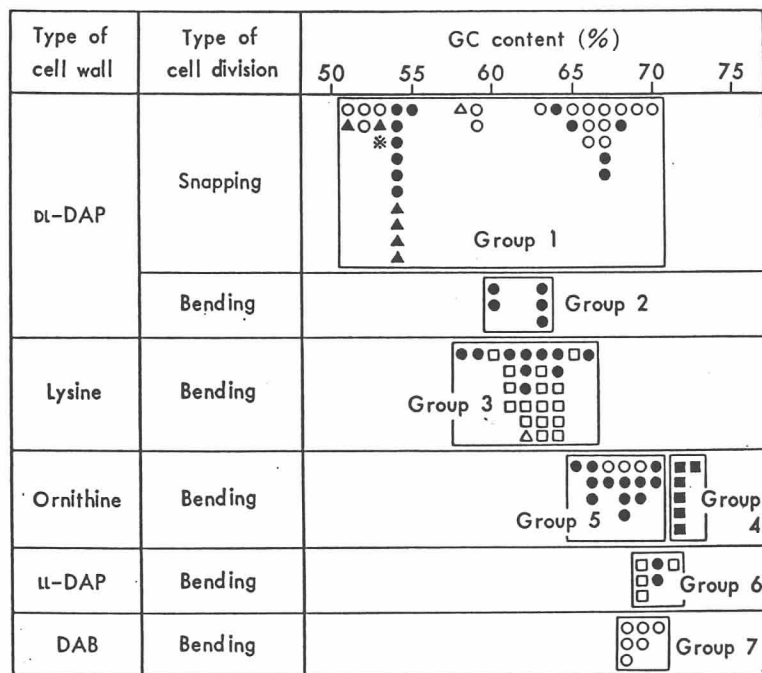
1953 年、東京大学に应用微生物研究所が設立され、分類・保存部門（第三研究部）が設けられた。この部門の目的は、種々の観点から微生物の性格づけを行い、それぞれの微生物の類縁を明らかにし、それを体系づけ、微生物分類学を確立することである (19)。わが国で、独立した微生物分類学の研究室が設けられたのはきわめて希なことである。当時、いわゆる黄変米が社会的な問題となり、研究部もあげて穀類の微生物学的研究を行うことになった。私もこの問題にかかわり、米糲の内部にきわめて多数の細菌が存在することを認めた。さらに、石油や天然ガスに関する微生物学的研究をとおして多種類の好気性細菌に出会うことになった。しかし、その頃の細菌の分類学的研究は同定の域を脱することができず、もっぱら細胞形態、グラム染色、鞭毛染色、糖からの酸の生成、炭素化合物の資化性などを調べていた。

1960 年、私は、味の素株式会社中央研究所に勤務することになった。さいわい良い研究環境と優れた共同研究者に恵まれ、広い範囲の微生物の分類学的研究を行うことができた。なかでも、グルタミン酸生産菌を含むコリネフォルム細菌は、表現形質だけでは同定することができず、その分類・同定は難渋をきわめていた。1962 年、山田和彦さんがわれわれの研究室にこられ、このコリネフォルム細菌の分類学的研究にたずさわることになった。山田さんは、生化学が専門で、いままでの表現形質に基づく分類に疑問をもち、これからは物質レベルの研究をしなければならないとあって、コリネフォルム細菌の細胞壁の分析を行った。さらに、自らフォトメータと温度制御のポンプを組み合わせて DNA の塩基組成の測定装置を組み立てた。しかし、自動的に温度をコントロールできないので、何かおきにレギュレーターを調節しなければならなかった。そのころ、米国製の装置は 500 万円ぐらいしたと記憶している。山田さんは、この自製の測定装置を用いて多数のコリネフォルム細菌の DNA の塩基組成を測定した。私の研究のなかで、この研究が微生物の化学分類学的研究の最初である。山田さんは、1972 年、コリネフォルム細菌を細胞分裂の様式、DNA の塩基組成、細胞壁の主要アミノ酸を組み合わせたフレームワークを発表し、あわせてコリネフォルム細菌の属の概念を明らかにした (24)。このフレームの性状に、新たな性状が加わ

りコリネフォルム細菌の属の概念が次第に明らかになった。山田さんの組み立てた DNA の塩基組成測定装置は、その後も研究室の中瀬崇さんの酵母の分類学的研究に用いられた。中瀬さんは、500 株にもおよぶ酵母の DNA の塩基組成を測定した。これは、当時知られていた酵母の種の 80% 近

くに相当するもので、個人でこれだけの DNA の塩基組成を測定した例は未だかつてない。味の素（株）中央研究所に在籍したのは 8 年ほどであったが、この間、化学分類学的視点から運動性球菌などの分類学的研究も行った。

図 1. Yamada, K. and Komagata, K. 1972) による coryneform bacteria のグルーピング (24)



○, *Corynebacterium*; □, *Arthrobacter*; △, *Microbacterium*; ●, *Brevibacterium*; ■, *Cellulomonas*; ※, *Micrococcus glutamicus*; ▲, Unidentified coryneform bacteria.

第 1 回国際微生物株保存会議

1968 年、味の素（株）中央研究所を退職し、東京大学の応用微生物研究所の古巣の第三研究部に戻るようになった。そして、1968 年 10 月、東京において第 1 回の国際微生物株保存会議 (The First International Conference on Culture Collections, ICC-1)

が開催された (11)。そのさい、微生物の分類に関するいくつかのシンポジウムがあり、その一つは化学分類にかかわるものであった。これがわが国で開催された化学分類に関する最初の会合と思われるので、演者と演題をつぎに記すことにする。

Symposium B. edited by Yukinori Tsunematu

N. Ueta, I. Ishizuka, and T. Yamakawa

Gas chromatographic grouping of bacteria

Koei Shioiri-Nakano and Ichiro Tadokoro

Sugar and fatty acid composition of hemolytic streptococci

T. Suto, M. Minato, S. Ishibashi, R. Azuma, and K. Ogimoto

Gas chromatography as an aid for differentiation of strict anaerobes

Tadasi Arai, Yasumasa Koyama, and Junpei Koike

Infrared spectrophotometry of Actinomycetes in relation to oil seal preservation

H. Takahashi and H. Saito

Genetic relatedness in several species of bacteria studied by the DNA-DNA and DNA-ribosomal RNA hybridization methods

R. R. Colwell

Polyphasic taxonomy of bacteria

上記の演題からすでにわが国の化学分類学の研究に様々な手法が用いられていたことが理解できよう。現在、微生物分類学分野で頻繁に用いられている polyphasic taxonomy (多相分類学) は当時米国の Georgetown University の助教授であった Colwell, R. R. 博士がこのシンポジウムではじめて用いた言葉である。この会議の直後、彼女から ICC-1 で最も興味があったのは日本の研究者による脂肪酸組成の研究であったという手紙がとどいた。

微生物の化学分類の勉強会

東大の応用微生物研究所に戻ったものの、大学紛争のため研究どころではなかった。この間、当時家畜衛生試験場におられた須藤恒二先生のところにときどき寄せて頂き、菌体脂肪酸組成の研究や分類学についてのご教示を賜った。ようやく紛争も終わり、研究ができるようになった。研究費を全部

集めて島津のガスクロマトグラフィーを購入し、須藤先生のご指導のもとメタノール資化性細菌と *Pseudomonas* の脂肪酸組成を測定し、1978年に報文にまとめることができた。しだいに、大学院生や研究生の人たちの数も増え、微生物分類学の勉強会を研究室内だけでなく、他大学の研究室とも合同勉強会を開くようになった。

そのうち、微生物分類学に興味をもつ人たちが集まって勉強会を開こうという機運が生まれ、須藤先生、倉石衍先生の肝いりで1980年10月箱根で第1回の微生物の化学分類の勉強会が開かれた。この会は、学会のような形式にとらわれず、自由闊達な討論を旨とした。また、海外の研究者に比べ、われわれの発表は未熟なところがあるので、これをブラッシュアップする場にし、さらに、泊まり込みで自由な意見の交換をしようというのが当時の人たちの意気込みであった。

微生物の化学分類の研究会は、1980年の第1回から1983年の第3回まで続いたが、勉強会では企業からの出張がむずかしいという声もあって、1985年の第4回から名称を化学分類研究会と改めた。さらに、広い範囲の微生物と新しい研究手法を討論の対象とすることが計られ、1995年の第15回の研究会から、名称を微生物分類研究会と改めた。

化学分類学

化学分類学 (chemotaxonomy) という言葉はいつから微生物分類学に用いられるようになったのであろうか。十分ではないが、手許の資料で調べてみた。1976年、Smith, P. M.が著した *The chemotaxonomy of plants* (18) によれば、もともと化学分類学は植物学の分野で生まれたものと考えられる。1930年前後から植物の油脂や精油の組成を分類に用いようという試みがなされている。1980年、Bisby F. A.らの編集による *Chemosystematics: principles and practice* (4) が出版されているが、現在のような化学分類学的性状の記述は少ない。1995年、Hawksworth, D. L. らはその著書 *Dictionary of fungi* (10) なかで、chemotaxonomy を化学的性状を利用する分類学と定義し、その性状は広義の意味で一次代謝産物、二次代謝産物、生理学的・化学的テストを含むと述べている。英国の Raistrick, H. グループの菌類の色素の研究 (16)、朝比奈先生のグループによる地衣の代謝産物の研究 (2) もこの範疇に入るのであろう。

DNA の塩基組成が細菌分類学に導入されたのは1960年代であるが、この時点ではまだ化学分類学という言葉は用いられていない。1962年、英国の *The Society for*

General Microbiology は第12回シンポジウムを開催した。その主題は *Microbial classification* (1) で、20編の論文が掲載されているが、化学分類に関する論文は掲載されていない。また、1968年に開催された *ICCC-1* において、細菌の脂肪酸組成などと分類との関係が報告されているが、この時点においても化学分類学という言葉は見られない。1968年に出版された Cowan, S. T. の *A dictionary of microbial taxonomic usage* (6) にはまだ化学分類学という言葉は見られないが、1978年に出版された Cowan, S. T. (edited by Hill, L. R.) の *A dictionary of microbial taxonomy* (7) には chemotaxonomy という項目がみられる。その定義は微生物の構造と機能の化学性状の分類学への応用と書いてあるだけで、現在の化学分類学とはすこし離れている。1981年に出版された *The prokaryotes* (20) のなかで、Trüper, H. G. and Krämer, J. は、原核生物の新しい分類学の潮流として chemotaxonomy をあげ、その性状として DNA base ratio, amino acid sequence of proteins (e.g. cytochromes), DNA-DNA & DNA-RNA homologies, ribosomal constituents, cell wall constituentsなどを記している。1983年、Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E. は *molecular systematics of prokaryotes* という総説 (17) を発表している。1984年に出版された *Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1* (13) には、numerical taxonomy と並んで nucleic acids in bacterial classification, serology and chemotaxonomy という項目が見られる。そして、核酸に関しては、DNA base composition, DNA denaturation and renaturation, RNA/DNA hybrids, chemotaxonomy に関しては cell wall

composition, lipid composition, isoprenoid quinones, cytochrome composition, amino acid sequences of various proteins, protein profiles, enzyme characterization, fermented product profiles という項目が見られる。その後、いくつかの成書に chemotaxonomy と chemosystematics という言葉が見られるようになった。たとえば、1986 年に出版された、Austin, B. and Priest, F. の著した Modern bacterial taxonomy (3) には chemosystematics という言葉がみえる。

Brock, T. D. の Biology of microorganisms は、広く微生物学の教育に用いられている優れた教科書である。そこで、いつからこの本に化学分類学に関する記述がなされたか調べてみた。驚いたことに、1970 年に出版された初版に molecular and genetic taxonomy という言葉が用いられており、DNA の塩基組成、DNA-DNA 類似度について述べられている。このことは、2 版 (1974 年)、3 版 (1979 年)、4 版 (1984 年) に踏襲されている。5 版は手許にないのでわからないが、6 版 (1991 年) には molecular taxonomic approaches という項目があり、DNA の塩基組成、DNA-DNA 類似度と rRNA のシーケンスのことが簡単に述べられている。7 版 (1988 年)、8 版 (1996 年) では Microbial Evolution and Systematics という章があり、domains のことや化学分類学的性状がかなり詳しく述べられている。最新の 2000 年に出版された 9 版 (15) では、molecular taxonomy という言葉が定着している。余談であるが、この教科書は、改訂ごとに新しい知見を取り入れ、しかも頻繁に改訂しているので、信頼できるものとなっている。

1993 年には、Goodfellow, M. & O'Donnell,

A. G. の編集した Handbook of new bacterial systematics (8)、1994 年には同じく Goodfellow and O'Donnell, A. G. の編集した Chemical methods in prokaryotic systematics (9) が出版され、chemotaxonomy という言葉が用いられている。1994 年に出版された Logan, N. A. の Bacterial systematics (14) には細胞の構成成分とそれにかかわる化学分類学の方法が述べられている。この頃から、化学分類学という言葉が定着したものであると思われる。なお、1983 年、東京で開催された第 3 回国際菌学会議 (IMC 3) で、Chemotaxonomy of yeasts and other fungi というシンポジウムがもうけられ、倉石先生がこのシンポジウムの開会の辞を、私が閉会の辞を述べている。

1965 年、Zuckerkandle, E. and Pauling, L. (27) は DNA, RNA, polypeptides が分子進化時計 (molecular evolutionary clock) の役割を演じ、これらの物質を semantides (情報高分子) と命名し、分子系統学 (molecular phylogenetics) の展望を示唆した。その後、5S rRNA, 16S rRNA のシーケンスの決定技術の進歩、木村資生先生の分子進化の中立説 (neutral theory of molecular evolution) (12)、Woese, C. R. らのグループ (22, 23) によりそれまで進化や系統関係の明らかでなかった微生物にも新しい展望が開け、この分野の研究が飛躍的に発展した。

第 1 回の微生物の化学分類の勉強会が開かれたのが 1980 年のことであるから、この分野の研究会としては世界的にみてもかなり早い時期である。ちなみに岩波の生物学辞典の第 2 版 (1977 年) (25) には化学分類という項目は見られない。化学分類学という言葉が現れたのは第 3 版 (1983 年) (26) 以降のことである。

現在、菌体脂肪酸組成、キノン組成などに関する研究を chemotaxonomy といい、DNA の塩基組成を除いた、DNA, RNA に基づく系統的な関係を研究する分野を chemosystematics あるいは molecular phylogenetics とよぶむきもある。情報高分子の情報、生命の維持に必須な物質の化学的・生化学的情報に基づく微生物の分類・相互関係を研究する学問分野を広義の微生物の化学分類学とみなすことはいかかなものであろうか。微生物分類学の初期の頃は、分類 (classification), 命名 (nomenclature), 同定 (identification), 系統 (phylogeny) の定義もおぼつかなく、末広りの扇子がたたまれていたような状態であったと思われる。研究が進むにつれ、この扇子は次第に開かれ、左に系統を置き、右に同定を置くならば、両端は一見無関係のように見えてくる。そして、両端に位置する研究者が互

いに無関心であることが微生物分類学の進歩にとってマイナスであることはいうまでもない。

化学分類学と微生物分類学

1872 年, Cohn, F. (5) は、はじめて細菌を細胞形態に基づいて分類したが、その分類群はわずか次の 4 群 (連), 6 属であった。その後、細菌分類学は 130 年ものあいだ様々な曲折をへて、現在では 980 を越える属, 5,200 を越える種が記載されている。Trüper, H. G. and Krämer, J. (20) は、Cohn, F. の時代の細菌分類学を第 1 世代の分類学、生理学的性状を取り入れた Orla-Jensen の細菌分類学を第 2 世代の分類学、そして化学分類学を第 3 世代の分類学と呼んでいる。分子進化時計に基づく最近の分類学は、第 4 世代の分類学といえるであろう。

Cohn, F. (1972) による細菌の分類 (5)

- Tribus I *Sphaerobacteria* (Kugelbacterien)
 - Gattung 1. *Micrococcus char. emend.*
- Tribus II *Microbacteria* (Stäbchenbacterien)
 - Gattung 2. *Bacterium char. emend.*
- Tribus III *Desmobacteria* (Fadenbacterien)
 - Gattung 3. *Bacillus n. g.*
 - Gattung 4. *Vibrio char. emend.*
- Tribus IV *Spirobacteria* (Schraubenbacterien)
 - Gattung 5. *Spirillum Ehr.*
 - Gattung 6. *Spirochaete Ehrenberg*

微生物分類学の研究で重要なことの一つは、研究の対象となる微生物の多様性である。もう一つは、研究手法が優れていることである。それぞれの微生物の詳しい研究

と方法論は別の章で述べられるはずである。研究会の当初、研究対象は細菌が多かったが、次第に酵母、糸状菌、放線菌、最近ではアーケア、微細藻類と広い範囲の微生物

が対象となっている。この研究会で紹介され、世界的に広まった研究手法もある。例えば、細菌の菌体脂肪酸組成の研究は世界に先駆けてなされた。また、広い範囲の微生物のキノンと分類との関係は、山田雄三先生の研究を嚆矢とするもので、わが国の研究者の成果である。ヤマサ醤油（株）で開発された核酸分解酵素を用いる DNA の塩基組成の測定法は、わが国独特のものである。DNA をヌクレオシドまたはヌクレオチドに分解し、直接 HPLC で定量するので、DNA の塩基組成を間接的に測定する T_m 法より格段と優れており、現在世界的に広く用いられている。江崎孝行先生の photobiotin ラベルの DNA-DNA hybridization technique は完全にラジオアイソトープラベルの手法と置き換わった。内田欣哉さんにより開発された Actinobacteria の細胞壁のアシル・タイプもこの分野の細菌の分類・同定に広く用いられている。藪内英子先生と矢野郁也先生による細菌のスフィンゴ磷脂質、スフィンゴ糖脂質の発見は *Sphingobacterium* と *Sphingomonas* の設立へと発展した。この研究会は過去 20 年間多くの手法を包含した研究を討議してきた。従って、一つのパラメータで微生物の分類を論じた研究は少なく、いくつかのパラメータを組み合わせ、できるだけ客観的に微生物の分類を論じてきた。このことも、この研究会の特徴であり、同時にわが国の微生物分類学の優れている点である。化学分類学あるいは分子系統学は微生物分類学を大きく変えた。また、これらの研究手法が微生物の相互関係を研究するだけでなく、微生物の同定にも用いられていることは、驚くべき発展である。その意味において広義の化学分類学は微生物分類学に大きな貢

献をしてきたし、これからもするであろう。まさに微生物分類学の IT 革命である。

「微生物の化学分類実験法」の出版

微生物の化学分類に関心をもつ研究者が増えてきたので、文部省に科学研究費を申請したところ、昭和 53 年度（1978 年）、昭和 54 年度（1979 年）にわたり総合研究 A「微生物の化学分類に関する研究、課題番号 336008」の研究助成を受けることができた。さらに、微生物の化学分類に関する実験書の出版を計画し、文部省の出版助成を申請したところ、出版助成が認められ（昭和 56 年度科学研究費補助金研究成果刊行費、申請番号 603）、1982 年「微生物の化学分類実験法」を学会出版センターから出版することができた。その内容は、細胞壁、脂質、蛋白質、核酸、免疫学的方法、熱分解法、データ解析の 7 部に分かれ、それぞれはさらに詳しく細分されている。本書は、化学分類の実験書として広く使用され、出版されて以来 18 年が経過したが、現在でも書店で見ることができる。この出版にあたって内田欣哉さんのご尽力を頂いた。

海外から研究者の招聘

この研究会では、時に応じて国内・国外から著名な研究者を招聘し、特別講演をして頂き、最新の情報の導入につとめた。また、海外からの講演者の場合は、われわれの研修を含めて発表を英語でするようにした。海外からの研究者のプロフィールを紹介する。

第 2 回の研究会には、当時関西医大の藪内先生の所に来日していた米国アトランタ

の CDC の Moss, C. W. 博士が細菌の脂肪酸組成について講演した。ガスクロマトグラフィーにキャピラリーカラムが使われた頃で、博士はそのことに触れたような記憶がある。この会は山梨の勝沼のぶどうが丘の宿泊施設を使って開催されたが、夜の懇親会ではこの施設のあらゆる酒を飲み尽くし、Moss, C. W. 博士は自分の一生の飲み分をここで飲んだようだと言っていた。米国に帰られてから手紙を頂いたが、そのなかに日本の若い人たちの英語に感心したと記されていた。

第 3 回の研究会には、当時東大の私の研究室にきていたチェコスロバキア（現在のチェコ共和国）の Czechoslovak Collection of Microorganisms の Kocur, M. 博士に *Micrococcus* の分類について講演をお願いした。博士は、90 キロを超える巨漢で研究室に用意した事務用のデスクではおさまらず、教授室の大きなテーブルを使っていた。その後何度も会う機会があったが、その度ごとに、東大の応微研にいた時が自分の人生にとって最も幸せであり、思い出すと涙が流れると言っていた。

第 8 回の研究会には、当時の東京農工大学の倉石先生、片山葉子さんのお骨折りで、ベルギーのアントワープ大学の De Ley, J. 教授を招待し、細菌の superfamily の講演をして頂いた。教授は、糖代謝の生化学から細菌の分類に手を染めた方で、常に新しい手法を開発するとともに、研究対象とする菌株を徹底的にカルチャーコレクションより取り寄せ、一株ごとといて良いほど、詳しい分類学上の検討を加えた論文を発表している。これらの研究に用いた菌株がベルギーの細菌のカルチャーコレクションの中核をなしているのだから、このコレクションの信

頼度は高い。教授は先年亡くなられた。猫背の教授にお目にかかれないのはさみしいことである。

第 13 回の研究会には、理研の微生物系統保存施設のお世話でベルギーの De Ley, J. 教授と同じ研究室の Kersters, K. 教授を招待し、whole-cell protein analysis と細菌の分類との関係を講演して頂いた。この研究手法は、同教授により開発されたもので、一種の蛋白質のパターン認識ともいえよう。酢酸菌をはじめ数々の細菌、酵母の分類に応用されている。同教授は、優れた研究者であるのみならず、人柄もよく、忘れがたい人である。

第 15 回の研究会には、東大の分生研の杉山先生のお骨折りで米国のデューク大学の Vilgalys, R. 教授を招待した。同教授は、菌類の種分化を調べる方法論や種概念の現代像について講演した。さらに、ヒラタケ属 (*Pleurotus*) の最新の研究成果を紹介しながら、生物地理学と分子系統学の統合的アプローチが異所的不連続化 (vicariance)、隔離機構、形態進化、生態的適応を含む種分化の様々な様相を理解するのに有用であることを示した。

第 20 回の記念研究会に招待する Vandamme, P. 博士は Kersters, K. 教授とともに polyphasic taxonomy に関する優れた総説 (21) を著している。そのなかで、現在用いられている化学分類学的手法の意義づけについて記されているので紹介しておく。

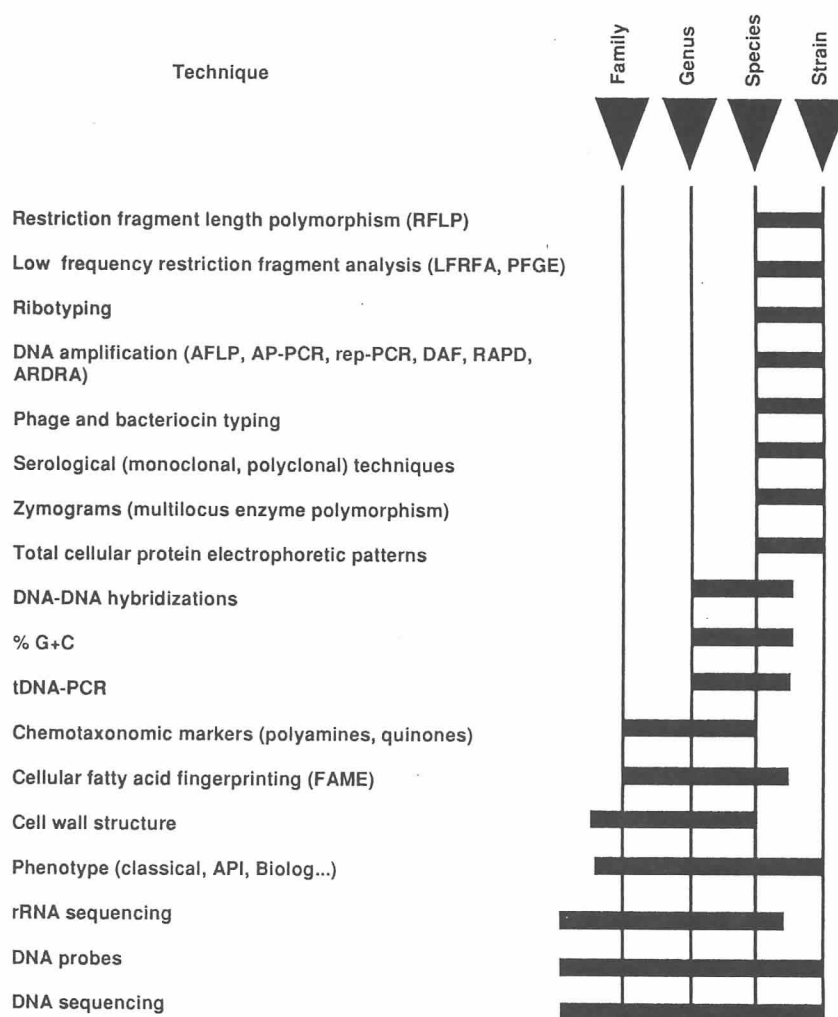
むすび

第 1 回の微生物の化学分類の勉強会は、当時農林省の食糧研究所におられた加藤清昭さんのお世話で林野庁の姥子保養所で開催した。二日目の朝も勉強会を開いた。帰

途, ある人が「この会はおっかない」といったのを覚えている. そのくらい熱気があった. その後もこの研究会は, 常に新しい分野を開きながら今日に至っている. ちなみに, 1999 年の International Journal of

Systematic and Evolutionary Microbiology には 222 編の論文が掲載されているが, そのうち 32 編, すなわち 14.4%がわが国の研究者の投稿である. この研究会のますますの発展を期待するものである.

図 2. Vandamme, P. ら (1996) による化学分類学的性状と階級との関係 (21)



本稿を執筆するにあたり, 倉石衍先生, 杉山純多先生, 小迫芳正さんから有益なご

助言を頂いた. ここに記して感謝の意を表す.

文献

1. Ainthworh, G. C. and Sneath, P. H. A. (eds.) *Microbial classification, The twelfth symposium of the Society for General Microbiology*, The Cambridge University Press, Cambridge (1962).
2. Asahina, Y. and Shibata, S. *Chemistry of lichen substances*, Japan Society for the Promotion of Science, Tokyo (1954).
3. Austin, B. and Priest, F. *Modern bacterial taxonomy*, Van Nostrand Reinhold, Berkshire (1986).
4. Bisby, F. A., Vaughan, J. G. and Wright, C. A. *Chemosystematics: principles and practice*, Academic Press, London (1980).
5. Cohn, F. *Untersuchungen über Bacterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzen.* **1**, 127- 224 (1872).
6. Cowan, S. T. *A dictionary of microbial taxonomic usage*, Oliver & Boyd, Edinburgh (1968).
7. Cowan, S. T. (eds. by Hill, L. R.). *A dictionary of microbial taxonomy*, Cambridge University Press, London (1978).
8. Goodfellow, M. and O'Donnell, A. G. (eds.). *Handbook of new bacterial systematics*, Academic Press, London (1993).
9. Goodfellow, M. and O'Donnell, A. G. (eds.) *Chemical methods in prokaryotic systematics*, John Wiley & Son, Chichester (1994).
10. Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. and Pegler, D. N. *Ainthworh & Bisby's Dictionary of the fungi*, 8th ed., p. 85, CAB International, Wallingford (1995).
11. Iizuka, H. and Hasegawa, T. (Editors-in-chief) *Proceedings of the first international conference on culture collections*, p.371, University of Tokyo Press, Tokyo (1970).
12. 木村資生 分子進化の中立説 紀伊国屋書店 東京 1986年(まとまったものとして本書をあげた)
13. Krieg, N. R. and Holt, J. G. (Editor-in-chief). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 1, p. 15, Williams & Wilkins, Baltimore (1984).
14. Logan, N. A. *Bacterial systematics*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1994).
15. Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. *Brock: Biology of microorganisms*, 9th ed., Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ 07458 (2000).
16. Raistrick, H., Birkinshaw, J. H., Charles, J. H. V., Clutterbuck, P. W., Coyne, F. P., Hetherington, A. C., Lilly, C. H., Rintoul, M. L., Rintoul, W., Robinson, R., Stoyale, J. A. R., Thom, C. and Young, W. *Studies in the biochemistry of micro-organisms. Phil. Trans.* **220B**, 1-367 (1931).
17. Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E. *Molecular systematics of prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol.* **37**, 143-187 (1983).
18. Smith, P. M. *The chemotaxonomy of plants*, Edward Arnold, London (1976).
19. 東京大学百年史編集委員会 東京大学百年史 部局史 三 応用微生物研究所 東京大学 東京大学出版会 東京 昭和62年(1987), 34-37頁
20. Trüper, H. G. and Krämer, J. *Principles of characterization and identification of prokaryotes. In*

- Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A. and Schlegel, H. G. (eds.), *The Prokaryotes*, vol. 1, p. 176-193, Springer-Verlag, Berlin (1981).
21. Vandamme, P., Pot, B., Gills, M., De Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* **60**, 407-438 (1996).
 1. Woese, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271 (1987). (まとまっているものとしてこの総説をあげた).
 23. Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 4576-4579 (1990).
 24. Yamada, K. and Komagata, K. Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. Classification of coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **18**, 417-431 (1972).
 25. 山田常雄 前川文夫 江上不二夫 八杉竜一 小関治男 古谷雅樹 日高敏隆 編集
岩波生物学辞典 第2版, 岩波書店, 東京 (1977).
 26. 山田常雄 前川文夫 江上不二夫 八杉竜一 小関治男 古谷雅樹 日高敏隆 編集
岩波生物学辞典 第3版, 岩波書店, 東京 (1983).
 27. Zuckerkandl, E. and Pauling, L. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theoret. Biol.* **8**, 375-466 (1965).

2 分類手法の 20 年の歩み

DNA 塩基組成と DNA 類似度

江崎孝行

はじめに

微生物の遺伝子の持つ情報が細菌の分類に利用されだしたのは 1960 年代で Watson-Crick の DNA モデルが発見されて 10 年足らずのことである。二本鎖の DNA を一本鎖に解離させると吸光度が増大し、DNA の G+C 含量と一定の関係があることが解明され、DNA の塩基組成の測定を吸光度で測定する方法が普及するきっかけとなった。それまで DNA の塩基組成は超遠心法 (Buoyant Density 法) (7) が中心で高価な超遠心器を使わなければならないため、容易には計測できなかった。分光高度計の測定波長を 260 nm にして DNA が入ったセルを徐々に加熱し吸光度を計測し、DNA の融解曲線から塩基組成を計測する Tm 法 (8) は比較的容易に実験できるので普及した。DNA の類似度を計測する DNA 類似度の実験方法として 1960 年代に membrane filter 法が開発されたが、吸光度計のセルの中で DNA のハイブリッド形成率を吸光度から予測する方法も 1970 年代の初期には確立された (3)。

DNA の塩基組成

1979 年大学院を休学して Virginia Polytechnic Institute (VPI) で Moore, W. E. C., Hodemann, R. および Jhonsn, J. の嫌気性菌の研究所で分類学的な手法を学んできた時期は Gilford 社の 6 連のセルを使用し

Tm 方法で DNA の G+C 含量を計測する方法が主流を占めていた。DNA の類似度の計測に membrane filter 法 (4) が導入され、アイソトープで標識した DNA を使い DNA の類似度を計測していた。同じ時期に米国 Center for Disease Control (CDC) の Brenner, D. J. を中心とするグループは hydroxyapatite を使った DNA 類似度の計測法を使用して多くのデータを出していた (6)。

第 3 回の化学分類研究会 (1983 年) からこの会に参加し勉強をさせていただいたところ、発表される DNA の G+C 含量や DNA 類似度のデータは Tm 法と membrane filter 法がほとんどであった。1980 年に米国から帰国し実験室で DNA の G+C% を測定する環境を作ろうとしたが、国内には Tm 法で多くの DNA の G+C% を同時に測定する機器がなく米国の Gilford の機器しかなく、高価で実験室に設置できなかった。自分で分光器メーカーに依頼し 6 連のセルを備えた Tm の測定装置を作り 1990 年頃まで使用してきた。その後、国内でも DNA の G+C% を測定できる加温式の分光高度計が市販されるようになったがセルが一つで正確な Tm が測定できないので失望した記憶がある。Tm はイオン濃度に影響されるので必ずコントロールの DNA (通常は大腸菌 B 株を使用) を準備し、両方の DNA を同じ緩衝液に入れて透析することでイオ

ン濃度を同じくし、同時に T_m を計測しなければ正確なデータはでない。この分光高度計を使う方法では T_m を計測するには貴重な DNA の量が沢山いるため何とか量を減らす方法がないのかと知恵を絞った時期であった。1985 年の第 4 回の化学分類研究会でヤマサ醤油の研究グループ、及び東京農工大、東大応微、及び理研から HPLC を使った分析方法が報告された (9)。我が国ではこの発表以後、DNA の G+C 含量の計測方法は急激にこの HPLC 法に傾いていった。この方法が普及した背景は HPLC という比較的安価な分析機器を使用すること、使用する DNA の量が少なくてすむことがあげられる。さらに DNA の G+C 含量を計測するために正確に計測された ATGC 塩基の等モルの標準物質が入手できるようになったのも重要な背景にある。私も従来の T_m 法を見捨て早速 HPLC 法をつかった DNA の G+C 含量の計測方法を使用し研究室では単一集落から抽出した DNA で DNA の G+C 含量が簡単に計測できるようになった (2)。

DNA の G+C 含量の計測は容易になったが HPLC を使用して測定しているうちに次の問題点が出てきた。逆相カラムを時間をかけて安定化させないと正確な定量ができないこと、常に標準物質を準備しておかなければならないことの二点である。時間をかけて DNA の G+C 含量をゆっくり計測するにはこの方法で問題はないが、我々は分離した菌株の集落から迅速に抽出し、DNA ハイブリッド法で菌種を同定する方法を作成していたため、DNA の G+C 含量を迅速に計測し、次のステップである DNA 類似度の実験の温度条件を決めなければならない必要に迫られていた。

そのために HPLC のカラムの条件が安定するまで 1 日待つて計測することはできなかった。

1990 年代後半になって Syber Green I という二本鎖の DNA に取り込まれると蛍光を出す物質が使用できるようになった。この方法を使って DNA の G+C 含量が迅速に計測できないかと考えるようになった。PCR の機械を使って DNA の入った毛細管を加熱していくと DNA が次第に一本鎖になる。その際に蛍光強度が減少していく。これをモニターして蛍光の減少曲線を微分すれば T_m が簡単に計算できることになる。毛細管では反応液は 10-20 マイクロリットルですむのと測定が数分で完了するので迅速性にも優れている。

1999 年の第 18 回の化学分類研究会でこの方法を発表した。その後、従来の T_m 法の計算式で不正確であった DNA の G+C 含量が高い領域の T_m の計算式を新たに提案しより正確にしかも迅速に T_m を計測する蛍光 Capillary 法を提案した (10)。

DNA 類似度

DNA の類似度を測定するハイブリッド法には液体中で行う液相法と非標識の DNA を固定する固相法の 2 通りの方法がある。化学分類研究会に参加した 1980 年代の初期は多くの研究者が membrane filter を使った固相法を使ってハイブリッドの形成実験を行っていた。この方法は一本鎖にした DNA をニトセルロースに固定しアイソトープで標識した DNA と反応させる方法で大量の DNA が必要になる。培養しにくい細菌、大量に DNA を回収することが難しい細菌、細胞壁の破壊が難しいグラム陽性菌などへ応用するには多くの障害があ

った。私も培養が難しい嫌気性グラム陽性球菌を 10 リッターほど培養し DNA を抽出しようとしたがエタノール沈殿でさせる段階でガラス棒に巻き付くはずの DNA が全く回収されないといった経験を何度も繰り返した。破壊が困難な細菌からいかにして DNA を回収するかといったノウハウはこの化学分類研究会の夜の部の会議で若手研究者と情報交換することができた。泊まり込みで交流と勉強を積み重ねてきた会の重要な一面であった。細菌の破壊に CO₂ ビーズシェーカー、フレンチプレス、など本に標準的に記載されている方法だけでなく、酸化アルミナと菌を混ぜ乳鉢で摩擦させて壊す方法、凍結融解を加えて破壊させる方法など、ちょっとした研究者のアイデアが加わり、効果的な破壊方法を見つけることができた。このような喜びを化学分類研究会を通じて知り合った会員と分かち合うことができた。おかげで現在ではどのような細菌でも破壊することができるという自信とそのプロトコルを保有している。

Membrane filter 法で DNA ハイブリッド形成実験を行っていたころ次の 2 つのことが問題となった。一つは DNA を大量に準備しなければならない欠点、もう一つはアイソトープを使用しなければならない点である。この二つをなんとか改善しようということで 1980 年代の中頃から市販の 96well のマイクロプレートを使って定量的なハイブリッド形成実験を開始した。1988 年の第 8 回化学分類研究会で biotin 標識 DNA を使って ELISA の原理を利用し蛍光法でハイブリッド形成 DNA を定量する方法を報告した。この方法の開発により DNA ハイブリッド法の実験が一般の実験室で簡単に実施できるようになった (1)。その後

研究会の多くの先生方がこの方法を使用して論文を書いていただいたため広く知られるようになった。またこの方法を使って抗酸菌やレジオネラなどの同定方法として臨床検査でルーチンに使用されるようになっていく (5)。

しかしこの方法を使用しているうちに新たな問題がわかってきた。DNA をマイクロプレートに固定する際、プレートの DNA 吸着量が少ないため、多糖体が混入していると DNA が固定されにくいことがわかってきた。通常 DNA の純度を測定する場合、260nm/280nm の吸光度を計測する。ところが此の検定では多糖体が混じっていてもわからない。糖を硫酸法などで発色させ定量することも可能だが煩雑なため一般には行われていない。

そこで我々は実験を液体中に行えば反応液に糖が混入していても影響を受けないことに着目し、次のステップの DNA ハイブリッド法を液体中で行う液相法の開発に没頭した。片方の DNA を Biotin で標識し、液体中で反応させ ハイブリッドを形成した biotin DNA を回収する。回収したハイブリッドに Syber Green1 を加えて二本鎖になった DNA を定量する方法を作成し 1999 年の第 19 回化学分類研究会で発表した。この方法はまだ第三者の評価を受けていないが方法が簡便で液体で反応させることからハイブリッドの形成時間が 30 分～60 分でよいことから将来は菌の同定にも利用できると考えている。

DNA ハイブリッド形成法で菌種の同定と分類を初めて 20 年が経過した。1980 年代は実験の反応液は試験管で行っていたため 1ml、1980 年代の後半にはマイクロプレートを使用するようになり 100 μ l と微量化

が進んだ。1990年代の後半には液相法を使い、さらに10-20 µlで実験ができるようになった。2000年を迎え現在はDNAのマイクロアレイを使用するようになったため(19回化学分類研究会で発表)ナノリットルと微量化に拍車がかかっている。

化学分類研究会の20年の歴史の中で会員の先生方の支援と批評を受けながら、方法論の改良に情熱を燃やすことができた。

現在、生物の分類に系統分類学が導入され、Small ribosomal RNA subunitの配列が系統

分類の構築に重要な貢献をしている。そのデータが蓄積されるに従い、菌種の定義に関心が高まっている。16S rDNA配列が蓄積されるに従い、此の配列情報だけでは菌種が決定できないことがわかってきており、最終的な菌種の決定に“70%以上のDNA-DNAハイブリッドを安定に形成する菌株の集団が菌種である”という国際微生物連合・国際細菌分類命名委員会の特別委員会の勧告の持つ重要性がますます高まっている(11)。

文献

1. Ezaki, T., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 224-229. (1989).
2. Ezaki, T., Saidi, S. M., Liu, S. L. Hashimoto, Y., Yamamoto, H. and Yabuuchi, E. Rapid procedure to determine the DNA base composition from small amounts of Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**, 127-130. (1990).
3. De Ley, J. H. Carroir, and Reynaerts, A. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.*, **12**, 133-142. (1970).
4. Gillespie, D. and Spiegelman, S. A quantitative assay for DNA. RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. Mol. Biol.* **12**, 829-842. (1965).
5. Kusunoki, S., Ezaki, T., Tamesada, M., Hatanaka, Y., Asano, K., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* species. *J. Clin. Microbiol.* **29**, 1596-1603. (1991).
6. Lachance, M. A Simple method for determination of deoxyribonucleic acid relatedness by thermal elution in hydroxyapatite microcolumns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 433-436. (1980).
7. Mandel, M. L. Igambi, J. Bergendahl, M. L. Dodson, Jr and Scheltgen, E. Correlation of melting temperature and cesium chloride buoyant density of bacterial deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **101**, 333-338. (1970).
8. Marmur, J. and Doty, P. Determination of the base composition of DNA from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Microbiol.* **5**, 109-118. (1962).
9. Tamaoka, J. and Komagata, K. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* **25**, 125-128. (1984).

10. Xu, H. X., Kawamura, Y., Li, N., Zhao, L. Li, T. M., Li, Z. H., Shu, S. and Ezaki, T. A rapid method to determine the G+C content of bacterial chromosomes by monitoring fluorescence intensity during DNA denaturation in a capillary tube. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1463-1469. (2000).
11. Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. D. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. and Truper, H. G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 463-464. (1987).

はじめに

脂質は化学分類学的指標として用いられる微生物の生体成分の中で、充実した分析法、分布の普遍性、そして構成成分の多様性といずれにおいても優れたマーカーであるといえる。酵母や糸状菌では蓄積脂質としてのトリグリセリドの存在が知られているが、細胞の主要な脂質は膜に存在する極性脂質であり、さらにその構成成分である脂肪酸が分類指標としてよく使われる。また、一部の細菌にしか存在しないが、ミコール酸は、分類のみならず、生化学的にも興味深い材料である。菌体脂肪酸組成は微生物化学分類研究会でもいろいろな微生物群の特徴づけに用いられるとともに、その評価法にも多くの興味深い発表が行われてきた。一般に化学分類学的性状は遺伝子の解析による系統分類をよく反映していると評価されているが、基盤となる分類体系が未熟であった 1950-60 年代には分類群の不均一性として結論づけられてしまっていたものも多い。いずれにせよ、細菌の多様な脂質成分は分析化学、生化学に興味深い材料を提供すると同時にその成果は細菌分類学にとって貴重な情報として蓄積された (11)。本稿では日本での研究を中心に、その流れを解説する。多くの関連講演があり、本研究会の貢献するところも少なくない。総説的な発表は矢野 (38)、藪内 (37) 鈴木 (27) が行っている。

菌体脂肪酸

菌体脂肪酸の分析の細菌分類への応用は、日本でも早くから行われ、石塚ら (8)、植田ら (35)、岡見ら (21)、内田らの研究 (34) 及び総説 (33) がある。細菌では分子種も多様であり、分析は全菌体をメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーで定量分析できるので、大量処理も容易でランニングコストも安価である。海外では Moss, C. W. とその研究グループが 1970 年代初頭からグラム陰性細菌の解析していた (17, 18) が、日本でも 1970 年代後半には普及した。Moss, C. W. は第 2 回の研究会で特別講演を行っている。日本の研究の特徴は、菌体脂肪酸組成を表現性状のひとつと捉え、生理・生化学試験、キノン系などのその他の性状と組み合わせて多相分類学の形でまとめられていることが多いことである (1, 9, 10)。嫌気性細菌 (16)、酵母の分類への応用も試みられた (19, 25)。

菌体脂肪酸は、主要成分が分類群を記載する特徴として有効であるばかりではなく、パターンとしてその組成を数値解析することにより、類似度の計算を行い、データベースから近似の微生物株の検索やデンドログラム(樹状図)を作成することができ、また多数の未同定株のグルーピングや代表株の選抜にも利用することができる (6, 24)。米国の MIDI (Microbial Identification System, 115 Barksdale Prof. Center Newark, DE 19711, U.S.A.) では、ガスクロマトグラフ、カラム、解析ソフト、標準物質のすべてを標準化し、データベースと合わせて販売し、世

界的標準になっている。

1) グラム陰性細菌

好気性のグラム陰性細菌の多くは C16:0, C18:1, C16:1, C18:0 といった直鎖偶数の飽和及び不飽和酸を主要成分とし, 3 ヒドロキシ酸, シクロプロパン酸を含む (6, 11, 17). *Flavobacterium-Cytophaga complex* と *Stenotrophomonas maltophilia* は例外的に iso-C15:0 などの分枝酸を主成分としている (7, 18, 22). 研究会では *Thiobacillus* 属 (10), *Alteromonas* 属 (9), *Alcaligenes* 属 (1), メタノール資化性細菌 (36) 及びこれらの関連細菌について多くの話題が提供され, 他の性状と合わせて polyphasic な議論が行われた。

2) グラム陽性細菌

放線菌も含め, グラム陽性細菌の菌体脂肪酸は大きく 3 群に分けることができる。すなわち, (I) 直鎖の飽和とモノ不飽和脂肪酸を主成分とするもの, (II) イソ, 及びアンテイソの分枝脂肪酸を主成分とし, 不飽和脂肪酸をほとんど含まないもの, (III) 両者を併せた多くの種類の成分を持つものである。研究会ではいわゆるコリネフォルム細菌について鈴木(23) が発表しているほかには特に発表はない。

3) 真菌と藻類

細菌では二重結合が 2 つ以上の脂肪酸は原則として存在しないが, シアノバクテリア, 真菌および藻類では高度不飽和酸の分離定量が必要である。脂肪酸分子種の多様性は乏しいので, 定性的に特徴づけることは難しいが, 接合菌類の *Mortierella* 属では主要脂肪酸は C18:1 であるが C20 の不飽和酸の有無が亜属に対応していることが研究会で報告された(2)。MIDI には酵母のデータベースもある。

4) ヒドロキシ脂肪酸

グラム陰性細菌にはリポ多糖を含む特有の細胞表層があり, これに由来する 3 ヒドロキシ (3-OH)脂肪酸は, 細胞膜リン脂質とは違った局在性を示す。Oyaizu and Komagata (23) は, この 3-OH 脂肪酸の分布を調べ, その組成は, *Pseudomonas* 属及び関連細菌の分類に有効であることを示し, その結果は, rRNA ホモロジーグループが *Burkholderia*, *Comamonas* などの属レベルの分割を支持する表現性状となった。横田と坂根 (43) は *Rhizobiaceae* の細菌に適用し, *Bradyrhizobium japonicum* は種内はホモロジーグループに関係なく共通, *Rhizobium* 属では, 4 種が知られているが, 3-OH-anteiso-C15:0, 3-OH-iso-C13:0, 3-OH-iso-C15:0 の有無によって種ごとの特徴が示されることを明らかにした。

微生物分類研究会で特に話題が集まったのは *Sphingomonas paucimobilis* 及びその関連細菌で, これらはグラム陰性細菌であるにもかかわらず, リポ多糖層を持たないので, 3-OH 脂肪酸がなく, 代わりにスフィンゴ糖脂質を持つ (13)。そしてこの成分として 2-OH 脂肪酸が検出される。このスフィンゴ糖脂質の局在性を調べたところ, 一般のグラム陰性細菌の細胞外膜の代わりをしている可能性が示唆された (14)。これらの細菌は, *Proteobacteria* α サブクラスの分類の視点からも興味を持たれている (31)。

5) 特殊な脂肪酸

細菌には, 他の生物には存在が知られていない特有の脂肪酸としてイソ, アンテイソ分枝酸が広く分布していることが知られている。他にも興味深い構造の脂肪酸が身近の細菌にも見いだされ, 分類学的にも議論された。

a) ω -シクロヘキシル脂肪酸

ω -シクロヘキシル脂肪酸は、好酸好熱性グラム陽性芽胞桿菌の *Alicyclobacillus acidocaldarius* に見いだされ、酸性環境や高温環境に適応する脂質の構成成分と考えられていた。Suzuki et al. (29) は *Curtobacterium* 属細菌の菌体脂肪酸を調べている過程で、唯一 *C. pusillum* においてこの脂肪酸を主要成分としていることを見いだした。本種は、分類学的には *Curtobacterium* 属の性状を満たしており、また、イソ・アンテイソ分枝酸も含むこと、この脂肪酸の比率は培地のグルコースの量に及び培養温度に比例して増加することなどから、イソ・アンテイソ型の菌体脂肪酸タイプのひとつのバリエーションと考える。

b) 不飽和アンテイソ脂肪酸。

Microbacteriaceae の新属新種として発表された *Cryobacterium psychrophilum* は Inoue and Komagata によって南極の土壌から分離された好気性のグラム陽性細菌で、20°C以上では生育しない絶対好低温細菌である。基本的にはイソ・アンテイソ分枝型で *Family Microbacteriaceae* に共通のものであるが、アンテイソ型の不飽和脂肪酸を著量に含有する点が特徴である (30)。元来、アンテイソ脂肪酸は融点が低く、多くのグラム陽性細菌で見られるアンテイソ酸を主成分とするタイプには不飽和脂肪酸がほとんど含まれない。このアンテイソ不飽和脂肪酸の主成分 anteiso-15:1 は培養温度が低くなるほど組成比は高くなり、4°Cで 26%に達する。ただし、この細菌の生育温度上限

に近い 17°Cでは 4%程度にまで減少する。一方、ほかの類縁細菌をこのような低温環境で培養すると、若干の anteiso-15:1 に相当する脂肪酸のピークが出現し、環境適応としての菌体脂肪酸組成の変動としてきわめて合理的な反応を示す。この脂肪酸の二重結合の位置はまだ明らかになっていない。

c) 12-Me-C17:0

Rubrobacter radiotolerans は、鳥取県の三朝温泉から分離された高度放射線耐性のグラム陽性桿菌である。Suzuki et al. (28) は、この細菌は 12-methylheptadecanoic acid (12-Me-C17:0) という特異な脂肪酸を主成分としており、この種に対し新属を提案した。この組成において、主成分の分枝脂肪酸に関連する同族体も対応する不飽和脂肪酸もほとんど検出されず、その他には若干の 2-ヒドロキシ脂肪酸が存在するだけであり、その局在性と合わせて興味を持たれる。その後提案された本属の 2 番目の種も同様な分枝脂肪酸を持つことが報告されている (5)。

4) 脂肪酸合成から見た菌体脂肪酸組成

菌体脂肪酸組成という表現形質は FAS と呼ばれる脂肪酸合成酵素による骨格の合成を基本とし、それを制御する要因と付加的な反応をする過程を経て形成される。合成系のプロフィールもひとつの分類指標とすることができると同時に脂肪酸組成の分類指標としての評価に重要な情報を提供している (27, 32)。

a) 脂肪酸合成酵素のプロフィール

脂肪酸合成は 7 段の触媒反応の反復で行われる。一般に細菌の脂肪酸合成酵素は、植物と同様に、各酵素が独立

のタンパクとして膜に局在するタイプ (FAS-II)であるのに対し、ミコール酸含有菌群と菌類は1つの巨大なタンパクが合成の全機能をもつ複合酵素であることが知られ、これは動物と同じで FAS-I と呼ばれる。細菌には2つのタイプがともに存在し、さらに *Corynebacterium* 属の中に同じ FAS-I でも不飽和酸を合成するものとしないうものが存在するなど、生産物だけではわからない興味深い特徴も存在する (3)。

また、脂肪酸合成開始のプライマーが脂肪酸種を決定するが、その基質特異性について、 ω -シクロヘキシル脂肪酸をもつ *C. pusillum* の脂肪酸合成酵素を用いて研究され、脂肪酸分子種を決定するのはアシル-CoA からアシル基をアシルキャリアータンパク (ACP) に転移する酵素の特異性であることが明らかとなった (12)。

b) 二次的反応

菌体脂肪酸は、細胞の持つ脂肪酸のある時点での一断面を見ているのであるが、実際は細菌では脂肪酸は脂肪酸合成酵素によって作られ、リン脂質などの構成成分になるとともに、二次的な反応による生成物も含んでいる。10メチル分枝酸及びシクロプロパン酸が不飽和脂肪酸に S-アデノシルメチオンが付加した脂肪酸であることはよく知られているが、リン脂質を形成する脂肪酸が α 酸化を受け、2-OH 酸となったり、さらに酸化されて炭素数が1少ない脂肪酸になる現象も Yano et al. (41, 42) によって報告されている。このような反応が一部の放線菌に見られる複雑な組成の原因となっていると思

われ、菌体脂肪酸組成をどのようにすれば安定した分類指標として扱えるかを考えさせられる。

c) 不飽和脂肪酸の分類学的意義

脂肪酸の二重結合の合成は鎖長伸長過程で作られるものと、完成した飽和脂肪酸が後から不飽和化されるものがある。後者が酸素を使って不飽和化酵素の作用で行われるので好氣的不飽和化と呼ばれるのに対し、前者は嫌氣的不飽和化と呼ばれる。一般に多くのグラム陰性細菌や乳酸菌では嫌氣的不飽和化が行われ、*Bacillus*, *Mycobacterium* などでは好氣的不飽和化が主体であるとされている。*Corynebacterium* 属では、*C. diphtheriae* が好氣的、*C. ammoniagenes* が嫌氣的と両方が見いだされ、その分布に興味を持たれている (3)。

ミコール酸

ミコール酸は抗酸菌類に特徴的な脂質成分として古くから研究されてきた。その分布は *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium* など、Class *Actinobacteria* の Suborder *Corynebacterineae* に限られ、これらの細菌に特徴的な細胞表層の疎水性を維持している (4, 38)。ミコール酸とは 2アルキル-3 ヒドロキシ脂肪酸で、大部分は細胞壁の多糖層に結合したり、コードファクターと呼ばれるトレハロース-6,6'-ジミコール酸のような糖脂質として存在するほか、遊離のものも抽出される。総炭素数は 26 から 90 に達する。

分析法としては、まず菌体脂肪酸と同様に全菌体をメチルエステル化し、TLC によって全体的なパターンを見る。さらに、ミ

コール酸を TMS 誘導体とし、そのガスクロマトグラフィーによってミコール酸の総炭素数ごとの分布と組成を調べることができる。さらにガスクロマトグラフ-質量分析を行うことによってミコール酸の主鎖と側鎖それぞれの鎖長、あるいは官能基を知ることができる (40)。ミコール酸の分析法、生化学及び細菌分類、臨床への応用は矢野とその研究グループによって精力的な研究が行われ、世界的にも主導的な成果を上げるとともに、本研究会でも多くの発表がある。

ミコール酸は、およその炭素数の分布が分類群と相関性を示し、もっとも短いもので *Corynebacterium* 属の C26-36 から、長いものでは *Mycobacterium* 属が C60-90 に分布する (39)。そのほか、*Dietzia* 属のミコール酸は、*Corynebacterium* 属と同程度に短い、偶数酸と奇数酸がほぼ等量あることを特徴とし、*Tsukamurella* 属は、*Mycobacterium* 属に匹敵する 62-78 という炭素鎖長を持つが、不飽和度が 3-6 と高く、低温での生育と関連が示唆される (20)。

極性脂質

リン脂質は、グラム陽性細菌を特徴づけるのに有効なことが多く、放線菌ではリン

脂質タイプとしてパターン分けがされている。たとえばフォスファチジルエタノールアミンの有無によって *Rhodococcus* 属と *Corynebacterium* 属が区別できる (15)。一般に二次元 TLC を用い、特異的な発色で同定する。このような分類としての利用が研究会で演題のテーマとして取り上げられたことはないが、スフィンゴ糖脂質やミコール酸含有糖脂質に関する報告は前述の通りである。これからは HPLC を利用した迅速な定量的な分析法が分類に応用できるようになることが期待される。

まとめ

菌体脂肪酸は初期の化学分類研究会では相対的に大きな割合を占めていた。その後他にも多くの手法が登場したが、現在も有効な指標として評価されている。菌体脂肪酸を用いた同定システムとして開発された MIDI では、16S rDNA の塩基配列情報と組み合わせるシステムに発展し、表現性状の代表とでもいえる情報源のひとつになっている。本稿の後半で述べたように、菌体脂肪酸組成が決定されるまでも複雑な制御と反応が関与しており、これらの遺伝子レベルでの解析も興味深い。まだこれからの展開が待たれる指標である。

文献

1. 赤川昌世 グラム陰性好気性海洋細菌の化学分類 第 7 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 5-7 (1987).
2. 天野典英 川島洋 天知輝夫 清水昌 山田秀明 *Mortierella* 属 (真正菌門・接合菌亜門) の化学分類学的研究 - 特に菌体脂肪酸組成の分類学的意義について - 第 9 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 25 (1989).
3. Ariga, N., Maruyama, K. and Kawaguchi, A. Comparative studies of fatty acid synthases of corynebacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **30**, 87-95 (1984).
4. 馬場恒子 束村道雄 西内由紀子 矢野郁也 *Nocardia asteroides*, *N. nova*, および *N.*

- farcinica* のミコール酸分子種組成による分類と type strain の是非について 第 10 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 21-22 (1990).
5. Carreto, L., Moore, E., Nobre, M. F., Wait, R., Riley, P. W., Sharp, R. J. and Da Costa, M. S. *Rubrobacter xylanophilus* sp. nov., a new thermophilic species isolated from a thermally polluted effluent. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 460-465 (1996).
 6. Ikemoto, S., Kurahashi, H., Komagata, K., Azuma, R., Suto, T. and Murooka, H. Cellular fatty acid composition in *Pseudomonas* species. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **24**, 199-213 (1978).
 7. Ikemoto, S., Suzuki, K., Kaneko, T. and Komagata, K. Characterization of strains of *Pseudomonas maltophilia* which do not require methionine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 437-447 (1980).
 8. Ishizuka, I., Ueta, N. and Yamakawa, T. Gas chromatographic studies of microbial components II. carbohydrate and fatty acid constitution of the family *Micrococcaceae*. *Jpn. J. Exp. Med.* **36**, 73-83 (1966).
 9. 伊藤 隆 *Alteromonas putrefaciens* の化学分類学的研究について 第 4 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 6 (1985).
 10. Katayama-Fujimura, Y. Significance of cellular fatty acid composition, quinone system, and GC-content of DNA on the taxonomy on the genus *Thiobacillus*. Workshop on Chemotaxonomy at Katsunuma (1981).
 11. Kates, M. Bacterial lipids. *Adv. Lipid Res.* **2**, 17-90 (1964).
 12. Kawaguchi, A., Uemura, N. and Okuda, S. Characterization of the fatty acid synthetase system of *Curtobacterium pusillum*. *J. Biochem.* **99**, 1735-1742 (1986).
 13. 川原一芳 松浦基博 檀原宏文 通常のリポ多糖を含まないグラム陰性細菌 *Sphingomonas paucimobilis* の糖脂質の化学構造 第 9 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 3-4 (1989).
 14. 川崎聡子 川原一芳 *Sphingomonas paucimobilis* の細胞表層構造 第 12 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 7-8 (1992).
 15. Komura, I., Yamada, K., Otsuka, S. and Komagata, K. Taxonomic significance of phospholipids in coryneform and nocardioform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **21**, 251-261 (1975).
 16. 宮川栄一 嫌気性細菌の菌体脂肪酸組成 第 1 回微生物の化学分類の勉強会 (1980).
 17. Moss, C. W., Samuels, S. B. and Weaver, R. E. Cellular fatty acid composition of selected *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* **24**, 586-598 (1972).
 18. Moss, C. W., Samuels, S. B., Liddle, J. and McKinney, R. M. Occurrence of branched-chain hydroxy fatty acids in *Pseudomonas maltophilia*. *J. Bacteriol.* **114**, 1018-1024 (1973).
 19. Moss, C. W., Shinoda, T. and Samuels, J. W. Determination of cellular fatty acid compositions of various yeasts by gas-liquid chromatography. *J. Clin. Microbiol.* **16**, 1073-1079 (1982).
 20. Nishiuchi, Y., Baba, T. and Yano, I. Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia*, and *Dietzia*. *J. Microbiol. Methods* **40**, 1-9 (2000).

21. Okami, Y., Hamada, M. and Ueda, N. Relationship between genera of actinomycetes with reference to gas chromatographic analysis. In H. Iizuka & T. Hasegawa, (eds.), Proceedings of the 1st International Conference on Culture Collections, p. 457-475, University of Tokyo Press, Tokyo (1970).
22. Oyaizu, H. and Komagata, K. Chemotaxonomic and phenotypic characterization of the strains of species in the *Flavobacterium-Cytophaga* complex. J. Gen. Appl. Microbiol. **27**, 57-107 (1981).
23. Oyaizu, H. and Komagata, K. Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special references to the existence of 3-hydroxy fatty acids. J. Gen. Appl. Microbiol. **29**, 17-40 (1983).
24. Saddler, G. S., O'Donnell, A. G., Goodfellow, M. and Minnikin, D. E. SIMCA pattern recognition in the analysis of streptomycete fatty acids. J. Gen. Microbiol. **133**, 1137-1147 (1987).
25. 須藤恒二 酵母の菌体脂肪酸組成 第1回微生物の化学分類の勉強会 (1980).
26. Suzuki, K. Cellular fatty acid composition in coryneform bacteria. Workshop on Chemotaxonomy at Katsunuma (1981).
27. 鈴木健一郎 菌体脂肪酸組成 第6回微生物化学分類研究会要旨集 p. 9 (1986).
28. Suzuki, K., Collins, M. D., Iijima, E. and Komagata, K. Chemotaxonomic characterization of a radiotolerant bacterium, *Arthrobacter radiotolerans*: description of *Rubrobacter radiotolerans* gen. nov., comb. nov. FEMS Microbiol. Lett. **52**, 33-40 (1988).
29. Suzuki, K., Saito, K., Kawaguchi, A., Okuda, S. and Komagata, K. Occurrence of ω -cyclohexyl fatty acids in *Curtobacterium pusillum* strains. J. Gen. Appl. Microbiol. **27**, 261-266 (1981).
30. Suzuki, K., Sasaki, J., Uramoto, M., Nakase, T. and Komagata, K. *Cryobacterium psychrophilum* gen. nov., sp. nov., nom. rev., comb. nov., an obligately psychrophilic actinomycete to accommodate "*Curtobacterium psychrophilum*" Inoue and Komagata 1976. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**, 474-478 (1997).
31. 武内真理子 坂根健 柳美代子 山里一英 横田明 植物から分離された 3-ケトラクトース生成能を示す *Sphingomonas* 属細菌の分類学的検討 第13回微生物化学分類研究会要旨集 p. 24-25 (1993).
32. 内田金治 細菌の菌体脂肪酸と分類 I. 細菌脂肪酸の構造と生合成 醜協誌 **32**, 471-483 (1974).
33. 内田金治 細菌の菌体脂肪酸と分類 II. 各種細菌の脂肪酸組成ととその分類学への応用 醜協誌 **33**, 212-226 (1975).
34. Uchida, K. and Mogi, K. Cellular fatty acid spectra of *Sporolactobacillus* and some other *Bacillus-Lactobacillus* intermediates as a guide to their taxonomy. J. Gen. Appl. Microbiol. **19**, 129-140 (1973).
35. Ueta, N., Ishizuka, I. and Yamakawa, T. Gas chromatographic grouping of bacteria. In H. Iizuka & T. Hasegawa, (eds.), Proceedings of the 1st International Conference on Culture

Collections, p. 371 - 381, University of Tokyo Press, Tokyo (1970).

36. 浦上貞治 C1 化合物資化性細菌の分類 第 7 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 1-2 (1987)
37. 藪内英子 細菌分類の鍵としての菌体脂質・脂肪酸組成 第 12 回微生物化学分類研究会要旨集 p.9 (1992).
38. 矢野郁也 ミコール酸の分子種形成による *Mycobacterium* 及びその関連細菌の化学分類学的研究. 第 4 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 12-15 (1985).
39. 矢野郁也 抗酸菌の化学分類とその臨床的意義について 第 12 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 21 (1992).
40. 矢野郁也 西内由紀子 上田定男 藤井平 キャピラリー GC/MS および FAB/MS によるミコール酸分子種分離・同定 第 13 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 14-15 (1993).
41. Yano, I., Furukawa, Y. and Kusunose, M. Conversion of α -hydroxypalmitic acid to pentadecanoic acid by resting cells of *Arthrobacter simplex*. J. Gen. Appl. Microbiol. 17, 429-432 (1971).
42. Yano, I., Furukawa, Y. and Kusunose, M. α -Oxidation of long chain fatty acids in cell free extracts of *Arthrobacter simplex*. Biochim. Biophys. Acta. 239, 513-516 (1971).
43. 横田明 坂根健 *Rhizobiaceae* 細菌の菌体脂肪酸組成とその分類学的意義 第 9 回微生物化学分類研究会要旨集 p. 1-2 (1989).

ユビキノンとメナキノン

山田雄三

はじめに

1966年、筆者らは新規酵素、フラクトース脱水素酵素 (EC 1.1.99.11) を、酢酸菌に見出した。本酵素は D-フラクトースの 5-ケト-D-フラクトースへの酸化を触媒、細胞質膜に結合する脱水素酵素であり、呼吸鎖に連繋する時、ユビキノン 10 (Q-10) の関与が認められた。その酵素の菌株間分布は、酢酸菌、とくに、*Gluconobacter* Asai 1935 に属する菌株に限られた。その酵素の精製と酵素化学的諸性質の検討を IFO 3267 株に求めた。本菌株は、後年、*Gluconobacter cerinus* Yamada and Akita 1984 の基準株とされた。

Gluconobacter cerinus IFO 3267 に見い出された Q-10 は、当然、他の酢酸菌のユビキノン分子種分布の研究へと導いた。その理由は、当時、大腸菌は Q-8、*Pseudomonas* は Q-9 であり、Q-10 を示す細菌は異例であったからである。その菌株間分布は、*Acetobacter* Beijerinck 1898 には Q-9、*Gluconobacter* には Q-10 が、主たるキノンとして、存在した。また、このユビキノン分子種の分布は、取り扱った総ての菌株には、「例外」は認められなかった。この研究成果を、当時、筆者の所属する東京大学応用微生物研究所第四研究部 (微生物生理研究部門) の雑誌会で発表、その結びに、キノン分子種は酢酸菌の分類同定、とくに、*Acetobacter* と *Gluconobacter* の分別には、化学的に定義付けられ、広く、微生物の分類同定のクリテリアの 1 つとして使用されうるとした (16)。

1964年、朝井ら (1) は、酢酸菌に、2種類

の中間株の存在を報告した。ユビキノン分子種では、中間株は、決定的に、異なっていた (16)。すなわち、周鞭毛の中間株は、*Acetobacter* の様に、酢酸の二酸化炭素と水への完全分解系をもつにかかわらず、*Gluconobacter* と同じ Q-10 をもっていた。一方、極鞭毛の中間株には、他の酢酸菌では存在の認められなかった分子種、Q-8 が見出された。それらの結果も、また、朝井らによって提案された 2 種類の中間株に、ユビキノン分子種は、化学的側面より、その妥当性を示した。この実験事実は、既存の酢酸菌の分類体系に対して、問題提起をなしたのである。

ユビキノンおよびメナキノン分子種の同定

筆者らのユビキノン抽出は、細菌細胞の場合、エタノール・エーテル混液を「生菌体」に、直接、加える方法であった (16)。カビ、酵母の様な真核微生物は細胞中にステロールなどを大量に含み、それらがユビキノンの単離に困難を来した。それは、メタノール・水の混液にピロガロールと水酸化ナトリウムを添加する、いわゆる、生菌体の「鹼化」によって解決した。そうして、ユビキノンはヘキサン転溶にて抽出することができた (15)。ユビキノンの部分精製は少量のアセトンへの転溶、ユビキノンの精製は、当時、広く使用されつつあった薄層クロマトグラフィーをとった。その時代、シリカゲルプレートは自作、溶媒系はベンゼンのみ。これは薄層クロマトグラフィーの繰り返しで、溶媒が減少、溶媒

の追加の必要を感じた時には、ベンゼンのみを展開槽に入れることでたりた。

細菌細胞よりユビキノ分子種の抽出には、筆者らの使用したエタノール・エーテル混液に代わって、現在、クロロホルム・メタノール混液を用いる方法が広く採用されている。最近、酵母、カビなどの真核微生物よりユビキノンを抽出する場合にも、クロロホルム・メタノール混液を用いる方法が報告された(8)。本法は凍結乾燥菌体を用いるが、生菌体の鹼化とは異なり、ユビキノンの抽出時、ユビキノンの低下を免れることができる。

ユビキノ分子種の決定には、筆者らは逆相ペーパークロマトグラフィーを用いた。濾紙は東洋濾紙 No. 50、短冊型に切断した濾紙にシリコンをコーティング。他の1つはワセリンをコーティングした。展開にあたって、使用した溶媒系は、当初、4種類。その後、溶媒系は2種類に限定した。ペーパークロマトグラフィーの装置は自作可能、その装置は汎用型、何処でも入手可能であり、1960-70年代、研究費の問題が山積する地方国立大学での研究遂行には、恰好のものであった。その後、逆相薄層クロマトグラフィーもキノ分子種の同定に利用される様になった。

ユビキノおよびメナキノ分子種の同定に、定量的な取り扱いを可能にしたのは、高速液体クロマトグラフィーである(11)。本法は、現在、キノ分子種の定量解析に、広く、用いられている。

微生物の分類におけるユビキノおよびメナキノ分子種、その後の展開

筆者らは、1968年、呼吸鎖に関与するキノ分子種、すなわち、酢酸菌のユビキノ分子種が、酢酸菌それ自体の分類同定に、極め

て、有用であることを見出した(16)。同じ頃、英国でも、同様の研究が行われていた。Jeffries, L. ら(6)は好気性グラム陽性球菌をとりあげ、その呼吸鎖メナキノ分子種に分類学的意義を見出した。しかし、惜しむらくは、彼らの研究は好気性グラム陽性球菌に限られ、それに続く研究へは、ついぞ、発展しなかった。また、それらが、微生物の「属レベル」のクリテリアの1つとして、有用であるとする見解には達してはいなかった様である。洋の東西、偶然、似た研究が、似た時に、出現したことになる。

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Edition, 1974は、分類学的位置付けとしてのイソプレノイドキノンを好気性グラム陽性球菌と酢酸菌で採用している。しかし、その取り扱いには、雲泥の差があった。すなわち、前者は引用文献を掲載しているが、後者は引用文献はおろか、著者名の掲載さえ無かったのである。

1969年春4月、筆者は静岡大学農学部農芸化学科応用微生物学研究室に転出した。当時、静岡大学農学部には大学院農学研究科修士課程は無かった。あるは、ただ、卒業論文の学生のみであった。卒業論文の学生の「呼吸鎖に関与するイソプレノイドキノンの微生物における分布状況や如何」は恰好の研究テーマであった。筆者は、ここで、酢酸菌に加えて、グラム陽性球菌、コリネフォルム細菌、放線菌、*Pseudomonas*などのグラム陰性菌、さらには、酵母および酵母様糸状菌なども採り上げ、そのキノ分子種分布に関する研究に入った。卒業論文の学生はその研究の最前線に立ち、大戦力となった。

ユビキノとメナキノ分子種による微生物の分類のためのクリテリオン(酵母および酵母様糸状菌を例にした場合)としての利用

は (12), 1) 酵母および酵母様糸状菌には, 天然に存在するすべてのユビキノ分子種が存在する. この事実はそれらの微生物が系統的に diversity であることを示す. 2) 一般に, 現在までに設定された酵母および酵母様糸状菌のそれぞれの属には, それ固有のユビキノ分子種が存在する. 3) もし, ある特定の酵母の属に, 複数のユビキノ分子種が見出された場合, その属は分類学的に heterogeneity である. したがって, ユビキノ分子種は属レベルのグルーピングに用いられる. 4) ユビキノ分子種はある特定の生体成分であるがため, 得られた情報は極めてクリアカットである. 5) 酵母および酵母様糸状菌のユビキノ分子種は 5 種類存在する. この数は自然界に存在する酵母および酵母様糸状菌を分類するには, あまりにも少な過ぎる. したがって, ある特定の酵母の間で, 同一のユビキノ分子種が見出せたとしても, それらは, 必ずしも, 近縁の関係にあるとは言い難い. この様な経験則は, 原核微生物である細菌でも, 同様であった (12).

1976 年, 筆者らは, 分類学的観点より, コリネフォルム細菌のメナキノ分子種を報告した (17). この論文の別刷りを送ってくれとする請求が, 好気性グラム陽性球菌のそれとともに, 世界各国より来, 多数に上った. これに不思議さを感じていたところ, 翌年, 同じ研究が発表されたのである (4). それは Collins, M. D.らの研究グループで, 先のグループと同じ英国の産であった. そうすると, Jeffries, L.らの研究は, 長期間, 彼らによっては認識されずにきたのであり, まさに, 「再発見」であった.

それ以後, Collins, M. D.らのグループの研究の質と量は, 何人も知るところである. 彼らは, メナキノ分子種の相違に基づき, グ

ラム陽性細菌に, 数々の新しい属を提案した. 筆者はそれを横目で眺めていたのである.

筆者の出自は生化学, 純粹の分類学ではないとする奇妙な観念であったのだろうか, 筆者らの取り扱った菌株に対して, 新属設定の可能性は論議しながらも, 新属設定そのものは, ついぞ, おこなわなかった. 当時, もし, 筆者が新属の設定をおこなうとすれば, それは酢酸菌においてのみなされるべきであったとした.

筆者らのコリネフォルム細菌のメナキノ分子種に関する分類学的研究の公表は, Collins, M. D. らの研究グループのそれに先行すること, 僅かに 1 年であった.

後年, Collins, M. D. and Jones, D. (3) は細菌の呼吸鎖キノンの分布に関する総説をものした. 筆者は, 当時, 英語で総説を書くことなど, 夢想だにしなかった. 同様のものは, 糸状菌では, なされているが (7), 酵母および酵母様糸状菌では, 未だしである.

コリネフォルム細菌, 放線菌には, 高度に飽和したイソプレノイド側鎖をもつメナキノ分子種の存在が知られている (13). Azerad, R. and Cyrot-Pelletier, M.-O. (2) は, *Mycobacterium phlei* の MK-9(H₂) では, 水素原子で飽和したイソプレノユニットはキノン核より数えて, 第 2 番目であるとした. MK-9(H₄) では, 第 2 番目に加えて, 第 3 番目にあり, 飽和の位置は連続しているとされた (13). MK-9(H₆) は化学構造を異にする 2 種類の分子種をもつ. その 1 つは, 第 2 番目と第 3 番目の他に, 最外側, すなわち, 第 9 番目に, 飽和したイソプレノユニットがあり, 他の 1 つは, 最外側より数えて第 2 番目, すなわち, キノン核より数えて第 8 番目にあるとされた. 最後の MK-9(H₈) では, 両者の MK-9(H₆) 分子種を統合した形, すなわち, 水素原子で飽和

したイソプレヌユニットは、キノン核より数えて、第2、第3番目と第8、第9番目にあるとされた。

ユビキノン分子種では、2種類が知られている。Q-10(H₂)では、飽和したイソプレヌユニットはイソプレノイド側鎖の最外側にあった(12)。Q-10(H₄)では、飽和の位置は、最外側、すなわち、第10番目に加え、第9番目のイソプレヌユニットにもあるとされた(5)。

1980年代後半、微生物のリボゾームRNA塩基配列が微生物分類学の世界に、華々しく、登場した。現在では、その解析なしには、新しい微生物の属の提案は不可能である。本法の登場により、数多くの新属の提案がなされた。まさに、自然界に数多く存在する微生物を分類するにあたり、ユビキノン分子種は僅々5種類、その無力さを示した。しかし、今度は、逆に、面白い現象が細菌に見出された。グラム陰性細菌、すなわち、*Proteobacteria*のうち、 α -*Proteobacteria*に属する菌株にはQ-10、 β -*Proteobacteria*ではQ-8あるいはQ-9、 γ -*Proteobacteria*ではQ-8に、それぞれ、特徴づけられた(13)。また、 δ -*Proteobacteria*はメナキノン分子種をもつという。

もし、ある微生物に予期せぬキノン分子種が存在、さらに、「例外無し」の予想外のキノン分子種が見出されたならば、即、そのキノン分子種を表現型のクリテリオンとして、新属の設定が可能である。現在、リボゾームRNA塩基配列によって、多数の新属設定はなされたが、逆に、それを裏付ける表現型の数の不足を痛感する。細菌では、菌体脂肪酸組成とともに、キノン分子種は、なお、それに応えうるものと考えている。

DNA分子雑種形成が、細菌、および、酵母および酵母様糸状菌の種を規定する基準となつて久しい。ここでも、なお、種を分別する

表現型の数の不足を痛感する。事態は、リボゾームRNA塩基配列と同じである。

酢酸菌のユビキノン分子種、その後の展開

酢酸菌の属 *Acetobacter* Beijerinck 1898 が設定されて 100 年以上を経過する。第 2 の属 *Gluconobacter* Asai 1935 は、提案後、65 年を経過した。この新属の提案の折り、朝井は基準種の設定をおこなわなかったとして、新たに、*Gluconobacter oxydans* (Henneberg) De Ley 1961 が基準種とされた。それは、朝井の新属提案以来、実に、4 分の 1 世紀を経過しての出来事であった。それまで、名の優先権を巡って、“*Acetomonas* Leifson” と *Gluconobacter* の間で、熾烈な論争が続いていた。

1964 年、朝井ら (1) は 2 種類の間株を報告した。その 1 つは、周鞭毛をもち、酢酸の二酸化炭素と水への完全分解系をもつ点では *Acetobacter* と同じであるが、培地中に水溶性褐色色素を生成、グリセロールよりジヒドロキシアセトンを生じる点では、*Gluconobacter* に似た性質をもつ。代表菌は、かつて、“*Gluconobacter liquefaciens* Asai” とされたものである。他の 1 つは、極鞭毛をもつ点では、*Gluconobacter* と同じであるが、*Gluconobacter* とは異なり、*Acetobacter* と同様、酢酸の完全分解系をもつ。その菌の名は、“*Acetobacter aurantius* Kondo and Ameyama” であった。前者は、とくに、ヨーロッパの研究者は、*Acetobacter aceti* (Pasteur) Beijerinck 1898 の褐色色素を生成する単なる一変種に過ぎないと、考えていた。

筆者らは、それぞれの間株に、それ特有のユビキノン分子種の存在を見出した (16)。Q-8 に特徴づけられる中間株には、当然、新属の設定が可能であると、イソプレノイドキ

ノンに関する経験則より、考えていた。そこで、極鞭毛をもつ中間株は、酢酸を酸化しないとする原記載とは、性質を異にした。その矛盾の解明のため、新たに、菌株の分離を試みた。磐田市の野いちごより、朝井らの記載と、ほぼ、同じ性質をもつ菌が数株えられた(18)。十分に材料の出揃ったこの時点で、本中間株にたいして、新しい属の設定が可能であるとした。しかし、なお、慎重を要するとし、新属の提案を先送りにした。これが悔いを千載に残すこととなった。しかし、1970年代、新属の提案は、この表現型の記載で、充分であったはずである。ちなみに、新属の名は *Asaia* を想定していた。

極鞭毛をもつ中間株にたいして、後年、新属 *Frateuria* Swings et al. 1980 が提案された。明らかに、筆者らは後塵を拝したのである。考えてみるに、慎重を期すからとて、なお、余分の実験を重ね、報文化を後回しにした。まさに、空白の4年間であった。

周鞭毛の中間株には、未だ1つの問題を残していた。ユビキノン分子種は、*A. acetii* 自体のもの(Q-9)とは異なり、Q-10。この中間株は、したがって、少なくとも、新種として、扱うべきであると考えていた。しかし、これは *Acetobacter liquefaciens* (Asai) Gosselé et al. 1983 とされ、またもや、後塵を拝したのである。

周鞭毛の中間株には、なお、問題が残されていた。この菌株にたいして、新属の設定が無理であるとするならば、近い将来、新属に昇格可能な新亜属であるべきとした。公表の場所は国内で刊行される雑誌に求めた。Subgenus *Gluconoacetobacter* (ex Asai) Yamada and Kondo 1984 はかくして生まれたのである。今にして思えば、この雑誌の編集者は、よくぞ、筆者らの論文を受理、掲載してくれたと。

1990年代、筆者らは、酵母および酵母様系状菌のリボゾーム RNA による分子系統学的分類に、研究の主力を投入した(13, 14)。ここでは、数々の新しい属の提案を、ユビキノン分子種をクリテリアの1つとして、おこなった。それは1970年代の研究とは裏腹の態をなした。

1995年春3月、筆者は静岡大学の停年を迎えることになった。その直前、再び、酢酸菌の研究に入った。今度の手法はリボゾーム RNA 部分塩基配列であり、これは酵母での研究と同一線上にあった。その実験データを一見し、やはり、イソプレノイドキノノン分子種は期待を裏切らなかつたと感じた。

周鞭毛をもつ中間株、すなわち、Q-10をもつ *Acetobacter* 属細菌 (*A. liquefaciens* など) は、Q-10をもつ *Gluconobacter* 属細菌や Q-9をもつ *Acetobacter* 属細菌とは異なり、遙か彼方の系統枝に位していた(19)。メタノール資化性酢酸菌 *Acidomonas* Urakami et al. 1989 に属する菌株も、ともども、遙かなる位置関係にあった。

新亜属 *Gluconoacetobacter*、および、新属 *Acidomonas* は、ヨーロッパの研究者の間では、散々の不評であった(10)。1994年、Sievers, M. ら(9)は酢酸菌の16Sリボゾーム RNA 塩基配列を決定、それに基づき、メタノール資化性酢酸菌 *Acidomonas* の存在を否定、名を *Acetobacter methanolicus* Uhlig et al. 1986 に戻すべしとした。しかし、彼らには、亜属 *Gluconoacetobacter* の認識はなかつたようである。それについては、一切、触れていなかった。

筆者らは、彼等のデータを引用、酢酸菌を *Gluconobacter* を含む複数の属に分割するならば、*Acidomonas* の存在は認めるべきであり、同時に、亜属 *Gluconoacetobacter* は属に昇格す

べきであるとした。新属 *Gluconacetobacter* Yamada et al. 1997 は、かくして、誕生したのである。本属の基準種は *Gluconacetobacter liquefaciens* (Asai) Yamada et al. 1997 と定めた。この事実は、細菌分類学におけるイソプレノイドキノン分子種の「凄さ」を物語るものである。

最近、インドネシア、タイ、フィリピンなど、熱帯地方の花より興味ある酢酸菌が分離された (20)。本菌は、糖および糖アルコールを炭素源として、酢酸菌にあるまじき活発な生育を示す。あまつさえ、本菌は、エタノールの酢酸への酸化活性を欠くことより、およそ、酢酸菌の範疇を越えるものと認識された。ユビキノン分子種は、 α -*Proteobacteria*らしく、Q-10。リボゾーム RNA 塩基配列では、既存の酢酸菌とは異なった系統枝を与えたが、なお、family *Acetobacteraceae* の系統に含まれていた。この実験事実より、筆者らは、本菌にたいして、新属を与えることが妥当であると考えた。その新属の名は、酢酸菌の分類における「朝井」に因んで、*Asaia* Yamada et al. 2000 とした。ここに、朝井の名を冠した新しい属の誕生を、ようやくにして、見たのである。

思い返せば、筆者が、かつて、涙を飲んだ新しい属 *Frateria* (Q-8 をもつ) は γ -*Proteobacteria* に属す。*Asaia* は、正真正銘、 α -*Proteobacteria* に属す。不思議な運命の出会いと考えざるをえない。

1968年、*Acetobacter* は Q-9、*Gluconobacter* は Q-10 なる相違に気付く、それが微生物の分類同定に役立つと考えた時、例外であるとした *Gluconobacter* の Q-10 は、実は、 α -*Proteobacteria* では、例外ではなく、むしろ、*Acetobacter* の Q-9 が例外中の例外であったことを知った。もし、*Acetobacter* も、また、同

じ Q-10 であったとしたならば、かかる研究方向へは、当然、進まなかったであろうと考える時、ただただ、その幸運に、感謝あるのみである。

おわりに

イソプレノイドキノン分子種につき、長々と、手前味噌の限定した話ばかり書き連ねてしまった。新属の提案の折り、リボゾーム RNA 塩基配列と同様、細菌では、表現型としてのイソプレノイドキノンの記載が、現今、不可欠の感がある。したがって、イソプレノイドキノン分子種に関する参考文献は膨大に上ると考えられる。筆者は、それらのすべてを網羅することができず、話の展開は限られてしまった。ここに述べなかつたイソプレノイドキノン分子種につき、それぞれの研究者には、それぞれの「思い出」と「ドラマ」が、必ず、存在するものと思うからであり、それらは後日に期したいと思う。したがって、高温水素細菌に存在するメチオナキノンなど、また、光合成細菌に存在する特異なイソプレノイドキノンなどは、割愛のやむなきにいたったこと、ここに、あらためて、謝したいと思う。

現在、DNA 分子雑種形成やリボゾーム RNA 塩基配列などの分子生物学的手法が、微生物の分類体系の構築に、著しく、寄与したこと、ひろく、万人の認めるところである。しかし、今度は、逆に、微生物のもつ表現型の数のいちじるしい不足を実感。その開発が急務であると感じざるをえない。それは、微生物分類学にたずさわる研究者の、もっとも、得意とする領域である。本稿を終わるにあたり、筆者は、この開発に多大の期待を寄せるものである。

文献

1. Asai, T., Iizuka, H. and Komagata, K. The flagellation and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediate strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **10**, 95-126 (1964).
2. Azerad, R. and Cyrot-Pelletier, M.-O. Structure and configuration of the polyprenoid side chain of dihydromenaquinones from Myco- and Corynebacteria. *Biochimie.* **55**, 591-603 (1973).
3. Collins, M. D. and Jones, D. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* **45**, 316-354. (1981).
4. Collins, M. D., Pirouz, T., Goodfellow, M. and Minnikin, D. E. Distribution of menaquinones in *Actinomycetes* and Corynebacteria. *J. Gen. Microbiol.* **100**, 221-230 (1977).
5. Itoh, M., Katayama, Y., Sugiyama, J. and Kuraishi, H. Isolation and structure elucidation of a tetrahydrogenated isoprenoid side-chain ubiquinone with ten isoprene units isolated from *Chaetomium funicola* JS 525. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1195-1201 (1988).
6. Jeffries, L., Cawthorne, M. A., Harris, M., Cook, B. and Diplock, A.T. Menaquinone determination in the taxonomy of *Micrococcaceae*. *J. Gen. Microbiol.* **54**, 365-380 (1969).
7. Kuraishi, H., Sugiyama, J. and Yamada, Y. Distribution of ubiquinone systems in fungi. *Bull. JFCC.* **7**, 111-133 (1991).
8. Mikata, K. and Yamada, Y. The ubiquinone system in *Hasegawaea japonica* (Yukawa et Maki) Yamada et Banno: a new method for identifying ubiquinone homologs from yeast cells. *IFO Res. Comm.* **19**, 41-46 (1999).
9. Sievers, M., Ludwig, W. and Teuber, M. Revival of the species *Acetobacter methanolicus* (ex Uhlig et al. 1986) nom. rev. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**, 352-354 (1994).
10. Swings, J. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter*. In Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds.), *The Prokaryotes*, 2nd ed., vol. 3, p. 2268-2286, Springer-Verlag, New York (1992).
11. Tamaoka, J., Katayama-Fujimura, Y. and Kuraishi, H. Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high performance liquid chromatography. *J. Appl. Bacteriol.* **54**, 31-36 (1983).
12. 山田雄三. 呼吸鎖に關与するキノン類の分子種に基づく微生物の分類. 発酵と工業. **37**, 940-954 (1979).
13. 山田雄三. 呼吸鎖に關与するキノン類の分子種に基づく微生物の分子系統分類. バイオサイエンスとインダストリー. **49**, 829-839 (1991).
14. 山田雄三. 酵母リボゾームRNA部分塩基配列雑感 - その分類学的側面. 日本菌学会会報, **35**, 239-252 (1994).
15. Yamada, Y. and Kondo, K. Coenzyme Q system in the classification of the yeast genera *Rhodotorula* and *Cryptococcus* and yeast-like genera *Sporobolomyces* and *Rhodospiridium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **19**, 59-77 (1973).
16. Yamada, Y., Aida, K. and Uemura, T. Distribution of ubiquinone - 10 and - 9 in acetic acid bacteria

- and its relation to the classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*, especially of the so-called intermediate strains. *Agric. Biol. Chem.* **32**, 786-788 (1968).
17. Yamada, Y., Inoue, G. and Kondo, K. The menaquinone system in the classification of coryneform and nocardioform bacteria and related organisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **22**, 203-214 (1976).
 18. Yamada, Y., Okada, Y. and Kondo, K. Isolation and characterization of polarly flagellated intermediate strains in acetic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **22**, 237-245 (1976).
 19. Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 1244-1251 (1997).
 20. Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T. and Komagata, K. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 823-829 (2000).

細胞壁組成

横田 明

細菌細胞壁

微生物の細胞壁は固有の細胞壁を持つ。真正細菌では細胞壁に強度を与える成分としてペプチドグリカンを持つが、その構成成分は菌種に共通の構造を有する部分と、菌種により異なる部分とが認められる。すなわち、グリカン部分は N-アセチル - グルコサミン-N-アセチル - ムラミン酸の 2 糖構造がポリマーを形成しているのに対して、ペプチド部分はグラム陰性細菌では一定であるがグラム陽性細菌ではアミノ酸組成に変化があり、分類同定の重要な手がかりとなっている。このムラミン酸の N-アセチル基も希に変化して N-グリコリル化している場合もあり、これを分類同定の指標として用いることができる。さらにグラム陽性細菌では細胞壁中に著量の多糖類が主にペプチドグリカンに共有結合で結合して存在し、その糖成分の分類学的意義についてこれまで種々議論がなされてきた。一方、グラム陰性菌では細胞壁は内膜、ペプチドグリカン層、外膜の 3 層より構成されているが、外膜成分にはグラム陰性細菌に特有な成分であるリポ多糖が含まれ、これは O - 抗原特異性を担う多糖部分、コア多糖とリポド A と呼ばれる部分から成る。O - 抗原の特異性は血清学的に多数の型別が成されているように構成糖や結合様式が極めて多彩である。グラム陰性細菌ではグラム陽性細菌と異なり、ペプチドグリカン組成が一定で変化が認められないことから分類指標としての価値はなく、リポ多糖の糖組

成あるいは脂肪酸組成に分類指標としての有用性が認められている。

細菌ではその細胞壁の基礎的研究の当初から、各種細菌における細胞壁組成の多様性とその分類学的有用性が認識されていた。ジアミノピメリン酸のメソ型、LL 型の簡便な識別法を見出し、広範な細菌について分布を調べて分類基準としての有効性を示した Work, E. (37) の先駆的研究があり、さらに Cummins, E. S. and Harris, H. (3) により分類基準としての細胞壁アミノ酸および糖組成の重要性が示されてきた。また、Kandler, O. らは 1960 年代後半より TLC を用いた独自の方法により多数の細菌のペプチドグリカン構造を決定し、化学構造に基づく総合的な分類システムを提唱し (13, 14)、多くの細菌分類群との対応を詳細に検討した。Yamaguchi, T. (39) の放線菌における分析から分類指標としての可能性が示され、後に出てきた Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A. (6) による好気性放線菌の細胞壁組成 (アミノ酸と糖組成) を基にした分類システムに結びついて、放線菌の識別と分類に大きく貢献した。コリネフォルム細菌では Yamada, K. and Komagata, K. (38) により細胞壁アミノ酸構成を重要な柱として分裂様式、DNA の GC 含量、生理・生化学的性状の組み合わせによる分類システムを提唱し、さらに細胞壁アシル型、メナキノン組成、リン脂質組成などの化学分類学的性状を加えてこのシステムの妥当性を確認するとともに、この分類群について

より細部にわたる分類を可能とした。

このような状況下で、内田 (28) は、*Mycobacterium-Nocardia* の細胞壁を構成するペプチドグリカンのムレインのアミノ糖 (グルコサミンおよびムラミン酸) のうち、ムラミン酸の 2 位の水酸基が通常知られているアセチル化のものと異なってグリコリル化されていることに注目し、その迅速分析法 (定性および定量法) を確立した (29-34)。さらにこの分析は放線菌の諸属にまで広く行われ、その分布が最近の分子系統学的研究の進歩に伴う放線菌の分類システムと極めてよく一致すること、すなわち、細胞壁アシル型は放線菌の属、科レベルで同一であることを実証した (35)。この実験手法は今日では Uchida-Aida の方法として広く世界中の研究室で用いられ、放線菌の分類、さらにはグラム陽性細菌の分類指標の一つとして欠くことのできない項目となっている。

武内と横田 (22, 25) はコリネフォルム細菌での細胞壁多糖体の存在様式と糖組成について検討し、属あるいは種によって一定であるのかどうかについて調べた。既に Keddie, R. M. and Cure, G. L. が広くコリネフォルム細菌について調べた結果を報告していた (5) が、彼らの方法はアルカリ処理後の沈殿物を細胞壁標品としていたもので、このような標品では細胞壁以外に由来する糖質も共に分析する可能性が考えられたことから、本報告では酵素処理および SDS 処理を行った後の標品について解析した。その結果、多糖体の種類は属レベルでよくまとまっており、さらに糖組成は種レベルでよくまとまっていることから、糖組成の違いが種を区別する指標と成り得ることを報告した。さらに、広く放線菌を含めた

Actinobacteria について細胞壁糖組成を調べた (23, 26) ところ、*Nocardiaceae* 科、*Mycobacteriaceae* 科、および *Corynebacteriaceae* 科ではアラビノースとガラクトースを含むが、*Micromonosporaceae* 科ではキシロースを持つことでまとまっていること、一方全菌体糖組成としてアラビノースとガラクトースを持つことが知られている *Pseudonocardiaceae* 科の菌種では、細胞壁を調製して細胞壁糖組成を調べた場合には本科 10 属のうち 3 属のみがアラビノースを含み、他の属はアラビノースを含まないことから、本科の細胞壁糖組成のまとめは見られないことを指摘した。

武内 (21) は細胞壁のペプチド鎖の架橋や 3 位のアミノ酸が異なることによるムレインタイプの違いが系統を反映したものであるかを検証している。従来 *Microbacterium* 属菌種には B1 α タイプと B1 β タイプとが、*Aureobacterium* 属には B2 β タイプと B2 α タイプとが知られていたが 16S rRNA 塩基配列に基づく系統解析の結果、何れのタイプに属する菌種間の配列の類似度は非常に高く、系統樹では 4 つのタイプに菌種は 1 つのクラスターの中に混在していることを見出し、この結果に基づいて、*Aureobacterium* 属と *Microbacterium* 属を統合した (24)。すなわち、少なくとも *Microbacteriaceae* 科に含まれる属ではムレインタイプの違いは系統を反映したものではないことを明らかにした。

細胞壁ペプチドグリカンは、ペプチドサブユニットが L-アミノ酸と D-アミノ酸の交互ペプチドであり、架橋を形成しているペプチドにもこれらの立体異性体が特異的に配置されていることから、そのアミノ酸組成を D/L の区別をして解析することは構

造を推定する上で有益な情報となる。佐々木ら (12) は HPLC を用いて全アミノ酸に対して D-, L-異性体の一斉分析を行い、特に *Microbacteriaceae* 科の菌種について調べた結果、*Curtobacterium*, *Aureo-bacterium*, *Cellulomonas* の各属は何れもペプチドグリカンにオルニチンを持っているが、前二者は D-型であるのに対し、後者は L-型であることを確認した。また、細胞壁に 2, 6-ジアミノ酪酸 (A₂bu) を含む属として *Agrococcus*, *Agromyces*, *Clavibacter*, *Leucobacter*, *Cryobacterium*, *Rathayibacter* の 6 属が知られているが、*Clavibacter michiganensis* の 3 亜種と “*Corynebacterium aquaticum*” JCM 1368 は L-型と D-型の A₂bu が 1 : 1 で含まれていたが、*Rathayibacter* および *Agromyces* のすべての菌種は L-型のみより成っていることを見出した。これらはこれらの属の境界を考える上で分類学的に興味深い。このように、D/L アミノ酸の一斉分析法は細菌の同定、細胞壁構造の推定において有効な手法であることを示した。この結果に基づいて彼らのグループ (18) および Evtushenko, L. I. ら (4) により、“*Corynebacterium aquaticum*” に対して新属 *Leifsonia* が提唱された。

酵母細胞壁

菌類の細胞壁は N-アセチルグルコサミンのポリマーであるキチンを骨格とし、これにグルカンまたはマンナンなどの多糖類およびタンパク質などが結合し、細菌と同様、いくつかの層によって構成されている。酵母の細胞壁は、一般に、グルカン、マンナンなどの多糖類であるといわれている (1)。菌類は細胞壁多糖の組成に基づき、大

きく 8 つのカテゴリーに分けられることが見出され (2) て以来、酵母も含めた菌類の中で菌体糖組成は重要な分類指標といわれ、特に形態の分化が乏しい酵母で細胞壁糖組成の分類学的意義について研究が行われてきた。その結果、子囊菌系酵母の細胞壁は、主にグルカン-マンナン型で、一部の菌類はさらにガラクトースを構成成分として含むことが明らかとなり、一方、担子菌系酵母では、細胞壁に局在するといわれているキシロースの有無が属以上のレベルでの分類指標として用いられている (15, 19, 36)。酵母細胞壁糖組成を論じる場合、細胞そのものすなわち全菌体の糖組成を比較する方法、細胞壁を分離後その細胞壁中の主要構成糖を分析する手法、そして細胞より酸ないしはアルカリで抽出した精製多糖について糖組成を調べる方法がある。この方法で抽出されたもので最も研究が進んだのは酵母マンナンである。しかしその化学構造を分類指標とするのは困難でもっぱらプロトン NMR スペクトル、および血清学的性状が分類指標として用いられた。また土屋らのグループによる酵母菌体の血清学的分類体系は、酵母の類縁関係を示すものとして重要である。酵母の菌体凝集反応の抗原は細胞表層の多糖類と考えられ、主要な抗原については化学構造との対応も明らかにされている。土屋らの分類 (27) では、群特異抗原は属レベルの分類指標と考えられた。

分類指標としての菌体糖組成の決定には、全菌体加水分解法が従来から用いられてきた。しかし、全菌体加水分解法では定量的な評価を行うことができないことから、近年では細胞壁を調製し、その構成糖の分析が行われるようになってきている。

Prillinger, H.らは広範な範囲の子囊菌類および担子菌類の細胞壁を調製し、その細胞壁中性糖の組成を決定した(8 - 11)。このデータと担子菌類の系統関係が良い一致を示すことから、細胞壁糖組成が高次分類群の指標として有効であることが示されている。

鈴木(17)は射出胞子形成酵母において分類指標としての細胞壁糖組成としてキシロースの有無の重要性を指摘し、これを分類指標として、酵母の新規分類群の提案を行っている。酵母の全菌体糖組成では、キシロースの有無が、不完全菌酵母において、子囊菌と担子菌系の酵母の属間の区別、および担子菌系酵母属間の区別に重要であることがそれまで指摘されていた。しかし、研究者間に結果の違いが見られ、また方法にも違いが見られたので、鈴木は従来の糖を誘導体化してガスクロマトグラフィーにより分析する方法とは異なり、HPLCを用いて全菌体糖組成について酵母の菌体糖組

成の化学分類学的意義について検討した(16)。その結果、キシロースの有無が射出胞子形成酵母の *Bullela* 属と *Sporoboromyces* 属の区別に重要であること、これに基づき、キシロースの有無と形態とユビキノン組成の組み合わせにより、新属 *Kurtzmanomyces*, *Bensingtonia*, *Kockovaella*, *Tsuchiyaea*, *Ballistosporymyces* を設立した。さらに、子囊菌酵母では *Yallowia* 属がガラクトースの有無によって *Saccharomycopsis* 属と区別できることを明らかにした(7)。さらに、Takashima, M.ら(20)は *Urediniomycetes* 綱、主に *ballistoconidium* 形成性酵母および関連属酵母について細胞壁を調製してその構成糖組成を調べた結果、フコースの有無が系統的位置とよく一致することを見出し、フコースを持つ持たないことが系統をよく反映したよい分類指標であることを報告している。この様に、菌体糖組成は他の形質と組み合わせて分類学的指標としての重要性を示すことを指摘した。

文献

1. Ballou, C.E. Yeast cell wall and cell surface. *In*: Strathern J.N., Jones, E.W. and Broach J.R. (eds). *The molecular biology of the yeast Saccharomyces*. pp. 335-360, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982).
2. Bartnicki-Garcia, S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **22**, 87-108 (1968).
3. Cummins, C. S. and Harris, H. The chemical composition of the cell wall in some Gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character. *J. Gen. Microbiol.* **14**, 583-600 (1956).
4. Evtushenko, L. I., Dorofeeva, L. V., Subbotin, S. A., Cole, J. RR. and Tiedje, J. M. *Leifsonia poae* gen. nov., sp. nov., isolated from nematode galls on *Poa annua*, and reclassification of 'Corynebacterium aquaticum' Leifson 1962 as *Leifsonia aquatica* (ex Leifson 1962) gen. Nov., nom. Rev., comb. nov. and *Clavibacter xyli* Davis et al. 1984 with two subspecies as *Leifsonia xyli* (Davis et al. 1984) gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 371-389 (2000).
5. Keddie, R. M. and Cure, G. L. *In*: Special Publication of the Society for General Microbiology I.

- Coryneform Bacteria, ed. by Bousfield, I.J. and Calley, A.G., Academic Press, London p. 43-83. (1978).
6. Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. A. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**, 435-443 (1970).
 7. 中瀬 崇. 細胞壁組成一菌類. 第6回微生物化学分類研究会 (1986).
 8. Prillinger, H., Deml, G., Dörfler, C., Laaser, G. and Lockau, W. Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbilogie Höherer Pilze: Hefe-Typen der Basidiomyceten. Teil II: *Microbotryum*-Typ. *Bot. Acta* **104**, 5-17 (1991).
 9. Prillinger, H., Dörfler, C., Laaser, G. and Hasuska, G. Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbilogie Höherer Pilze: Hefe-Typen der Basidiomyceten. Teil III: *Ustilago*-Typ. *Z. Mykol.* **56**, 251-278 (1990).
 10. Prillinger, H., Laaser, G., Dörfler, C. and Ziegler, K. Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbilogie Höherer Pilze: Hefe-Typen der Basidiomyceten. Teil IV: *Dacrymyces*-Typ, *Tremella*-Typ. *Sydowia* **53**, 170-218 (1991).
 11. Prillinger, H., Oberwinkler, F., Umile, C., Tlachac, K., Bauer, R., Dörfler, C., Taufrazthofer, R. Analysis of cell wall carbohydrate (neutral sugars) from ascomycetous and basidiomycetous yeasts with and without derivatization. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **39**, 1-34 (1993).
 12. 佐々木淳子, 鈴木健一朗, 千々松昌男. グラム陽性細菌の細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸組成分析法とその分類への応用. 第15回微生物分類研究会 (1995)
 13. Schleifer, K. H. Analysis of the chemical composition and primary structure of murein. *In: Methods in Microbiology*, vol. 18, G. Gottschalk (eds.), pp. 123-156, Academic Press Inc., London (1985).
 14. Schleifer, K.H. and Kandler, O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**, 407-477 (1972).
 15. Sugiyama, J., Fukagawa, M., Chiu, S. and Komagata, K. Cellular carbohydrate composition, DNA base composition, ubiquinone systems and diazonium blue B color test in the genera *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **31**, 519-550 (1985).
 16. 鈴木基文. 酵母の菌体糖組成の化学分類学的意義とHPLC分析法. 第11回微生物化学分類研究会 (1991).
 17. 鈴木基文. 射出胞子形成酵母の分類. 第7回微生物化学分類研究会 (1987).
 18. Suzuki, K., Suzuki, M., Sasaki, J., Park, Y.H., and Komagata, K. *Leifsonia* gen. nov., a genus for 2,4-diaminobutyric acid-containing actinomycetes to accomodate "*Corynebacterium aquaticum*" Leifson 1962 and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* Davis *et al.* 1984. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **45**, 253-262 (1999).
 19. Suzuki, M. and Nakase, T. The distribution of xylose in the cells of ballistosporous yeasts - Application of high performance liquid chromatography without derivatization to the analysis of

- xylose in whole cell hydrolysates. J. Gen. Appl. Microbiol. **34**, 95-103 (1988).
20. Takashima, M., Hamamoto, M. and Nakase, T. Taxonomic significance of fucose in the class Urediniomycetes: Distribution of fucose in cell wall and phylogeny of urediniomycetous yeasts. System. Appl. Microbiol. **23**, 63-70 (2000).
 21. 武内真理子. *Microbacterium* 属と *Aureobacterium* 属の統合, および *Microbacterium* 属の7新種について. 第17回微生物分類研究会 (1997).
 22. 武内真理子, 横田 明. コリネフォルム細菌における細胞壁糖組成の分類学的意義. 第11回微生物化学分類研究会 (1991).
 23. 武内真理子, 坂根 健, 横田 明. *Actinobacteria* における細胞壁組成の分類学的意義. 第15回微生物分類研究会 (1995).
 24. Takeuchi, M. and Hatano, K. Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**, 739-747 (1998).
 25. Takeuchi, M. and Yokota, A. Cell-wall polysaccharides in coryneform bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **35**, 233-2525 (1989).
 26. Takeuchi, M., Nishii, T., and Yokota, A. Taxonomic significance of arabinose in the family *Pseudonocardiaceae*. Actinomycetologica, **6**, 79-90 (1992).
 27. Tsuchiya, T., Fukazawa, Y., Taguchi, M., Nakase, T. and Shinoda, T. Serological aspects of yeast classification. Mycopathol. Mycol. Appl. **53**, 77-91 (1974).
 28. 内田欣哉. Coryneform-nocardioform-mycobacteria の細胞壁アシル型. 第1回微生物化学分類研究会 (1980).
 29. 内田欣哉. 細胞壁組成一細菌. 第6回微生物化学分類研究会 (1986).
 30. 内田欣哉. 細菌の細胞壁. 微生物の化学分類実験法, 駒形和男編, 学会出版センター, 東京 p. 5-45 (1982).
 31. Uchida, K. An improved method of the glycolate test for simple identification of the acyl type of bacterial cell walls. J. Gen. Appl. Microbiol. **30**, 131-134 (1984).
 32. Uchida, K. and Seino, A. Intra- and intergeneric relationships of various actinomycete strains based on acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycans examined in a glycolate test. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**, 182-190 (1997).
 33. Uchida, K. and Aida, K. Taxonomic significance of cell wall acyl type in *Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia* group by a glycolate test. J. Gen. Appl. Microbiol. **25**, 169-183 (1989).
 34. Uchida, K., Kudo, T., Suzuki, K. and Nakase, T. A new method of glycolate test by diethyl ether extraction, which is applicable to a small amount of bacterial cells of less than one milligram. J. Gen. Appl. Microbiol. **45**, 49-56 (1999).
 35. Uchida, K. and Aida, K. Acyl type of bacterial cell wall: Its simple identification by a colorimetric method. J. Gen. Appl. Microbiol. **23**, 249-260 (1977).

36. Weijman, A. C. M. and Rodrigues de Miranda, L. Xylose distribution within and taxonomy of the genera *Bullera* and *Sporobolomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 559-562 (1983).
37. Work, E. The mucopeptides of bacterial cell walls. A review. *J. Gen. Microbiol.* **25**, 167-189 (1961).
38. Yamada, K. and Komagata, K. Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. Classification of coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **18**, 417-431 (1972).
39. Yamaguchi, T. Comparison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol.* **89**, 444-453 (1965).

酵素電気泳動パターン解析

杉山純多 山崎真司 田村美貴

はじめに

筆者と酵素電気泳動パターン解析とのかわりについて記してこのパートのはじめとしたい。筆者が東大応微研 3 研の助教授として着任した 1980 年 (昭和 55 年) 10 月は、当時主任の駒形教授の指導で山崎真司さんが博士論文「酵素の電気泳動パターンに基づく酵母の類縁に関する研究」を丁度まとめているときであった。着任後まもなく「微生物の化学分類の勉強会」が箱根姥子温泉で開催された。山崎さんの研究の主眼は酵母における酵素の電気泳動パターンの分類形質としての評価にあった。アナモルフ酵母を含む子囊菌系から担子菌系酵母 370 株を供試して、糖代謝にかかわる 12 酵素の電気泳動パターンの解析から酵素電気泳動パターンは種に特異的であるとの結論を導いた。さらに、この手法は泳動パターンの類似度に基づいてアナモルフの *Rhodotorula* 属酵母からテレオモルフの *Rhodospiridium* 属酵母に対応する株を検出し、実際に交配試験をして本手法の有用性を見事に実証した (2)。彼の接合試験の供

試株の中には筆者が南極南ビクトリアランドの塩湖湖水から分離し、後に後藤昭二先生 (当時山梨大学助教授) ら (1) と *Rhodotorula glutinis* var. *rufusa* と同定した酵母が含まれていた。山崎さんの研究から、この南極産酵母は *Rhodospiridium toruloides* の交配型 A と接合し、担子菌酵母特有の生活環を完結することが判明した (2)。交配型 A 株の産地はスウェーデンである。地理的に離れた南極株 (交配型 a) と有性生殖したことは生態的、進化的に大変興味をもたれた。この実験結果を指導教官の駒形教授と山崎さんから聞いたとき、試行的に行われていたアナモルフとテレオモルフ関係の解明に本手法を導入したアイデアの新鮮さと手法としての切れ味に感動したのでよく覚えている。本手法は日本の化学分類学のお家芸の一つといってもよく、Kurtzman, C. P. 博士から先年出版された "The yeasts, A taxonomic study, 4th ed." の総論の 1 章の執筆を依頼されたのもその証左であろう (3)。

文献

1. Goto, S., Sugiyama, J. and Iizuka, H. A taxonomic study of Antarctic yeasts. *Mycologia*. **61**. 748-774 (1969).
2. Yamazaki, M. and Komagata, K. Taxonomic significance of electrophoretic comparison of enzymes in the genera *Rhodotorula* and *Rhodospiridium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**. 361-381 (1981).
3. Yamazaki, M., Kurtzman, C. P. and Sugiyama, J. Electrophoretic comparison of enzymes. In Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (eds.), *The yeasts, a taxonomic study*, 4th ed., p. 49-53. Elsevier,

酵母の酵素の電気泳動パターン

生物の進化は、DNAの塩基配列の進化として説明され、その反映が生物の機能や細胞構成成分にみられる。当時、DNAやRNAの塩基配列を簡単に比較することが難しかったため、DNAの塩基配列の反映であり、機能を持ったタンパク質である基本的な代謝系の酵素に着目し、酵素の構造を反映する電気泳動パターンを比較することにより酵母の分類および同定が試みられた。

タンパク質（酵素を含む）の電気泳動パターンは、医学分野では臨床にも応用されていたが、微生物分野で分類に応用する研究は、一部にすぎなかった。酵母の化学分類法の研究においても、酵素の電気泳動パターンを分類・同定に応用しようという研究は、1976年頃までは、ほとんど行われていなかった。

本研究会における酵母を対象にした酵素電気泳動パターンに基づく分類・同定手法の研究発表は、研究会の発足直後の2編のみである。最初は、第3回（昭和58年11月、当時は勉強会として開催された）であり、山崎（発表当時、山梨大発酵研）が、駒形先生（当時、東大応微研）の指導もとで、博士課程の研究として行った*Rhodotorula*属

酵母とそのテレオモルフである *Rhodosporidium* 属酵母の類縁関係を中心とした酵素の電気泳動パターンの分類学的意義について総括的な発表を行った。その後、第5回研究会（昭和58年11月）において、鈴木基文（理研）がヒトから分離される *Candida* 種について酵素の電気泳動パターンを比較した結果について発表した。

酵母の酵素の電気泳動パターンにおける分類学的研究は、山崎ら (2, 8-18) および山田ら (3-7) により、ほとんどの属において行われた。

電気泳動法およびバンドの数値化

電気泳動の支持体としては、スラブ型のポリアクリルアミドゲル (5 - 7.5%) が使用された。酵素は、脱水素酵素系など数種から10種以上について染色して検出し、得られたバンドの相対移動度 (Rm値) を求めて菌株間の相同性を比較した (8)。また、数値分類法として、求めたRm値から菌株間の相似度値 (similarity value) を算出し、トライアングルマトリックス (図1) やデンドログラム (図2) を作成して菌株間の相同性が考察されている (1, 3-7, 19)。

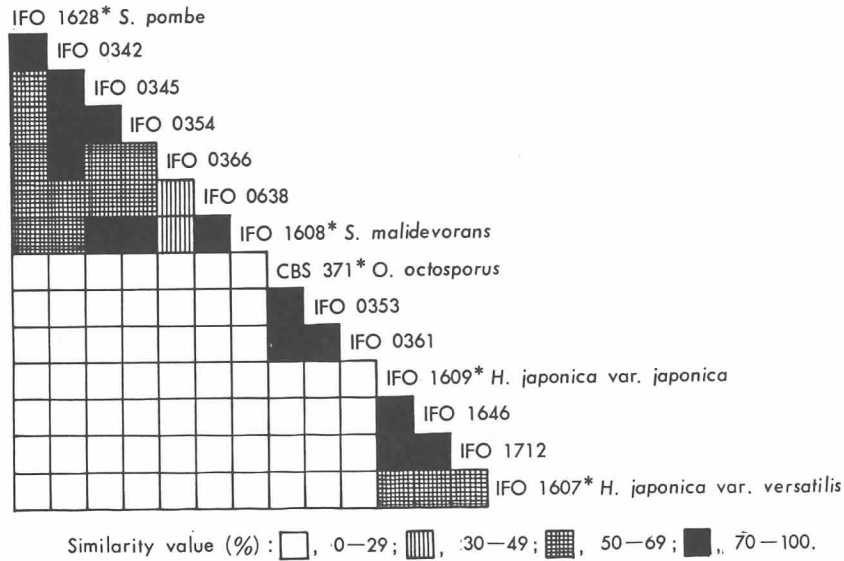


図1. *Schizosaccharomyces*属, *Octosporomyces*属および*Hasegawaea*属の酵素の泳動パターンに基づくトライアングルマトリックス (7)

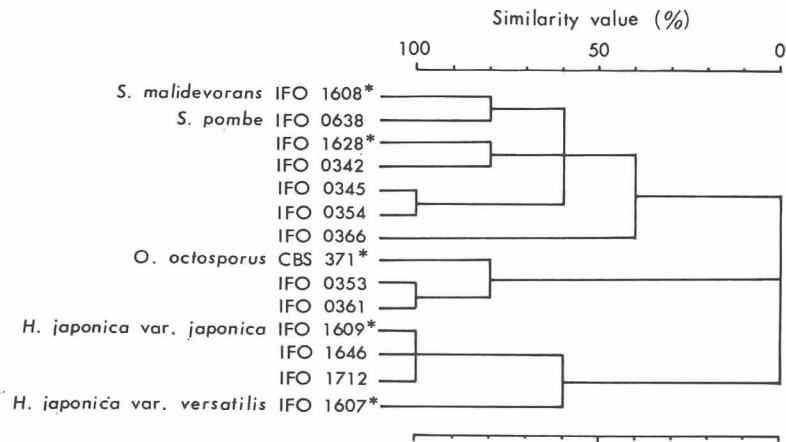


図2. *Schizosaccharomyces*属, *Octosporomyces*属および*Hasegawaea*属の酵素の泳動パターンに基づくデンドログラム (7)

***Rhodotorula* 属と*Rhodosporidium* 属**

*Rhodotorula*属酵母とそのテレオモルフである*Rhodosporidium*属酵母は、酵母の分類学において、伝統的に日本の研究者によって良く研究されていたものである。山

崎ら (8, 12, 13, 16) は、*Rhodotorula*属に含まれる12種6変種64株と*Rhodosporidium*属に含まれる8種44株について酵素の泳動パターンを比較した。

その結果、*R. glutinis*は2グループに、

*R. lactosa*は2グループに分かれること、*R. pilimanae*は*R. rubra*と同一種であることなどが、酵素の泳動パターンからうかがわれた。また、*Rhodotorula*属酵母の中に*Rhodosporidium*属酵母と類似した泳動パターンを示すものが十数株見つかったため、類似した泳動パターンを示した菌株間の接合試験を行ったところ、表1に示したような菌株のテレオモルフが判明した。*Rhodosp. toruloides*のアナモルフは、それまですべて*R. glutinis*の中からのみ見つかった。 *R. glutinis*と*R. rubra*は、硝酸塩の資化性の有無で区別されていたので、異種間で接合が行われたことになり、今までの分類法のみでは不十分であることが示された。しかしながら、酵素の泳動パターンなどの生化学的手段も取り入れた分類法を導入すれば、このような菌株群については、分類・同定がよりの確になることが示された。

その後、浜本ら (1) は、これら酵素の泳動パターンに基づいて算出されたバンドの移動度を数値分類法に応用し、ユビキノシステムとの関連をからめて、これら酵母の類縁関係を一層明らかにした。

射出胞子酵母 (12, 16, 17)

*Sporobolomyces*属、*Sporidiobolus*属および*Bullera*属の酵母は、射出胞子を形成する特徴的な酵母だが、射出胞子形成能を失うと*Rhodotorula*属や*Cryptococcus*属の酵母と区

別がつかない。当時、研究室に射出胞子形成能を失った菌株が保存されていた。これらの菌株は、今までの同定法に従えば射出能を有していれば*Sporobolomyces*属に同定されるべきであるが、射出能を失えば*Rhodotorula*属に同定されてしまうものだった。これら胞子射出能を失った菌株も酵素の泳動パターンは同じだった。また、カロチノイド色素形成能を失った菌株が*S. roseus*の中から分離されたが、酵素の泳動パターンは同じであった。このような菌株が自然界から分離され、今までの方法で同定された場合、*Bullera*属に入れられてしまう。以上の結果から射出胞子酵母の射出胞子形成能や色素形成能を失った菌株が、*Rhodotorula*属や*Cryptococcus*属に多く混入していることが酵素の泳動パターンの比較から推測された。

子囊菌系酵母とそのアナモルフ

*Rhodotorula*属酵母とそのテレオモルフである*Rhodosporidium*属酵母との類縁関係が酵素の泳動パターンで確かめられたことから、子囊菌系酵母においてテレオモルフとアナモルフの相関関係が示唆されていた菌種間について酵素の泳動パターンから検討してみた。その結果、表2に示したような菌種間において泳動パターンの相同性がみられ、テレオモルフとアナモルフの類縁関

表1. 酵素の泳動パターンの類似性に基づく接合試験の結果、判明した*Rhodotorula*属酵母のテレオモルフ

アナモルフ	菌株	テレオモルフ	交配型
<i>R. glutinis</i> var. <i>rufusa</i>	AY28	<i>Rhodosp. toruloides</i>	a

<i>R. glutinis</i> var. <i>salinaria</i>	IFO 1438	<i>Rhodosp. sphaerocarpum</i>	a
<i>R. glutinis</i>	IFO 0688	<i>Rhodosp. diobovatum</i>	α
<i>R. rubra</i>	G5	<i>Rhodosp. toruloides</i>	A
<i>R. rubra</i>	G8	<i>Rhodosp. toruloides</i>	A
<i>R. rubra</i>	G27	<i>Rhodosp. toruloides</i>	A
<i>R. rubra</i>	G29	<i>Rhodosp. toruloides</i>	A

係が裏付けられた (14) .

・ *Dekkera* 属酵母とそのアナモルフである *Brettanomyces* 属酵母の酵素の泳動パターンと Smith, M. ら (2) の DNA-DNA ホモロジーとの相関関係の研究で, *Dekkera* 属3種は, *D. anomala* と *D. bruxellensis* (synonym: *D. intermedia*) の2種に, *Brettanomyces* 属9種は, *B. anomalus* (synonyms: *B. claussenii*), *B.*

bruxellensis (synonym: *B. abstinens*, *B. custersii*, *B. intermedius*, *B. lambicus*), *B. custerianus* および *B. naardenensis* の4種に統合できた. また, これらの酵母と類縁関係があると思われていた *Eeniella* 属酵母は, 泳動パターンもかなり異なり, 単一種として残された.

表2. 子囊菌系酵母とそのアナモルフと思われていた無胞子酵母 (1982年当時)

子囊菌系酵母	アナモルフ
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>Lodderomyces elongisporus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Pichia fermentans</i>	<i>Candida lambica</i>
<i>Hanseniaspora vinea</i>	<i>Kloeckera africana</i>
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	<i>Kloeckera apiculata</i>
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	<i>Candida macedoniensis</i>
<i>Hanseniaspora valbyensis</i>	<i>Kloeckera japonica</i>
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	<i>Candida pseudotropicalis</i>
<i>Saccharomyces exiguus</i>	<i>Torulopsis holmii</i>
<i>Hansenula wingei</i>	<i>Candida melinii</i>
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	<i>Torulopsis colliculosa</i>
<i>Hansenula jadinii</i>	<i>Candida utilis</i>

その他の酵母

山田ら (4) は, *Sterigmatomyces* 属とその中から形態および化学分類の見地から独立した属として分けられた *Fellomyces* 属, そしてそれらのテレオモルフである *Sterigmatosporidium* 属について, 酵素の泳動パターンからの分類学的研究を行った. また, 子嚢胞子の形態, 脂肪酸組成, キノンタイプなどから, 分裂酵母である *Schizosaccharomyces* 属から *Octosporomyces* 属と *Hasegawaea* 属を独立させたが, これらの酵母について, 酵素の泳動パターンからも分類学的研究を行い, 改めて独立した属であることを確認した (7). その他, 山田ら (5) は, *Mrakia* 属, *Cystofilobasidium* 属, *Leucosporidium* 属および *Rhodosporeidium* 属 の分類学的研究においても酵素の泳動パターンを応用した.

さらに, *Saccharomyces* 属酵母 (10), *Hansenula* 属酵母 (18), *Lipomyces* 属と *Myxozyma* 属の類縁関係 (3) についても酵素の泳動パターンから多くの分類学的知見が得られている. また, 山田ら (6) は,

Lipomyces 属から *L. lipofer* を *Waltomyces* 属として独立させ, 酵素の泳動パターンも分類学的研究に応用している.

酵素の泳動パターンの分類学的意義

酵素の泳動パターンは, 酵素の構造の微少な差異を区別できるので, 種あるいは菌株レベルにおいて, 形態的および生理的性質が類似して判別が困難な菌種群の区別に有用である. また, 酵母の分類基準として重要視されている性質, たとえば, 胞子の形成能, 硝酸塩の資化能, 色素の形成などを失った場合でも, この手法により, その類縁を知ることができる. また, 真核生物の場合, アナモルフの菌種がテレオモルフのどの種類に対応しているかという問題は重要だが, この手法により, その対応関係がある程度推測できることが明らかとなった. なお, 最近出版された “The yeasts” (第4版) (19) にも酵素の泳動パターンの分類学的意義が考察されている.

文献

1. Hamamoto, M., Sugiyama, J., Goto, S. and Komagata, K. Numerical taxonomy based on the electrophoretic mobility of enzymes in the genera *Rhodosporeidium*, *Cystofilobasidium* and *Rhodotorula*. J. Gen. Appl. Microbiol. **32**, 89-99 (1986).
2. Smith, M. TH., Yamazaki, M. and Poot, G. A. *Dekkera*, *Brettanomyces* and *Eeniella*, Electrophoretic Comparison of Enzymes and DNA-DNA Homology, Yeast **6**, 299-310 (1990).
3. Yamada, Y. and Aizawa, K. Electrophoretic comparison of enzymes in strains of species in the genera *Myxozyma* (Cryptococcaceae) and *Zygozyma* (Lipomycetaceae). Trans. Mycol. Soc. Japan. **28**, 163-170 (1987).
4. Yamada, Y., Aizawa, K., Matsumoto, A., Nakayama, Y. and Banno, I. The electrophoretic comparison of enzymes in strains of species in the anamorphic yeast genera *Sterigmatomyces* and *Fellomyces* and in the teleomorphic yeast genus *Sterigmatosporidium*. J. Gen. Appl. Microbiol. **32**, 157-163 (1986).

5. Yamada, Y. and Matsumoto, A. An electrophoretic comparison of enzymes in strains of species in the genus *Mrakia* Yamada et Komagata (Filobasidiaceae). J. Gen. Appl. Microbiol. **34**, 201-208 (1988).
6. Yamada, Y. and Matsumoto, A. An electrophoretic comparison of enzymes in strains of species in the genera *Lipomyces* Lodder et Kreger-van Rij and *Waltomyces* Yamada et Nakase (Lipomycetaceae). Agric. Biol. Chem. **52**, 2525-2530 (1988).
7. Yamada, Y., Watanabe, M., Akita, M. and Banno, I. An electrophoretic comparison of enzymes in strains of species in the fission yeast genera *Schizosaccharomyces*, *Octosporomyces*, and *Hasegawae*. J. Gen. Appl. Microbiol. **33**, 363-369 (1987).
8. 山崎真司. 電気泳動パターン. 微生物の化学分類実験法. 駒形和男編集. 学会出版センター p. 184-209 (1982).
9. Yamazaki, M. and Goto, S. An electrophoretic comparison of enzymes in the genera *Lipomyces* and *Myxozyma*. J. Gen. Appl. Microbiol. **31**, 313-321 (1985).
10. Yamazaki, M., Goto, S. and Komagata, K. An electrophoretic comparison of the enzymes of *Saccharomyces* yeasts. J. Gen. Appl. Microbiol. **29**, 305-318 (1983).
11. Yamazaki, M., Goto, S. and Komagata, K. Taxonomical studies of the genus *Tilletiopsis* on physiological properties and electrophoretic comparison of enzymes. Trans. Mycol. Soc. Japan. **26**, 13-22 (1985).
12. 山崎真司, 駒形和男. 酵母の酵素の電気泳導パターンによる *Rhodotorula-Rhodospidium* の研究. 微生物の生態 9, 糸状細胞, 微生物生態研究会編, 学会出版センター p. 197-227 (1981).
13. Yamazaki, M. and Komagata, K. Taxonomic significance of electrophoretic comparison of enzymes in the genera *Rhodotorula* and *Rhodospidium*. Int. J. Syst. Bacteriol. **31**, 361-381 (1981).
14. Yamazaki, M. and Komagata, K. Asporogenous yeasts and their supposed ascosporeogenous states: An electrophoretic comparison of enzymes. J. Gen. Appl. Microbiol. **28**, 119-138 (1982).
15. Yamazaki, M. and Komagata, K. An electrophoretic comparison of enzymes in the genus *Cryptococcus* and related microorganisms. J. Gen. Appl. Microbiol. **28**, 429-449 (1982).
16. 山崎真司, 駒形和男. 酵母の酵素の電気泳導パターンと分類 酵母研究における方法論 基礎と応用 永井 進編集. 学会出版センター p. 2-23 (1982).
17. Yamazaki, M. and Komagata, K. An electrophoretic comparison of enzymes of ballistosporogenous yeasts. J. Gen. Appl. Microbiol. **29**, 115-143 (1983).
18. Yamazaki, M. and Komagata, K. An electrophoretic comparison of the enzymes of *Hansenula* yeasts. J. Gen. Appl. Microbiol. **29**, 365-378 (1983).
19. Yamazaki, M., Kurtzman, C. P. and Sugiyama, J. Electrophoretic comparisons of enzymes, The yeasts, a taxonomic study, 4th, ed. by Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, p. 49-53 (1998). (山崎真司)

カビにおける酵素電気泳動パターン解析

本研究会におけるカビを対象にした酵素電気泳動パターンに基づく分類手法の研究発表は 2 報のみである。最初は、第 10 回研究会（平成 2 年 11 月）において、Rahayu, E. S.（東大応微研，現東大分生研）が好乾性 *Aspergillus* 分類群について、関連テレオモルフ種との関係を明らかにした。その後、第 14 回研究会（平成 6 年 12 月）において、田村（東大分生研）が同様の手法を用いて、好乾性 *Aspergillus penicillioides* 14 株を対象に、本種の系譜的 (genealogical) 多様性を明らかにした。この 2 つの研究の端緒は、杉山・大和屋 (11), 大和屋ら (15) の *Aspergillus* 属 2 節を対象にした研究成果である。前者は、ユビキノ系からも多様性が示唆された *Ornati*, *Cremeri* 両節に帰属する 30 株について研究を行なった。後者は、*Flavi* 節に帰属する 41 株について研究を行い、DNA 相同 (ホモロジー) 値 (3) との比較を行い、本手法の意義について検討、考察を行なった。両者の研究を基礎にして、その後の酵素電気泳動パターン解析は展開した。

そこで、本稿では、*Aspergillus* 属とその関連テレオモルフを対象にした化学分類学的手法としての酵素電気泳動パターン解析の評価について、同属の節ごとに議論を進める。

実験及びデータの解析法

酵素の電気泳動とその検出法は、山崎 (16) に従った。用いた酵素は 5 つ；glutamatedehydrogenase (GDH), fumarase (Fum), malate dehydrogenase (MDH),

glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), lactate dehydrogenase (LDH) であり、GDH を除き、菌類における糖代謝に関わる主要な酵素で、比較的検出しやすいものを選んだ。現れたバンドの相対移動度 (R_m) を求め、求めた R_m 値から菌株間の相似度値を算出し、平均連結法を用いてデンドログラムとして表現した。（実験法及びデータ解析法の詳細は、前述の「酵母の酵素の電気泳動パターン」の項を参照。）

Aspergillus 属における酵素電気泳動パターンの評価

Nealson, K. H. and Garber, E. D. (7), Kurzeja, K. C. and Garber, E. D. (5) は、酵素パターンの比較を *Aspergillus* 属の分類に適用した。しかし、この技法が、*Aspergillus* 属の分類指標として有効であるかどうかについて検討、あるいは、評価されたわけではなかった。そこで、大和屋ら (15) は、*Flavi* 節に帰属する 41 株について研究を行い、Kurtzman, C. P. ら (3) による DNA 相同値の結果と比較し、本手法の化学分類学的形質としての意義について検討した。

Circumdati 亜属 *Flavi* 節菌種は、主要ユビキノ系 Q-10(H₂) をもち、その関連テレオモルフは今だに不明である。本節には *A. oryzae*, *A. sojae* を初めとする黄麹菌が含まれ、酒、味噌、醤油などの発酵食品の製造に利用されているが、反面、アフラトキシンなどのカビ毒を産生する *A. flavus*, *A. parasiticus* なども含まれるため、多方面から研究がなされてきた。

図 1 は、*Flavi* 節の *A. flavus* 及び表現型が類似する 4 株間において、遺伝形質、酵素パターンと DNA 相同性データをまとめ

たものである。 *A. flavus* と *A. oryzae* は、酵素パターンと DNA 相同性ともに 100%、また、 *A. parasiticus* と *A. sojae* は、90%の相似度値、100%の相同値を示した。さらに、これら 4 種間においては、酵素パターンは 72%の相似度値を、DNA 相同性は 60~74%の相同値を示した。以上の結果から、酵素パターンは、それぞれの種において特徴的であり、DNA 相同値ともよい相関を示したことから、 *Aspergillus* 属の種レベルの識別に有用な指標であると結論づけた (15)。酵母では、DNA 相同値が 70%以上であれば同一種であると報告されている (3)。田村ら (14) は、このガイドラインを酵素パターンにあてはめ、相似度値 60%より大きい値を示す菌株は同種であると定義づけた。田村ら (13) は、これら 4 株間の DNA 相同性をメンブレンフィルター法において調べたところ、種内の株間では高い相同値 (80%以上) が得られ、Kurtzman, C. P. らのデータ (3) を支持した。さらに、遺伝形質である DNA の塩基配列においては、蛋白質をコードしている遺伝子において *A. flavus*, *A. oryzae* と *A. parasiticus* とも同一配列であり (1)、また、介在配列 (ITS1, 2) においては、 *A. flavus*, *A. oryzae* と *A. parasiticus*, *A. sojae* 間は、1%の相違があった (8)。遺伝形質と表現形質からも、これら 4 種は、同種か或いは類縁種であることが明確となった。これらの研究成果の一部は、第 14 回研究会で田村により発表された。

1) *Aspergillus* 属 *Ornati* 節

Ornati 亜属 *Ornati* 節は、4 つのテレオモルフ属 (*Dichlaena*, *Hemicarpenteles*, *Sclerocleista*, *Warcupiella*) と関係し、アナモルフの種をふくめて 10 種 1 変種より構成

され、コピキノン系は 3 分子種 (Q-9, Q-10, Q-10(H₂)) が分布しており、実に多様性にとんでいる。杉山・大和屋 (11) は、本節に含まれる内外のカルチャーコレクションから入手したタイプに由来する株を中心に 30 株について酵素パターンの比較を行なったところ、同じ種内の産地及び生育地の異なる菌株は同一もしくは似たような酵素パターンを示した。デンドログラムにおいては、相似度値 30%で 5 つのクラスターに分かれ、本節は、酵素パターンから見ても異質な分類群の集まりであることが裏付けられた。

2) *Aspergillus* 属 *Fumigati* 節

Fumigati 亜属 *Fumigati* 節は、アスペルギルス症 (aspergillosis) の主原因菌を含むことから医真菌学上、また食品汚染菌として食品衛生上も重要な菌である。松田ら (6) は、臨床分離 64 株について電気泳動パターンを行ったところ、34 株の *A. fumigatus*, 8 株の *A. terreus*, 14 株の *A. niger* は、それぞれ 70~100%と高い相似度値を示し、60%のガイドラインで独立したクラスターに分かれ、種を明確に識別することができた。従って、酵素パターンは、臨床分離株においても、迅速に同定できることがわかった。

3) *Aspergillus* 属 *Aspergillus*, *Restricti*

両節

Aspergillus 亜属 *Aspergillus* 節は、*Eurotium*, *Edyullia* がテレオモルフ種として関連しているが、*Restricti* 節のテレオモルフは不明である。両節は、好乾性 (Xerophilic) という共通した生理的性質をもつ。杉山ら (10) は、好乾性 *Aspergillus* 属

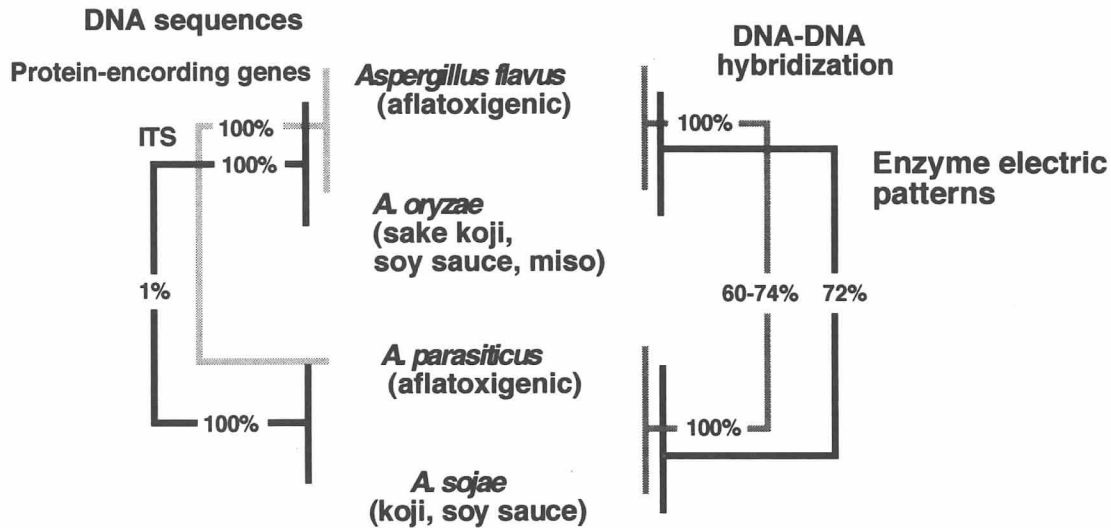


図1. *Aspergillus* 属 *Flavi* 節に帰属する4種の表現形質と遺伝形質の関係 (9, 一部改変)

DNAの塩基配列はGeiser, D. M. ら (1) と Nikkuni, S. ら (8), DNA相同性実験は Kurtzman, C. P. ら (3), 酵素電気泳動パターンは Yamatoya, K. ら (15) のデータを用いた。

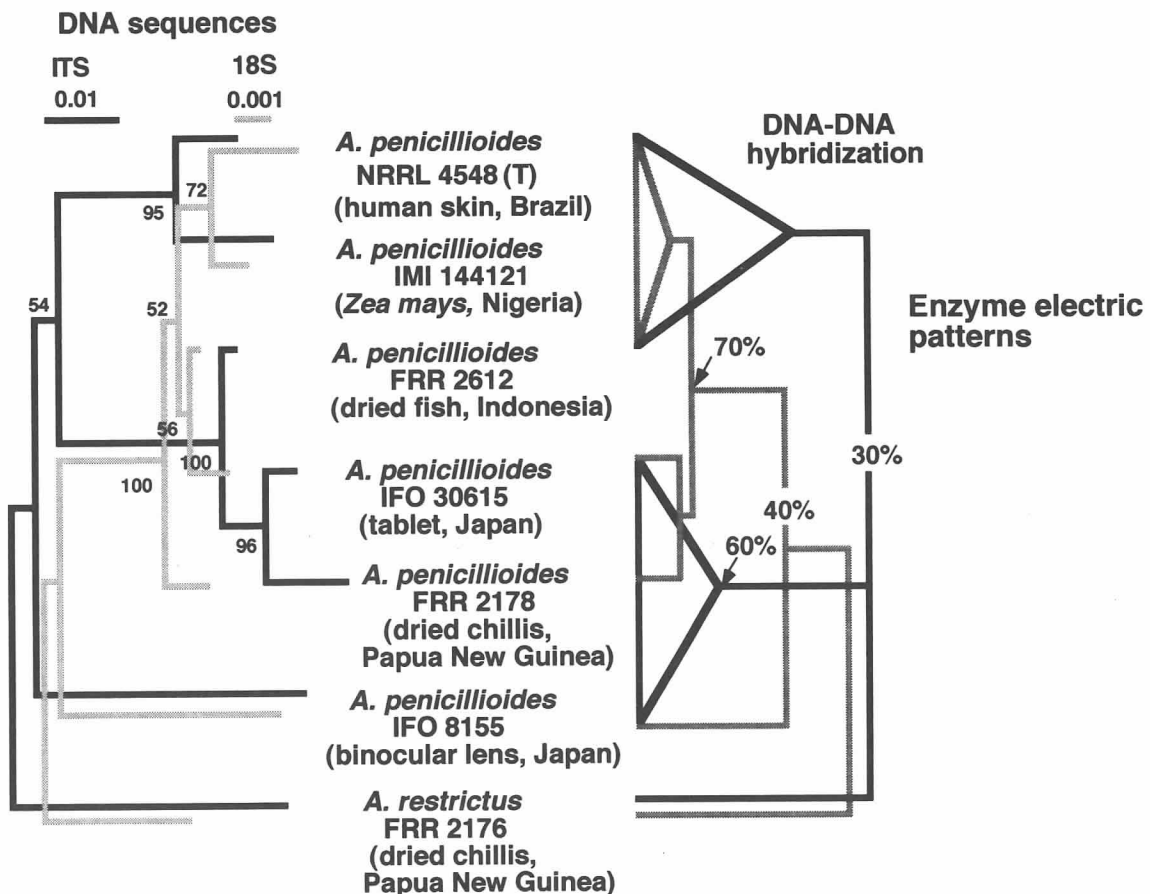


図2. *Aspergillus penicillioides* 6株における種内多様性

DNAの塩基配列とDNA相同性実験は Tamura, M. ら (13), 酵素電気泳動パターンは Tamura, M. ら (14) のデータを用いた系統樹において、バーの長さは、それぞれ、1置換/100座位 (ITS), 1置換/1000座位 (18S) を示す。また、数値は、1,000回のブートストラップ値を%で示したものである。

と関連テレオモルフ属菌種について、酵素パターンの解析からその多様性を示唆し、第 10 回研究会で Rahayu, E. S. により発表された。

A. penicillioides は、*Restricti* 節に帰属するアナモルフ種であり、書物などの文化財、レンズ、乾燥穀物成分の劣化を引き起こす。また、人の皮膚・眼球、空中の埃からも分離され、アレルギー疾患を引き起こす原因菌としても知られ、医真菌学の分野からも注目されている。田村ら (14) は、*A. penicillioides* のアイデンティティーを調べるため、*Aspergillus*, *Restricti* 両節と関連テレオモルフ属に帰属する 42 株について酵素パターンの解析を行った。その結果、相似度値 10%以下で 3 つの大きなクラスターに分かれ、60%のガイドラインで 22 のサブクラスターに分かれた。*A. penicillioides* 14 株は、9 つのサブクラスターに分散した。従って、主要ユビキノン系 Q-9 を持ち、形態学的、生理学的性質により同一種とされた *A. penicillioides* 菌株は、複数種に分割される可能性が強く示唆された (第 14 回にて発表)。さらに、田村ら (13) は、酵素パターンから別種である可能性が示唆された IFO 8155 を中心に、DNA 相同性、遺伝子塩基配列による系統解析を行なった。その結果、IFO 8155 と基準株を含む *A. penicillioides* 5 株との DNA 相同性は 40%と低かった。また、IFO 8155 は、18S rDNA, 5.8S rDNA と介在配列 (ITS 2) に基づく系統樹からも、他の *A. penicillioides* 菌株とは離れて位置し、*A. penicillioides* ではない可能性がより明確となり、もとの学名 *A. vitricola* を復活し、帰属すべきであると結論づけた。図 2 は、本稿にあわせて、*A. penicillioides* 6 株の分離源と産地 (国名)、

遺伝子 (18S rDNA, ITS) による系統解析、酵素パターン、DNA 相同性を示し、その多様性について示したものである。

4) *Aspergillus* 属 *Clavati* 節

A. clavatus を基準種とする *Clavati* 亜属 *Clavati* 節菌種は、4 種が含まれ、棍棒状の頂囊の長さと大きさにより、識別される。田村ら (12) は、本節に帰属する 10 株において酵素パターンの比較を行ったところ、60%のガイドラインで 4 種はそれぞれ独立したクラスターを形成した。さらに、これら 4 種の DNA-DNA 交雑実験を行った結果、4 種の株間では、77~100%と高い相同値を示したが、4 種内の基準株間では、36~59%と低かった。従って、酵素パターンの比較、DNA 相同性の結果から、形態では識別が困難な 4 種は、それぞれ独立した種であることが裏付けられた。

まとめ

酵素電気泳動パターンとその数値分類、ユビキノン系、DNA 塩基組成、DNA 相同性などの化学分類学的指標の組み合わせは、酵母のみならず、*Aspergillus* 属などの菌類における種レベルの類縁度を測るのに有用な分類指標である。そこから得られるデータは、主として形態学的概念に基づいて提案された分類群の妥当性を評価するのに有用である。現在では、rRNA 遺伝子 (ITS 領域を含む) や蛋白質をコードする遺伝子、例えば、Geiser, D. M. ら (1, 2) の塩基配列に基づく比較解析が主流となっている。これらの遺伝情報は、*Aspergillus* 属分類群およびそれらのテレオモルフ属の進化的関係を調べる指標として有用であり、そのデータの蓄積は、系統に基づく本属の分類体系再編に大きく寄与するものと期待される。

今後、このような遺伝形質と表現形質の統合的解析がなされることにより、カビの分類、系統進化の関係がより明確なものとなるであろう。

文献

1. Geiser, D. M., Pitt, J. I. and Taylor, J. W. Cryptic speciation and recombination in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**, 388-393 (1998a).
2. Geiser, D. M., Frisvad, J. C. and Taylor, J. W. Evolutionary relationships in *Aspergillus* section *Fumigati* inferred from partial β -tubulin and hydrophobin DNA sequences. Mycologia **90**, 831-845 (1998b).
3. Kurtzman, C. P., Smiley, M. J., Robnett, C. J. and Wicklow, D. T. DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. Mycologia **78**, 955-959 (1986).
4. Kurtzman, C. P. Prediction of biological relatedness among yeasts from comparisons of nuclear DNA complementarity. Stud. Mycol. **30**, 459-468 (1987).
5. Kurzeja, K. C. and Garber, E. D. A genetic study of electrophoretically variant extracellular amylolytic enzymes of wild strains of *Aspergillus nidulans*. Can. J. Genet. Cytol. **15**, 275-287 (1973).
6. Matsuda, H., Kohno, S., Maesaki, S., Yamada, H., Koga, H., Tamura, M., Kuraishi, H. and Sugiyama, J. Application of ubiquinone systems and electrophoretic comparison of enzymes to the identification of clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and several other species of *Aspergillus*. J. Clin. Microbiol. **30**, 1999-2005 (1992).
7. Neelson, K. H. and Garber, E. D. An electrophoretic survey of esterases, phosphatases, and leucine amino-peptidases in mycelial extracts of species of *Aspergillus*. Mycologia **59**, 330-336 (1967).
8. Nikkuni, S., Nakajima, H., Hoshina, S., Ohno, M., Suzuki, C., Kashiwagi, N., Suzuki, C. and Mori, K. Evolutionary relationships among *Aspergillus oryzae* and related species based on the sequences of 18S rRNA genes and internal transcribed spacers. J. Gen. Appl. Microbiol. **44**, 225-230 (1998).
9. O' Donnell, K. Molecular genetic approaches for measuring microbial diversity : Examples from filamentous fungi. In Diversity and use of agricultural microorganisms, ed. by Kunihiko, K. *et al.*, MAFF & NIAR, Tsukuba, p. 7-25 (1999).
10. Sugiyama, J., Rahayu, E. S., Chang, J.-M. and Oyaizu, H. Chemotaxonomy of *Aspergillus* and associated teleomorphs. Jpn. J. Med. Mycol. **32** (Suppl. 2), 39-60 (1991).
11. Sugiyama, J. and Yamatoya, K. Electrophoretic comparison of enzymes as a chemotaxonomic aid among *Aspergillus* taxa : (1) *Aspergillus* sects. *Ornati* and *Cremeri*. In Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification, ed., by Samson, R. A. and Pitt, J. I., Plenum Press., New York, p. 385-393 (1990).
12. Tamura, M., Hamamoto, M., Gibas, C., Sugiyama, J. and Nakase, T. Genetic relatedness among

- species in *Aspergillus* section *Clavati* as measured by electrophoretic comparison of enzymes, DNA base composition, and DNA-DNA hybridization . J. Gen. Appl. Microbiol. **45**, 77- 83 (1999).
13. Tamura, M., Kawasaki, H. and Sugiyama, J. Identity of the xerophilic species of *Aspergillus penicillioides* : Integrated analysis of the genotypic and phenotypic characters. J. Gen. Appl. Microbiol. **45**, 29-37 (1999) .
 14. Tamura, M., Rahayu, E. S., Gibas, C. and Sugiyama, J. Electrophoretic comparison of enzymes as a chemotaxonomic aid among *Aspergillus* taxa : (3) The identity of the xerophilic species *Aspergillus penicillioides* in subgen. *Aspergillus* sect. *Rectrici*. J. Gen. Appl. Microbiol. **42**, 235-248 (1996).
 15. Yamatoya, K., Sugiyama, J. and Kuraishi, H. Electrophoretic comparison of enzymes as a chemotaxonomic acid among *Aspergillus* taxa: (2) *Aspergillus* section *Flavi*. In Samson, R. A. and Pitt, J. I. eds., Modern Concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, p. 395-405, Plenum Press, New York (1990).
 16. 山崎真司, 電気泳動パターン, 微生物の化学分類実験法, 駒形和男編, 学会出版センター, p. 184-209 (1982).

(田村美貴)

タンパク質

信太 治

はじめに

タンパク質は、遺伝子から mRNA を介して最初に合成される第 1 次表現形質で、物質としての安定性は非常に高く、菌体脂肪酸が培養温度で組成比を変えるのとは対照的である。その代わり、タンパク質の生産は、遺伝子から mRNA への転写や mRNA からタンパク質への翻訳といったそれぞれの段階で高度に制御され、最終的に生産されるさまざまなタンパク質はその種類によって生産量が大きく変化する。タンパク質はアミノ酸配列において情報高分子としての性格を持つ。rRNA がそれ自体に構造体としての機能があるのに対し、タンパク質はそのアミノ酸配列が機能を規定すると同時に、それをコードしている遺伝子の塩基配列が進化を反映していると考えられ、両者を対比した系統分類学的な解析を可能としている。タンパク質の解析には、1) それをコードする遺伝子、2) そのアミノ酸配列、そして 3) 分子としてのタンパク質と 3 段階のアプローチがある。タンパク質解析技術は、分子生物学の分野で日々革新が続けられており、これから分類指標として最も期待される生体成分であることは相違ない。

タンパク質の細菌分類学への応用

先に挙げた 3 つのタンパク質の解析方法のうち、1) および 2) に関しては最近の研究の進展はめざましいものがある。その例として、リボソームタンパク質のひとつである L-30 の 2 次元電気泳動に置ける移動度と、その N 末端のアミノ酸配列から、特に放線菌の分類に

おけるこのタンパク質の有効性が報告されている (8-11)。また、細菌の II 型トポイソメラーゼである DNA gyrase の B subunit をコードする遺伝子 *gyrB* に注目し、その塩基配列とそこから予想されるアミノ酸配列に基づく系統関係から、さまざまな細菌の種レベルでの同定への応用を展開している (20, 27, 28)。一方、3) に関しては古くからさまざまなアプローチが試みられてきている。前項の酵素タンパク質の 1 次元電気泳動による移動度の違いの比較もタンパク質の解析の 1 種であるし、病原性細菌で古くから行われてきた免疫学的手法もその 1 つであろう。また、細菌細胞表層タンパク質 (S-layer) という構造的なタンパク質の機能やその免疫学的性質が 1 部の好気性有孢子細菌の属を反映することが報告されている (1, 7, 14, 17, 19, 21)。そのなかで、最も代表的な手法はタンパク質の電気泳動によるプロファイル进行分类指標とする方法であろう。特に全菌体タンパク質の電気泳動によるプロファイルを用いる分類法は長年にわたって広く用いられてきた実績があり、特にベルギーの De Ley, J., Kersters, K. らのグループが重用し、大きな成果を上げている (5, 12, 13, 23, 25, 26)。この手法の大きな利点は、1 度に多数の細菌株を処理できること、他の化学分類学的指標では識別しにくい、種レベルかそれ以下のレベルのグルーピングなどで威力を発揮することである (24)。これらのデータは数値解析の材料として多く採用されており、その解析ソフトが市販されているなど、システムとしても普及している。

日本における全菌体タンパク質の電気泳動プロファイルを用いる分類法の応用

全菌体タンパク質の電気泳動プロファイルを用いる分類法は、他の化学分類学的手法にはない、大きな利点があるにもかかわらず、日本ではこの手法を用いて細菌の分類を行う研究グループは極めて少なかった。それは、電気泳動プロファイルを解析処理する高性能のコンピュータとその周辺機器、さらにプロファイルを数値データに変換しそれを解析するソフトがわが国になかったことが大きな原因であったと考えられる。1990年代に入り、このようなコンピュータを中心とした解析装置やソフトのめざましい技術革新があった。現在では日本でもタンパク質や核酸の電気泳動パターンの解析ソフトが市販されているなど、システムとしての普及がみられ、細菌全菌体タンパク質の電気泳動プロファイルによる分類を誰でも簡単に行える環境が整っている。

1990年代初頭、我が国では核酸・タンパク質プロファイルの解析ツールは開発途上であった。そのため、日本でこのようなシステムを使用した研究を行うためには、数千万円もする高価な外国製のシステムを導入する必要があった。農水省種苗管理センターは他の国内の研究機関に先駆けて、タンパク質・核酸電気泳動プロファイル解析システムである Discovery Series™ (PDI Inc., NY, USA) を導入し、核酸のプロファイル解析を中心とした研究を精力的に行っていた。我々のグループは当センターの矢野 博 博士（現農水省中国農業試験場育種工学研究室長）の協力を得て、本システムを利用した菌体タンパク質のプロファイル解析を行う機会を得た。その結

果をここで紹介する。

全菌体タンパク質の電気泳動プロファイルによる *Brevibacillus* 属細菌と *Aneurinibacillus* 属細菌の分類

我々のグループは *Bacillus brevis* とその近縁種である考えられていた“*B. aneurinolyticus*”について分類学的検討を試み、これらを9種 (*B. brevis sensu stricto*, *B. agri*, *B. centrosporus*, *B. choshinensis*, *B. parabrevis*, *B. reuszeri*, *B. formosus*, *B. borstelensis*, *B. migulanus*, *B. aneurinilyticus*) に再分類した (15-17, 21)。さらに系統分類学的知見と S-layer 蛋白質の免疫学的な特徴から、9種 (*B. brevis sensu stricto*, *B. agri*, *B. centrosporus*, *B. choshinensis*, *B. parabrevis*, *B. reuszeri*, *B. formosus*, *B. borstelensis*, *B. laterosporus*) を新属 *Brevibacillus* 属、2種 (*B. migulanus*, *B. aneurinilyticus*) を新属 *Aneurinibacillus* 属とした (14)。これら2つの属の構成種が示す表現形質や化学分類学的性質は極めて類似しており、これらの細菌の識別には DNA 相同性の値を算出することが最も有効な方法であると考えられた。そこで、*Brevibacillus* 属細菌と *Aneurinibacillus* 属細菌の構成種を識別する簡便な手法を開発する目的で、菌体蛋白質の電気泳動プロファイルによる分類を試みた。

実験に供した細菌株は *Brevibacillus* 属細菌9種67株と *Aneurinibacillus* 属細菌2種23株である。細菌株は T2 寒天培地 (22) で 30°C、24 時間培養した。湿重量 20 mg の菌体を 180 μ l の PBS (8 mM リン酸水素二ナトリウム, 1.5 mM リン酸二水素カリウム, 137 mM 食塩, 2.7 mM 塩化カリウム) に懸濁し、20 μ l の SDS 化バッファ (128 mM トリス-塩酸 (pH 6.8), 10% (w/v) SDS, 50% (w/v) グリセロール, 25% (v/v) メルカプトエタノール, 0.005%

(w/v) プロモフェノールブルー)加えた.100°Cで15分処理後,15,000 rpmで3分遠心し,その上清を菌体蛋白質とした.電気泳動装置はHoefer Science Instruments (CA, USA)のSE 600を用い,0.75 mmのスペーサーを使用した.SDS-7.5%ポリアクリルアミドゲル1枚当たりのコース数は15とし,1レーン当たり15 μlの試料をロードした.分子量マーカーはBio-rad laboratories (CA, USA)のSDS-PAGE molecular weight standard broad rangeを用い,5レーン毎にロードした.SDS-7.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動はLaemmli, U. K.の方法(6)で,4°C,50 mAの定電流下で行った.電気泳動終了後,ゲルは0.5%クマシーブルー R-250で染色,20%酢酸で脱色し,ゲルドライヤー (Rapidry-mini, ATTO Co., Tokyo, Japan)で乾燥させた.

タンパク質の電気泳動プロファイルのスキヤニングと解析はDiscovery Series™ (PDI Inc., NY, USA)を用いて行った.それぞれの細菌株に由来するタンパク質は,分子量30~200 kDaの明瞭な蛋白質のバンドのうち,吸光度が0.3以上のものを選択した.1株当たりそれぞれのレーンの蛋白質の移動度は5レーン毎に泳動した分子量マーカーの移動度に基づいて調整した.細菌株間の類似度はシンプルマッチング法で計算し,UPGMA法でクラスタリングを行った.類似度の計算およびクラスタリングはNTSYS-pc ver. 1.6プログラム(Exter Publishing Ltd., NY, USA)を用いた.*Brevibacillus*属細菌と*Aneurinibacillus*属細菌11種90株の菌体蛋白質の電気泳動プロファイルは図1に示した.タンパク質のプロファイルから数値分類に供するバンドを選択した

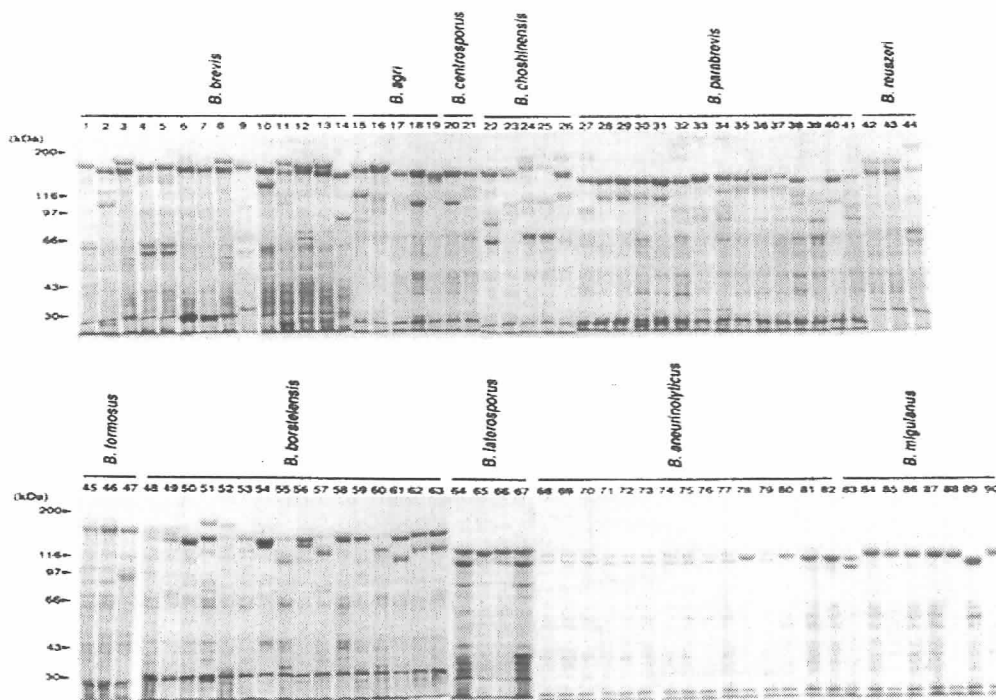


図1. *Brevibacillus*属細菌と*Aneurinibacillus*属細菌の菌体タンパク質の電気泳動プロファイル

ところ, 各細菌株とも 45~50 種類の蛋白質を数値分類に用いることになった. この結果を基に数値分類を行い, 得られたデンドログラムを図 2 に示した. 供試した 2 属 90 株は 55% の類似度で *Brevibacillus* 属細菌で構成されるクラスター 1 と *Aneurinibacillus* 属細菌で構成されるクラスター 2 に分類された. さらにクラスター 1 および 2 は, 76% の類似度でそれぞれ 8 つ, 2 つのサブクラスターに分類された. クラスター 1 に属するサブクラスター A,

B, D, E, F, G, H はそれぞれ *B. brevis*, *B. laterosporus*, *B. agri*, *B. reuszeri*, *B. choshinensis*, *B. formosus*, *B. borstelensis* と分類されている細菌株で構成されていた. サブクラスター C は *B. centrosporus* と *B. parabrevis* と分類されている細菌株で構成される 2 つのクラスターからなっていた. クラスター 2 に属するサブクラスター I, J はそれぞれ *A. aneurinilyticus*, *A. migulanus* と分類されている細菌株で構成されていた.

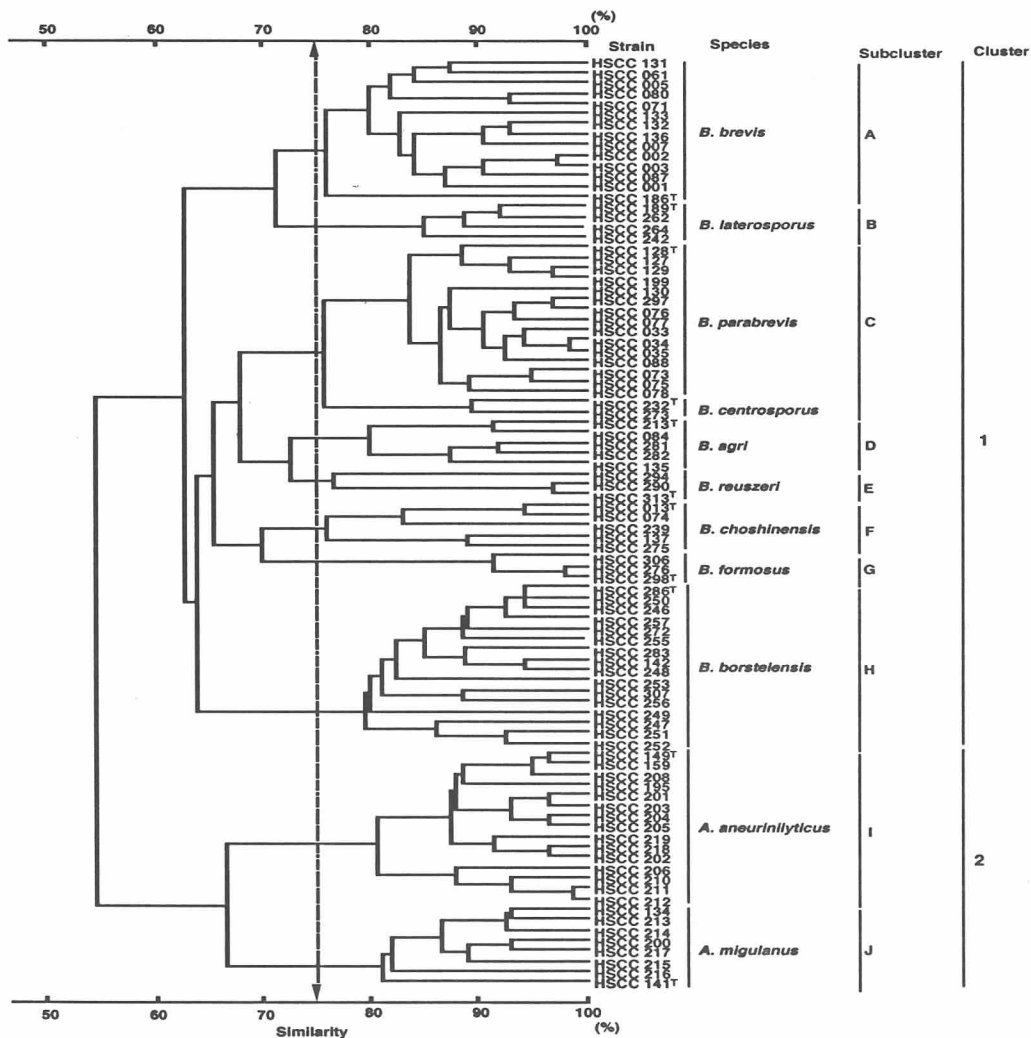


図 2. *Brevibacillus* 属細菌と *Aneurinibacillus* 属細菌の菌体タンパク質の電気泳動プロファイルに基づく数値分類の結果得られたデンドログラム

Brevibacillus 属細菌 9 種, *Aneurinibacillus* 属細菌 2 種, *Bacillus* 属細菌 5 種, *Paenibacillus* 属細菌 2 種の基準株の菌体蛋白質の電気泳動

プロファイルについて解析した. これらの細菌株の電気泳動プロファイルは図 3 に示した.

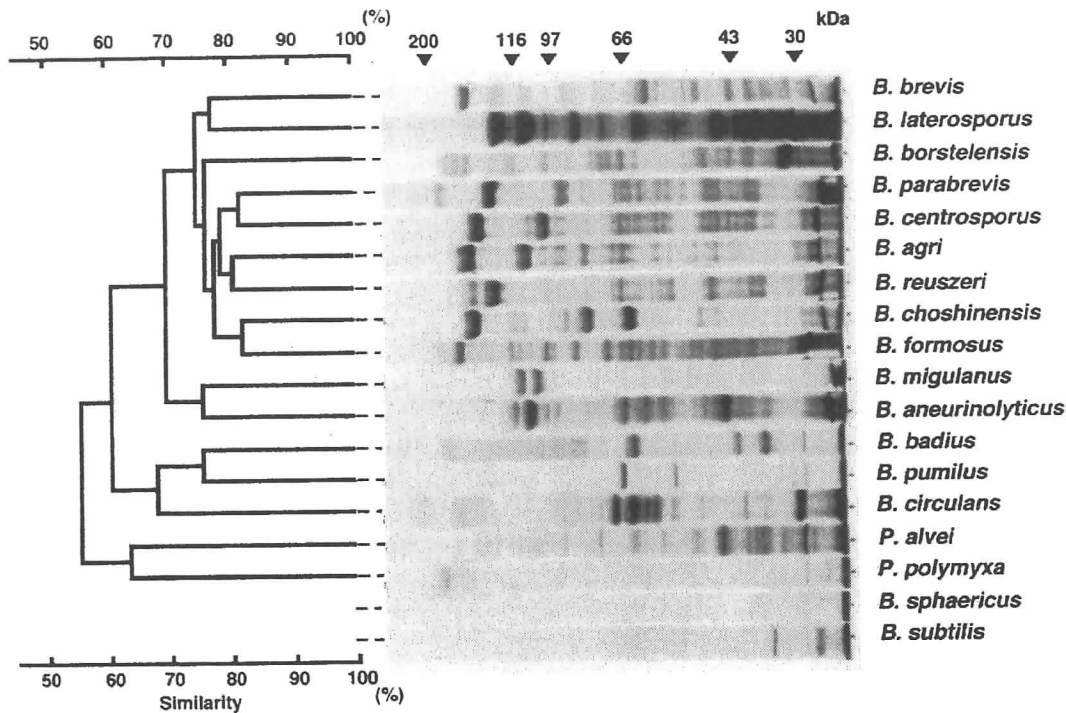


図 3. 18 種の好気性有孢子細菌の基準株の菌体タンパク質の電気泳動プロファイルとその数値分類により得られたデンドログラム

18 種のうち, 16 種の細菌については分子量 30 ~ 200 kDa の明瞭な蛋白質のバンドが 30 ~ 50 種類得られたが, *B. subtilis*, *B. sphaericus* は明瞭な蛋白質のバンドは得られなかった. 16 種の細菌のパターンはそれぞれ異なっており, 82% の相同性で区別することができた.

おわりに

Brevibacillus 属細菌 9 種と *Aneurinibacillus* 属細菌 2 種は菌体蛋白質の電気泳動プロファイルに基づく数値分類によって, 図 2 に示したように明確に区別することができた. この結果は DNA 相同性の値に基づく種レベルでの分類結果と良く一致した. さらに, 系統分

類の結果や S-layer 蛋白質の免疫学的性質や化学分類学的諸性質による分類した属レベルでの分類結果も良く反映していた.

ここまでの結果から, 菌体蛋白質の電気泳動パターンに基づく数値分類は, *Brevibacillus* 属細菌と *Aneurinibacillus* 属細菌の簡便かつ迅速な識別法として使用できることが明らかとなった. また, 他の好気性有孢子細菌についても簡便かつ迅速な種レベルでの識別法として応用できる可能性が示された.

この方法は電気泳動パターンのプロファイリングという手法であることから, 学名の記載に使用できるデータとはならないが, 既に分類学的位置が明確になっている細菌の種あ

るいは株レベルでの識別に優れた威力を発揮する。既知の化学分類学的手法や表現型の比較では識別が困難な細菌群、特に好気性有孢子細菌のように培養が容易で生育が早い細菌種の識別には最適な手法であると考えられる。プロファイルをデータベース化し、解析ツールを整備すれば、未知の細菌株との比較を簡単に行うことができるようになる可能性を秘めている。一方、図3に示したように *B. subtilis* や *B. sphaericus* は明瞭な菌体蛋白質パターン

が得られなかった。このような細菌種は他にも存在すると考えられるが、この方法は応用に当たっては十分な注意が必要である。

この方法が応用された細菌は、*Xanthomonas* 属 (23, 25), *Brevundimonas* 属 (13) などのグラム陰性細菌や、*Lactobacillus* 属 (26), *Bacillus* 属 (3, 12), *Paenibacillus* 属 (2, 4), *Aneurinibacillus* 属 (17, 18), *Brevibacillus* 属 (18) などであるが、詳しい結果はそれぞれの文献を参照されたい。

文献

1. Beveridge, T. J. and Graham, L. L. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.* **55**, 684-705 (1991).
2. Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Scheldeman, P., Hoste, B., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N. A., Aziz, A. M., Ali, N. and Berkeley, R. C. W. *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *gordonae* (Pichinoty et al. 1986) Ash et al. 1994 is a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *validus* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, emended description of *P. validus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 661-668 (1995).
3. Kaji, D. A., Rosato, T. B., Conhos, V. P. and Priest, F. G. Characterization by polyacrylamide gel electrophoresis of whole-cell proteins of some *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains isolated in Brazil. *Syst. Appl. Microbiol.* **17**, 104-107 (1994).
4. Kanzawa, Y., Harada, A., Takeuchi, M., Yokota, A. and Harada, T. *Bacillus curdlanolyticus* sp. nov. and *Bacillus kobensis* sp. nov., which hydrolyze resistant curdlan. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 515-521 (1995).
5. Kersters, K. and De Ley, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* **87**, 333-342 (1975).
6. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**, 680-685 (1970).
7. Messner, P. and Sleytr, U. B. Crystalline bacterial cell-surface layers. *Adv. Microbiol. Physiol.* **33**, 213-275 (1992).
8. Ochi, K. Comparative ribosomal protein sequence analyses of a phylogenetically defined genus, *Pseudomonas*, and its relatives. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 268-273 (1995).
9. Ochi, K. A taxonomic study of the genus *Streptomyces* by analysis of ribosomal protein AT L-30. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 507-514 (1995).
10. Ochi, K. and Miyadoh, S. Polyacrylamide gel electrophoresis analysis of ribosomal protein AT L-30 from an actinomycete genus *Streptosporangium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 151-155 (1992).
11. Ochi, K., Miyadoh, S. and Tamura, T. Polyacrylamide gel electrophoresis analysis of ribosomal

- protein AT L-30 as a novel approach to actinomycete taxonomy, application to the genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 234-239 (1991).
12. Raspoet, D., Pot, B., De Deyn, D., De Vos, P., Kersters, K. and De Ley, J. Differentiation between 2, 3-butanediol producing *Bacillus licheniformis* and *B. polymyxa* strain by fermentation product profile and whole-cell protein electrophoretic pattern. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**, 1-7 (1991).
 13. Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K. and De Vos, P. Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas vesiculans* comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 499-510 (1994).
 14. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. and Komagata, K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 939-946 (1996).
 15. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. and Komagata, K. Proposal of *Bacillus reuszeri* sp. nov., *Bacillus formosus* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus borstelensis* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 93-100 (1995).
 16. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Udaka, S. and Komagata, K. *Bacillus galactophilus* is a later subjective synonym of *Bacillus agri*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 172-173 (1994).
 17. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Yano, H., Abe, M., Udaka, S. and Komagata, K. *Bacillus aneurinolyticus* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 143-150 (1994).
 18. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Yano, H. and Komagata, K. Differentiation of species in the *Bacillus brevis* group and the *Bacillus aneurinolyticus* group based on the electrophoretic whole-cell protein pattern. *Antonie Leeuwenhoek.* **70**, 31-39 (1996).
 19. Sidhu, M. S. and Olsen, I. S-layers of *Bacillus* species. *Microbiology* **143**, 1039-1052 (1997).
 20. Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S. and Yamamoto, S. Phylogenetic analysis of genus *Marinilabilia* and related bacteria based on the amino acid sequences of GyrB and emended description of *Marinilabilia salmonicolor* with *Marinilabilia agarovorans* and its subjective synonym. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1551-1557 (1999).
 21. Takagi, H., Shida, O., Kadowaki, K., Komagata, K. and Udaka, S. Characterization of *Bacillus brevis* with descriptions of *Bacillus migulanus* sp. nov., *Bacillus choshinensis* sp. nov., *Bacillus parabrevis* sp. nov., and *Bacillus galactophilus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 221-231 (1993).
 22. Udaka, S. Screening for protein-producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **40**, 523-528 (1976).
 23. Vauterin, L., Swings, J. and Kersters, K. Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars by SDS-PAGE of proteins. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 1677-1687 (1991).
 24. Vauterin, L., Swings, J. and Kersters, K. Protein electrophoresis and classification. In Goodfellow, M. and O'Donnell, A. G. (eds.) *Handbook of new bacterial systematics*, p. 251-280, Academic Press, London (1993).
 25. Vauterin, L., Vantomme, R., Pot, B., Hoste, B., Swings, J. and Kersters, K. Taxonomic analysis of *Xanthomonas campestris* pv. *begoniae* and *X. campestris* pv. *pelargonii* by means of

- phytopathological, phenotypic, protein electrophoretic and DNA hybridization methods. Syst. Appl. Microbiol. **13**, 166-176 (1990).
26. Vogel, R. F., Bocker, G., Sotolz, P., Ehrmann, M., Fanta, D., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., Sohleifer, K. H. and Hammes, W. P. Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**, 223-229 (1994).
27. Yamamoto, S. and Harayama, S. PCR Amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. Appl. Environ. Microbiol. **61**, 1104-1109 (1995).
28. Yamamoto, S. and Harayama, S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**, 506-511 (1995).

分類研究会の歩みと微生物系統学の進歩

小柳津広志

私は、1977年から1983年までの6年半の間、東京大学の応用微生物研究所において駒形教授のご指導によって、微生物の分類学の勉強をさせていただきました。1982年3月「*Flavobacterium-Cytophaga* complexの分類学的研究」で農学博士号を取得し、その後1年6ヶ月の間、応用微生物研究所で研究生をしておりました。博士課程在学中に「化学分類の勉強会」が開始されたので、この会には第一回目から参加してきたこととなります。当時の駒形研究室ではあらゆる微生物分類群で、細胞の菌体脂肪酸組成、キノン組成、DNAのGC含量などの化学分類学的データを収集しようとしておりましたので、私もグラム陰性、好気性で色素を生成する細菌の一群について菌株収集とデータの取得を行っておりました。

博士課程在学の最後の年である1981年は、就職先を探さなければならない立場になっておりましたが、当時は研究を続けたいという希望だけが先に立ち、具体的に就職を探すなどということはほとんど考えておりませんでした。化学分類は、細胞成分の比較によって、微生物の違いを明らかとし、しかも、この違いは系統を反映したものであるということで大変魅力的なものに見えました。しかし、残念なことにこのデータで系統関係は全く分かりません。当時、最も関心があったことは、簡単にかつ明瞭に系統関係を明らかとする手法はないかと

いうことでありました。このころ、微生物の系統研究では、名古屋大学理学部の堀寛を中心としたリボソーム5S rRNAの配列に基づくアプローチと米国イリノイ大学のWoese, C. R. らによるリボソーム16S rRNAをRNase T1で切断して生じたオリゴヌクレオチドの配列を分析し、これの全体の情報を比較するアプローチ（リボソーム16S rRNAのカタログ法）の2つ流れがありました。私は、5S rRNAはわずか約120塩基のヌクレオチドから構成されており情報不足であると考え、Woese, C. R. らの研究に強く興味を引かれておりました。そこで、なんとか留学させてもらえないかと、手紙を送りました。これと同時に、さまざまな留学支援助成に応募しましたが、なかなか支援は得られませんでした。このような状況を当時応用微生物研究所の第2研究部で教授をされていた斉藤日向先生にご相談したところ、大変運良く東洋紡バイオテクノロジー財団の海外派遣助成をご紹介していただき、博士課程卒業から1年5ヶ月経った1983年8月にWoese, C. R. 教授の研究室に留学することになりました。

イリノイ大学のWoese, C. R. 教授は1977年に古細菌の概念を提唱し(1)、この内容は日本の新聞紙上では、各紙の1面で紹介され、駒形先生のもとにはいろいろなところから問い合わせの電話がかかってくるようになりました。Woese, C. R. の研究室では、1970

年代半ばから細菌のカタログ分析を開始し、私が留学した 1983 年には、おおかたの細菌群の分析を終えており、16S rRNA の全長の塩基配列の解読を開始していたところでした。私は、1983 年の 9 月からタイミングよくこのプロジェクトの開始時に参加することになりました。Woese, C. R. 教授は私に、これまでにカタログ法で解明した細菌の系統を代表する細菌種を選択し、それらを培養して 16S rRNA 遺伝子をクローン化して、配列を解読するようにと指示しました。私は、遺伝子操作は初めての作業であったので、最初の 4 ヶ月はなかなかうまくいきませんでした。ちょうど 5 ヶ月目を過ぎたころから、作業は順調に進むようになり、クローンの取得は 1 週間程度で、また配列の解読は 3 週間程度でできるようになりました。このころは、当然、DNA シークエンサーなどなく、塩基配列解読はラジオアイソトープを用いた手作業で行われたため、今とは比較にならないほど時間のかかるもので、1 つの 16S rDNA の解読には半年近くをかけて行っていました。私が 1 ヶ月程度で解読することに、Woese, C. R. 教授は大変驚き、5 ヶ月を過ぎたころには、これから何年でもいてくださいと言われ、大変嬉しかったことを記憶しています。その後、この塩基配列解読をもっと簡略化することができないかと作戦を練りましたが、最終的に逆転写酵素を用いる方法を提案しました。しかし、ちょうど同じ頃、当時インディアナ大学にいた Pace 教授のところと同じ方法を検討中であることを知らされ、実験を待つように言われ、残念な思いをしたことを記憶しています。逆転写酵素を用いる方法は、その後 1985 年に Lane

ら (2) によって報告され、1990 年代に PCR 法による塩基配列解読が一般的になるまで、微生物の系統解析に広範に利用されたことはご存じのとおりであります。

その後、私は 1985 年に富山大学教養部の生物学担当の講師として採用され、帰国することになりました。このころ、東京大学の応用微生物研究所の駒形研究室では、朴勇河さんが、5S rRNA の配列を解読して細菌の系統を詳細に調べる研究を行っていました。5S rRNA は情報が限られており、塩基配列解読も 16S rRNA より難しいので、なにを今さらそのような研究をしているのか、と不思議に感じていました。その後、微生物の系統研究では、16S rRNA 配列が利用されるようになり、私の予想は的中いたしました。1987 年に発表された Woese, C. R. 教授の細菌の系統に関する総説は、細菌の分類・系統の研究者のバイブル的な存在になっておりますが、その中で私の未発表データがたくさん引用され、大変嬉しく感じたことを記憶しています。富山大学時代は、他の大学の学生や職員の方々が私の研究室を訪ねてくださりまして、いっしょに研究をさせていただきました。1987 年から 1991 年の間に来られた方々は、応用微生物研究所の杉山純多先生のところの修士課程学生であった張志銘君、静岡大学農学部の山田雄三先生のところの学生であった川崎浩子さん、東京大学海洋研究所の清水潮先生のところの職員である塚本久美子さん、岐阜大学の教授の藪内英子先生などでした。これらの方々の多くは、その後いろいろな微生物の系統研究を発展させてくれました。

その後、私は 1991 年 6 月に東京大学農

学部の土壌学研究室に移り、土壌微生物の研究を開始することになりました。私の興味は、富山大学時代から次第に微生物の生態の研究に移っていったので、土壌微生物の研究はまさに望ましい研究分野でした。私が大学院時代から強く望んでいたことは、微生物の系統を明らかとし、系統に基づいた分類体系を作ることでしたが、もう一つの望みがありました。それは、分類群の系統が明らかとなった場合、それでは、その分類群が他の分類群とどのように隔てられたのであろうか、ということの解明できないかということでした。この望みは、生態の研究で初めて叶えられることなので、私は大変幸運であったと感じております。

図 1 は、私が博士課程の時代に書いたものであります。私の研究の流れはこの図に端的に示されています。細菌の生態研究では、第一に種を規定して認識することが重要です。しかし、種の定義づけは原核生物の場合には有性生殖がなく、真核生物のように有性生殖を行って遺伝子を子孫に伝える集団であるという規定はできません。図 1 は、一般的な生物の進化の系統樹を等高線の形で表現したものです。この図で山の最も高い部分が現在であり、低い部分は過去と考えます。一つ一つの山は生物の集団であって、有性生殖を行う生物においては、さまざまな要因によって生殖の隔離が起こり、これによって集団は系統的にしだいに隔てられ、それぞれの集団がはっきりと区別される集団となります。この集団の最小単位が種と考えられます。原核生物においても、どの範囲の集団が種を形成するのか規定しなければなりません。有性生殖を行わないため、どの範囲が種なのか判定で

きません。図 1 のような進化の様子を推定し、山の形を判定する方法は皆無と言えます。このようなことから、現在では、原核生物では便宜上ゲノム全体の DNA-DNA 相同性試験によって、70%以上を示す集団を種とするという考え方が一般に受け入れられるようになりました (3)。この DNA-DNA 相同性の値は、リボソーム RNA の配列では約 99.7%以上の配列の相同性であると考えられています。微生物の種を DNA-DNA 相同性で定義づけることは、あくまで便法であって、本来は図 1 の山の形を理解して、これを反映するように種を規定する必要があります。原核生物においても、種と種を隔てる要因があったと私は考えております。仮に、種と種を隔てる要因がないとすると、集団の隔たりがないため、図 1 に示した山は存在しなくなります。私は、原核生物の大きな分類分けを見ると、集団と集団を隔てる要因が無かったとは考えにくいと感じております。たとえば、シアノバクテリアは酸素発生を伴う光合成を行う細菌として明瞭に他群と系統樹上でも隔たっています。グラム陽性細菌は、乾燥に強いという性質を共通に持ち、系統樹上でも独立した位置にあります。

私は、ひとつの例として、一般的にグラム陰性細菌と呼ばれているプロテオバクテリアについて、詳細な系統樹を作成してみました。プロテオバクテリアは α , β , γ および δ サブグループに分けられていますが、菌株データの豊富な α , β および γ サブグループについて、詳細な系統樹を 16S rDNA 配列に基づいて作成してみました (4)。また、 γ サブグループは腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) を含み、非常に多数の種

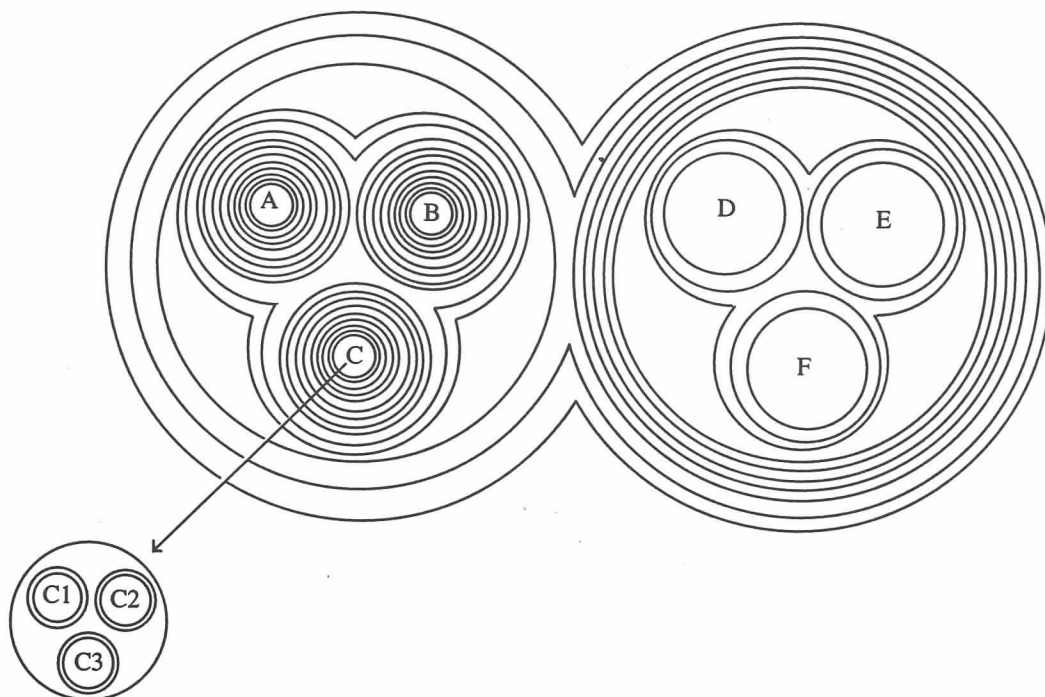


図 1. 等高線を用いて表現した生物種間の進化の様子

が知られているので、より詳細な腸内細菌科に近縁な種だけを含む系統樹も作成してみました。これらの系統樹は、これまでに知られている系統樹作成法で最も信頼度が高いと考えられている最尤法の HKY モデルに基づいて R オプションで作成したものであり (5), 解析ではできるだけ正確な並列配置を行い、系統樹の信頼度はブートストラップ確率を RELL 法で評価したものです (6, 7)。これらの系統関係を見ると、比較的大きなクラスターは、非常に高いブートストラップ確率を示し、明瞭に分けられます。したがって、これらの系統樹からプロテオバクテリアのクラスター、即ち科レベルの系統は、なんらかの性質によって明瞭に分けられた群と考えられます。次に、

属および種レベルではどうか見るために、プロテオバクテリアの代表として *Pseudomonas* 属 (この属は歴史的に系統的に隔たった菌群から成るゆるヘテロな属と考えられているが、ここでは *sensu stricto Pseudomonas* (真正 *Pseudomonas*) を *Pseudomonas* 属と呼ぶ) について、詳細な系統樹を作成しました (図 2)。この系統樹を見て分かるように、属および種レベルの系統樹ではクラスターは明瞭に形成されなくなります。このことは、グラム陽性菌群などの他の菌群の属および種レベルのクラスターでも同じような結果となります。図 2 には 51 の菌株を加えてありますが、このような明瞭にクラスターで分けられない系統樹において、クラスターを明瞭化す

るには、おそらく解析に加える菌株を 100 倍程度に増やせば可能になるでしょう。しかしながら、5000 以上の菌株を分離して、これらの性状検査を行い、系統関係を解明するには、膨大な労力を必要とします。現実的には、このような作業を多くの属で行うことは不可能であると言わざるを得ません。したがって、別な選択肢として、なんらかの方法で種と種を隔てた要因を見いだし、これに基づいて種を定義づけるという方向が考えられます。

原核生物の種や属レベルの集団においては、集団と集団を隔てる要因は存在したのでしょうか。シアノバクテリアの一つである *Microcystis* 属は球形をした細胞が複数集まったコロニーを形成し、ガス胞を使って水面表層に浮き上がって生活します。世界中から *Microcystis* の株を集めてみると、リボソームの ITS 領域の配列においても非常に高い相同性が確認され、一つの種と考えられる集団でありました (8, 9)。この集団は系統樹上において、他のシアノバクテリアと明瞭に識別されるので、この集団を他の集団と隔てる要因は存在しています。次に、腸内に生息する細菌について、種と種を隔てる要因が、生態的性質に見られるかを考えて見ます。*Bifidobacterium* 属と

Ruminococcus 属の種のヒト腸内での出現頻度を調べてみると、*Bifidobacterium* と *Ruminococcus* のそれぞれの種は腸内での出現頻度に特徴があり、また、ヒトの成長するに従って出現頻度が異なることが分かります。したがって、腸内に生息する細菌についても、生態的性質が種を隔てる要因となっていると考えても問題がないと考えられます。現在は、植物根に生息する蛍光性 *Pseudomonas* について種を形成する生態的要因を遺伝子レベルで調べているところです。

種と種の集団を隔てる生態的、遺伝的因子を解明することは大変難しい課題ですが、分類学・系統進化学の究極の目的はここにありますので、この研究会でも今後この分野の話題が多数報告されることを期待しております。

最後に

私には、このようなレビューを書く機会はいまだにありませんでしたが、このような機会において、私は私をこの分野の研究に導いていただきました駒形先生に改めて感謝の気持ちを抱くことになりました。

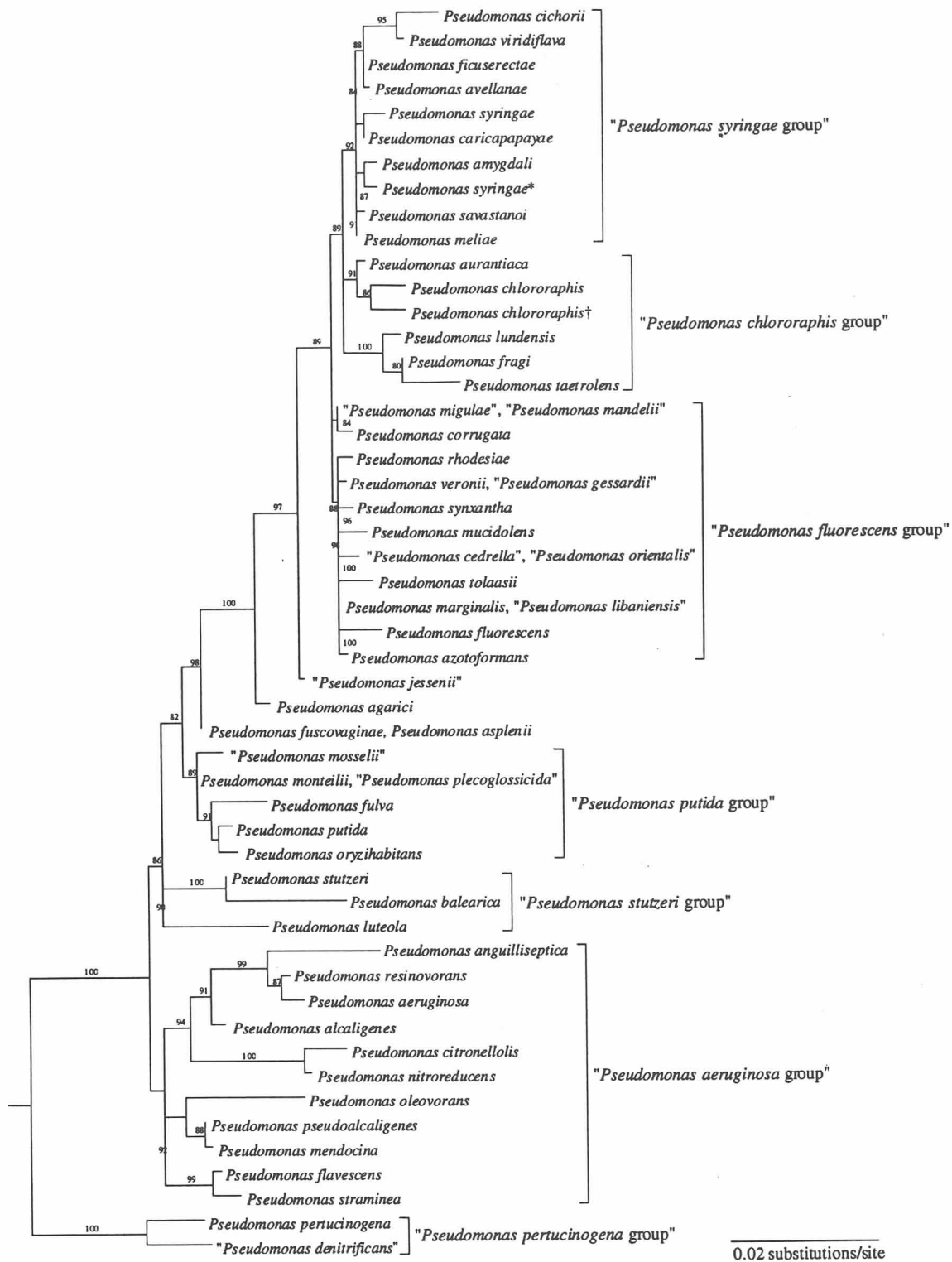


図2. 16S rDNA配列に基づく真正*Pseudomonas*属の系統関係

文献

1. Woese, C. R. and Fox, G. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5088-5090 (1977).
2. Woese, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271 (1987).
3. 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. and Truper, H. G. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 463-464 (1986).
4. Anzai, Y., Kim, H. Park, J. and Oyaizu, H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1563-1589 (2000).
5. Hasegawa, M., Kishino, H. and Yano, T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* **22**, 160-174 (1985).
6. Kishino, H., Miyata, T. and Hasegawa, M. Maximum likelihood inference of protein phylogeny and the origin of chloroplasts. *J. Mol. Evol.* **31**, 151-160 (1990).
7. Hasegawa, M. and Kishino, H. Accuracies of the simple methods for estimating the bootstrap probability of a maximum likelihood tree. *Mol. Biol. Evol.* **11**, 142-145 (1994).
8. Otsuka, S., Suda, S., Li, R. H., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin, *FEMS Microbiol. Letters* **164**, 119-124 (1998).
9. Otsuka, S., Suda, S., Li, R. H., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. Phylogenetic relationships between toxic and nontoxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequences, *FEMS Microbiol. Letters* **172**, 15-21 (1999).

3 微生物系統分類学の 20 年の歩み

グラム陰性細菌

中川恭好

はじめに

現在の多様な生物（微生物）は、進化の過程における系統分化の結果として生じたものである。したがって微生物の分類体系はその進化の結果に基づいて構築されることが理想の姿であり、それを構築することが分類学の重要な役割の 1 つでもある。しかしながら、細菌などの微生物においては化石の記録から進化や系統分化の過程を推定することは不可能であり、さらに有性生殖がなく形態的特徴の乏しい細菌では客観的に分類を行うことさえ非常に困難であった。従来細菌分類学では、生理・生化学的性状や培養性状が分類指標として一定の役割を果たしてきた。しかし、これらの性状の個々の重要性は経験に基づいて評価されたものであり、その当時の分類は実用性に基づくもの、いかえれば人為的なものであったといわざるを得ない。一方、分類学と微生物株の同定は表裏一体の関係にあり、分類学には同定手法を発達させ、同定するための情報を供給するという側面もある。従来表現型質のみに基づいた分類体系のもとでは、未知株を同定するにも熟練した技能と知識が必要であった。すなわち、微生物の同定方法を確立する意味からも、客観的な分類体系を構築するということが分類学に求められてきたのである。

分類学はいかにしてより客観的な分類を行うかを追い求めてきた。このような細菌

分類学において、化学分類学、16S rRNA/rDNA 塩基配列に基づく分子系統分類学は大きな役割を果たしてきた。化学分類学ではキノン系、脂肪酸組成や DNA の GC 含量などの細胞の生体成分を指標として分類を行うため、分類学から主観性がある程度排除することに成功した。しかし、それらの性状が進化の過程を反映したものであるかは考慮されてはならず、残念ながら築かれた分類体系が生物の系統に基づいたものであると考えることはできなかった。これに対する 1 つの答えが 16S rRNA 塩基配列に基づく分子系統分類学の導入であり、これによってその後の微生物分類学は大きく変わった。1960 年代以降の分子生物学の発展は、生物間の系統関係を遺伝子の塩基配列あるいはタンパク質のアミノ酸配列などの情報高分子を比較することにより論議できることを明らかにした。これによって細菌等の微生物においても系統進化を論議する途が開かれた。Woese, C. R. のグループは 16S rRNA 塩基配列に基づいて生物の分子系統解析を行い、Archaeobacteria (59) (いわゆる古細菌、現在は *Archaea* (60) と呼ばれる) を発見し、また表現型に基づく分類学的手法では決してつかむことのできなかった細菌の系統関係を明らかにした (58)。これらの研究の影響は微生物（化学）分類研究会の要旨にも表れており、日本における過去 20 年間の微生物分類学は 1980

年代の化学分類学を中心とした時代と、分子系統分類学的手法が導入された 1985 年以降の 2 つの時代に分けて考えることができる。

ここでは、本誌の趣旨にのっとり過去 20 年間 (1980-1999) のグラム陰性細菌についての微生物 (化学) 分類研究会の活動や研究成果と分類学への貢献についてまとめてみたい。グラム陰性細菌とはグラム染色によって後染色の色調を示す、ひいてはグラム陰性型の細胞壁を有する種類の細菌

種の総称である。16S rRNA 塩基配列に基づく系統樹では (図 1), 主要なグラム陰性細菌だけでも *Proteobacteria*, *ateroides-cytophaga-flexibacteria* group, *green sulfur bacteria*, *green non-sulfur bacteria* などの複数の系統群にわたって分布している。また細胞壁がなくグラム染色では陰性を示す *Mycoplasma* 類はグラム陽性細菌の系統群に属する。すなわちグラム陰性細菌といっても系統的には多様な細菌であり、ひとまとめにすることができないのが現実である。

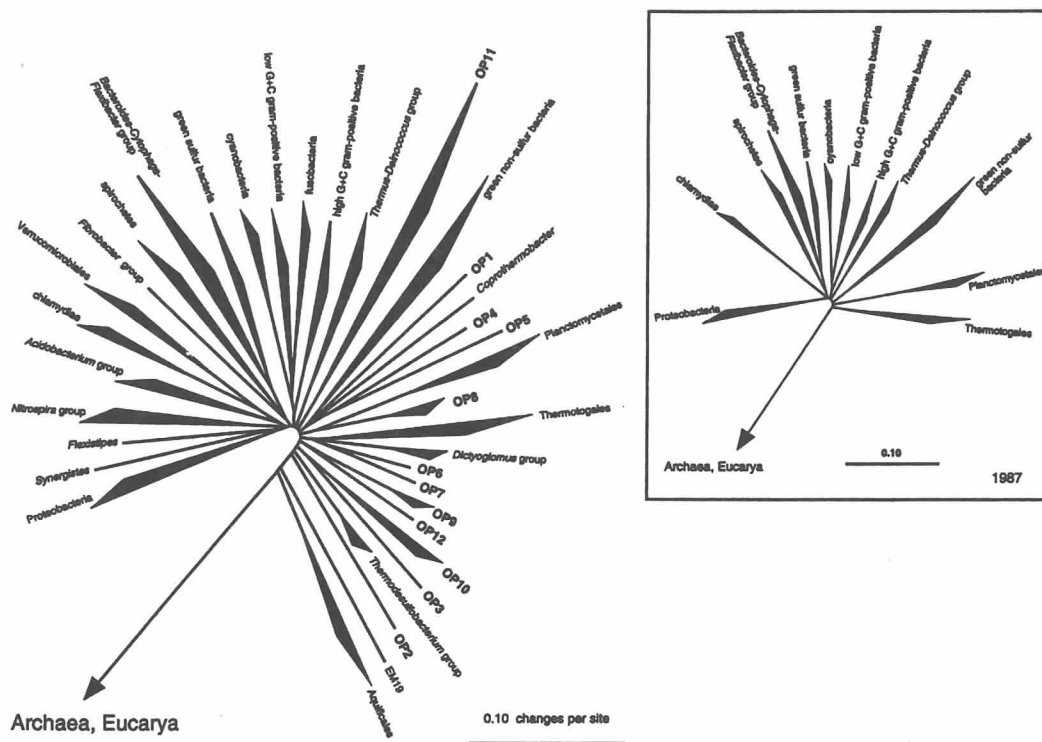


図 1. 16S rRNA 塩基配列に基づく domain *Bacteria* についての系統樹。OP は環境から直接得られた 16S rDNA クローンであり、培養されていない系統。右図は 1987 年当時に発表された系統樹 (58)。Hugenholtz, P. et al. (14) より引用。

化学分類学の時代

グラム陰性細菌における有用な化学分類学的指標としては、キノン系、脂肪酸組成

や DNA の GC 含量などがあげられる。グラム陽性細菌でよく用いられる細胞壁組成は、グラム陰性細菌ではあまり有用ではな

い。1980年代の微生物（化学）分類研究会では化学分類を中心に発表が行われた。以下にそれらの研究を簡単にまとめる。

- 1) *Thiobacillus* 属（第1回，藤村；2回，3回，片山-藤村）

Thiobacillus 属は硫黄または無機硫黄化合物を硫酸塩に酸化することで生育し，系統的には *Proteobacteria* に属する。

片山らは *Thiobacillus* 属をキノン系と化学独立栄養性の相違に基づいて3つのグループに，さらに3-OH 脂肪酸組成により細分できることを明らかにし，*Thiobacillus* 属をキノン系がユビキノン-10 (Q-10) で通性化学独立栄養性で特徴づけられる Group I (*T. novellus* (Group I-1), “*T. organoparus*”, *T. acidophilus* (I-2)), Q-8 で通性化学独立栄養性の Group II (*T. delicatus*, *T. perometabolis*, *T. intermedius*), Q-8 で偏性化学独立栄養性の Group III (*T. denitrificans*, *T. thioparus* (III-1), *T. neapolitanus* (III-2), *T. ferrooxidans*, *T. thiooxydans*, *T. concretivorus* (III-3)) に分類し (18), またいくつかの新種を記載した (19, 20). その後の 16S rRNA/rDNA 塩基配列に基づく分子系統解析によって，*Thiobacillus* 属は *Proteobacteria* の α , β , γ subclass に分かれる多様な菌種を含む属であり，基準種 *T. thioparus* と系統的に近縁であるのは *T. denitrificans* のみである (III-1) ことが明らかとなった。そして *Thiomonas* 属 (II) (26), *Acidithiobacillus* 属 (III-3), *Halothiobacillus* 属 (III-2) (25) などの新属が提案され，*Thiobacillus* 属は再編されつつあるが，これは片山らの分類と完全に一致している。

- 2) C_1 化合物資化性細菌（第1回，7回，浦上）

浦上らは多くの分離株を用いてメタン，メタノールなどを資化する C_1 化合物資化性細菌を細胞形態や化学分類学的性状に基づいて分類し，メタノール資化性細菌が 11 グループに，メタン資化性細菌が 3 グループに，メチルアミン資化性細菌が 2 グループに分かれることを明らかにした (41, 42, 44). その結果に基づき，新属として *Protomonas* 属を記載し（その後 *Methylobacterium* 属に移す提案がなされた. (5)），*Pseudomonas aminovorans* に対して *Aminobacter* 属を設立すること，*Acetobacter methanolicus* に対して *Acidomonas* 属を設立すること，*Methylobacillus* 属の定義を修正することを発表し，新種として *Hyphomicrobium denitrificans*, *Methylobacterium aminovorans*, *Paracoccus alcaliphilus*, *P. aminophilus*, *P. aminovorans* などを記載した (37-40, 43, 45, 46). 彼らによって C_1 化合物資化性の多くの新種が記載され，また属の定義が明確化された。

- 3) *Sphingobacterium* 属（第2回，金子ら；7回，藪内）

藪内らは *Flavobacterium* 属の 3 種 *F. spiritivorum*, *F. multivorum*, *F. mizutae* にスフィンゴリン脂質が存在することを明らかにし，これを指標として *Sphingobacterium* 属を設立することを提案した (48). Holmes, B. (13) は長年 *Sphingobacterium* 属を認めない立場をとっていたが，その後の 16S rRNA 塩基配列に基づく分子系統解析によって，*Sphingobacterium* 属が *Flavobacterium* 属とは異なる独立した系統群を構成するこ

とが明らかとなった (30)。また Steyn, P. L. et al. (33) によって、スフィンゴリン脂質を保持し *Sphingobacterium* 属に近縁な菌株に対して *Pedobacter* 属が提案され、*Sphingobacterium* 属とともに *Sphingobacteriaceae* 科に分類することも提案された。さらに藪内らは *Pseudomonas* 属に分類されていた一部の種にスフィンゴ糖脂質の存在を見だし、*Sphingomonas* 属を設立することを提案した (50)。スフィンゴ脂質を分類学的指標とした両属の設立は、現在広く受け入れられている。

4) *Acetobacter* 属と *Gluconobacter* 属 (第2回, 4回, 山田ら; 18回, 山田&駒形; 19回, 桂ら)

Acetobacter 属と *Gluconobacter* 属は酢酸菌として知られるグラム陰性桿菌で *Proteobacteria* α subclass に属する。

山田らはキノン系が典型的な *Acetobacter* 属 (Q-9) と *Gluconobacter* 属 (Q-10) で異なることを明らかにし、キノン系が分類学的指標として有用であることをみいだした (51, 52)。現在、キノン系が細菌のみならず酵母を含めた真菌類においても分類学的指標としてひろく用いられていることは周知の通りである。彼らは *A. aceti* (本属の基準種) とは異なり、Q-10 で特徴づけられた *A. liquefaciens* と *A. xylinum* を亜属 *Gluconoacetobacter* (*Gluconoacetobacter* (sic)) に分類することを提案し (55)、その後 16S rRNA の部分塩基配列による分子系統解析結果に基づいて属へ昇格させた (53)。また Q-8 で特徴づけられる酢酸菌のグループが存在することを明らかにしたが、このグループに対しては

Swings, J.ら (35) によって *Frateuria* 属が提案された。*Frateuria* 属は *Acetobacter* と *Gluconobacter* 属が含まれる *Proteobacteria* α subclass ではなく、 γ subclass に含まれることが知られている (32)。

さらに山田らは、既知の属とは別の系統群を構成する酢酸菌をインドネシアより分離し、これらに対して新たに *Asaia* 属を設立した。またいわゆる酢酸菌と総称される *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Asaia*, *Gluconoacetobacter*, *Gluconobacter* 属が、それぞれ系統的に独立していることを明らかにした (54)。

5) グラム陰性好気性海洋性細菌 (第7回, 赤川; 9回, 赤川&山里)

赤川らは多くの分離株を用いてグラム陰性の海洋性細菌について化学分類学的研究を行い、これらの菌株が3グループに分かれていることを明らかにし、グループ1はQ-8であり *Alteromonas*, *Marinomonas* 属などに関連すること、グループ2はQ-9で *Alcaligenes*, *Deleya* 属などに関連すること、グループ3はQ-10で *Agrobacterium* 属の海洋性の種と関連することを示唆した。さらに *Deleya* 属の基準種 *Deleya aesta* と *Alcaligenes aquamarinus* および *A. faecalis* subsp. *homari* が同種であることを明らかにした。そして *A. aquamarinus* に命名上の優先権があることから、本種を *Deleya* 属に移し、新たに *Deleya* 属の基準種とする属の定義の修正を行った (3)。また新種として *Alteromonas atlantica*, *A. carrageenovora* を記載し、*A. haloplanktis* と *A. tetraodonis* が同種であることを報告した (1, 2)。その後これらの細菌に対

しては、系統関係に基づき *Alteromonas* 属の一部に対して *Pseudoalteromonas* 属を設立する提案 (7) と *Deleya* 属を *Halomonas* 属に統合する提案 (6) がなされた。

系統分類学の導入と発展

16S rRNA 塩基配列や 5S rRNA 塩基配列に基づく細菌の分子系統解析に関する演題は、第 5 回 (1985) の研究会において初めて発表された。その後 16S rRNA/rDNA の塩基配列決定手法が容易になったことや 16S rRNA が 5S rRNA より情報量が多く細菌の分類に適していたことから、16S rRNA/rDNA 塩基配列を用いる分子系統分類学的手法が普及し、現在の細菌分類学においては必須の手法となった。さらに近年では他の遺伝子を用いた系統解析についても報告されるようになってきている。以下にいくつかの演題について簡単にまとめる。

1) *Vibrionaceae* 科関連細菌 (第 9, 10 回, 塚本)

Vibrionaceae 科に属する細菌は、世界中の海域に広く分布し海洋性の従属栄養細菌の中で大きな位置を占める細菌として知られる。

塚本らは *Vibrionaceae* 科関連細菌について 16S rRNA の約 600 塩基の配列に基づいて系統解析を行い、*Vibrionaceae* 科から分けられた *Aeromonadaceae* 科、*Vibrio* 属から分けられた *Photobacterium* 属、*Alteromonas* 属から分けられた *Marinomonas* 属と *Shewanella* 属がそれぞれ系統的に独立していることを明らかにし、これらの分類群の提案を系統的に裏付けた。また *Vibrio* 属と *Listonella* 属が

異質であることを明らかにし、その後 *Vibrio marinus* に対して *Moritella* 属を提案した (47)。

2) 光合成細菌 (第 12 回, 平石; 15 回, 川崎)

光合成細菌は光エネルギーを化学エネルギーに変換する細菌であるという観点から、長い間、非光合成細菌とは一線を画して分類されてきた。光合成細菌の一種類である紅色非硫黄光合成細菌は、硫黄を電子受容体として必須としない光合成細菌で系統的には *Proteobacteria* に属する。紅色非硫黄光合成細菌の分類では、従来細胞形態に重点がおかれていたが、その後 16S rRNA 塩基配列やチトクローム *c* のアミノ酸配列に基づく系統解析がなされ、Imhoff, J. F. et al. (16) は紅色非硫黄光合成細菌群に新たに二属を設立することを提案した。さらにその後の 16S rRNA/rDNA 塩基配列に基づく分子系統解析の結果から、紅色非硫黄光合成細菌は *Proteobacteria* α subclass と β subclass にまたがる異質な集団であることが明らかとなり、これらの結果に基づいて、1984 年以降新たに 12 属が報告された (8-12, 15, 22)。本研究会においても、平石らが分子系統学的手法により数多くの新規光合成細菌の存在を示唆し、いくつかの新属を発表した。また川崎らは紅色非硫黄光合成細菌が異質な集団であるとともに、多種多様の非光合成細菌と属レベルで系統的に近縁であることを明らかにした (21, 23, 24)。光エネルギーを獲得し利用する系は単純ではなく、その表現型の進化の過程は明らかにされていない。したがって単に 16S rDNA から得られた系統関係に基づいて光合成細菌と

非光合成細菌の分類群を統合することは時期尚早とも考えられることから、これまでのところ両者の分類群の統合は行われていない。このような事実から、光合成細菌の進化を 16S rDNA 以外の分子情報から明らかにしようという試みも行われている。永島ら (第 14 回) は光化学反応活性中心体をコードする遺伝子を、Cantera ら (第 19 回) はイソプレノイド合成系関与遺伝子を用いた分子系統解析について発表を行っている。今後、16S rDNA だけではなく他の分子情報からのアプローチや全ゲノム解析などから、光合成細菌の分類体系が構築されることが期待される。

3) *Flavobacterium* 関連細菌 (第 12 回,

中川&山里; 18 回, 鈴木ら)

Flavobacterium 属は *Cytophaga*, *Bacteroides* 属などとともに細菌の主要 phyla の 1 つを構成する細菌であり、その分類学的な混乱から *Flavobacterium-Cytophaga* complex とよばれていた。

中川らは 16S rRNA 塩基配列に基づく分子系統解析から、このグループがおおきくメナキノン-6 (MK-6) で特徴づけられるグループと MK-7 のグループの 2 つに、さらにそれぞれがいくつかの系統群に分かれることを明らかにした。また *C. hutchinsonii* (本属の基準種) は *C. aurantiaca* のみと近縁であること、*F. aquatile* (本属の基準種) は MK-6 で海洋由来ではない *Cytophaga* spp. と近縁であることを報告した (29)。さらにこれらの結果に基づき *Cytophaga* 属の定義の修正, 系統的に独立している *C. salmonicolor* と *C. agarovorans* に対して *Marinilabilia* 属を, *C. aprica* に対して

Flammeovirga 属を, *C. diffluens* に対して *Persicobacter* 属を設立することを提案した (28, 30)。一方 *Flavobacterium* 属については Bernardet, J.-F. ら (4) によって *F. aquatile* と近縁な種に限る定義の修正がなされた。その後 MK-6 の菌種に対していくつかの新属が提案され分類学的再編が進んだ。また鈴木らは 16S rRNA より進化速度の速い DNA gyrase β subunit 遺伝子 (*gyrB*) をもちいて分子系統解析を行い、自然界にこの細菌群に属する数多くの未知菌種が存在することを明らかにするとともに, *Marinilabilia* 属の 2 種が同種であることを報告した (34)。

4) *Sphingomonas* 属 (第 14 回, 辛; 19 回, 武内ら)

藪内らにより提案された *Sphingomonas* 属は当初 5 種を含む属であったが、その後数多くの新種, 新組み合わせが発表され現在までに 26 種が報告されている (17)。また *Rhizomonas* 属と *Erythromonas* 属は *Sphingomonas* 属の系統群に属し, スフィンゴ糖脂質を有することから, 藪内らはこれら両属を *Sphingomonas* 属に移すとともに, *Sphingomonas* 属の定義を拡大する方向で修正することを提案した (49)。一方, 本研究会では辛 (第 14 回) と武内ら (第 19 回) によって *Sphingomonas* 属の分割を提案する演題が発表された。

5) 海洋性 *Agrobacterium* (第 18 回, 19 回, 内野ら)

Rüger, H. J. and Höfle, M. (31) は *Agrobacterium atlanticum*, *A. ferrugineum*, *A. gelatinovorum*, *A. meteoli*, *A. stellulatum* を記載し, これらの菌株は海洋由来であることなどから典型的な *Agrobacterium*

属とは異なることを指摘した。

内野らはこれらの菌株について 16S rDNA に基づく分子系統解析を行い、“*A. kieliense*”と *A. stellulatum* はそれぞれ *Proteobacteria* α -2 subdivision 内で、また *A. atlanticum*, *A. meteoli*, *A. gelatinovorum* の 3 種と *A. ferrugineum* は α -3 subdivision 内で系統的に独立していることを明らかにした。そして *A. atlanticum* (*A. meteoli*) と *A. gelatinovorum* に対しては *Roseobacter algicola* とともに *Ruegeria* 属を、“*A. kieliense*”には *Ahrensia* 属を、*A. stellulatum* には *Stappia* 属を設立することを提案した (36)。

6) 構造遺伝子に基づく分子系統解析

(第 14 回, 永島ら; 16 回, 山本; 18 回, 鈴木ら; 19 回, Cantera ら, 西田ら, 内野ら)

16S rRNA/rDNA 塩基配列に基づく分子系統解析が細菌分類学において必須となる一方, 近年ではその他の遺伝子に基づく分子系統解析も行われている。そして 16S rRNA 塩基配列に基づく系統分類が評価され, また問題点も指摘されている。

山本らは DNA gyrase β subunit 遺伝子 (*gyrB*) による細菌の分子系統解析手法を開発し, *gyrB* が 16S rRNA よりも置換頻度が高く, 種レベルの識別に適していることを報告した (56, 57)。鈴木らは *gyrB* に基づく *Flavobacterium* 関連細菌群の系統分類について発表を行っている (前述)。

永島らは *Proteobacteria* に属する光合成細菌について光化学反応中心体をコードする遺伝子である *puf L*, *puf M* の配列による分子系統解析を行った。その結果,

Proteobacteria α subclass の一部に β , γ subclass の菌種が含まれ, *puf* 遺伝子が水平移動したことを示唆した (27)。

内野らは, 系統的には光合成細菌である *Rhodobacter* 属に含まれる非光合成細菌の *Agrobacterium ferrugineum* からは *puf L*, *puf M*, *puf A* が検出できないことを明らかにし, 光合成能の分類学的意義を疑問視する発表を行った。

Cantera らはイソプレノイド合成系に関わる *parnesyl diphosphate synthase* 遺伝子に基づいて光合成細菌の分子系統解析を行い, 16S rRNA の系統関係と比較した。その結果, 光合成細菌である *Rhodopseudomonas palustris* と根粒形成菌である *Bradyrhizobium* 属との分子系統関係の相違を指摘した。

西田らは *Rhizobium* 属細菌について 16S rRNA と根粒形成遺伝子である *nod A*, *nod D*, 窒素固定遺伝子である *nif H* のそれぞれに基づく系統関係を比較し, 16S rRNA では認められなかった根粒形成, 窒素固定遺伝子の多様性を明らかにした。

終わりに

化学分類学は分類という行為から主観性のある程度排除することに成功し, その化学分類学的性状という表現型による分類が系統分類により得られた結果とよく一致していることも示された (矛盾点もある)。そして 16S rRNA/rDNA 塩基配列に基づく分子系統分類学的手法の導入は, もはや閉塞状況であった表現型に基づいた分類を大きく変貌させた。分子系統分類学が微生物分類学に導入されることによって, 種相互の相違を進化の関係でとらえるという

Darwin 以降の生物学が、初めて細菌分類学において具体化されたと考えることができる。さらに 16S rRNA/rDNA に基づく分子系統分類学によって、同定手法が著しく進歩したことも見逃せない。表現型に基づく分類体系のもとでは、未知株を属レベル以下にしぼりこむには、多くの表現型質の調査を必要とするうえ、熟練した技術と知識が要求された。しかし、分子系統分類学的手法の発達とこれにともなう 16S rRNA/rDNA 塩基配列データベースの充実、その配列さえ決定すれば未知菌株を属レベル以下に迅速に同定することを可能にした。現在、塩基配列決定手法は最も容易な技術の 1 つであることから、細菌の同定は著しく簡便になったといえる。

では 16S rRNA/rDNA 塩基配列から得られた系統関係を分類学上の単位にまとめ、配列し、分類体系を構築することによって、目的とする進化の過程に基づいた分類がなされたのであろうか。答えは否である。そ

の系統関係はあくまでも 16S rRNA 分子の系統にすぎず、それが生物の本来の系統関係であることは保証されないからである。したがってその分類体系は 16S rRNA に基づいた合意であり、必ずしも真実ではないことを認識しておかなければならない。有性生殖を行う生物において客観的に認識できる単位である種でさえ、細菌分類学では DNA 相同性が 70%以上であるという人為的な取り決めで分類されているのが現状である。

しかし、すでに多くの細菌についてその全遺伝子配列が決定されている。この膨大な遺伝子情報は、分類学においても重要である。遺伝子の塩基配列だけではなく、ゲノム構造や遺伝子の配置などの情報が微生物の進化の過程を明らかにし、分類学に応用されることにより、進化の過程を反映した分類体系の構築と、それに基づく微生物同定が可能になるのではないだろうか。

文献

1. Akagawa-Matsushita, M., Koga, Y. and Yamasato, K. DNA relatedness among nonpigmented species of *Alteromonas* and synonymy of *Alteromonas haloplanktis* (ZoBell and Upham 1944) Reichelt and Baumann 1973 and *Alteromonas tetraodonis* Simidu *et al.* 1990. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 500-503 (1993).
2. Akagawa-Matsushita, M., Matsuo, M., Koga, Y. and Yamasato, K. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 621-627 (1992).
3. Akagawa, M. and Yamasato, K. Synonymy of *Alcaligenes aquamarinus*, *Alcaligenes faecalis* subsp. *homari*, and *Deleya aesta*: *Deleya aquamarina* comb. nov. as the type species of the genus *Deleya*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 462-466 (1989).
4. Bernardet, J.-F., Segers, P., Vancanneyt, M., Berthe, F., Kersters, K. and Vandamme, P. Cutting a Gordian knot: emended classification and description of the genus *Flavobacterium*, emended description of the family *Flavobacteriaceae*, and proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 128-148

- (1996).
5. Bousfield, I. J. and Green, P. N. Reclassification of bacteria of the genus *Protomonas* Urakami and Komagata 1984 in the genus *Methylobacterium* (Patt, Cole, and Hanson) emend. Green and Bousfield 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **35**, 209 (1985).
 6. Dobson, S. J. and Franzmann, P. D. Unification of the genera *Deleya* (Baumann *et al.* 1983), *Halomonas* (Vreeland *et al.* 1980), and *Halovibrio* (Fendrich 1988) and the species *Paracoccus halodenitrificans* (Robinson and Gibbons 1952) into a single genus, *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1996, **46**, 550-558 (1996).
 7. Gauthier, G., Gauthier, M. and Christen, R. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella* and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 755-761 (1995).
 8. Hiraishi, A. Transfer of the bacteriochlorophyll *b*-containing phototrophic bacteria *Rhodopseudomonas viridis* and *Rhodopseudomonas sulfoviridis* to the genus *Blastochloris* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 217-219 (1997).
 9. Hiraishi, A., Hoshino, Y. and Satoh, T. *Rhodoferax fermentans* gen. nov., sp. nov., a phototrophic purple nonsulfur bacterium previously referred to as the "*Rhodocyclus gelatinosus*-like" group. *Arch. Microbiol.* **155**, 330-336 (1991).
 10. Hiraishi, A. and Ueda, Y. Intrageneric structure of the genus *Rhodobacter*: transfer of *Rhodobacter sulfidophilus* and related marine species to the genus *Rhodovulum* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 15-23 (1994).
 11. Hiraishi, A. and Ueda, Y. *Rhodoplanes* gen. nov., a new genus of phototrophic bacteria including *Rhodopseudomonas rosea* as *Rhodoplanes roseus* comb. nov. and *Rhodoplanes elegans* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 665-673 (1994).
 12. Hiraishi, A., Urata, K. and Satoh, T. A new genus of marine budding phototrophic bacteria, *Rhodobium* gen. nov., which includes *Rhodobium orientis* sp. nov. and *Rhodobium marinum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**, 226-234 (1995).
 13. Holmes, B. The genera *Flavobacterium*, *Sphingobacterium*, and *Weeksella*. In Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (eds), *The prokaryotes*, second edition, volume I., p. 3620-3630 Springer-Verlag, Berlin (1991).
 14. Hugenholtz, P., Pitulle, C. Hershberger, L. and Pace, N. R. Novel division level of bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* **180**, 366-376 (1980).
 15. Imhoff, J. F., Petri, R. and Süling, J. Reclassification of species of the spiral-shaped phototrophic purple non-sulfur bacteria of the α -*Proteobacteria*: description of the new genera *Phaeospirillum* gen. nov., *Rhodovibrio* gen. nov., *Rhodothalassium* gen. nov. and *Roseospira*

- gen. nov. as well as transfer of *Rhodospirillum fulvum* to *Phaeospirillum fulvum* comb. nov., of *Rhodospirillum molischianum* to *Phaeospirillum molischianum* comb. nov., of *Rhodospirillum salinarum* to *Rhodovibrio salinarum* comb. nov., of *Rhodospirillum sodomense* to *Rhodovibrio sodomensis* comb. nov., of *Rhodospirillum salexigens* to *Rhodothalassium salexigens* comb. nov. and of *Rhodospirillum mediosalinum* to *Roseospira mediosalina* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**, 793-798 (1998).
16. Imhoff, J. F., Trüper, H. G. and Pfennig, N. Rearrangement of the species and genera of the phototrophic "purple nonsulfur bacteria". Int. J. Syst. Bacteriol. **34**, 340-343 (1984).
 17. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. vol. 50, No. 4 (2000)までに *Sphingomonas* の 26 種が報告されている。
 18. Katayama-Fujimura, Y., Tsuzaki, N. and Kuraishi, H. Ubiquinone, fatty acid and DNA base composition determination as a guide to the taxonomy of the genus *Thiobacillus*. J. Gen. Microbiol. **128**, 1599-1611 (1982).
 19. Katayama-Fujimura, Y., Kawashima, I., Tsuzaki, N. and Kuraishi, H. Reidentification of *Thiobacillus perometabolis* ATCC 27793 and *Thiobacillus* sp. strain A2 with reference to a new species, *Thiobacillus rapidicrescens* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **33**, 532-538 (1983).
 20. Katayama-Fujimura, Y., Kawashima, I., Tsuzaki, N. and Kuraishi, H. Physiological characteristics of the facultatively chemolithotrophic *Thiobacillus* species *Thiobacillus delicatus* nom. rev., emend., *Thiobacillus perometabolis*, and *Thiobacillus intermedius*. Int. J. Syst. Bacteriol. **34**, 139-144 (1984).
 21. Kawasaki, H., Hoshino, Y., Hirata, A. and Yamasato, K. Is intracytoplasmic membrane structure a generic criterion? It does not coincide with phylogenetic interrelationships among phototrophic purple nonsulfur bacteria. Arch. Microbiol. **160**, 358-362 (1993).
 22. Kawasaki, H., Hoshino, Y., Kuraishi, H. and Yamasato, K. *Rhodocista centenaria* gen. nov., sp. nov., a cyst-forming anoxygenic photosynthetic bacterium and its phylogenetic position in the *Proteobacteria* alpha group. J. Gen. Appl. Microbiol. **38**, 541-551 (1992).
 23. Kawasaki, H., Yamasato, K. and Sugiyama, J. Phylogenetic relationships of the helical-shaped bacteria in the α *Proteobacteria* inferred from 16S rDNA sequences. J. Gen. Appl. Microbiol. **43**, 89-95 (1997).
 24. Kawasaki, H., Hoshino, Y. and Yamasato, K. Phylogenetic diversity of phototrophic purple non-sulfur bacteria in the *Proteobacteria* α group. FEMS Microbiol. Lett. **112**, 61-66 (1993).
 25. Kelly D. P. and Wood A. P. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**, 511-516 (2000).
 26. Moreira, D. and Amils, R. Phylogeny of *Thiobacillus cuprinus* and other mixotrophic thiobacilli: proposal for *Thiomonas* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**, 522-528 (1997).
 27. Nagashima, K. V., Hiraishi, A., Shimada, K. and Matsuura, K. Horizontal transfer of genes

- coding for the photosynthetic reaction centers of purple bacteria. *J. Mol. Evol.* **45**, 131-136 (1997).
28. Nakagawa Y., Hamana, K., Sakane, T. and Yamasato, K. Reclassification of *Cytophaga aprica* (Lewin 1969) Reichenbach 1989 in *Flammeovirga* gen. nov. as *Flammeovirga aprica* comb. nov. and of *Cytophaga diffluens* (ex Stanier 1940; emend Lewin 1969) Reichenbach 1989 in *Persicobacter* gen. nov. as *Persicobacter diffluens* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 220-223 (1997).
 29. Nakagawa, Y. and Yamasato, K. Phylogenetic diversity of the genus *Cytophaga* revealed by 16S rRNA sequencing and menaquinone analysis. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1155-1161 (1993).
 30. Nakagawa, Y. and Yamasato, K. Emendation of the genus *Cytophaga* and transfer of *Cytophaga agarovorans* and *Cytophaga salmonicolor* to *Marinilabilia* gen. nov.: phylogenetic analysis of the *Flavobacterium-Cytophaga* complex. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 599-603 (1996).
 31. Ruger, H. J. and Hofle, M. Marine star-shaped-aggregate-forming bacteria: *Agrobacterium atlanticum* sp. nov.; *Agrobacterium meteori* sp. nov.; *Agrobacterium ferrugineum* sp. nov., nom. rev.; *Agrobacterium gelatinovorum* sp. nov., nom. rev.; and *Agrobacterium stellulatum* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**, 133-143 (1992).
 32. Stackebrandt, E., Murray, R. G. E. and Truper, H. G. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 321-325 (1988).
 33. Steyn, P. L., Segers, P., Vancanneyt, M., Sandra, P., Kersters, K. and Joubert, J. J. Classification of heparinolytic bacteria into a new genus, *Pedobacter*, comprising four species: *Pedobacter heparinus* comb. nov., *Pedobacter piscium* comb. nov., *Pedobacter africanus* sp. nov. and *Pedobacter saltans* sp. nov. Proposal of the family *Sphingobacteriaceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 165-177 (1998).
 34. Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S. and Yamamoto, S. Phylogenetic analysis of genus *Marinilabilia* and related bacteria based on the amino acid sequences of *GyrB* and emended description of *Marinilabilia salmonicolor* with *Marinilabilia agarovorans* as its subjective synonym. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1551-1557 (1999).
 35. Swings, J., Gillis, M., Kersters, K., De Vos, P., Gossele, F. and De Ley, J. *Frateuria*, a new genus for "*Acetobacter aurantius*". *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 547-556 (1980).
 36. Uchino, Y., Hirata, A., Yokota, A. and Sugiyama, J. Reclassification of marine *Agrobacterium* species: proposals of *Stappia stellulata* gen. nov., comb. nov., *Stappia aggregata* sp. nov., nom. rev., *Ruegeria atlantica* gen. nov., comb. nov., *Ruegeria gelatinovora* comb. nov., *Ruegeria algicola* comb. nov., and *Ahrensia kieliense* gen. nov., sp. nov., nom. rev. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**, 201-210 (1998).
 37. Urakami, T., Araki, H., Oyanagi, H., Suzuki, K.-I. and Komagata, K. Transfer of *Pseudomonas aminovorans* (den Dooren de Jong 1926) to *Aminobacter* gen. nov. as *Aminobacter aminovorans*

- comb. nov. and description of *Aminobacter aganoensis* sp. nov. and *Aminobacter niigataensis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **42**, 84-92 (1992).
38. Urakami, T., Araki, H., Suzuki, K.-I. and Komagata, K. Further studies of the genus *Methylobacterium* and description of *Methylobacterium aminovorans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **43**, 504-513 (1993).
 39. Urakami, T. and Komagata, K. *Protomonas*, a new genus of facultatively methylotrophic bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 1984, **34**, 188-201 (1984).
 40. Urakami, T. and Komagata, K. Emendation of *Methylobacillus* Yordy and Weaver 1977, a genus of methanol-utilizing bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. **36**, 502-511 (1986).
 41. Urakami, T. and Komagata, K. Occurrence of isoprenoid compounds in Gram-negative methanol-, methane-, and methylamine-utilizing bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **32**, 317-341 (1986).
 42. Urakami, T. and Komagata, K. Cellular fatty acid composition with special reference to the existence of hydroxy fatty acids in Gram-negative methanol-, methane-, and methylamine-utilizing bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **33**, 135-165 (1987).
 43. Urakami, T., Sasaki, J., Suzuki, K.-I. and Komagata, K. Characterization and description of *Hyphomicrobium denitrificans* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **45**, 528-532 (1995).
 44. Urakami, T., Tamaoka, J. and Komagata, K. DNA base composition and DNA-DNA homologies of methanol-utilizing bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **31**, 243-253 (1985).
 45. Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K.-I. and Komagata, K. *Acidomonas* gen. nov., incorporating *Acetobacter methanolicus* as *Acidomonas methanolica* comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **39**, 50-55 (1989).
 46. Urakami, T., Tamaoka, J., Suzuki, K.-I. and Komagata, K. *Paracoccus alcaliphilus* sp. nov., an alkaliphilic and facultatively methylotrophic bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. **39**, 116-121 (1989).
 47. Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Steven, S. E., Ohwada, K. and Colwell, R. R. A proposal to transfer *Vibrio marinus* (Russell 1891) to a new genus *Moritella* gen. nov. as *Moritella marina* comb. nov. FEMS Microbiol. Lett. **165**, 373-378 (1998).
 48. Yabuuchi, E., Kaneko, T., Yano, I., Moss, C. W. and Miyoshi, N. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum*, sp. nov., *Sphingobacterium multivorum*, comb. nov., *Sphingobacterium mizutae*, sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucose-nonfermenting Gram-negative rods in CDC groups IIK-2 and IIB. Int. J. Syst. Bacteriol. **33**, 580-598 (1983).
 49. Yabuuchi, E., Kosako, Y., Naka, T., Suzuki, S. and Yano, I. Proposal of *Sphingomonas suberifaciens* (van Bruggen, Jochimsen and Brown 1990) comb. nov., *Sphingomonas natatoria* (Sly 1985) comb. nov., *Sphingomonas ursincola* (Yurkov *et al.* 1997) comb. nov., and emendation of the genus *Sphingomonas*. Microbiol. Immunol. **43**, 339-349 (1999).

50. Yabuuchi, E., Yano, I., Oyaizu, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T. and Yamamoto, H. Proposals of *Sphingomonas paucimobilis* gen. nov. and comb. nov., *Sphingomonas parapaucimobilis* sp. nov., *Sphingomonas yanoikuyae* sp. nov., *Sphingomonas adhaesiva* sp. nov., *Sphingomonas capsulata* comb. nov., and two genospecies of the genus *Sphingomonas*. *Microbiol. Immunol.* **34**, 99-119 (1990).
51. Yamada, Y., Aida, K. and Uemura, T. Distribution of ubiquinone 10 and 9 in acetic acid bacteria and its relation to the classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*, especially of so-called intermediate strains. *Agric. Biol. Chem.* **32**, 786-788 (1968).
52. Yamada, Y., Aida, K. and Uemura, T. Enzymatic studies on the oxidation of sugar and sugar alcohol V. Ubiquinone of acetic acid bacteria and its relation to classification of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter*, especially of the so-called intermediate strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **15**, 181-196 (1969).
53. Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to generic level. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**, 1244-1251 (1997).
54. Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y. Saono, S., Seki, T., Uchimura, T. and Komagata, K. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 823-829 (2000).
55. Yamada, Y. and Kondo, K. *Gluconoacetobacter*, a new subgenus comprising the acetate-oxidizing acetic acid bacteria with ubiquinone-10 in the genus *Acetobacter*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **30**, 297-303 (1984).
56. Yamamoto, S. and Harayama, S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 1104-1109 (1995).
57. Yamamoto, S. and Harayama, S. Phylogenetic analysis of *Acinetobacter* strains based on the nucleotide sequences of *gyrB* genes and on the amino acid sequences of their products. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 506-511 (1996).
58. Woese, C. R. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**, 221-271 (1987).
59. Woese, C. R. and Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5088-5090 (1977).
60. Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* & *Eucarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579 (1990).

グラム陽性細菌

鈴木健一朗

はじめに

グラム染色性は細菌を陽性と陰性とに二分する第一の分類指標として用いられてきた (3). グラム陰性細菌は 16S rRNA による系統分類において *Proteobacteria* をはじめ多くの *phylum* に分散するのに対し, グラム陽性細菌は高 G+C 細菌群と低 G+C 細菌群の 2つの *phylum* に対応する(48). 便宜的に開発された手法あり, 若干の例外はあるかもしれないが, 極めて優れた分類指標である. グラム陽性高 G+C 細菌には, 菌糸状の世代を持つ, いわゆる放線菌も含まれ, この分類群に対して *Actinobacteria* 綱が提案されている (26). 一方低 G+C 細菌群は, *Lactobacillus*, *Streptococcus* などの乳酸菌群, *Bacillus*, *Clostridium* などの有孢子細菌群, *Staphylococcus* 属, *Eubacterium* 属などが含まれる.

グラム陽性細菌は, 両菌群とも系統分類の導入により属レベルの分割, 統合, 新組み合わせなどの再編成が積極的に進められてきた. その背景には, 豊富な化学分類学的性状により, 属を中心とした分類群の記載に適した表現性状が多いことが挙げられる. グラム陽性細菌には, 厚いペプチドグリカン層による強固な細胞壁があり, それに, テイコ酸, 多糖層などとあわせて多様な表層構造を形成している. さらに, 菌体脂質も重要な指標として貢献している. この項では本研究会で発表され, 議論された分類群を中心にその分類の現状と動向について紹介する.

グラム染色

グラム染色にはいくつかの方法があるが, Hucker の方法ではクリスタルバイオレットとルゴールで処理した細胞がアルコールによる脱色に耐えるかどうかで判定される (14). グラム染色で陽性と判定される細菌で前述の 2つの *phylum* に入らないものとしては *Deinococcus* 属と *Archaea* の *Methanobacterium* 属が知られている. *Deinococcus* 属は, 元来放射線抵抗性のもので知られていた *Micrococcus* 属のいくつかの種に対して設けられた属である (4). この属の細菌は, ペプチドグリカンを調製して分析するとオルニチンが検出され, 他のグラム陽性細菌と同程度の量のペプチドグリカンを持っていることが推定される. しかし, 系統分類学的には“グラム陰性菌”である *Thermus* 属とともに独立した *phylum* を形成している (9). Oyaizu, H. ら (23) は放射性抵抗性のグラム陰性桿菌を分離し, これに対し *Deinobacter* 属を提案した. その後本属は *Deinococcus* 属に統合された (24) が, これらはグラム染色を行うと, 典型的な陽性より若干薄く染色される. それにより Oyaizu, H. らは *Deinobacter* をグラム陰性と記載したと考えられる. *Methanobacterium* 属は *Archaea* で唯一ペプチドグリカン層を有しているが, これは(真正)細菌の共通構造と異なる骨格を持っているので *pseudomurein* と呼ばれている (15).

陽性と判定されるものでも常に明確な陽

性に染色されるものと不安定なものがある。*Deinococcus* 属は細胞の染色性が弱いといえるが、その他、*Bacillus* 属及び関連細菌では培養に伴い溶菌により染色されない細胞及び断片が増加する。また、一部のコリネフォルム細菌で多形性の形態変化に伴い、染色性の異なる細胞が共存することや、*Mycobacterium* 属細菌のように細胞表層の強い疎水性により染色が不均一になったり、染色されない場合もある。かつては細菌の表現性状で第一の分類指標のひとつであったグラム染色も、その不安定さを解決するために系統分類や化学分類が優先的に分類学的位置を決定するようになってきた。

***Bacillus* 属及び関連細菌**

Bacillus 属は、すべての好気性の有孢子桿菌を包含していたが、16S rRNA による分子系統では、乳酸菌群や *Staphylococcus* 属も含むような広がりを示し (1)、属レベルの見直しが進められてきている。その最初が Ash, C. らによる *Paenibacillus* 属の提案であった (2)。それに続き、Shida, O. らは *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus* を提案した (27)。これらの属は分子系統からは相互に十分な距離があるにもかかわらず、化学分類学的には原則としてペプチドグリカンが meso-ジアミノピメリン酸 (meso-DAP) の直結型、イソプレノイドキノンは MK-7、菌体脂肪酸はイソ、アンテイソ分枝型と共通点が多い (7)。*Bacillus* 属細菌は古くから胞子の位置と形状、生理・生化学試験により種レベルの同定手順が確立していた。これに基づき、ある意味では種レベルの同定が容易であったといえるが、その後の DNA の G+C 含量と交雑実験による相同性の研究により、多くの種でその不均一性が明らか

かとなり、Bergey's manual (7) ではいくつかの種で「ホモロジグループ」の存在が示されている。信太らは *Bacillus* 属及び関連細菌について精力的な研究を行い、本研究会でも数多くの発表がある (28-32)。*Bacillus brevis* と同定された菌体外蛋白を多量に蓄積する株を集めたところ G+C 含量で 10%もの幅があり、DNA-DNA 相同性で 6 グループに分かれた (41)。これらの分類学的問題を解決するために、あらたにこれらの結果に対応する表現性状を探索し、種としての記載を行った。続いて対象を拡大し、好気性の有孢子桿菌全体に対し、DNA プローブによる同定法の開発を試みた。プローブの増幅の可否といくつかの有効な表現性状を組み合わせることで属レベル、あるいはそれ以下のグループへの絞り込みをかのうとした。さらに DNA-DNA 交雑実験、酵素遺伝子を用いたサザンプロットにより種の決定に至る方法を確立した。このスキームは大きくグルーピングする表現性状の乏しい細菌群に対してその有効性が示され、技術の一般化と共に今後普及していくものと考えられる (33)。

***Sporolactobacillus* 属及び関連細菌**

いわゆる有孢子乳酸菌とよばれる細菌群は、カタラーゼ陽性の *Bacillus coagulans* と、北原らが発表したカタラーゼ陰性の細菌、*Sporolactobacillus inulinus* のみが知られていた (13)。その後中山らは山梨県の植物根圏土壌から耐熱性胞子を形成し、乳酸を生成する細菌を約 120 株分離し、これらをカタラーゼに基づいて属を分類し、それぞれにいくつかの種を提案した (18, 19)。Yanagida, F. らはこれらの株の再整理を行い、生理・生化学試験と DNA-DNA 相同性

によりグルーピングを行った (51, 52). そして新たな分離株とあわせ, カタラーゼ陰性の菌群に対して 4 新種と 1 亜種を記載した. Suzuki, T. and Yamasato, K. の 16S rRNA 塩基配列の解析により, *Sporolactobacillus inulinus* と *Bacillus laevolacticus* を含む Nakayama, O. らの分離した株はカタラーゼ試験の結果にかかわらず 1 つの系統枝に入り, これが *Sporolactobacillus* 属に対応することが示された (40). また, カタラーゼ陰性の有孢子細菌として, メナキノンとチトクロームを欠損している好アルカリ性の *Amphibacillus xylanus* が報告されている (20). この 5S rRNA および 16SrDNA の塩基配列の解析により, 本属は *Clostridium* よりも *Bacillus* のグループに入り, その中で独立していることが確認された (27, 53).

乳酸菌

乳酸菌は乳製品, 植物, 腸管内などから分離される糖類から著量の乳酸を生成する細菌と定義されてきたが, その範疇の細菌はすべてグラム陽性で低 G+C 含量の菌群に入り, しかもひとつのクラスターを形成している (37). 応用微生物学から臨床細菌学まで, 広い分野で重要な細菌群である. 従来分類法では, 細胞形態が桿菌であるか球菌であるか, 発酵形式がホモ型であるかヘテロ型であるか, そして各種糖類の発酵パターンによって種を決定することができた (12). 化学分類学的にはペプチドグリカンのアミノ酸には多様性が見られるが, 一般にイソプレノイドキノン含有しない. 菌体脂肪酸は直鎖の飽和及びモノ不飽和脂肪酸からなり, 多くはシクロプロパン酸 (C19 または C17) を含む (47). したがって, 脂肪酸組成は量的な差で特徴づけられ

るので, 定量的分析, 必要によっては数値解析をすることによって有効な識別指標となる可能性がある. ペプチドグリカンの有効性は, 高 G+C 含量菌群のように, 原則として属に対応するといえるほどではないが, いくつかの種においてその種の特徴として同定にも利用される. すなわち, 乳酸菌のペプチドグリカンは 2 塩基アミノ酸の多くがリジンであり, その架橋ペプチドの多様性を特徴とする. *Lactobacillus* 属の中で meso-DAP をもつものは *L. mali*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. vaccinoferus* など約 10 種であり, *Lactobacillus* 属から独立した *Carnobacterium* 属はすべて meso-DAP である (38, 55). これらの性状は, それぞれ種, 属の特徴とすることができる. 乳酸菌において, リジン型ペプチドグリカンで最も多いのは Lys-Asp (架橋がジカルボン酸なので A4 α 型) である. しかし, *Leuconostoc* 属は架橋に Ser と Ala しか持たない A3 α 型である. 系統分類により *Leuconostoc paramecenteroides* を中心にヘテロ乳酸発酵をする *Lactobacillus* 属細菌が集まって *Weissella* 属が設けられた. これにより, 桿菌 (*Lactobacillus*) か球菌か (*Leuconostoc*) という形態的特徴は属の特徴とならないことも示された. このように分子系統と化学分類の両面から分類指標が的確に評価されることは, 明確な同定にも貢献している. この体系に基づき Cai, Y. らは分離した肉製品の汚染菌やプロバイオティック乳酸菌をそれぞれ *Leuconostoc gelidum*, *Weissella helenica* と同定している (5, 6).

一方, *Pediococcus* 属は 16S rRNA 塩基配列の解析による系統分類から *Lactobacillus* 属の中に埋め込まれてしまったが, 1 グル

ープを形成し、そのペプチドグリカンも Lys-Ala-Asp という共通性がある (8). しかも、これは系統分類によって別属として独立した *Tetragenococcus halophilus* にも共通であることは興味深い。

化学分類研究会では江崎らによる嫌気性グラム陽性球菌 *Peptostreptococcus* と関連細菌の脂質と DNA レベルの分類の発表 (10, 16), 浜名による好気性も含むグラム陽性球菌のポリアミンの分布に関する報告がある (11). さらに、鈴木らによる *Leuconostoc mecenteroides* に存在する 3 亜種の分類学的評価 (39), 馬目らによる乳酸菌の生成する乳酸菌の光学異性体の性状としての安定性の検討 (17) などは、乳酸菌分類の基盤となる知見として重要な内容を持っている。

コリネフォルム細菌

「コリネフォルム細菌」は Bergey's manual では「グラム陽性不規則桿菌 (irregular, nonsporing, Gram-positive rods)」に対応するが、形態的特徴のみでまとめられた一群で特定の分類群を示すものではない。グルタミン酸生産菌をはじめ、アミノ酸、核酸あるいは酵素の生産に有用な細菌が多く見つけられてきたことや植物病原菌、動物病原菌も含まれたことから多くの分類学的研究が行われてきた。これらはグラム陽性高 G+C 含量の細菌群、すなわち *Actinobacteria* 綱の *Micrococccineae*, *Corynebacterineae*, *Propionibacterineae* などの亜目に分布している (26).

Actinobacteria 綱に含まれる細菌における分類学的アプローチは、形態を除き、放線菌と共通点が多い。豊富な化学分類学的な性状は、分類学的指標として系統分類との相関性によって評価され、興味深い知見が

得られてきた。研究会初期のころには鈴木はコリネフォルム細菌について菌体脂肪酸組成と DNA-DNA 相同性を中心としてその分類学的話題を提供した (35, 36). 武内と横田 (42) は細胞壁糖組成の分析を行い、その分類学的意義について考察し、そのバリエーションは種レベルで評価されるべきものであると結論した。武内ら (43) はこれをさらに *Actinobacteria* に拡大して検討した。また、佐々木ら (25) はアミノ酸の異性体分析を導入し、組成の分析でより確実に構造を推定する方法を検討した。落合らはリボソーム蛋白の 2 次元電気泳動パターンをもちいて *Arthrobacter* 属の分類を検討している (22).

武内は *Microbacterium* 属と *Aureobacterium* 属の統合について、新種 7 種の追加とあわせて考察している (44). *Microbacterium* 属は細胞壁にリジンを、*Aureobacterium* 属はオルニチンを持つ点で区別されてきたが、それ以外の性状、すなわち B 型構造でグリコリル型のペプチドグリカン、メナキノンの組成 (MK-11 - MK-13) を持つ点は共通でこれらの性状の方がペプチドグリカンのアミノ酸より分子系統を反映していることから得られた結論である。同様の例として *Oerskovia* 属が *Cellulomonas* 属に統合されたケースがある。化学分類学的指標のなかで、ペプチドグリカン構造はもっとも早く普及したので、それに基づいた体系が優先していたが、その後イソプレノイドキノンや細胞壁アシル型のほうがより系統を反映していると考えられるようになっている。

田中らは不規則桿菌 (irregular rod) である *Arthrobacter* 属細菌の大型球状細胞である cystite の形成条件の検討と、形成する種お

よび株の分布について調べた (45)。いままで、このような細胞が形成されることは知られていたが、その再現ある条件の確立と栄養細胞との比較の詳細な研究がなかったので、今後の発展が期待されるテーマである。細菌の形態分化と制御は 2 次代謝産物の生産の制御にも関連が示唆され、詳細な遺伝子レベルでの解析などへの展開に興味をもたれる。

ミコール酸含有菌群については、鈴木による *Corynebacterium* 属の菌体脂肪酸組成 (34, 36)、矢野が *Mycobacterium* 属のミコール酸の組成の特徴からその分類学的意義を解析した (56-57)。また越智 (20) はリボソーム蛋白 AT-L30 の解析を通じて分類学的考察を行っている。(ミコール酸の研究については「脂肪酸, ミコール酸, 極性脂質」の項参照)

文献

1. Ash, C., Farrow, J. A. E., Wallbanks, S. and Collins, M. D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* **13**, 202-206 (1991).
2. Ash, C., Priest, F. G. and Collins, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*, **64**, 253-260 (1993).
3. (Ed.) Barrow, G. I. and Feltham, R. K. A. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria. Third edition. Cambridge University Press, Cambridge (1993).
4. Brooks, B. W. and Murray, R. G. E. Nomenclature for "*Micrococcus radiodurans*" and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**, 353-360 (1981).
5. Cai, Y., Benno, Y., Takeda, A., Yoshida, T., Itaya, T. and Nakase, T. Characterization of *Leuconostoc* species isolated from vacuum-packaged ham. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**, 153-159 (1998).
6. Cai, Y., Benno, Y., Nakase, T., and Oh, T. -K. Specific probiotic characterization of *Weissella hellenica* DS-12 isolated from flounder intestine. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**, 311-316 (1998).
7. Claus, D. and Berkely, R. C. W. Genus *Bacillus*. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E.,

おわりに

本研究会が化学分類研究会として発足した 1980 年代初頭には、混乱していたコリネフォルム細菌の分類体系がいくつかの化学分類学的手法の組み合わせによって明確な解決を示した強烈な印象があった。Yamada, K. and Komagata, K. (49) による形態、生理・生化学試験、細胞壁、DNA の G+C 含量を組み合わせた多相分類学による属レベルの再編成につづき、Yamada, Y. らによるイソプレノイドキノンの分析 (50) と Uchida, K. and Aida, K. による細胞壁アシル型 (46) は日本オリジナルの分類指標であり、現在も系統分類との相関性においても高い評価を得ている指標である。この研究会の流れが今までの実績に引き続き、生物の本質を見極める有効な分類指標の探索と分類体系の構築に向けて発展することが期待されている。

- and Holt, J. G. (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1105-1139 (1986).
8. Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M. and Wallbanks, S. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**, 5-12 (1991).
 9. Embley, T. M., Thomas, R. H., and Williams, R. A. D. Reduced thermophilic bias in the 16S rDNA sequence from *Thermus ruber* provides further support for the relationship between *Thermus* and *Deinococcus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 25-29 (1993).
 10. 江崎孝行 嫌気性グラム陽性球菌の molecular systematics. 第9回微生物化学分類研究会要旨集 p.15 (1989).
 11. 浜名康栄. グラム陽性球菌におけるポリアミン分布. 第13回微生物化学分類研究会要旨集 pp. 20-21 (1993).
 12. Kandler, O. and Weiss, N. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E., and Holt, J. G. (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology* vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 1209-1234 (1986).
 13. Kitahara, K. and Suzuki, J. *Sporolactobacillus* nov. subgen. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **9**, 59-71 (1963).
 14. 駒形和男. 細菌(1) - 好気性細菌 (長谷川武治編) 微生物の分類と同定 (下) 学会出版センター 東京 (1975) pp.99- 161.
 15. König, H. Archaeobacterial cell envelopes. *Can. J. Microbiol.* **34**, 395-406 (1988).
 16. 李 娜, 橋本安弘, 江崎孝行 Domain Bacteria の中で独自の進化をとげる *Peptostreptococcus* について. 第12回微生物化学分類研究会要旨集 pp. 1-2 (1992).
 17. 馬目章, 岡田早苗, 内村泰, 駒形和男. 生成乳酸の異性体比に基づく *Lactobacillus sake* の特徴. 第17回微生物分類研究会要旨集 pp. 18-20 (1997).
 18. Nakayama, O. and Yanoshi, M. Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere. I. Taxonomic studies on *Bacillus laevolacticus* nov. sp. and *Bacillus racemilacticus* nov. sp. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**, 139-153 (1967).
 19. Nakayama, O. and Yanoshi, M. Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere. II. Taxonomic studies on the catalase-negative strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**, 155-165 (1967).
 20. 越智幸三. リボソーム蛋白 AT-L3-の解析による *Nocardia*, *Mycobacterium* 及び関連属の分類学的研究. 第12回微生物分類研究会要旨集 p. 13 (1992).
 21. Nishiuchi, Y., Baba, T. and Yano, I. Mycolic acids from *Rhodococcus*, *Gordonia*, and *Dietzia*. *J. Microbiol. Methods* **40** : 1-9 (2000).
 22. 落合恵子, 鈴木誠, 安藤勝彦, 川本勲. 新しい分類指標としてのリボソーム蛋白の2次元電気泳動パターン: *Arthrobacter* 属細菌における応用. 第15回微生物分類研究会要旨集 p. 13 (1992).

- 旨集 pp. 6-8 (1995).
23. Oyaizu, H., Stackebrandt, E., Schleifer, K. H., Ludwig, W., Pohla, H., Ito, H., Hirata, A., Oyaizu, Y. and Komagata, K. A radiation-resistant rod-shaped bacterium, *Deinobacter grandis* gen. nov., sp. nov., with peptidoglycan containing ornithine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**, 62-67 (1987).
 24. Rainey, F. A., Nobre, M. F., Schumann, P., Stackebrandt, E. and da Costa, M. S. Phylogenetic diversity of the deinococci as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 510-514 (1997).
 25. 佐々木淳子, 鈴木健一朗, 千々松昌夫. グラム陽性細菌の細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸組成分析法とその分類への応用. 第15回微生物分類研究会要旨集 pp. 13-15 (1995).
 26. Stackebrandt, E., Rainey, F. A., and Ward-Rainey, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 479-491 (1997).
 27. Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K. and Komagata, K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 939-946 (1996).
 28. 信太治, 駒形和男, 鶴高重三. *Bacillus brevis* の数値分類と化学分類. 第11回微生物化学分類研究会要旨集 pp. 15-16 (1991).
 29. 信太治, 高木広明, 門脇清, 駒形和男, 鶴高重三. *Bacillus brevis* グループの化学分類. 第12回微生物化学分類研究会要旨集 pp. 3-4 (1992).
 30. 信太治, 高木広明, 門脇清, 矢野博, 駒形和男. *Bacillus brevis* グループと *Bacillus aneurinolyticus* グループの菌体蛋白質の電気泳動パターンによる分類. 第13回微生物化学分類研究会要旨集 pp. 22-23 (1993).
 31. 信太治, 高木広明, 門脇清, 駒形和男. 菌体抗血清及び菌体外酵素遺伝子を用いた *Paenibacillus* 属の分類と同定. 第15回微生物分類研究会要旨集 pp. 16-19 (1995).
 32. 信太治, 高木広明, 門脇清, 駒形和男. 遺伝子型による好気性有胞子細菌の分類学的研究. 第17回微生物分類研究会要旨集 pp. 11-14 (1997).
 33. 信太治. 好気性有胞子細菌の新しい分類体系と 16S rRNA 遺伝子および酵素遺伝子の細菌分類学への応用. 第19回微生物分類研究会要旨集 pp. 55-56 (1999).
 34. Suzuki, K. Cellular fatty acid composition in coryneform bacteria. Workshop on Chemotaxonomy at Katsunuma (1981).
 35. 鈴木健一朗. コリネフォルム細菌の分類学上の問題点. 第5回微生物化学分類研究会要旨集 p. 11-12 (1985).
 36. 鈴木健一朗. 菌体脂肪酸組成. 第6回微生物化学分類研究会要旨集 p. 9 (1986).
 37. 鈴木健一朗. 分類と分子系統. (乳酸菌研究集談会編) 乳酸菌の科学と技術 学会出版センター, 東京 (1996) pp.24-37.
 38. 鈴木健一朗. 乳酸菌各属の特徴. (乳酸菌研究集談会編) 乳酸菌の科学と技術 学会出版センター, 東京 (1996) pp.37-46.

39. 鈴木正人, 岡田早苗, 内村泰, 駒形和男. DNA-DNA 相同性によりまとめられた *Leuconostoc mesenteroides* 菌株の種内多様性について. 第 17 回微生物分類研究会要旨集 pp. 15-17 (1997).
40. Suzuki, T. and Yamasato, K. Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. FEMS Microbiol. Lett. **115**, 13-18 (1994).
41. Takagi, H., Shida, O., Kadowaki, K., Komagata, K. and Udaka, S. Characterization of *Bacillus brevis* with descriptions of *Bacillus migulanus* sp. nov., *Bacillus choshinensis* sp. nov., *Bacillus parabrevis* sp. nov., and *Bacillus galactophilus* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **43**, 221-231 (1993).
42. 武内真理子, 横田明. コリネフォルム細菌における細胞壁糖組成の分類学的意義. 第 11 回微生物分類研究会要旨集 pp.3-4 (1991).
43. 武内真理子, 横田明, 坂根健. *Actinobacteria* における細胞壁糖組成の分類学的意義. 第 15 回微生物化学分類研究会要旨集 pp.9-12 (1995).
44. 武内真理子. *Microbacterium* 属と *Aureobacterium* 属の統合, 及び *Microbacterium* 属の 7 新種について. 第 17 回微生物分類研究会要旨集 pp.8-10 (1997).
45. 田中尚人, 内村泰, 駒形和男. *Arthrobacter* 属細菌の cystite 形成について. 第 18 回微生物分類研究会要旨集 pp. 5-8 (1998).
46. Uchida, K. and Aida, K. Acyl type of bacterial cell wall: its simple identification by colorimetric method. J. Gen. Appl. Microbiol. **23**, 249-260 (1977).
47. Uchida, K. and Mogi, K. Cellular fatty acid spectra of *Sporolactobacillus* and some other *Bacillus-Lactobacillus* intermediates as a guide to their taxonomy. J. Gen. Appl. Microbiol. **19**, 129-140 (1973).
48. Van de Peer, Y., Neefs, J. -M., De Rijk, P., De Vos, P., and De Wachter, R. About the order of divergence of the major bacterial taxa during evolution. Syst. Appl. Microbiol. **17**, 32-38 (1994).
49. Yamada, K. and Komagata, K. Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. Classification of coryneform bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **18**, 417-431 (1972).
50. Yamada, Y., Inouye, G., Tahara, Y. and Kondo, K. The menaquinone system in the classification of coryneform and nocardioform bacteria and related organisms. J. Gen. Appl. Microbiol. **22**, 203-214 (1976).
51. Yanagida, F., Suzuki, K., Kaneko, T., Kozaki, M. and Komagata, K. Morphological, biochemical, and physiological characteristics of spore-forming lactic acid bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **33**, 33-45 (1987).
52. Yanagida, F., Suzuki, K., Kaneko, T., Kozaki, M. and Komagata, K. Deoxyribonucleic acid relatedness among some spore-forming lactic acid bacteria. J. Gen. Appl. Microbiol. **33**, 47-55 (1987).
53. Yanagida, F., Niimura, Y., Koh, E., Suzuki, K., Kozaki, M. and Komagata, K. Nucleotide sequence of 5S ribosomal RNAs of '*Amphibacillus xylanus*' and *Clostridium carnis*. Nucleic

Acids Res. 17, 443 (1989).

54. Yanagida, F., Suzuki, K., Kozaki, M. and Komagata, K. Proposal of *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* sp. nov., subsp. nov., *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *racemicus* subsp. nov., *Sporolactobacillus terrae* sp. nov., *Sporolactobacillus kofuensis* sp. nov., and *Sporolactobacillus lactosus* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 47, 499-504 (1997).
55. 柳田藤寿. 乳酸菌の種について (乳酸菌研究集談会編) 乳酸菌の科学と技術 学会出版センター, 東京 (1996) pp.46-58.
56. 矢野郁也. ミコール酸の分子種形成による *Mycobacterium* 及びその関連細菌の化学分類学的研究. 第4回微生物化学分類研究会要旨集 pp. 12-15 (1985)
57. 矢野郁也. 抗酸菌の化学分類とその臨床的意義について. 第12回微生物化学分類研究会要旨集 p.21 (1992).

放線菌

波多野和徳

はじめに

放線菌 (actinomycetes) は高度な形態分化を示す高 GC グラム陽性細菌の一群に与えられた名称である。その代表である *Streptomyces* 属菌は放射状に伸長した基生菌糸 (栄養菌糸) 上に孢子連鎖をともなった気中菌糸を形成する。この菌群は抗生物質を始めとする多種多様な二次代謝産物を生産することから、その生物学的な研究は分類も含めて 1940 年代頃から活発に行われ今日に至っている。一方、高 GC グラム陽性細菌のうち分岐した栄養菌糸を形成する菌群、例えば *Arthrobacter*, *Corynebacterium* や *Micrococcus* 属菌などに対しては放線菌と一線を画していた。しかし、1990 年代に入り DNA 塩基配列の解析技術の発展にともなって細菌群の系統解析がすすみ、これら両群は形態的、化学分類学的に異なるものの系統的に近い関係にあることが示唆された。1997 年 Stackebrandt, E. らはこれら一群を *Actinobacteria* 綱の *Actinomycetales* 目にまとめることを提案した (16)。その分類に従えば上述した放線菌は *Actinomycetales* 目の *Glycomycineae*, *Micromonosporineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae* および *Streptosporangineae* 亜目に含まれる。一方、気中菌糸の形成などの形態分化を示さない菌群は *Actinomycineae*, *Corynebacterineae* および *Micrococcineae* 等に含まれる。この菌群のうち嫌気性を有する菌は病原菌として、好気性を有する菌は抗生物質などの生理活性

物質生産菌やアミノ酸生産菌として深く研究された。これに加えて最近では、好気性を有する菌は環境汚染物質や難分解化合物除去の主役として注目されこの菌群の研究は爆発的な広がりをみせてきた。

この小論では、好気性で孢子連鎖を形成する菌群 (狭義の放線菌) に焦点をあて、その分類学的研究の進展とそれに関わった日本人研究者の研究内容について概説する。最初に表現型に基づく伝統的分類法、多数の表現形質を等価に評価し前者より客観性を持たせた数値分類法について述べ、次いで属の区別を体系づけるために導入された化学分類法、さらに 1990 年代以降今日に至る遺伝子の塩基配列をもとに展開した系統分類法について述べる。

伝統的分類法

放線菌は古くから動植物の寄生菌として、また土壌微生物の一群として研究されていたが、1939 年に発刊された *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 第 5 版に記載されている放線菌は *Actinomyces* 属のみであった。放線菌の研究が爆発的な広がりを見せたのは *Streptomyces griseus* によるストレプトマイシン生産の発見が契機になったと言っても過言でないであろう。その後の放線菌による新規抗生物質の探索研究の発展はそのまま本菌群の分類研究の発展と同時に新属新種の乱造と分類・同定の混乱につながっていった。

Waksman, S. A. and Henrici, A. T. (27) は

Actinomyces 属菌のうち腐生性を有し、好気性で孢子連鎖を形成する一群にたいし *Streptomyces* 属とすることを提案し、嫌気性で病原性のある菌種と区別した。当時の分類・同定における基準は、形態（孢子形成菌糸および孢子表面の構造など）、気菌糸、基生菌糸（栄養菌糸）の色調、可溶性色素産生の有無や色調、メラニン様色素産生の有無、生育に寄与する炭素源や窒素源の種類、その他生理的性状などの表現形質によるものであった。これらの性状は培地の種類や培養条件などで変化し易く、この表現形質上の違いをもとに 1970 年までに 3000 種をこえる新種が提案された。1960 年代に入り、*Streptomyces* 属菌の分類基準の手法を統一しようと Subcommittee on Taxonomy of Actinomycetes of the International Committee on Bacteriological Nomenclature and the Subcommittee on Actinomycetes of the Committee on Taxonomy of the American Society of Microbiology による International *Streptomyces* Project (ISP) が計画され実行された。このプロジェクトでは統一した培地、操作ならびに観察方法 (11) を用い、450 余株の *Streptomyces* 属および *Streptoverticillium* 属菌を選び出し、これらを世界中の研究機関（日本では 5 研究機関）で精査し、その結果を報告した (12, 13, 14, 15)。このプロジェクトで用いられた菌株は世界の 4 微生物保存機関 (ATCC; The American Type Culture Collections, CBS; Centraalbureau voor Schimmelcultures, IFO; Institute for Fermentation, Osaka, RIA; The Russian Research Institute for Antibiotics Culture Collection) に寄託され保存されている。

また、ここで採用された方法は現在では

Streptomyces 属菌種の分類同定を行うとき用いる観察の標準法として広く採用されている。

DNA-DNA 交雑法

DNA-DNA 交雑法は細菌における種の同定において最終判断を下すとき最も信頼度の高い方法である。放線菌については Yamaguchi, T. (29) や Okanishi, M. (9) らの先駆的な研究がある。彼らの研究をもとに Okanishi, M. らは *Streptomyces griseus* 群 (10) について、Toyama, H. らは whorl-forming *Streptomyces* 菌群 (23) についてそれぞれ DNA 相同性と種の関係について検討し、DNA-DNA 交雑法が種の同定に有用であることを示した。その後、Ezaki, T. らは標識として放射性物質の代わりに蛍光色素を用いる方法を開発 (1, 2) し、DNA-DNA 交雑法が簡便に利用できるよう貢献した。

数値分類法

数値分類法は *Streptomyces* 属菌種の分類に用いられた伝統的分類法があまりにも多くの経験が必要である事に加えて個人的見解が入りすぎるとの批判を受け、菌の持つ形質を全て等価に扱いその類似性を統計処理する事により伝統的分類より客観性のある分類法として採用された。その一例として Williams, S. T. らの報告 (28) を紹介する。彼らは ISP 菌株 394 株を含む 475 菌株の *Streptomyces* 属菌について 139 項目の性状を調べ、その性状の一致度を求め、それを UPGMA (the unweighted pair group method with averages algorithm) で解析し、一つのクラスター (同種の集合体) を相似度 77.5% でまとめた。その後、本法でまとめられた

相似度 77.5%のクラスター内の菌種間における DNA-DNA 交雑の相同値が同種と判断できない低い値を示す菌種も含まれているケースが認められた。

化学分類法

化学分類は表現形質の乏しい高 GC グラム陽性菌、いわゆる *actinobacteria* の分類を中心に採用され発展してきた（詳細は本誌細胞壁組成およびグラム陽性細菌の項を参照）。放線菌に適用し体系化したのは Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. である。彼らは放線菌の細胞壁アミノ酸組成ならびに全菌体糖組成を組み合わせることにより放線菌の科ならびに属を体系的に分類した

(7)。この分類体系は 1974 年に刊行された Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 第 8 版に採用され（表 1, 2, 3）好気性放線菌の科および属を分類した。その後、脂肪酸組成、メナキノンなどの成分情報を組み合わせて精度の高い属レベルでの分類に発展していった。

内田は (24) ムラミン酸の糖鎖部に結合しているアシル基がアセチル型あるいはグリコリル型かは放線菌の科または属レベルでまともまっていることを見だし (25)、これと細胞壁アミノ酸組成と組み合わせることにより解像度の高い分類基準を作れることを提案すると共にその簡便な検出方法を考案した (26)。

表 1. 好気性放線菌の細胞壁型における主要構成成分

Cell wall types	DAP		Glycine	Arabinose	galactose
	meso-	LL-			
I	-	+	+	-	-
II	+	-	+	-	-
III	+	-	-	-	-
IV	+	-	-	+	+

表 2. 好気性放線菌における全菌体の糖組成パターン

Pattern	Arabinose	Galactose	Xylose	Madurose
A	+	+	-	-
B	-	-	-	+
C	-	-	-	-
D	+	-	+	-

表 3. *Actinomycetales*目に含まれる各属の特徴を示す細胞壁型と全菌体糖組成パターンの分布

Cell wall type	Sugar pattern	Genera
I	NC	<i>Streptomyces</i> , <i>Streptoverticillium</i> , <i>Microellobosporia</i> , <i>Sporichthya</i>
II	D	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i> , <i>Ampullariella</i> , <i>Amorphosporangium</i> , <i>Dactylosporangium</i>
III	B	<i>Microbispora</i> , <i>Streptosporangium</i> , <i>Spirillospora</i> , <i>Planomonospora</i>
	C	<i>Dermatophilus</i> , <i>Nocardia-madurae</i> type (<i>Actinomadura</i>)
	A	<i>Actinobifida</i> , <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Geodermatophilus</i>
IV	A	<i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Thermomonospora</i> , <i>Micropolyspora</i>

NC: no characteristic sugar pattern

系統分類法

伝統的分類や化学分類では種や属の分類は出来るがそれより高次の分類群の構成については十分な対応ができなかった。Stackebrandt, E. らは 1980 年から 16S rRNA カタログ法を用いて放線菌全体について広範な研究を行い、その結果をもとに放線菌の科および属レベルの分類体系を提案した。この分類体系は形態や化学分類から構築されていた体系に大きな変革をもたらした。Stackebrandt, E. らは 16S rRNA カタログ法の結果を基に *Streptosporangiaceae* 科, *Frankiaceae* 科の新設あるいは *Micromonosporaceae* 科の再定義を提案した。しかし、カタログ法は正確な遺伝距離をあらわすものでないこともあり、分類を系統的に論じられなかった。また、当時の塩基配列の解読技術がそれほど高くなかったこともあり 16S rRNA 塩基配列による系統分類を論じられた菌群はごく限られていた。

工藤は (4) 16S rRNA 以外の遺伝子で生物の系統進化を推定するのに利用可能な遺伝子として 5S rRNA を選び、カタログ法

を中心に論じられた放線菌分類の検証を行うために放線菌 10 属 13 菌株についてその全塩基配列を決定し、既報のデータと合わせて解析した。得られた結果は 16S rRNA のカタログ法ならびに塩基配列から論じられた放線菌の系統関係をほぼ裏付けた。

越智は (8) 放線菌のリボゾーム蛋白の一種である AT-L30 の 2 次元電気泳動 (PAGE) 上における挙動とそのアミノ酸配列が放線菌の属レベルの分類に有効であることを見いだした。これを分類学的位置づけが混乱している *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Gordonia* および *Tsukamurella* の各属に応用した結果、*Mycobacterium* 属は特異なアミノ酸で特徴づけられた極めて homogeneous な菌群であること、*Rhodococcus* 属も比較的 homogeneous であるが、*Nocardia* 属は heterogeneous な傾向がみられる事などを見いだした。

田村は (19) 土壌から分離した数多くの運動性放線菌について 16S rDNA 塩基配列に基づく解析を行った。その結果、運動性

を有する菌については属および科レベルでなんら系統的關係は認められない事を見いだした。また、形態的にも化学分類学的にも区別することが困難であった *Pseudonocardia* 科に含まれる *Microtetraspora* 属の一部の菌種と *Thermomonosporaceae* 科の *Actinomadura* 属菌種は、16S rRNA 塩基配列を用いることによって明確に区別することができた。今日では、前者は *Nonomuraea* 属に、後者は *Actinomadura* 属に再分類されている (31)。

1997年 Stackebrandt, E. らは 16S rRNA 塩基配列に基づく放線菌全体の新しい階層的分類体系を提案した (16)。この分類体系によれば放線菌は高 GC グラム陽性菌である *Actinobacteria* 綱の *Actinomycetales* 目に含まれる。この分類体系は従来の表現型分類や化学分類は一切考慮せず、各科および属の定義は signature nucleotides で行われている。図 1 に *Actinomycetales* 目に含まれる菌株の系統樹を示した (22)。最近になって *Actinobacteria* 綱に含まれるいくつかの新属が提案されたのを受けて Stackebrandt, E. and Schumann, P. (17) は *Micrococcineae* 亜目に関して *Bogoriellaceae*, *Dermacoccaceae*, *Rarobacteraceae* および *Sanguibacteraceae* の 4 科を新設し、これに伴って *Dermatophilaceae*, *Cellulomanadaceae* および *Intrasporangiaceae* の 3 科について従来の定義を一部変更した。Labeda, D. P. and Kroppenstedt, E. (6) は、16S rRNA 塩基配列に基づく系統分類学的検討から *Saccharothrix* 属とその関連菌を *Pseudonocardia* 科から独立させ *Actinosynnemataceae* 科を新設した。このように放線菌研究の進展にともなう新たな菌の発見は新たな遺伝子情報の蓄積をもたら

し、それにとまなう分類学上の整理が進んできた。

放線菌分類学における今後の問題点

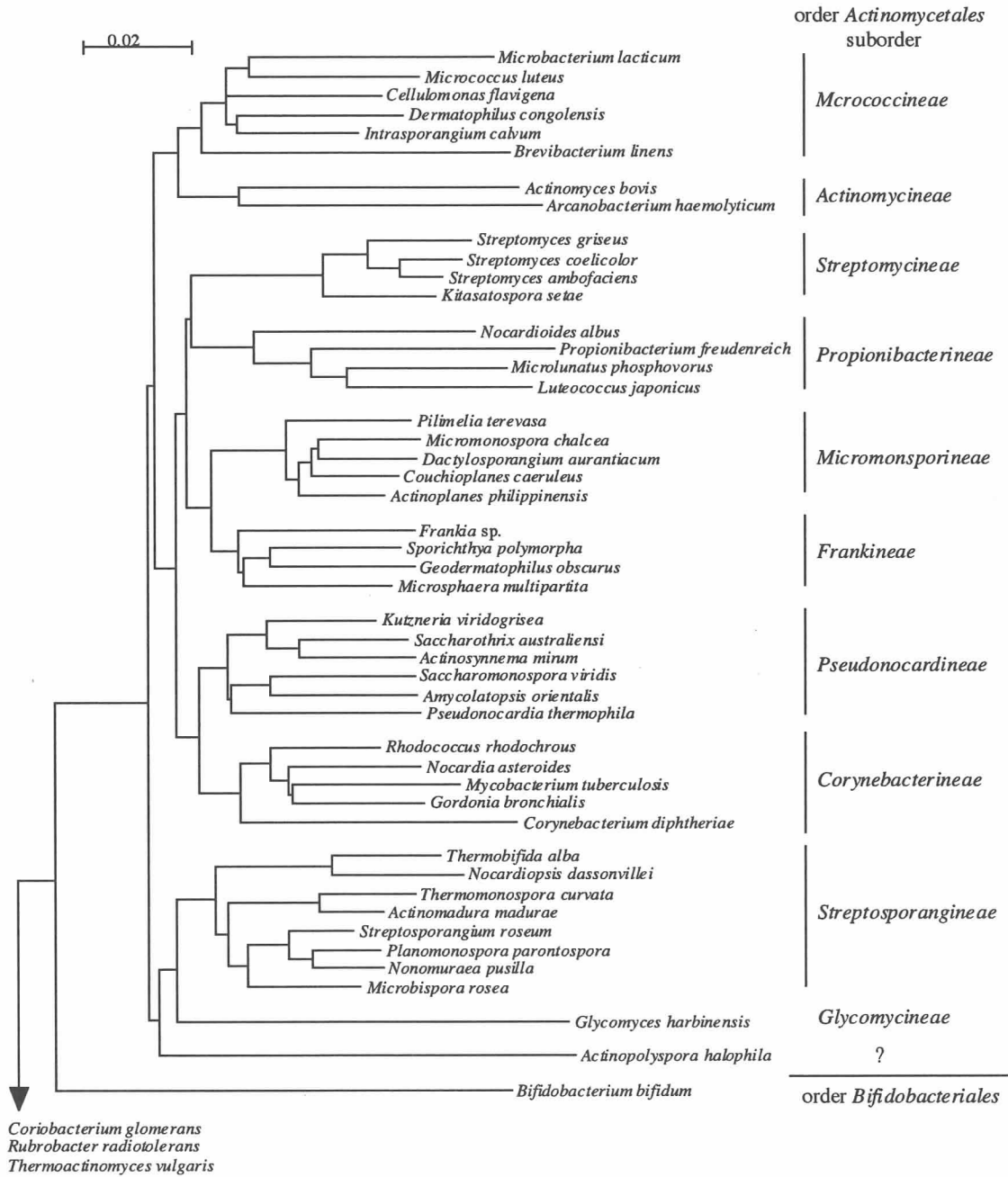
16S rRNA 塩基配列とその signature nucleotides でまとめた Stackebrandt, E. らが提案した放線菌の分類体系は生物進化に基づいたものとして広く受け容れられるだろう。特に、形態学的、化学分類学的に区別できなかった *Actinomadura* 群を 16S rRNA 塩基配列に基づく系統解析から見事に分類する事が出来たのは系統分類の有用性を示したものと思われる。

しかしながら Stackebrandt, E. らが提案した分類体系はあくまでも 16S rRNA という単一の遺伝子の塩基配列に基づいているため、16S rDNA と異なる遺伝子の発現によって生じる形態、あるいは細胞壁の化学組成などの違いを基に分類した菌と矛盾した結果が出現してくる可能性もある。これらの菌についてどの様に取り扱って行くべきか、その合意はできていない。新しい亜目、科ならびに属などを新設していくのか、あくまでも 16S rRNA 塩基配列に基づく評価のままにしておくのか今後の問題点として残っていくであろう。これに加えて、階層的分類体系の根幹をなす種の定義をどのようにするのも今後の研究課題として残っている。

最後に 1990 年以降、日本の放線菌分類研究者によって形態学的、化学分類学的ならびに系統分類学的に既存の菌と異なる放線菌のいくつかの新属 *Catenuloplanes* (30), *Herbidospira* (5), *Actinocorallia* (3), *Couchioplanes* (18), *Spirilliplanes* (20) および

Cryptosporangium (21) が提案されていることを紹介してこの小論を終える。

図 1. 16S rDNA 塩基配列に基づく *Actinomycetales* 目の近隣結合法で描かれた系統樹



depicted by Tamura (IFO)

文献

1. 江崎孝行 Fluorometric hybridization in microdilution wells for the identification of the gram-positive and negative bacteria. 微生物分類研究会 8 回大会 (1988).
2. Ezaki, T., Hashimoto, Y. and Yabuuchi, E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial stains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **39**, 224-229 (1989).
3. Iinuma, S., Yokota, A., Hasegawa, T. and Kanamaru, T. *Actinocorallia* gen. nov., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 230-234 (1994).
4. 工藤卓二 5S rRNA 塩基配列による放線菌の系統分類 微生物分類研究会 19 回大会 (1993).
5. Kudo, T., Itoh, T., Miyadoh, S., Shomura, T. and Seino, A. *Herbidospira* gen. nov., a new genus of the family *Streptosporangiaceae* Goodfellow et al. 1990. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 319-328 (1993).
6. Labeda, D. P. and Kroppenstedt, R. M. Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 331-336 (2000).
7. Lechevalier, M. P. and Lechevalier, H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**, 435-443 (1970).
8. 越智幸三 リボゾーム蛋白 AT-L30 の解析による *Nocardia*, *Mycobacterium* 及び関連属の分類学的研究 微生物分類研究会 12 回大会 (1992).
9. Okanishi, M. and Gregory, K. F. Methods for the determination of deoxyribonucleic acid homologies in *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* **104**, 1086-1094 (1970).
10. Okanishi, M., Akagawa, H. and Umezawa, H. An evaluation of taxonomic criteria in streptomycetes on the basis of deoxyribonucleic acid homology. *J. Gen. Microbiol.* **72**, 49-58 (1972).
11. Shirling, E. B. and Gottlieb, D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**, 313-340 (1966).
12. Shirling, E. B. and Gottlieb, D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**, 69-189 (1968).
13. Shirling, E. B. and Gottlieb, D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. III. Additional species descriptions from first and second studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**, 279-392 (1968).
14. Shirling, E. B. and Gottlieb, D. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**, 391-512 (1969).
15. Shirling, E. B. and Gottlieb, D. Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. V. Additional descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**, 265-394 (1972).

16. Stackebrandt, E., Rainey, F. A. and Ward-Rainey, N. L. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**, 479-491 (1997).
17. Stackebrandt, E. and Schumann, P. Description of *Bogoriellaceae* fam. nov., *Dermacoccaceae* fam. nov., *Rarobacteraceae* fam. nov. and *Sanguibacteraceae* fam. nov. and emendation of some families of the suborder *Micrococcineae*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**, 1279-1285 (2000).
18. Tamura, T., Nakagaito, Y., Nishii, T., Hasegawa, T., Stackebrandt, E. and Yokota, A. A new genus of the order *Actinomycetales*, *Couchioplanes* gen. nov., with descriptions of *Couchioplanes caeruleus* (Horan and Brodsky 1986) comb. nov. and *Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**, 193-203 (1994).
19. 田村朋彦 放線菌の 16S rRNA 塩基配列に基づく系統分類 微生物分類研究会 16 回大会 (1996).
20. Tamura, T., Hayakawa, M. and Hatano, K. A new genus of the order *Actinomycetales*, *Spirilliplanes* gen. nov., with description of *Spirilliplanes yamanashiensis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**, 97-102 (1997).
21. Tamura, T., Hayakawa, M. and Hatano, K. A new genus of the order *Actinomycetales*, *Cryptosporangium* gen. nov., with description of *Cryptosporangium arvum* sp. nov. and *Cryptosporangium japonicum* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. **48**, 995-1005 (1998).
22. Tamura, T. personal communication. (2000).
23. Toyama, H., Okanishi, M. and Umezawa, H. Heterogeneity among whorl-forming streptomycetes determined by DNA reassociation. J. Gen. Microbiol. **80**, 507-514 (1974)
24. 内田欣哉. 細菌細胞壁の化学組成・構造 - 細菌分類への応用とその評価. 微生物分類研究会 6 回大会. (1986).
25. Uchida, K. and Seino, A. Intra- and inter-generic relationships of various actinomycetes strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycans examined in a glycolate test. Int. J. Syst. Bacteriol. **47**, 182-190 (1997).
26. Uchida, K., Kudo, T., Suzuki, K. and Nakase, T. A new rapid method of glycolate test by diethyl ether extraction, which is applicable to a small amount of bacterial cells of less than one milligram. J. Gen. Appl. Microbiol. **45**, 49-56 (1999).
27. Waksman, S. A. and Henrici, A. T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. J. Bacteriol. **46**, 337-341 (1943).
28. Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A. and Sackin, M. J. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. J. Gen. Microbiology. **129**, 1743-1813 (1983).
29. Yamaguchi, T. Similarity in DNA of various morphologically distinct actinomycetes. J. Gen. Appl. Microbiol. **13**, 63-71 (1967).
30. Yokota, A., Tamura, T., Hasegawa, T. and Huang, L. H. *Catenuloplanes japonicus* gen. nov., sp.

nov., nom. rev., a new genus of the order *Actinomycetales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 805-812 (1993).

31. Zhang, Z., Wang, Y. and Ruan, J. Reclassification of *Thermomonospora* and *Microtetraspora*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 411-422 (1998).

Archaea

伊藤 隆

はじめに

Woese, C. R. らによって初めて古細菌 (Archaeobacteria, 後に Archaea) という概念が提唱された時 (18) には, 知られていた古細菌の数は極めて少かった. 20 年前に発表された Approved List of Bacterial Names (1980) では僅かに 8 属 20 種の古細菌が認められているだけである. その後古細菌の種は増加し, 今日では承認種の数には 65 属 185 種に達している (2000 年 8 月 31 日現在: 図 1 参照). この様に古細菌の発見は他の真正細菌に比べれば遅れていたが, 急ピッチで分類体系の構築が進められている. この分類学の発展において見過ごすことができないことは早くから 16S rRNA などの塩基配列による系統学的手法が持ち込まれてきたことである. そもそも古細菌の発見が 16S rRNA の塩基配列に基づいているので当然なことではあるが, 古細菌の発見が生物界全体の系統進化の議論を盛り上げることになり, その結果として古細菌の系統学的研究が飛躍的に進んだことも大きな要因であろう.

さて日本人研究者はどれほど古細菌の分類学的研究に貢献してきたのだろうか. 過去の本研究会を振り返ってみても, 古細菌を対象とした発表の数はそれほど多くはない. しかし日本人全体としてみればその貢献度は決して小さくない. 初期の古細菌全体の系統に関する論争でも, 5S rRNA を用

いた堀ら (14), 複合系統樹を導入した岩部

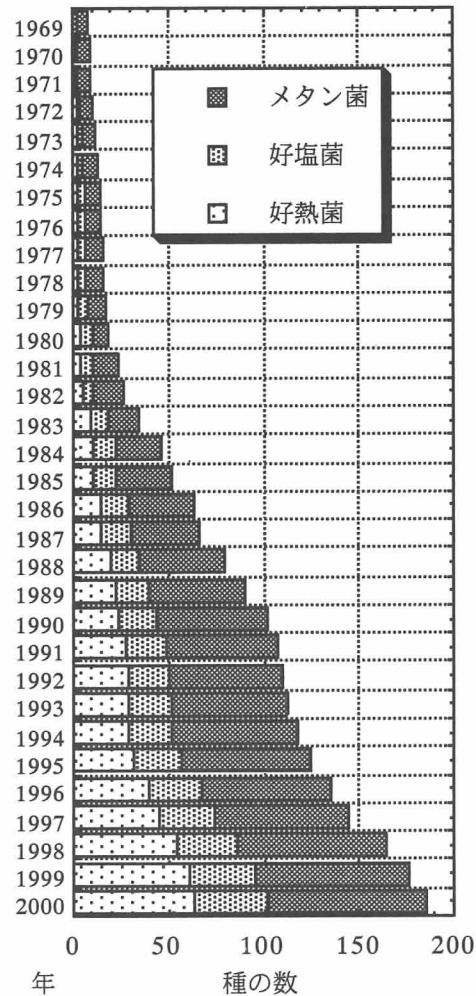


図 1. 古細菌種の数 (承認されている種の数のみを計数した. 2000 年は 8 月 31 日現在までのデータ)

ら (15) の発表は特筆するべきものであった。しかし本章では古細菌内の分類学の発展に焦点を当てることとし、その分類学的背景と本研究会を中心とする日本人研究者による研究を紹介したい。古細菌と一口に言ってもその範囲は広く、系統学的には *Euryarchaeota*, *Crenarchaeota* という 2 つの界 (kingdom) にまたがっており (19), また表現型的には大きくメタン生成古細菌, 好塩性古細菌, 好熱性古細菌と三つに分けることができる。表現型による区分は必ずしも系統学的関係を反映しているものではないが古細菌のイメージをとらえやすく繁用されている。そこで本章もメタン生成古細菌, 好塩性古細菌, 好熱性古細菌に大別し, それぞれについてまとめていくことにする。

メタン生成古細菌

メタン生成古細菌はメタン発生をエネルギー源として生育する絶対嫌気性古細菌である。自然界, あるいは人工の嫌気的環境下に幅広く分布しており, 富栄養化した河川・湖沼, また下水嫌気消化槽, 水田土壌, 海泥, 反芻動物のルーメンなどから分離されている。さらに塩湖の土壌から好塩性のメタン生成古細菌が, 温泉や海底熱水孔からも好熱性のメタン生成古細菌が分離されている。従来, 細胞形態, 培養性状 (温度, pH 等), メタン生成の基質などの表現性状によって分類が行われてきたが, それだけでは系統学的関係を正しく推定することは困難であった。このためメタン生成細菌分類学小委員会は, 新しいメタン生成古細菌を発表するときの最小基準を提案し (11), その中で遺伝子, あるいはタンパク質のデ

ータによる系統学的関係を反映させるべきであると勧告している。尚, 日本では古賀 (産業医大) が本小委員会のメンバーである。その後さらに多くの菌種について 16S rRNA 塩基配列が決定され, 系統分類学的関係に基づいた高次分類群が提案されており, このなかではメタン生成古細菌は 5 目 10 科に分類されている (12)。これらはまだ未承認のものが多いが, 今後この提案にそった再編が進んでいくものと思われる。

日本におけるメタン生成古細菌の分類学的研究では古賀らによる極性脂質に関する研究が注目に値する (2, 3, 4)。メタン生成古細菌の極性脂質は他の古細菌同様にエーテル型脂質から成るが, 脂質骨格, 炭化水素鎖, 糖鎖, ホスホジエステル結合した極性基などの相異によって様々なバリエーションがある。これまでの脂質の簡易分析は主に薄層クロマトグラフィー (TLC) によっているが, メタン生成古細菌の場合, 1 菌株あたりの脂質のバリエーションが多く, また未知脂質も多く含まれているため各スポットを同定するのも容易ではない。そこで彼らは全菌体から脂質構成部分の種類だけを簡便に分析する方法を開発し, これらのパターンをメタン生成古細菌の同定に応用した。こうした脂質構成成分によるメタン生成古細菌のグルーピングは Boone, D. R. らがまとめている 16S rRNA 塩基配列に基づいた科, 目レベルの分類ともよく合致しており, 分類同定の指標としての有用性が裏付けられている。川崎らは 11 種 19 株のメタン生成古細菌の 16S rRNA 部分塩基配列に基づく系統を調べ, さらに簡易同定への応用の可能性を示している (1)。今でこそ 16S rRNA 塩基配列を決定することは簡

単になり多くのメタン生成古細菌のデータが公開されているが、この当時まだ公表されているデータの数も少なく、本研究によるデータは貴重なものであった。

一方、メタン生成古細菌は嫌気的環境に幅広く生存し、温室効果の高いメタンガスを発生させることから生態学的にも注目されている。日本では水田土壌に生息するメタン生成古細菌にいくつかの研究報告がある。宮木らは水田土壌に生息するメタン生成古細菌が純粋培養では致死的な長期の乾燥または高温条件に曝されても水田土壌中においては残存可能であることを示した(6)。日本の水田土壌からはこれまで *Methanobrevibacter arbolophilus*, *Methanosarcina mazei* などの新規分離株や未同定メタン生成古細菌が分離されている。この他、畑地土壌、ルーメン、シロアリ後腸などからも新規メタン生成古細菌が分離されているが、日本人によって提唱されたメタン生成古細菌の新種はこれまで *Methanotherix thermophila* (現在は *Methanosaeta thermophila*) のみである。

好塩性古細菌

好塩性古細菌は飽和に近い食塩濃度で旺盛に生育する古細菌で、塩濃度が薄い (<1.5 M NaCl) と生育できず、多くは溶菌して死滅してしまう。もともとは塩蔵食品の腐敗の原因菌として、あるいは天日塩田に赤色化をもたらす(赤い色素を有した)"細菌"として比較的早くから知られていた。近年では死海やグレートソルトレイクなどの塩湖からも分離報告例が増えてきている。またアフリカや中国ではアルカリ性塩湖が存在し、そこからは好アルカリ性好塩性古細菌

菌が分離されている。これら好塩性古細菌はすべて *Halobacteriales* 目, *Halobacteriaceae* 科に含まれる。好塩性古細菌は有機物を含む寒天培地上で好氣的に生育できるため古細菌の中では早くから研究が進んできた。従来分類は細胞形態と生育 pH (好中性と好アルカリ性) に大きく依存していたが、1980年代頃から DNA-rRNA 相同性や極性脂質も分類指標として注目されるようになってきた。好中性好塩性古細菌では様々な糖脂質を有しており、これらは属レベルの分類指標として用いられている。一方、好アルカリ性好塩性古細菌の多くは糖脂質を欠いている。近年は 16S rRNA のデータが蓄積され、好塩性古細菌属の系統関係がより明確にされてきている。好塩性古細菌の糖脂質による分類は概ね 16S rRNA のデータとよく一致しているが、一部には異なる糖脂質を持つ菌株が同じ系統枝に入るケースがある。また桿菌状好アルカリ性好塩性古細菌はこれまですべて *Natronobacterium* 属に入れられてきたが、系統学的には少なくとも 4 属に分かれることが示され、その一部は好中性菌の属に移されたものもある。また好塩性古細菌には複数の 16S rRNA 遺伝子コピーがあり、一部の菌株ではコピー間で数%にもおよぶ相異が見られており、正確な系統学的位置の推定を困難にしている。最近になって新分類群記載のための最小基準が提案された(16)。

本研究会における好塩性古細菌に関する発表は少ないが、これまでに日本人研究者による分類学的研究の報告がいくつか見受けられる。特に亀倉(野田産研)は *Halobacteriaceae* 科古細菌分類学小委員会

のメンバーで精力的に好塩性古細菌の分類学的研究も行ってきており、これまでにいくつかの新属、新種の提唱に関わっている。また上記の 16S rRNA による好アルカリ性好塩性古細菌の再編も亀倉らによる研究結果である。日本から分離された好塩性古細菌には、海岸近くの砂にこびりついた塩から分離された *Natrialba asiatica* 172P1 (新属新種)、石川県の観光天日塩田から分離された *Haloarcula japonica* (新種) がある。これ以外に日本人研究者によって発表された好塩性古細菌としてはケニアの塩湖から分離した *Natronococcus amylolyticus*, アルゼンチンの塩地より分離した *Haloarcula argentinensis* および *Haloarcula mukohataei* などがある。

一方、近年になって日中共同で中国の塩湖から分離された好塩性古細菌の分類学的研究が進行している。本研究会では辛らが中国のアルカリ性塩湖より分離した好アルカリ性古細菌 3 株について分類学的特徴付けを行った結果を示している (10)。16S rRNA の系統学的解析からは一株は既知属の *Natronobacterium* 属に近いことが示されたが、残る 2 株は既知属とは離れていることが示された。しかし前述のように好アルカリ性好塩性古細菌は糖脂質を欠いており、属を区別するのに有効な表現型がなく、その分類学的位置の決定にはさらに研究が必要であることが示された。

好熱性古細菌

好熱性古細菌は古細菌の中でも主要なグループで、好熱性のメタン生成古細菌を除いても *Crenarchaeota* 界, *Euryarchaeota* 界の両界にまたがり幅広く分布している。至

適生育温度の分布は 60°C~107°C, さらに至適 pH の分布は 0.7~9, 好気性・微好気性・絶対嫌気性などとその培養性状も多様である。主な分離源は温泉, 硫気孔や海底の熱水孔などである (17)。1989 年に発行された *Bergey's manual of systematic bacteriology* では好熱性古細菌は表現形質から三つのグループ, すなわち硫酸還元性古細菌と無細胞壁古細菌, 硫黄代謝古細菌に分けられていた。しかしそれぞれのグループ中に硫酸を還元できないもの, 細胞壁を有したもの, 硫黄によって生育が阻害されるものが発見されるようになり, グループの名称も矛盾したものになってしまった。ここ数年は新しい好熱性古細菌が数多く報告されているが, 好熱性古細菌に関する純粋な分類学研究はごく僅かである。また新分類群記載のための最小基準も提案されておらず, 分類学的研究の遅れが目立っている。特に属以上の分類に有用な表現形質が少ないため, 16S rRNA 塩基配列など系統学的データに大きく依存している (13)。一方ではゲノム解析された好熱性古細菌など特定の好熱性古細菌の生化学的・遺伝学的データが飛躍的に蓄積されつつあり, 今後の分類学的研究への応用も期待されている。

世界有数の火山国である日本は好熱性古細菌の分離に適した地域であり, 日本人研究者による新奇好熱性古細菌の発表も多い。これまでに発表された新属新種の好熱性古細菌は *Aeropyrum pernix* (鹿児島県小宝島), *Caldivirga maquilangensis* (フィリピン, マッキリン山) (8), *Palaeococcus ferrophilus* (小笠原諸島) *Sulfurisphaera ohwakuensis* (神奈川県箱根), *Thermocladium modestium* (福島県野地温泉他) がある。さらに伊藤

らによって東日本各地の温泉から分離された桿菌状好熱性古細菌についても新属となる可能性が見いだされている (9)。また新種として *Pyrococcus horikoshii* (沖縄トラフ), *Sulfolobus hakonensis* (神奈川県箱根), *Thermococcus peptonophilus* (小笠原諸島), *Thermococcus profundus* (沖縄トラフ) などがある。増地は *Pyrococcus horikoshii* (発表は '*Pyrococcus shinkaii*') OT3 株の伸張因子の塩基配列を決定し系統樹を作成した (5)。また浜名は好熱性古細菌のポリアミンの分布を調べており、目、科レベルである程度のパターンが見いだされていることを示した (7)。先述のように好熱性古細菌分類のための表現形質が少ない状況で、こうした化学分類学的性状が有効な分類指標となる期待がもたれている。

むすび

以上述べてきたように古細菌の発見から

二十数年しか経っていないがその分類体系の構築は急ピッチで進められている。しかしその中で有効な化学分類学的性状が少なく 16S rRNA のデータが偏重されているところも多く、今後も分類学上検討すべき事項が多い。しかし微生物の研究が専門化される一方で分類学を専門とする研究者が減ってきていることは日本に限らず世界的な傾向である。その中で合理的な分類体系を構築して行くには世界的な協力関係が必要であろう。古細菌ではメタン生成古細菌、好塩性古細菌については分類学小委員会が設置され、最小基準の提案など一定の活動を行っているが、好熱性古細菌でもこの様な協力関係ができることが強く望まれる。またカルチャーコレクションやデータベースサービスの充実も分類学的研究を効率的に行っていく上で必要であろう。今後もこうした国際協力の中で日本人研究者が活躍していくことが望まれている。

過去の古細菌に関する演題

1. 第 10 回 (平成 2 年): 川崎浩子, 小柳津広志, 遠藤銀朗, 中村和憲, 鎌形洋一, 古賀洋介, 大神真美, 森永豪, 山里一英「16S rRNA 部分塩基配列に基づいたメタン生成細菌の系統的関係と同定」
2. 第 11 回 (平成 3 年): 古賀洋介, 赤川昌代, 大神真美「メタン生成細菌におけるエーテル型脂質構成残基成分の分布の分類学的意義」
3. 第 13 回 (平成 5 年): 古賀洋介「メタン生成細菌の同定-最近の動向」
4. 第 14 回 (平成 6 年): 森井宏幸, 赤川昌代, 大神真美, 古賀洋介「メタン生成細菌における極性脂質の簡易分析による化学分類学的特徴と 16S rRNA の塩基配列にもとづく分子系統群との関連」
5. 第 15 回 (平成 7 年): 増地矢恵子「*Pyrococcus shinkaii* のゲノム解析: Elongation factor 2 を中心として」
6. 第 16 回 (平成 8 年): 宮木太郎, 柴田哲, 小柳津広志「水田土壤中のメタン生成細菌の生存戦略」

- 7.第16回(平成8年):浜名康栄「好熱性真正細菌と好熱性古細菌のポリアミン構成」
- 8.第18回(平成9年):伊藤隆,鈴木健一郎, Priscilla C. Sanchez, 中瀬崇「フィリピンの一温泉から分離された新規桿菌状好熱性古細菌の分類学的研究」
- 9.第19回(平成10年):伊藤隆,鈴木健一郎, Priscilla C. Sanchez, 中瀬崇「日本およびフィリピンの温泉から分離した新規好熱性古細菌」
- 10.第19回(平成10年):Huawei Xin, Takashi Itoh, Ken-ichiro Suzuki, Peijin Zhou, Takashi Nakase「Characterization of new haloalkaliphilic archaeal strains isolated from soda lakes」

文献

- 11.Boone, D. R. and Whitman, W. B. Proposal of minimal standards for describing new taxa of methanogenic bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **38**, 212-219 (1988).
- 12.Boone, D. R., Whitman, W. B. and Rouvière, P. Diversity and taxonomy of Methanogens. *In* Methanogenesis. (J. G. Ferry ed.). Chapman & Hall, New York pp. 35-80. (1993)
- 13.Burggraf, S., Huber, H. and Stetter, K. O. Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 657-660 (1997).
- 14.Hori, H., Itoh, T. and Osawa, S. The phylogenic structure of the Metabacteria. *Zentrabl. Bakteriolog. Hyg., I. Abt. Orig.* **C3**, 18-30 (1982).
- 15.Iwabe, N., Kuma, K., Hasegawa, M., Osawa, S. and Miyata, T. Evolutionary relationship of archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes inferred from phylogenetic tree of duplicated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9355-9359 (1989).
- 16.Oren, A., Ventosa, A. and Grant, W. D. Proposed minimal standards for description of new taxa in the order *Halobacteriales*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 233-238 (1997).
- 17.Stetter, K. O. Diversity of extremely thermophilic archaeobacteria. *In* Thermophiles: general, molecular, and applied microbiology. (Brock, T. D. eds.). Wiley, New York pp. 38-74. (1986).
- 18.Woese, C. R. and G. Fox. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5088-5090 (1977).
- 19.Woese, C. R., Kandler, O. and Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579 (1990).

酵 母

中瀬 崇 鈴木基文 浜本牧子 高島昌子

はじめに

酵母の分類はこの 20 年間で大きく変化した。形態と炭素・窒素化合物の資化性や糖類の醗酵性などの手法は依然として用いられているが、種の性状の理解と実用的識別のためであり、分類学的に本質的な意義をもつものではなくなった。

1980 年代の後半まではユビキノン(補酵素 Q)系、菌体糖組成、酵素の電気泳動パターンの解析、DNA 塩基組成など、化学分類学的研究が酵母分類の主流をなしたが、1980 年代の後半からは rDNA など、遺伝子の塩基配列の決定とその系統学的解析が研究の主流となってきた。

米国の酵母研究者は 26S rDNA の D1/D2 領域の解析に力をそそいだが、わが国では欧州諸国の米国の影響下でない研究者と同じく、18S rDNA の解析が主流となり、さらに ITS 領域、ETS 領域の解析も行われた。他の遺伝子としてはトポイソメラーゼ II やチトクローム系の解析が行われている。

系統解析の結果は従来の分類体系の高次分類群の多くが系統学的関係を反映していないことを示し、目、科及び属として命名すべき多くの系統群があることが明らかになった。しかし、これらの系統群を区別する表現形質を見出すのは多くの場合困難であり、特に属を区別しうる指標を見出すのは至難である場合が多い。

酵母の種の区別は交配性と DNA 交雑

実験により行うのが原則である。交配性は生物種を区別する基本であり、ヘテロタリック酵母はこの方法で種を定義できるが、ホモタリック種とアナモルフ酵母には適用できない。幸いに、DNA 交雑実験は交配性と良い相関性があるので、この手法を用いて、酵母種はほぼ同一のレベルで定義することができる。

DNA 交雑実験は時間と労力の負担が大きいので、rDNA の異なる塩基数により種を区別する動きがある。これは有望な手法であり、迅速・正確な同定法としても期待されるが、当分は慎重に行うべきである。18S rDNA の全塩基配列がほとんど同一でも DNA 交雑実験では別種と判断されることがあるからである。DNA 交雑実験で確認された種についてのみ適用した方がよいと思われる。

1998 年に出版された *The yeasts, A taxonomic study* 第 4 版には系統解析の結果が取り入れられたが、伝統的分類と入り混じった過渡期の分類体系となっている。現在は系統解析にもとづく体系の修正が行われている段階であり、2005 年に出版が予定されている第 5 版では、酵母の分類は面目を一新すると期待される。

上述の酵母分類学の動きにはわが国の研究者の貢献が大きく、常に研究の先端を走ってきた。*The yeasts, A taxonomic study* 第 4 版にはわが国の研究者が初めて参画し、7 名が執筆者に名を連ねた。

すべて微生物分類研究会の常連として互いに研鑽してきた仲間であり、微生物分類研究会の酵母分類学への貢献は大きい。

(中瀬 崇)

子囊菌系酵母

この 20 年間 (1980-2000) に酵母分類学は化学分類学および分子系統学的手法の導入によってダイナミックに発展し、酵母の種分類および分類体系が大きく変貌してきた。そのなかで、微生物分類研究会 (旧化学分類研究会) が大きな役割を演じてきたのは言うまでもない。1998 年に出版された酵母分類学の標準書である *The yeasts, A taxonomic study* 第 4 版では、日本人が初めて分担執筆者の中に含まれているが、すべての人がこの微生物分類研究会に参加された方々であった (5)。ここでは子囊菌系酵母に関する発表を中心にしてこの 20 年を振り返ることにする。

種概念と DNA 相同性

種レベルの分類においては、酵母の種を区別する方法論に変革があった。すなわち、形態および生理学的性状の相違に基づく形態種や生理種を基本とする伝統的な方法から交配性に基づいた生物学的種概念を基本とする方法になった (5)。

種々のヘテロタリックの子囊菌酵母において交配性と DNA 相同性には良い相関性があることが明らかになり、生物学的種概念が適用できないホモタリックの子囊菌酵母や無性生殖のみの不完全酵母の場合には DNA 相同性に基づいて種を区別するようになった。DNA 塩基組成 (G + C mol %) も有為な差があれば種の区別に有効であることが明らかになった。

本研究会からの例として、二つ挙げられる。

- 1) *Debaryomyces* 属の基準種 *D. hansenii* とそのアナモルフ *Candida famata* は、DNA 相同性に基づいて *D. hansenii* var. *hansenii* (*C. famata* var. *famata*), *D. hansenii* var. *fabryi* (*C. famata* var. *flareri*), *D. nepalensis* および *Candida saitoana* に分割された (第 3 回, 中瀬) (8, 9)。
- 2) 金子および坂野は DNA 相同性および染色体核型によって *Saccharomyces bayanus* の種の再検討を行った (第 10 回, 金子・坂野)。 *S. cerevisiae* など 17 種もあつた *Saccharomyces sensu stricto* 酵母が *The yeasts, A taxonomic study* 第 3 版 (1984 年) で *S. cerevisiae* 1 種に統合された後、種々の研究者が DNA 相同性、染色体核型、遺伝学的研究などによって再検討していた時期であつた。現在では *Saccharomyces sensu stricto* として *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. paradoxus* の 4 種が認められている。最近、金子 (2) はこれらの種分化の仮説をたてた。それによれば、2 組の染色体相互転座のある *S. bayanus* は *S. cerevisiae* とは少し異なるゲノム再編成をしたと考えられ、そのため生殖的隔離が強くなり、ゲノム塩基配列の変化が加速したと考えられている。 *S. paradoxus* はおもに地理的隔離の影響で、そのゲノム塩基配列の変化を蓄積して *S. cerevisiae* と種分化したと考えられている。 *S. pastorianus* は *S. bayanus* と *S. cerevisiae* の両タイプ

の染色体を保持しており、両種が種分化した後、雑種形成した株がもととなり種分化したと考えられている。

種レベルでの分類で有効な別法の一つに酵素の電気泳動パターン法がある。この方法は山崎および駒形によって酵母全般に適用され、担子菌系酵母および子囊菌系酵母の分類指標として有用であることが示された (13, 14)。特に DNA 相同性と良い相関性があることやテレオモルフ-アナモルフ関係の検索に有効であることが明らかになった。また、DNA 相同性に基づいた種が近縁の種と表現形質によって識別できない場合にその識別法として酵素の電気泳動パターンが有効であることが示された (第 5 回, 鈴木)。

属レベルの分類

属レベルの分類においては、1988 年以降にリボソーム RNA (rRNA) の塩基配列に基づく分子系統学的解析法の導入によって大きく進展した。本研究会では山田の研究に負うところが大きであった。山田および共同研究者はユビキノンの差異に基づいて設立した属の妥当性について 18S および 26S rRNA の部分塩基配列に基づいた分子系統学的解析によって精力的に検討し、属を識別できる 18S rRNA の塩基相違数の経験的推測値を見い出した (第 10 回, 山田) (11, 12)。彼らは、現在までにその経験的推測値に基づいて、多くの新属を提唱した。子囊菌系酵母では *Ogataea*, *Nakazawaea*, *Kodamaea*, *Komagataea*, *Komagataella*, *Kuraishia*, 分裂酵母の *Hasegawaea* などである。これらの研究の一端を *Pichia* 属と *Hansenula* 属の統合、そして再分割に焦点を当てて

述べてみたい。1984 年に Kurtzman, C. P. (3) は硝酸塩を資化する *Hansenula* 属の種と硝酸塩を資化しない *Pichia* 属の種が DNA 相同性に基づいて同種関係になる例を実証し、もはや硝酸塩の資化性の有無によって両属を区別するのは適切でないことを示した。この結果、彼は山高帽形の子嚢胞子をつくる *Hansenula* 属の種を *Pichia* 属に移したが、土星形の子嚢胞子をつくる *Hansenula* 属の種は *Williopsis* 属に移すべきと示唆するにとどまった。1991 年に Kurtzman, C. P. (4) および Liu, Z. and Kurtzman, C. P. (7) は土星形の子嚢胞子をつくる *Hansenula* 属の種と土星形の子嚢胞子をつくる *Pichia* 属の種について DNA 相同性および 18S および 26S rRNA の部分塩基配列による系統関係を検討し、土星形の子嚢胞子をつくる種を *Williopsis* 属に移すとともに数種の *Pichia* に対して新属 *Saturnispora* を設立した。結果として、この時点で *Hansenula* 属がなくなり *Pichia* 属, *Williopsis* 属, *Saturnispora* 属の 3 属となった。しかしながら、後者 2 属の主要ユビキノンは Q-7 のみであるが、*Pichia* 属は主要ユビキノンは Q-7, Q-8 および Q-9 からなるのでまだ不均一な属のままであった。1989 年、すでに Billon-Grand, G. (1) が Q-9 をもち山高帽形の子嚢胞子をつくる *Pichia* 属の種を新属 *Yamadazyma* に移すことを提案していたが、分子系統学的関係が明確にされていなかったなのでこの属は認められていなかった。そこで、山田および共同研究者は 18S および 26S rRNA の部分塩基配列の解析によってこれらの属について再検討を行った (11)。その結果、Q-8 をもつ *P. capsulata*, *P. holstii*, *P. pastoris* はそれぞれ

系統学的に独立しているので、*P. capsulata* に対して新属 *Kuraishia* が、*P. holstii* に対して新属 *Nakazawaea* が、および *P. pastoris* に対して新属 *Komagataella* が設立された。Q-7 をもつ種でメタノール資化性を有する *P. minuta* を含むグループに対して新属 *Ogataea* が設立された。Q-7 をもつ *Williopsis* 属も系統学的に不均一であることが示され、*W. pratensis* に対して、新属 *Komagataea* が設立された。Q-9 をもつ *Yamadazyma* 属も系統学的に不均一であることが示され、*Y. ohmeri* に対して新属 *Kodamaea* が設立された。さらに Q-7 をもつ *Pichia* 属から数種の新属が設立されていることから今後も *Pichia* 属および関連する属の再分割が進む方向にある。同様に他の子囊菌系酵母の属も再分割されている (11)。解析方法も 18S rRNA の部分塩基配列から 18S rRNA 遺伝子 (rDNA) の全塩基配列へ、26S rRNA の部分塩基配列から 26S rRNA 遺伝子 (rDNA) の D1/D2 領域の塩基配列へと遺伝子 DNA レベルの塩基配列が決定されるようになり、その配列に基づいて系統解析が行われるようになった。1996 年 (第 16 回) に上田および見方は 18S rRNA 遺伝子全塩基配列に基づいて分節胞子を形成する子囊菌系の酵母様糸状菌 *Dipodascus* 属、*Galactomyces* 属およびそれらのアナモルフの *Geotrichum* 属の系統関係を検討した。これらは大きく 2 群に分けられ、*Galactomyces* 属は *Dipodascus* 属に再統合されるべきであることが明らかになった。

種および種内の多様性

多様性という言葉は現代のキーワードの一つとなっているが、この多様性に

関わる発表もあった。最近になりアジア地域の微生物種の多様性が重要視されてきているが、本研究会においても研究成果が発表されてきた。子囊菌系酵母では次の二つの発表があった。東南アジアにおける耐塩・耐糖性酵母の多様性を明らかにするためにタイ、インドネシアの自然界から耐塩・耐糖性酵母が分離され同定された (第 18 回、川崎ら)。そして、これらの中から子囊菌酵母の *Citeromyces* 属の新種が発見された (第 19 回、永塚ら)。

もう一つ、種内の多様性に関わる発表として「*Candida albicans* の染色体核型から見た多様性」があった。有性生殖を行わず通常 2 倍体の状態で生育している不完全酵母 *C. albicans* がどの様にして多様性を獲得して種を維持しているのかという問題がある。この種では株によって著しい染色体核型の多型性が見い出されているが、染色体再配列を引き起こす *Pld* 遺伝子と反復配列 *RPS1* が染色体核型の多様性の鍵となる因子であり、種内における遺伝的な多様性をひき起こす原因となっていることが示された (第 16 回、岩口および鈴木)。

おわりに

以上、これまで研究会で発表された研究を簡単に述べてみたが、すべて世界的なレベルの研究であったことに改めて感銘した次第である。この研究会の前の名称は化学分類研究会であったが、この 20 年間で化学分類が苦難はあったと思うが伝統的分類とうまく融合して定着してきたと思える。分子系統学的研究の結果から、ほとんどすべての子囊菌系酵母は、

Schizosaccharomyces および *Saitoella* を除いて、半子囊菌類(Hemiascomycetes)に位置付けられ、*Schizosaccharomyces* および *Saitoella* は古生子囊菌類("Archiascomycetes")に位置付けられることがわかってきた(5, 10)。また、今までの子囊菌系酵母の分類体系において属以上の分類基準として重要であった子嚢胞子の形が系統的に反映されていないことが明らかにされた。このことは従来の分類体系が著しく変わることを意味し、表現形質に依存した体系づくりを根

底から覆すことを据えて、新たなより自然な子囊菌系酵母の分類体系を築き上げていかなければならないであろう。1998年には Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. (6) は子囊菌系酵母のすべての種について 26S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列を決定し、ほとんどの種がこの配列に基づいて区別できることを示した。このことは遺伝子 DNA の塩基配列に基づく種概念をつくり始めたことを意味する。そして、属概念の探究もまた始まることになる。

文献

1. Billon-Grand, G. A new ascosporeous yeast genus: *Yamadazyma* gen. nov. Mycotaxon. **35**, 201-204 (1989).
2. Kaneko, Y. A genetic study on species taxonomy in *Saccharomyces* sensu stricto. Microbiol. Cult. Coll. **15**, 1-7 (1999). (in Japanese)
3. Kurtzman, C. P. Synonymy of the yeast genera *Hansenula* and *Pichia* demonstrated through comparisons of deoxyribonucleic acid relatedness. Antonie van Leeuwenhoek. **50**, 209-217 (1984).
4. Kurtzman, C. P. DNA relatedness among saturn-spored yeasts assigned to the genera *Williopsis* and *Pichia*. Antonie van Leeuwenhoek. **60**, 13-19 (1991).
5. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W. (eds.) The yeasts, A taxonomic study, 4th ed., Elsevier, Amsterdam (1998).
6. Kurtzman, C. P. and Robnett, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie van Leeuwenhoek. **73**, 331-371 (1998).
7. Liu, Z. and Kurtzman, C. P. Phylogenetic relationships among species of *Williopsis* and *Saturnospora* gen. nov. as determined from partial rRNA sequences. Antonie van Leeuwenhoek. **60**, 21-30, (1991).
8. Nakase, T. and Suzuki, M. Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-van Riji and related species. I. Chemotaxonomic investigations. J. Gen. Appl. Microbiol. **31**, 49-69 (1985).
9. Nakase, T. and Suzuki, M. Taxonomic studies on *Debaryomyces hansenii* (Zopf) Lodder et Kreger-van Riji and related species. II. Practical discrimination and nomenclature. J. Gen. Appl. Microbiol. **31**, 71-86 (1985).

10. Nishida, H. and Sugiyama, J. Archiascomycetes: detection of a major new lineage within the Ascomycota. *Mycoscience* **35**, 361-366 (1994).
11. Yamada, Y. The 18S and 26S rRNA partial base sequencings of yeasts and yeast-like fungi from the phylogenetic and taxonomic point of view. *Nippon Kingakukai Kaiho* **35**, 239-252 (1994). (in Japanese)
12. Yamada, Y. and Kawasaki, H. The molecular phylogeny of the Q8-equipped basidiomycetous yeast genera *Mrakia* Yamada et Komagata and *Cystofilobasidium* Oberwinkler et Bandoni based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **35**, 173-183 (1989).
13. Yamazaki, M. and Komagata, K. Taxonomic significance of electrophoretic comparison of enzymes in the genera *Rhodotorula* and *Rhodosporidium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**, 361-381 (1981).
14. Yamazaki, M. and Komagata, K. Asporogenous yeasts and their supposed ascosporeogenous states: an electrophoretic comparison of enzymes. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **28**, 119-138 (1982).

(鈴木基文)

担子菌系酵母

担子菌系酵母の分類学的研究に ribosomal DNA (または RNA) の塩基配列の解析が導入されたのは 1982 年の Walker, W. F. と Doolittle, W. F. (16) による *Rhodosporidium* 属など 8 菌種の 5S rRNA 塩基配列からそれらの進化について考察を加えた研究の報告が初めてかと思う。その頃日本においては、主に、化学分類学的手法を用いて、従来の分類手法では分類が不十分であると考えられていた担子菌系酵母の再分類に力が注がれていたように思う。微生物分類研究会の発足当時の名称が微生物化学分類研究会であったことから明らかなように第 1 回から第 7 回までの担子菌系酵母に関する発表は酵素の電気泳動パターン、菌体の糖組成など化学分類に関するものが中心であった。日本において精力的に研究が行われた化学分類学的手法を用いた

研究により、担子菌系酵母の分類群の再編成、新属の提案などが行われた。日本における担子菌系酵母の分類学的研究は 1922 年の斉藤賢道先生の赤色酵母の分類学的研究以来、多くの研究者により受け継がれてきた (8)。その中でも 1967 年の坂野勲先生の有性時代の発見 (1) は世界的に注目され、これにより担子菌系酵母という概念が確立された。そして、前述の 1980 年代の日本における化学分類学的手法を駆使した研究成果により“子嚢胞子形成酵母とは毛色の異なる酵母”の分類学的研究は、各国の酵母分類学者の興味を集めることになったように思う。

さて、分類研究会において、担子菌系酵母の分子系統学的な視点からの発表は 1989 年の第 9 回研究会に初めて登場した。18S または 26S rRNA の塩基配列の解析より化学分類学的手法を用いた研

究からは推測することが困難であった属またはそれ以上の高次レベルの分類学的な位置付けや類縁関係に考察が加えられた。以下に日本における担子菌系酵母の分子系統学的視点からの研究の中で、分類研究会での発表を中心に酵母の分類学に大きく貢献したと思われる研究のいくつかを挙げてみる。

高次レベルの分類

前述の坂野先生が発見された担子菌系の有性時代酵母 *Rhodosporidium toruloides* は、その有性時代の生活環が黒穂菌類のそれに類似していることから *Ustilaginales* 目に分類され(1), 長い間、一般に受け入れられていた。しかし、18S rDNA 塩基配列の解析より *Rhodosporidium toruloides* は黒穂菌 *Ustilago maydis* とは系統を異にすることが示され(13), それまでの酵母の分類体系を大きく覆すことになった。その後の研究により *Rhodosporidium toruloides* は担子菌類の *Urediniomycetes cluster* に含まれることが明らかにされている。次に、ヒマラヤの土壌試料から分離され、形態および生理学的特徴に基づいて担子菌系の無性時代酵母 *Rhodotorula glutinis* と同定されていた(3) 赤色酵母2株は、主に化学分類学的手法を用いた多角的な研究より特異な存在の酵母であることが示された。すなわち子囊菌系酵母、担子菌系酵母にそれぞれ固有の特徴とされていたいくつかの性質をあわせ持つことが明らかにされ(第3回・山崎, 第5回・浜本), (5, 6, 11, 19), 新属 *Saitoella* が提案された(第7回・後藤), (4)。しかし、その分類学的な位置付けについては、明確な答えが得られていなかった。その後

18S rDNA 塩基配列の解析より、この *Saitoella* 属を含むいくつかの菌類が新たな主要系統群を構成することが明らかにされ“古生子囊菌類”(“Archiascomycetes”)と命名、提唱された(10)。この系統群は、子囊菌類系統群の共通祖先から最初に分岐した系統群であると考えられ、この系統群に含まれる菌類は多様であることから、今後、酵母のみならず高等菌類の分類体系に大きく影響を及ぼす存在になると考えられている。

新属の提案

有性時代の特徴に基づいて *Rhodosporidium* 属に分類されていた2種に対し、18S および 26S rDNA の部分塩基配列に基づき、それぞれ新属新組み合わせ *Kondoa malvinella*, *Sakaguchia dacryoidea* が提案された(第10回・山田), (17, 18)。一方、射出胞子形成酵母 *Bullera* 属に分類されていた3種に対して、18S rDNA の部分塩基配列および射出胞子の形態的な特徴に基づき新属新組み合わせ *Udeniomyces megalosporus*, *Udeniomyces piricola*, *Udeniomyces puniceus* が提案された(9)。これら3新属の提案の妥当性および高次レベルの分類学的な位置付けは、その後 18S rDNA の全塩基配列の解析により明らかにされた(第13回・徐ら), (12, 13)。

表現形質の意義

射出胞子形成酵母は20年ほど前までは主要な分類群のひとつと考えられていたことから明らかなように、その射出胞子形成能は重要な分類指標のひとつと考えられていた。しかし、射出胞子形成酵母の高次レベルの分類学的な位置付けおよび射出胞子形成能の分類学的な意義

は、明確にされていなかった。18S rDNA 塩基配列の解析より射出胞子形成酵母の中で最も多くの種を含む *Sporobolomyces* 属酵母は多系統であり、系統樹上で非射出胞子形成酵母と混在していることが明らかにされた (7)。つまり、射出胞子形成能は系統を反映していないことが示された。一方、菌体中のキシロースの有無と菌糸隔壁孔の微細構造は 18S rDNA 塩基配列に基づく解析結果と相関関係が見られた (第 9, 12 回・徐), (14)。つまり、これらの表現形質は系統を反映していることが示された。以上のことは、長い間重要な分類指標として用いられてきた表現形質と、それとは無関係な分子系統学的視点からの情報とを酵母の分類体系の構築にどのように適用していくべきか、という問題を提起しているように思われる。

以上、日本における分子系統学的な視点からの担子菌系酵母の分類学的研究のいくつかを簡単にまとめてみたが、微生物化学分類研究会の名称が微生物分類研究会へと変更され、新たな第一歩を踏み出した 1995 年にアメリカでは担子菌類

全般にわたる 18S rRNA 遺伝子を用いた系統学的な解析が行われた (15)。その結果、担子菌類は単系統であり、その中には Hymenomycetes, Urediniomycetes, Ustilaginomycetes の 3 つの系統から成ることが示され、担子菌類の分類体系が大きく改変された。担子菌系酵母はこれら 3 つの綱のすべてに分布しており、他の菌類との類縁関係に興味を持たれる。また、最近、アメリカ、オランダ、ポルトガルの共同研究により担子菌系酵母 230 種 337 菌株の 26S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列が決定され、Hymenomycetes の中に新たに Trichosporonales 目 (order) が提案された (2)。すなわち、現在知られているほとんどすべての担子菌系酵母の 26S rDNA の D1/D2 領域の塩基配列情報から、目レベルの分類についての考察が行われたのである。今後は 18S rDNA など他の分子種との比較検討を行い、誰もが納得できる分類体系の構築が望まれるところであろう。それと同時に生物学的な種概念と分子系統学的視点からの種概念についての議論も待たれるところであろう。

文献

1. Banno, I. Studies on the sexuality of *Rhodotorula*. J. Gen. Appl. Microbiol. **13**, 167-196 (1967).
2. Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. and Statzell-Tallman, A. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**, 1351-1371 (2000).
3. Goto, S. and Sugiyama, J. Studies on Himalayan yeasts and molds. IV. Several asporogenous yeasts including two new taxa of *Cryptococcus*. Can. J. Bot. **48**, 2097-2101 (1970).
4. Goto, S., Sugiyama, J., Hamamoto, M. and Komagata, K. *Saitoella*, a new anamorph genus in the Cryptococcaceae to accommodate two Himalayan yeast isolates formerly identified as *Rhodotorula glutinis*. J. Gen. Appl. Microbiol. **33**, 75-85 (1987).

5. Hamamoto, M., Sugiyama, J., Goto, S. and Komagata, K. Numerical taxonomy based on the electrophoretic mobility of enzymes in the genera *Rhodosporidium*, *Cystofilobasidium*, and *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**, 89-99 (1986).
6. Hamamoto, M., Sugiyama, J. and Komagata, K. DNA-DNA reassociation studies of strains in the genera *Rhodosporidium* and *Rhodotorula*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**, 57-73 (1987).
7. Hamamoto, M. and Nakase, T. Phylogenetic analysis of the ballistoconidium-forming yeast genus *Sporobolomyces* based on 18S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 1373-1380 (2000).
8. 駒形和男 世界に先駆けるロドトルラ属酵母の研究 カビと酵母 - 生活の中の微生物 - 小崎道雄 椿啓介編集 p. 96-121, 八坂書房, 東京 (1998)
9. Nakase, T. and Takematsu, A. *Udeniomyces*, a new ballistosporous anamorphic yeast genus in the Cryptococcaceae proposed for three *Bullera* species which produce large bilaterally symmetrical ballistospores. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**, 497-502 (1992).
10. Nishida, H. and Sugiyama, J. Archiascomycetes: detection of a major new lineage within the Ascomycota. *Mycoscience* **35**, 361-366 (1994).
11. Sugiyama, J., Fukagawa, M., Chiu, S.-W and Komagata, K. Cellular carbohydrate composition, DNA base composition, ubiquinone systems, and diazonium blue B color test in the genera *Rhodosporidium*, *Leucosporidium*, *Rhodotorula* and related basidiomycetous yeasts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **31**, 519-550 (1985).
12. Suh, S.-O. and Nakase, T. Phylogenetic analysis of the ballistosporous anamorphic genera *Udeniomyces* and *Bullera*, and related basidiomycetous yeasts, based on 18S rDNA sequence. *Microbiology.* **141**, 901-906 (1995).
13. Suh, S.-O. and Sugiyama, J. Phylogeny among the basidiomycetous yeasts inferred from small subunit ribosomal DNA sequence. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 1595-1598 (1993)
14. Suh, S.-O. and Sugiyama, J. Phylogenetic placement of the basidiomycetous yeasts *Kondoa malvinella* and *Rhodosporidium dacryoidum*, and the anamorphic yeast *Sympodiomyces paphiopedili* by means of 18S rRNA gene sequence analysis. *Mycoscience.* **35**, 367-375 (1994).
15. Swann, E. C. and Taylor, J. W. Phylogenetic perspectives on basidiomycete systematics: evidence from the 18S rRNA gene. *Can. J. Bot.* **73** (Suppl. 1), S862-S868 (1995).
16. Walker, W. F. and Doolittle, W. F. Redividing the basidiomycetes on the basis of 5S rRNA sequences. *Nature.* **21**, 723-724 (1982).
17. Yamada, Y., Nakagawa, Y., and Banno, I. The phylogenetic relationship of the Q9-equipped species of the heterobasidiomycetous yeast genera *Rhodosporidium* and *Leucosporidium* based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal ribonucleic acids: the proposal of a new genus *Kondoa*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **35**, 377-385 (1989).
18. Yamada, Y., Maeda, K., and Mikata, K. The phylogenetic relationships of *Rhodosporidium*

dacryoidum Fell, Hunter et Tallman based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs; The proposal of *Sakaguchia* gen. nov., a heterobasidiomycetous yeast genus. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58**, 99-103 (1994).

19. Yamazaki, M. and Komagata, K. Taxonomic significance of electrophoretic comparison of enzymes in the genera *Rhodotorula* and *Rhodospiridium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31**, 361-381 (1981).

(浜本牧子)

Group I intron

Group I intron は、真核生物の核 DNA およびミトコンドリア、プラスミド、シアノバクテリア、バクテリオファージなどの遺伝子に存在し、菌類の 26S および 18S rDNA にも存在が報告されている。報告されているすべてについて調べられているわけではないが、それ自身、self-splicing 活性を持ち (3)、また、他の遺伝子の ORF をもつものも報告されており (第 18 回・小倉ら) (10 など)、その機能についてはまだ研究中の部分が多い。

Michel, F. and Westhof, E. (8) は、group I intron の一次構造、特に活性中心を構成する部分(core region)の配列の特徴からさらにいくつかのサブグループにわかれると述べ、Damberger, S. H. and Gutell, R. R. (4) は、18S rDNA の group I intron はおもにサブグループ IB1, IB3 および IC1 に属すると報告している。同一の遺伝子の中に複数の異なった group I intron の挿入が見られる場合もあるが、Gargas, A. ら (5) は、系統的に離れた生物種においても group I intron の挿入位置は保存されていると述べている。しかしながら、IB3 と IC1 では構造的に異なっている点も多く (8)、また、保存領域の塩基配列に基づく系統樹では、IB3 に属するものと IC1 に属するものは系統的に

異なっており、また flanking region の配列の解析からも、これらイントロンの挿入は進化の過程で別々におこった事象であると推定されている (1)。イントロンの挿入がどのようにしておこったのか、については Nishida, H. and Sugiyama, J. (9, 10) は、共生や寄生がこのイントロンの伝搬の過程に関与しているのではないかと推測しており、また、Yamada, T. ら (11) は group I intron をもつウイルスが媒介した可能性について報告している。

分類指標という観点に立って group I intron を見てみると、例えば、*Tilletiopsis flava* と近縁な種間でこれを含む種と含まない種、また複数あるイントロンのうちひとつだけが欠失した種が存在する (第 18 回・高島ら)。また、*Candida albicans* と *C. dubliniensis* は系統的に非常に近縁であるが、これらの種の 26S rDNA にはそれぞれ長さが異なりかつ互いに self-splicing 活性を保持した group I intron が挿入されていることが報告されている (2)。

McCullough, M. J. ら (7) は、PCR 産物の解析から、*C. albicans* の 26S rDNA の V3 領域には group I intron を含むもの、まったく含まないもの、またその両方混在する株が存在すると述べている。これらの結果を考えあわせると、group I

intron は分類の指標としてはもちいることはできないと思われる。しかしながら、group I intron は、水平移動によって特定の位置に挿入され、その後ホストと共に

進化したと考えられていることから (1, 6), イントロン自身の、またそのホストの進化を議論するときの指標となるのではないかと考えられる。

文献

1. Bhattacharya, D., Friedl, T. and Damberger, S. Nuclear-encoded rDNA group I introns: Origin and phylogenetic relationships in insertion site lineages in the green algae. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 978-989 (1996).
2. Boucher, H., Mercure, S., Montplaisir, S. and Lemay, G. A novel group I intron in *Candida dubliniensis* is homologous to a *Candida albicans* intron. *Gene*. **180**: 189-196 (1996).
3. Cech, T. R., Zaug, A. J. and Grabowski, P. J. *In vitro* splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell*. **27**, 487-496 (1981).
4. Damberger, S. H. and Gutell, R. R. A comparative database of group I intron structures. *Nucleic Acids Res.* **22**, 3508-3510 (1994).
5. Gargas, A., DePriest, P. T. and Taylor, J. W. Positions of multiple insertions in SSU rDNA in lichen-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 208-218 (1995).
6. Hibbett, D. S. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi. *Mol. Biol. Evol.* **13**, 903-917 (1996).
7. McCullough, M. J., Clemons, K. V. and Stevens, D. A. Molecular and phenotypic characterization of genotypic *Candida albicans* subgroups and comparison with *Candida dubliniensis* and *Candida stellatoidea*. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 417-421 (1999).
8. Michel, F. and Westhof, E. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J. Mol. Biol.* **216**, 585-610 (1990).
9. Nishida, H. and Sugiyama, J. A common group I intron between a plant parasitic fungus and its host. *Mol. Biol. Evol.* **12**, 883-886 (1995).
10. Nishida, H., Tajiri, Y. and Sugiyama, J. Multiple origins of fungal group I introns located in the same position of nuclear SSU rRNA gene. *J. Mol. Evol.* **46**, 442-448 (1998).
11. Yamada, T., Tamura, K., Aimi, T. and Songsri, P. Self-splicing group I introns in eukaryotic viruses. *Nucleic Acids Res.* **22**, 2532-2537 (1994).

(高島昌子)

カビ

杉山純多 三川 隆 西田洋巳 小川裕由

本研究会創設期の菌類関係の発表 とその後

— 「はじめに」に代えて—

本研究会におけるカビ関係の最初の話題提供としては、Moss, C. W. 博士が特別講演を行った 1981 年の第 2 回研究会（勝沼町ぶどうの丘センター）のときである。このときの発表はすべて英語で行われた。お酒も入り皆リラックスした懇親会の座興として、筆者が "Microbial hunting in Oceania and South America" のタイトルで、三菱化成工業（株）総合研究所在職中に出張したオーストラリア（タスマニアを含む）、ニュージーランド、フィジー、南サモア、南米大陸のブラジル（マナウス、レシフェ、リオデジャネイロ）やペルーアマゾン（イキトス）などで採集した微小菌類（おもに sooty moulds）の多型性（pleomorphy）や *Cyrtaria* などについて、スライドを使って英語で話したのを記憶している。Darwin, C. W. 著「ビーグル号航海記」に収載されている航跡（地図）を話の下敷きにした。演

題は、駒形先生のヒントから de Kruif, P. の名著「微生物の狩人」（原題：Microbe Hunters, 1926）をなぞって上述のようにつけた。

1983 年開催の第 3 回（河口湖富士桜荘）は、Kocur, M. 博士を迎えて一般講演 9 題が英語で発表された。その中の一つが東京農工大学の倉石教授による子囊菌類のユビキノ系（ユビキノ系）の分類学的意義についての発表であった。これが実質的な本研究会におけるカビの化学分類の発表である。本記念誌「分類研究会 20 年の歩み」（駒形先生執筆）の中に記述されているように同年 8 月 28 日から 1 週間、第 9 回国際菌学会議（IMC-3）が新宿の京王プラザホテルで開催された。この会議のシンポジウムのテーマの一つとして「酵母とカビ・キノコの化学分類」が取り上げられた。これは本研究会の倉石、駒形両教授により企画されたもので、プログラムの演題（下記）からだけでもこの時代の日本や世界の菌類化学分類学の状況を読みとることができる。

Chemotaxonomy of yeasts and other fungi

Coveners: Kuraishi, H. and Komagata, K.

(a) Morning session

Chairmen: Phaff, H. J. and Komagata, K.

Kuraishi, H.: Opening address

- 1) Phaff, H. J.: Molecular taxonomy of yeasts: DNA/DNA homology and allozyme analysis
- 2) Yamada, Y.: Coenzyme Q system in yeasts and yeast-like fungi
- 3) Kuraishi, H., Sugiyama, J., and Yokoyama, T.: Coenzyme Q system in filamentous fungi
- 4) Kurtzman, C. P.: Definition of fungus taxa through comparison of DNA base sequence complementarity

5) Yamazaki, M. and Komagata, K.: Taxonomic significance of electrophoretic comparison of enzymes in the yeasts

(b) Afternoon session

Chairmen: Weijman, A. C. M. and Kuraishi, H.

6) Hiroi, M.: Fatty acid composition of basidiocarps

7) Montrocher, R. and Claisse, M. L.: Biochemical correlations among *Candida* and related yeasts

8) Weijman, A. C. M. and Windig, W.: Carbohydrate composition of yeast-like and filamentous fungi

9) Vishniac, H. S. and Baharaeen, S.: Ribosomal RNA homology in the taxonomy and phylogeny of basidiomycetous yeasts

Komagata, K.: Closing address

ユビキノンのカビの分類への適用は細菌や酵母の研究結果（本記念誌、山田雄三先生執筆の「ユビキノンのメナキノン」参照）を基礎にして発展したものであるが、上述の倉石教授の講演内容は1985年最初の原著論文（5）として結実し、現在では *Aspergillus* 属（4）や *Penicillium* 属（3）では切れ味鋭い分類形質として高く評価されている（7-9）。本研究会における発表が斯界に与えたインパクトの一つであろう。

カビにおける日本の菌類の化学分類学研究はこのユビキノンの研究成果を礎として、酵素電気泳動パターンに基づく *Aspergillus* 属分類群の類縁に関する研究（本研究誌「酵素電気泳動パターンの解析（カビ）」参照）、さらに分子情報（主に rRNA 遺伝子塩基配列データ）に基づく系統推定へと発展し、後者は1990年代初頭誕生した菌類分子系統分類学（2）の柱の一つになっている。

カビは形態的（とくに繁殖体）にも生態的にも、また生活環の点でも実に多様性に富んでいる。表現形質の解析からのみでは

解決できない分類学的問題が山積している。遺伝形質（とくに rRNA 遺伝子）、表現形質（とくに超微形態）の統合的手法（integrated approach）が菌類の類縁、アナモルフとテレオモルフの統合、系統推定などに有用である。因みに、1994年8月カナダ、バンクーバーで開催された第5回国際菌学会議（IMC-5）の "Systematics" 分野において、Congress Symposium "Phenotype and Genotype: Integrating Morphological and Molecular Characters (Organizers: Sugiyama, J. and Blackwell, M.)" が組まれた。Mixia の研究（6）は筆者によって本シンポジウムで発表され、タイトルに答えた研究成果として斯界の注目を引いた。この統合的手法は菌類の分類学的位置や系統関係の定説をみごとに覆してきた（たとえば、1, 10, 11）。菌類分子系統分類学分野の日本人による研究成果の一端は後述の三川、西田、小川の三博士執筆の回顧に含まれている。

（杉山純多）

文献

1. Berbee, M. L. and Taylor, J. W. Fungal phylogeny. *In* Oliver, R. P. and Schweizer, M (eds.), *Molecular fungal biology*, p. 21-77, Cambridge University Press, Cambridge (1999).
2. Bruns, T. D., White, T. J. and Taylor, J. W. Fungal molecular systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **22**, 525-564 (1991).
3. Kuraishi, H., Aoki, M., Itoh, M., Katayama, Y., Sugiyama, J. and Pitt, J. I. Distribution of ubiquinones in *Penicillium*, and related teleomorphs. *Mycol. Res.* **96**, 701-711 (1991).
4. Kuraishi, H., Ito, H., Tsuzaki, N., Katayama, Y., Yokoyama, T. and Sugiyama, J. The ubiquinone system as a taxonomic aid in *Aspergillus* and its teleomorphs. *In* Samson, R. A. and Pitt, J. I. (eds.), *Modern concepts in Penicillium and Aspergillus classification*, p. 407-421, Plenum Press, New York (1990).
5. Kuraishi, H., Katayama-Fujimura, Y., Yokoyama, T. and Sugiyama, J. Ubiquinone system in fungi 1. Distribution of ubiquinones in the major families of ascomycetes, basidiomycetes, and deuteromycetes, and their taxonomic implications. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **26**, 383-395 (1985).
6. Nishida, H., Ando, K., Ando, Y., Hirata, A. and Sugiyama, J. *Mixia osmundae*: transfer from the Ascomycota to the Basidiomycota based on evidence from molecules and morphology. *Can. J. Bot.* **73** (Suppl. 1), S660-S666 (1995).
7. Paterson, R. R. M. Chemotaxonomy of fungi by unsaponifiable lipids. *In* Frisvad, J. C., Bridge, P. D. and Arora, D. K. (eds.), *Chemical fungal taxonomy*, p.183-217, Marcel Dekker, New York (1998).
8. Samson, R. A. Current taxonomic schemes of the genus *Aspergillus* and its teleomorphs. *In* Bennett, J. W. and Klich, M. A. (eds.), *Aspergillus: Biology and industrial applications*, p. 355-390, Butterworth-Heinemann, Boston (1992).
9. Samson, R. A. Current systematics of the genus *Aspergillus*. *In* Powell, K. A. et al. (eds.), *The genus Aspergillus*, p. 261-276, Plenum Press, New York (1994).
10. Sugiyama, J. Relatedness, phylogeny, and evolution of the fungi. *Mycoscience* **39**, 487-511 (1998).
11. Sugiyama, J., Nagahama, T. and Nishida, H. Fungal diversity with emphasis on 18S ribosomal DNA sequence divergence. *In* Colwell, R. R., Simidu, U. and Ohwada, K. (eds.), *Microbial diversity in time and space*, p. 41-51, Plenum Press, New York (1996).

下等菌類

現在、一般に菌類の系統解析に用いられている分子種はリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子である。リボソーム RNA はすべての生物の生命活動に不可欠な蛋白合成に関わっており、これをコードする遺伝子であるリボソーム DNA (rDNA) はほとんどの生物でゲノム内に複数コピー存在し、真核生物では数百から数千コピー存在することが知られている(1, 4)。rDNA は真核生物では一般に 18S, 5.8S, 28S が連続して存在し反復配列を繰り返している。この場合、18S と 5.8S の間、5.8S と 28S の間に介在配列 (ITS-1, ITS-2) が存在する。分子系統的な研究は相同と考えられる遺伝子またはその介在配列の比較が一般的であるが、例えば、18S rDNA は科や目あるいは綱以上の高次分類群の系統関係の解明に有効である。28S rDNA は属や種レベルの系統解析に使われている。18S や 28S に比べて可変領域に富んだ介在遺伝子 (ITS-1, ITS-2) は近縁種あるいは種内系統群を識別する指標として用いられている。

分子生物学の技術開発とあいまって発足した微生物分類研究会はその時代、時代の新しい技術を取り入れた研究会として我が国の微生物分類学の最前線を歩んできた研究会と位置付けることが出来る。私は 1993 年の第 13 回大会より参加させていただき、私の研究の中から下等菌類に関する系統解析結果を報告する機会を得たことは、社内における微生物研究を推進する上での大きな原動力となった。ここでは、分子系統を推定する上で優れた指標として使われている 18S rDNA あるいは 28S rDNA 遺伝子の比較解析によって明らかにされた下等菌類相互の系統関係について、いくつかのトピ

ックスを紹介したい。

18S 及び 28S rDNA に基づく不等毛べん毛菌類の分子系統 (図 1)

生殖細胞に 1 本あるいは 2 本のべん毛を持つミズカビ類は、伝統的にべん毛菌亜門として一括して扱われてきた。しかし、細胞壁の生化学的情報やべん毛の微細構造などの情報が蓄積されるにつれてべん毛菌亜門という枠組みは系統的に異質なものの寄せ集めであることが指摘されるようになった。特に 1970 年代に始まった電子顕微鏡を用いた微細構造の比較研究から、べん毛形態とべん毛基部装置などの基本構造が明らかになりミズカビの大部分は光合成藻類である黄色植物などと系統的なつながりを持つことが示唆されるようになった。1990 年代に入り DNA の塩基配列と云った分子情報がミズカビでも蓄積され、べん毛菌類全体の系統関係が少しずつ明らかになってきた。このような状況下、今日では 2 本の不等毛べん毛を持つ卵菌類や Thraustochytriales 及び 1 本の羽型べん毛を前方に持つ Hyphochytridiales は菌類から除外されクロミスタ界に収容されるようになった。

三川ら及び本多らは卵菌類, Thraustochytriales, Hyphochytridiales に属す代表的な不等毛べん毛菌類について、18S rDNA の全塩基配列あるいは 28S rDNA の部分塩基配列を決定し分類群相互の系統関係を解明し、これらの生物群の系統学上の位置を明らかにすることを試みた (5, 6, 9)。

18S rDNA 及び 28S rDNA のシークエンス結果から、不等毛べん毛菌類は 3 つの系統群に大別された。各々 1)

Labyrinthulomycota, 2) Hyphochytriomycota, 3) Oomycota に対応した。

1) ラビリントラ門(Labyrinthulomycota)

この群は膜系と細胞質から成る ectoplasmic network と呼ばれる網状構造を持つグループで、1つのまとまりを示すが、変形体様の集合体を持ったり、遊走子を形成することから相互の類縁関係は不明確のままにしておかざるを得なかった。1999年、本多らは6属14種について18S rDNAの全塩基配列を決定し *Labyrinthula* 類と *Thraustochytrium* 類が単系統であることを示した(5, 6)。さらに、単系統群の中は大きく2つのグループ (labyrinthulid phylogenetic group と *Thraustochytrium* phylogenetic group) に大別されることを提示した。

2) サカゲツボカビ門

(Hyphochytriomycota)

前方に1本の羽型べん毛を持つ生物群で、

18S 及び 28S rDNA の解析結果から、独立した系統枝を形成した。18S 及び 28S rDNA に基づく系統樹は高い信頼度で Oomycota の近傍に位置し、卵菌類と単系統群を構成する事が示唆された。

3) 卵菌門 (Oomycota)

生殖細胞は1本の羽型べん毛と1本の尾型を持つ生物群で、18S 及び 28SrDNA の解析結果から、2つのサブクラスターに分かれた。1つは Dick, M. W. によって提案された *Saprolegniomycetidae* (*Saprolegnia* 亜綱) に対応し、もう1つは *Peronosporomycetidae* (*Peronospora* 亜綱) に対応した(3)。18S 及び 28S rDNA の解析結果から、(1) 二回の遊泳型の遊走子を持つ分類群は *Saprolegnia* 亜綱に含まれ、(2) 一回の遊泳型のもものは *Peronospora* 亜綱に含まれることが示唆された。

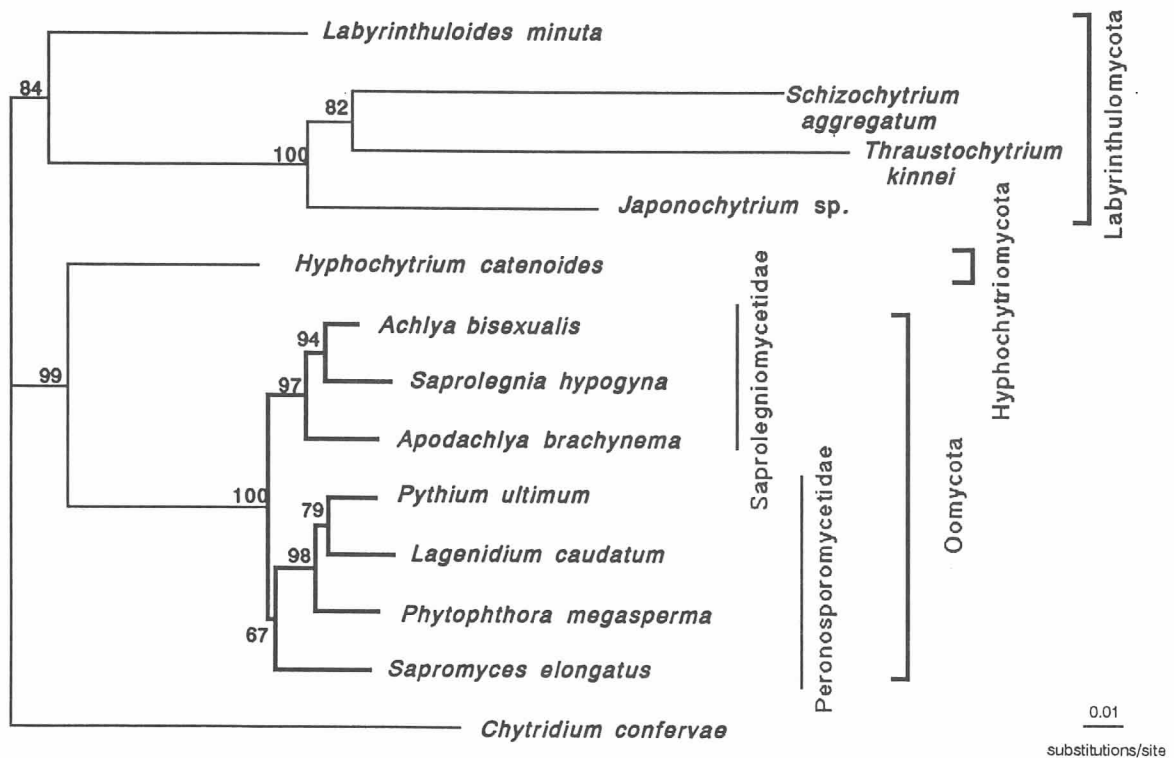


図1. 18S rDNAシーケンスに基づく不等毛べん毛菌類の分子系統樹 (NJ法)

18S rDNA に基づくツボカビ類の分子系統

ツボカビ類は後端に一本のムチ型鞭毛のある遊走子を共有した Chytridiales, Spizellomycetales, Monoblephalidales 及び Blastocladiiales に大別される。ツボカビ類の系統関係については、体制の分化、球状体 (lipoid body)、細胞内微細構造や鞭毛装置構造等を基盤に多くの研究者によって解析されている。最近では、ツボカビ類を含めた鞭毛菌類の系統解析に分子系統的アプローチがなされているが、高等菌類に比べ、解析例はまだ少ない。三川らはツボカビ類の代表的な分類群について、18S rDNA の部分塩基配列 (約 900bp) を決定し相互の類縁関係を考察した(8)。

Blastocladia , *Allomyces* ,
Phlyctochytrium , *Entophlyctis* ,
Rhizophydium , *Rhizophlyctis* 及び
Chytridium の 7 属 15 種について解析した結果、ツボカビ類は 2 つの独立した系統群に大別された。第 1 群は Blastocladiiales で構成され、第 2 群は Chytridiales で構成された。18S rDNA に基づく解析結果は体制構造、細胞内微細構造や鞭毛装置等の表現形質によるグルーピングをよく反映していることが判った(2)。

18S rDNA に基づく接合菌類の分子系統 (図 2)

接合菌類 (Zygomycetes) の無性生殖は孢子嚢内に形成される孢子嚢胞子あるいは分生子による。有性生殖は配偶子嚢の接合により形成される接合胞子による。接合菌類は無性生殖器官の形成様式によって孢子嚢形成群と分節孢子嚢形成群に大別されてい

る。孢子嚢形成群には多数の胞子を含んだ孢子嚢や脱落性の孢子嚢あるいは 1 孢子性の孢子嚢を持つグループがある。分節孢子嚢形成群では、円筒状の孢子嚢が形成され、この中に 1 個あるいは少数の胞子が縦方向に 1 列に並んで形成される。分生子柄先端に 1 個の射出性分生子を形成するグループもある。接合胞子の形成様式は多様性に富み、直線的に発達した接合枝が先端で接合して H 字型の接合胞子を作るもの、ラセン状に絡み合った接合枝が合体してクギヌキ型接合胞子を形成するもの、接合部位で出芽して接合胞子をつくるもの、あるいは接合枝や配偶子嚢の分化が明瞭でなく体細胞様の接合をするものがある。これらの無性・有性生殖器官の特徴は接合菌類の目や科の高次分類群の分類形質として使われており、接合菌類は Mucorales, Endogonales, Dimargaritales, Zoopagales, Kickxellales, Entomophthorales の 6 目に分類されている。

接合菌類の系統関係については、無性・有性生殖器官の比較形態学視点から多くの論議がなされているが、定説のないところである。三川らは接合菌類の 21 属 50 種以上からなる基準株あるいは分離株の 18S rDNA 遺伝子の部分塩基配列 (約 900bp) を決定し、比較解析して各分類群相互の類縁関係を明らかにすることを試みた (7)。

18S rDNA で見ると接合菌類は 6 つの系統群に大別される。第 1 のグループは Mucorales の Mucoraceae, Pilobolaceae, Sakseneaceae, Thamniaceae, Choanephoraceae, Cunninghamellaceae 及び *Mortierella* 属の *Micromucor* 亜属から構成され、無性生殖は球形の孢子嚢内 (多孢子性孢子嚢, 小孢子嚢, 1 孢子性孢子嚢) に形成

される胞子嚢胞子による。有性生殖は *Micromucor* 亜属を除いて、H 字型あるいはクギヌキ型に形成される接合胞子によって行われる系統群である。 *Micromucor* 亜属では有性生殖は確認されていない。第2のグループは Entomophthorales の Basidiobolaceae や Conidiobolaceae から構成され、無性生殖は射出性の分生子による。有性生殖は、接合枝や配偶子の分化が明瞭でなく体細胞様の接合をする。第3のグループは Kickxellales で構成され、1 胞子性の分節胞子嚢を持ち、体細胞様の接合をするグループである。第4のグループは円筒形の分節胞子嚢を持った Mucorales の Syncephalastraceae で構成される。有性生殖

は第1グループに見られる H 字型接合様式である。第5のグループは VA 菌根菌として知られている Glomales で構成された。有性生殖は知られていない。第6のグループは Endogonales 及び Mortierellaceae (*Mortierella* 属の *Mortierella* 亜属) を含み無性生殖器官は厚壁(厚膜)胞子あるいは胞子嚢と多様性に富む。有性生殖は *Mortierella* 亜属では配偶子嚢が合体後、一方の細胞内容物が片方の細胞に吸収されたり、あるいは接合部位で出芽状に接合胞子作る種もある。接合菌類の 18S rDNA に基づく系統樹は無性生殖器官の多様性や有性生殖の生殖様式と関連していると云える。

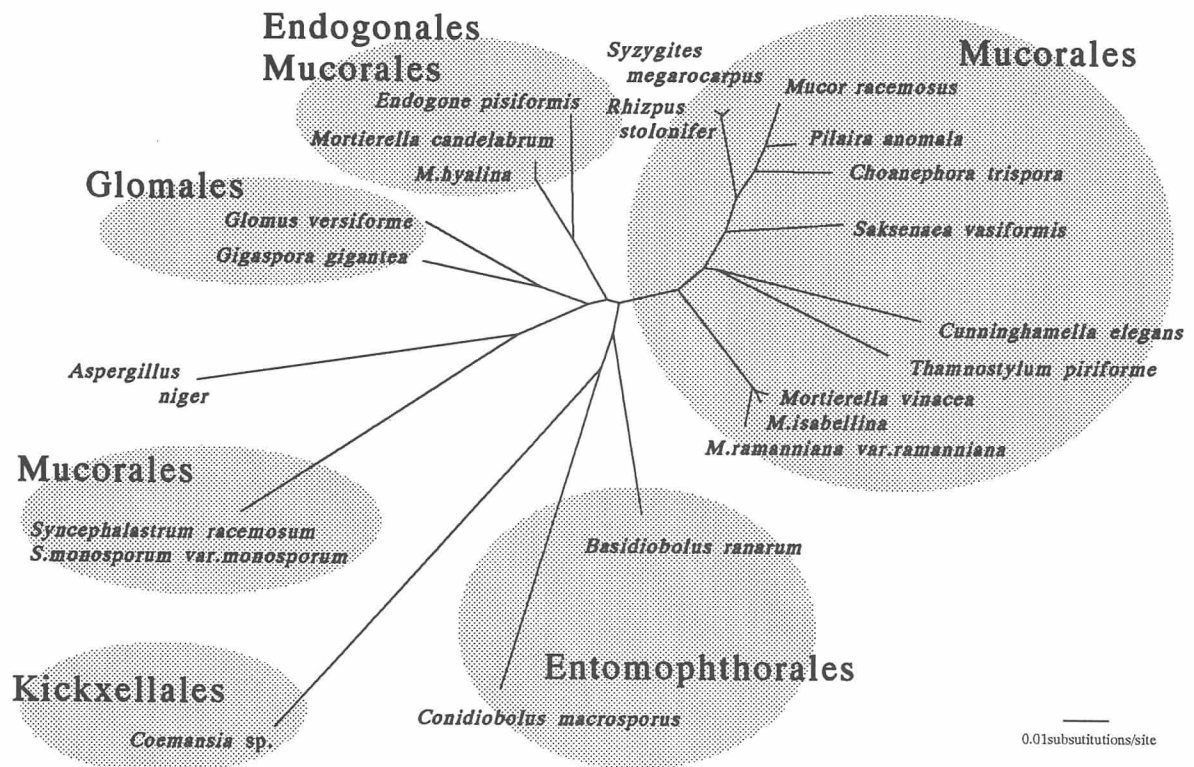


図2. 18S rDNA塩基配列に基づく接合菌類の分子系統樹 (NJ法)

寄生性接合菌類の分子系統

接合菌類の中には他のケカビ目菌類やアメーバ,線虫などに寄生する絶対寄生菌類(Zoopagales や Dimargaritales)がある。これらの菌群は純粋培養が出来ないことから通常の方法では DNA を取得することは困難であった。田辺らは宿主と二員培養した後,寄生菌類だけを選択的に単離し微量の菌体から DNA を抽出する技術を確立することにより DNA の塩基配列を決定した(12, 13)。得られた塩基配列と既存データを合わせて下等菌類全体の系統樹を作成し Zoopagales と Dimargaritales の分子系統上の位置関係を明らかにした。

ツボカビ類と接合菌類の系統関係 (図3)

ツボカビ類は運動性の遊走子を備え,菌体分化の単純なものが多く菌類全体の中で最も原始的な菌類と考えられていた。このツ

ボカビ類は多核管状体の菌糸を形成し,多くのものは配偶子嚢接合という有性生殖をすることから接合菌類との近縁性が指摘されてきた。長濱らは接合菌類の Entomophthorales に着目し,18S rDNA の塩基配列を解析して分子系統学的位置を明らかにした(10, 11)。彼らは Entomophthorales が大きく 2 つの系統に別れることを提示した。Basidiobolus は栄養菌糸の未分化のツボカビ類の一群に近縁であり,他の Conidiobolus, Entomophthora, Zoophthora は接合菌類の Mucorales や体制の分化したツボカビ類の一群である Blastocladiales と近縁であることを示した。すなわち,長濱らはツボカビ類と接合菌類はそれぞれ単系統を形成せず,水生のツボカビ類が多様化する中で鞭毛の消失あるいは獲得が複数の系統で起こり,陸上に適応した系統が接合菌類へと進化していったという新しい系統仮説を提唱している。

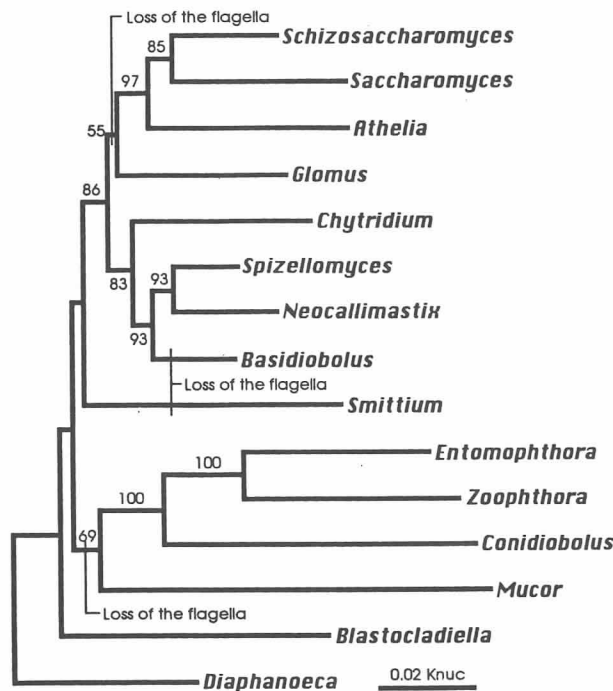


図3. ツボカビ類と接合菌類の系統関係 (Nagahama, T. et al., Mycologia 87: 206より引用)

おわりに

微生物分類研究会のこの 20 年の歩みの中で、ツボカビ類や接合菌類の rDNA 遺伝子群の塩基配列データが蓄積されるにつれ、それらは両者共に多系統な生物群であることが浮き彫りにされてきた。rDNA 遺伝子群は菌類の系統を探る上で最も適当な分子種であると考えられているが、多重遺伝

子であり不均等な交叉の可能性も指摘されており、今後、他の遺伝子による解析と検証が必要であると思われる。多系統であることの背後には何らかの不連続性や規則性が在るものと推察される。それらを追求することにより、下等菌類のたどった自然な構図を描くことが出来るのではないだろうか。

文献

1. Appels, R. and Honeycutt, R. L. DNA Systematics. p. 81-135, CRC Press, Boca Raton, Florida (1986).
2. Barr, D. J. S. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. Can J. Bot. **58**, 2380-2394 (1980) .
3. Dick, M. W. Phylum Oomycota. In Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., and Chapman, D. J. (eds.), Handbook of Protoctista, p. 661-685, Jones & Bartlett Pub. Boston (1989) .
4. Gerbi, S. A. Molecular evolutionary genetics, p.419-517, Plenum Press, New York (1985) .
5. 本多大輔 横地俊弘 中原東郎 Seshagiri, R. 中桐昭 Karsten, S. 東原孝規 ラビリンチュラ類とスラウストキトリウム類の 18S rRNA 遺伝子による分子系統解析 第 19 回微生物分類研究会 講演要旨集 p. 35-36 (1999).
6. Honda, D., Yokochi, T., Nakahara, T., Raghukumar, S., Nakagiri, A., Schaumann, K. and Higashihara, T. Molecular phylogeny of labyrinthulids and thraustochytrids based on the sequencing of 18S Ribosomal RNA gene. J. Eukaryot. Microbiol. **46**, 637-647 (1999).
7. 三川隆 大原亜紀子 中島伸介 四本能尚 接合菌類の分類と系統：無性・有性生殖器官の多様性と 18S rRNA シークエンス解析を中心に 微生物化学分類研究会 第 14 回研究集会 p. 19-21 (1994).
8. 三川隆 大原亜紀子 四本能尚 下等菌類の系統（その 1）18S rRNA から分子系統を探る 第 16 回微生物分類研究会 講演要旨集 p. 18-21 (1996) .
9. 三川隆 Daniel Lim 大原亜紀子 SSU 及び LSU rDNA に基づく不等毛べん毛菌の分子系統 微生物分類研究会 第 17 回研究集会 p. 28-31 (1997).
10. 長濱統彦 杉山純多 接合菌類 *Basidiobolus* 属菌種の分子系統 微生物分類研究会 第 15 回研究集会 p. 22-24 (1995).
11. Nagahama, T., Sato, H., Shimazu, M. and Sugiyama, J. Phylogenetic divergence of the entomophthoralean fungi: Evidence from nuclear 18S ribosomal RNA gene sequences. Mycologia **87**, 203-209 (1995) .
12. 田辺雅彦 O'Donnell, K. 犀川政稔 杉山純多 接合菌類トリモチカビ目の系統解析

微生物分類研究会 第18回研究集会 p.75 (1998).

13. Tanabe, Y., O'Donnell, K., Saikawa, M. and Sugiyama, J. Molecular phylogeny of parasitic Zygomycota (Dimargaritales, Zoopagales) based on nuclear small subunit ribosomal DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **16**, 253-269 (2000)

(三川 隆)

古生子囊菌類

古生子囊菌類は子囊菌類系統の共通祖先より最初に分岐した系統群である (6). この構成菌類の中で最も微生物分類研究会と縁の深いものは、アナモルフ酵母 *Saitoella complicata* である. 本菌は形態的および生理・生化学的特徴より, 1970年, ヒマラヤ土壌由来の酵母 *Rhodotorula glutinis* と同定・発表された (2). しかし, 化学分類学に基づいた比較解析および細胞壁・出芽様式の電子顕微鏡観察の結果, 1987年 *Saitoella complicata* が新たに設けられた (3). すなわち, 本菌は子囊菌酵母型の細胞壁を持つにもかかわらず, 担子菌酵母型の出芽様式であった. さらに, DBB 呈色試験陰性, 菌体外 DNase 試験陰性と子囊菌酵母の性質を有するにもかかわらず, ウレアーゼ試験陽性, 主要ユビキノン系 Q-10 と担子菌酵母の性質をあわせ持っていた. このような性質をもった酵母は他に報告がない. このように子囊菌類と担子菌類の性質をあわせ持つ本菌は, 18S rDNA の塩基配列比較に基づく分子系統解析によると, *Taphrina* に近縁であった (5). *Saitoella complicata* に関する一連の研究において, その初期 (1970年代) より東京大学応用微生物研究所第3研究部がかかわり, その分類学的研究は第3研究部の大学院学生 (当時) の研究テーマに含められ, 研究の成果は随時, 微生物分類研究会において発表・報告されてきた (例えば第7回後藤). 現在においても,

Saitoella complicata は菌類科学において極めて重要な研究対象である. 興味深いことには, 本菌が再度自然界より分離されたという報告がない. よって, 世界で研究されている *Saitoella complicata* はすべて IAM カルチャーコレクション由来のものである. 本株 (IAM 12963, IAM 12964) が IAM カルチャーコレクションより世界に広く分譲されていることを誇りに感じるとともに, 地球にどれほど本菌が分布しているのか研究してみたい. また, そのゲノム情報に関しても興味がある. *Saitoella complicata* の系統分類学はまだ終わっていない. なお, *Saitoella* をめぐる研究の歴史 (1993年頃まで) は, Sugiyama ら (7) の論文に記述されている.

次に古生子囊菌類の中で微生物分類研究会において発表が行われた菌類として *Protomyces* を挙げる. 近年, 18S rDNA 内に存在しているイントロン解析が行われているが, *Protomyces* はその領域に異なる2つのイントロンを有する初めての報告となった菌類である (4). 微生物分類研究会においては, タンポポ浮腫病菌 *Protomyces pachydermus* のグループ I イントロン内の挿入領域にコードされていた ORF の機能解析の報告があり, *in vitro*, *in vivo* においても配列特異的なエンドヌクレアーゼの活性は認められないというものであった (第18回小倉・西田・杉山). その後, 本研究室においてイントロンの水平移動に関する研

究が展開している。

紙面の都合上触れることができなかったが、古生子囊菌類の中にはほかにもユニークな菌類が存在している。例えば、分裂酵母 *Schizosaccharomyces*、カリニ肺炎菌 *Pneumocystis*、サクラやモモの天狗巣病菌

として知られる *Taphrina* などが挙げられる。古生子囊菌類に対しては、菌類学の教科書として世界で広く使われている *Introductory Mycology* 第4版において一章を設けられるなど高い関心が寄せられている(1)。

文献

1. Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. Chapter 9. Phylum Ascomycota Archiascomycetes. In *Introductory Mycology*, 4th ed., p. 258-271, John Wiley and Sons, New York (1996).
2. Goto, S., and Sugiyama J. Studies on Himalayan yeasts and molds. IV. Several asporogenous yeasts including two new taxa of *Cryptococcus*. *Can. J. Bot.* **48**, 2097-2101 (1970).
3. Goto, S., Sugiyama, J., Hamamoto, M. Komagata, K. *Saitoella*, a new anamorph genus in the Cryptococcaceae to accommodate two Himalayan yeast isolates formerly identified as *Rhodotorula glutinis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**, 75-85. (1987).
4. Nishida, H., Blanz, P., A. and Sugiyama, J. The higher fungus *Protomyces inouyei* has group I introns in the 18S rRNA gene. *J. Mol. Evol.* **37**, 25-28 (1993).
5. Nishida, H. and Sugiyama, J. Phylogenetic relationships among *Taphrina*, *Saitoella*, and other higher fungi. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 431-436 (1993).
6. Nishida, H. and Sugiyama J. Archiascomycetes: detection of a major new lineage within the Ascomycota. *Mycoscience.* **35**, 361-366 (1994).
7. Sugiyama, J., Nishida, H., and Suh, O.-H. The paradigm of fungal diagnoses and descriptions in the era of molecular systematics: *Saitoella complicata* as an example. In Reynolds, D.R. and Taylor, J.W. (eds.), *The Fungal Holomorph: Mitotic Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*, p. 261-269, CAB International, Wallingford (1993).

(西田洋巳)

真正子囊菌類

真正子囊菌類の主要分類群

真正子囊菌類は子囊菌門の中で半子囊菌類、古生子囊菌類とならぶ大分類群である。子嚢果、子嚢形成菌糸の構造と発達様式、子嚢果壁、子嚢・子嚢胞子の特徴により、不整子囊菌類(閉子嚢殻形成)、核菌類(子嚢殻形成)、盤菌類(子嚢盤形成)、小房子囊菌類(偽子嚢殻形成)、ラブルベニア菌

類(昆虫に絶対寄生)および半子囊菌類(酵母)に分けられていた。真正子囊菌類は40目から構成され、不整子囊菌類(エウロチウム目、ホネタケ目、ツチダンゴ目)および核菌類(ボタンタケ目、フンタマカビ目等9目)が分子系統上、それぞれ単系統群を形成することが示されている。一方、盤菌類(チャワントケ目、セイヨウシヨウロ目等)および小房子囊菌類(クロイボタケ

目等)は単系統ではないことが示されている。これらの分類群の分岐順序は明らかではなく、また、ラブルベニア菌類(ラブルベニア目)の系統的位罫も不明である。子

囊菌門における各主要分類群の系統関係の概略を図1に示す。詳細内容については総説(8)を参照されたい。

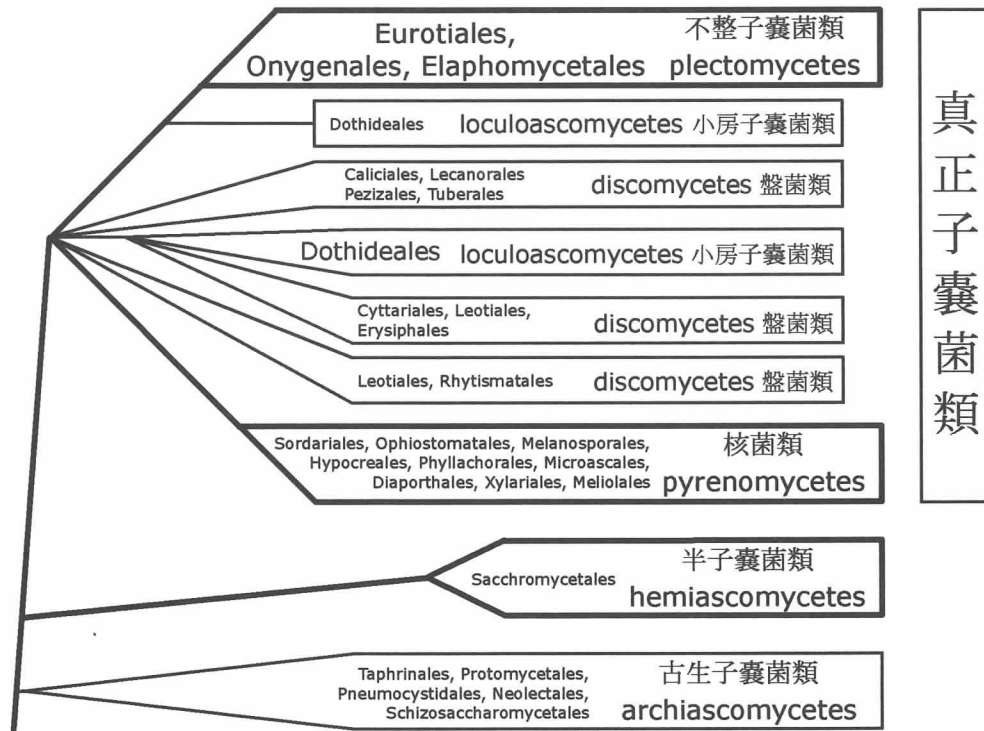


図1. 子囊菌門での各主要分類群の系統関係の概要。 Sugiyama (8, Fig. 3A-E) を改変。

Aspergillus, Penicillium 両属

洋の東西を問わず、古くからカビの有用な働きを利用して様々な発酵・醸造食品を人類は作ってきた。そのようなカビのなかでもコウジカビ (*Aspergillus* spp.) やアオカビ (*Penicillium* spp.) は特に有名である。また、両属にはカビ毒(マイコトキシン)生産、抗生物質生産、生物劣化などの観点からも重要な種が含まれる。両属はともにアナモルフ菌類である。これらのテレオモ

ルフ属はエウロチウム目マユハキタケ科に帰属する。マユハキタケ科菌類ではアナモルフとテレオモルフの形態のコンビネーションから属名が定められていた(4)。このアナモルフ-テレオモルフの関係を分子系統から解明しようとしたのが東京大学応用微生物研究所第3研究部の杉山教授であった。

杉山グループの18S rRNA部分塩基配列解析の研究成果はChang, J.-M.により1990

年の微生物化学分類研究会において発表され、翌年の *Aspergillus* 属 11 種の分子系統の原著論文(2)はインパクトが大きいものであった。その後も同グループにより *Aspergillus*, *Penicillium* 両属および関連菌類を中心に分子系統解析が進められた。しかし、Taylor, J. W. 教授, (UC-Berkeley) のアドバイスもあって、18S rRNA 遺伝子全塩基配列を利用するようになった。Taylor グループと杉山グループの共同研究の成果として、*Penicillium* 属は単系統ではなく、*Talaromyces*, *Eupenicillium* 両テレオモルフ属に関係する 2 系統群に分かれることが示された (1)。

Chang, J.-M.以後に微生物分類研究会において発表が行われた菌類としては杉山グループの Chang, J.-M.ら (2), 吉村ら (1, 6) が先鞭をつけた *Aspergillus*, *Geosmithia* 両属が挙げられる。紙面の都合上 *Aspergillus* 属の詳細については割愛する。*Geosmithia* 属は形態的特徴にもとづき *Penicillium* 属から分割・創設されたアナモルフ属である。本属は *Penicillium* 属とは系統的に近い姉妹群であり、独立した属あるいは亜属と考えられてきた。しかし、18S rRNA 遺伝子等塩基配列にもとづく系統解析の結果、基準種 *Geosmithia lavendula* 他 1 種が不整子囊菌類エウロチウム目とは明らかに異なる

単系統の核菌類ポタンタケ目に位置することが明らかとなった (6)。系統的にエウロチウム目に含まれる *Geosmithia* 属菌種については *Penicillium* 属に再分類するべきであると考えられるが、最新の容認種名リスト(7)においても達成されてはいない。

次に *Aspergillus*, *Penicillium* 両属菌種の分子系統と形態学的・化学分類学的形質との総合的研究としては 田村ら (9) および小川と杉山 (5) が挙げられる。倉石ら(3)以来、主要ユビキノ系は化学分類学的形質のひとつとして重視されており、データ蓄積が進んでいることと相まって利用価値が高い。マユハキタケ科では Q-9, Q-10, Q-10(H₂) がよく見られる。*Aspergillus* 属では分子系統的によくまとまったグループではあるが、主要ユビキノ系は多様性に富んでおり、Q-9 (*Eurotium*, *Chaetosartorya*, *Neosartorya*, *Sclerocleista*), Q-10(H₂) (*Emericella*, *Fennellia*), Q-10 (*Petromyces*, *Warcupiella*) 等がある。*Penicillium* 属では Q-10(H₂) (*Talaromyces*) および Q-9 (*Eupenicillium*) が主なものである。形態学的・化学分類学的に観察される現象が菌類の進化多様化にどのような関係を持ち、そのメカニズムがいかなるものであるかを解明することなど、今後明らかにすることは多いと思われる。

文献

1. Berbee, M. L., Yoshimura, A., Sugiyama, J. and Taylor, J. W. Is *Penicillium* monophyletic? An evolution in the family Trichocomaceae from 18S, 5.8S and ITS DNA sequence data. *Mycologia*. **87**, 210-222 (1995).

2. Chang, J.-M., Oyaizu, H. and Sugiyama, J. Phylogenetic relationships among eleven selected species of *Aspergillus* and associated teleomorphic genera. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**, 289-308 (1991).
3. Kuraishi, H., Katayama-Fujimura, Y., Sugiyama, J., and Yokoyama, T. Ubiquinone systems in fungi. I. Distribution of ubiquinones in the major families of ascomycetes, basidiomycetes, and deuteromycetes, and their taxonomic implications. *Trans. Mycol. Soc. Japan.* **26**, 383-395 (1985).
4. Malloch, D. and Cain, R. F. The Trichocomataceae: Ascomycetes with *Aspergillus*, *Paecilomyces*, and *Penicillium* imperfect states. *Can. J. Bot.* **50**, 2613-2628 (1972).
5. Ogawa, H. and Sugiyama, J. Evolutionary relationships of the cleistothecial genera with *Penicillium*, *Geosmithia*, *Merimbla* and *Sarophorum* anamorphs as inferred from 18S rDNA sequence divergence. In Samson, R. A. and Pitt, J. I. (eds.), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, p. 149-161, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands (2000).
6. Ogawa, H., Yoshimura, A. and Sugiyama, J. Phylogenetic origins of the anamorphic genus *Geosmithia* and the relationships of the cleistothecial genera: Evidence from 18S, 5S and 28S rDNA sequence analyses. *Mycologia.* **89**, 756-771 (1997).
7. Pitt, J. I., Samson, R. A. and Frisvad, J. C. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In Samson, R. A. and Pitt, J. I. (eds.), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, p. 9-49, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands (2000).
8. Sugiyama, J. Relatedness, phylogeny, and evolution of the fungi. *Mycoscience.* **39**, 487-511 (1998).
9. Tamura, M., Kawahara, K. and Sugiyama, J. Molecular phylogeny of *Aspergillus* and associated teleomorphs in the Trichocomaceae (Eurotiales). In Samson, R. A. and Pitt, J. I. (eds.), *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, p. 357-372, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, Netherlands (2000).

(小川裕由)

サビ菌類・菌じん類

百を超える属，5千を超える種を擁するサビ菌類は植物に寄生し，その多くは季節により宿主をかえる。また，大半が純粋培養に成功していない。よって，その分類は

主に植物上での形態による比較によって行われてきた。同じサビ菌類であっても宿主が異なれば異なる形態をとるため，その分類は系統を反映したものであるとはいえない。現在では，純粋培養できない生物に

対しても PCR を用いることにより、特定領域の DNA 塩基配列を決定できる。よって、サビ菌類に対しても分子系統学による研究ができるようになった。微生物分類研究会においては、18S rDNA の塩基配列の比較による本菌類への系統分類学的研究の報告がある（第 18 回 Sjamsuridzal ら）。それによると、サビ菌類は確かに 1 つの系統群を形成し、その単系統性が支持された。また、サビ菌類と *Helicobasidium* が近縁であることが示された。しかし、シダ植物へ寄生するサビ菌類はサビ菌類系統群の中心に位置し、種子植物に寄生するほかのサビ菌類とクラスターを形成した。すなわち、シダ植物に寄生するサビ菌類はマツ科の植物にも寄生し、マツ科の植物に寄生するほかのサビ菌類とクラスターを形成した。よ

って、現在シダ植物に寄生しているサビ菌類はシダ植物が進化上出現した際にすでに寄生していたサビ菌類の子孫ではなく、マツ科に寄生していたサビ菌類がその宿主をシダ植物にまで広げた結果であることを示した (1)。それでは最も祖先形質を残しているサビ菌類は何か？また、サビ菌類が出現した時期はどれほどの過去であり、植物の進化とはどのような関連を持つのか？微生物系統分類学がサビ菌類に対して明らかにすべきことは多々ある。

菌じん類については、第 15 回 Vilgalys による特別講演が行われ、ヒラタケの地球規模の分布に関して、分子系統学的アプローチにより解析した発表があった。この分野における野外研究と研究室での研究の大切さを認識させられた。

文献

1. Sjamsuridzal, W., Nishida, H., Ogawa, H., Kakishima, M. and Sugiyama, J. Phylogenetic positions of rust fungi parasitic on ferns: evidence from 18S rDNA sequence analysis. *Mycoscience*. **40**, 21-27 (1999).

(西田洋巳)

微細藻類

渡辺 信 井上 勲

微生物分類研究会での微細藻類講演の歴史

20年に及ぶ微生物分類研究会において微細藻類の研究発表がはじめてなされたのは、第15回研究会であった。その後第19回までに合計14題の発表がなされた。

1) 大塚重人, 多田信夫, 小柳津広志, 松本聰 (東京大学大学院農学生命科学研究科): 葉緑体から見た植物の進化

その後, 17回研究会では下記5題(うち1題は特別講演)の発表があった。

2) 大塚重人¹, 須田彰一郎², 李仁輝³, 渡辺真之⁴, 小柳津広志¹, 松本聰¹, 渡辺信⁵ (¹東京大学, ²地球人間環境フォーラム, ³筑波大学・生物, ⁴国立科学博物館, ⁵国立環境研究所): 水の華を形成するシアノバクテリア, *Microcystis* 属の分類に関する再考

3) 石田達也, 横田明, 杉山純多 (東京大学分子細胞生物学研究所): 16S rRNA 遺伝子配列に基づくユレモ目シアノバクテリアの系統解析

4) 張曉明¹, 野崎久義², 三沢計二², 渡辺信¹ (¹国立環境研究所, ²東京大学理学系大学院生物): 無色鞭毛藻の形態, 捕食特性と系統分類

5) 野崎久義¹, 渡辺信² (¹東京大学理学系大学院生物, ²国立環境研究所): 単細胞緑藻 *Chlorogonium* 属の客観的な種の識別基準と種レベルの自然分類体系の確立

6) 井上勲 (筑波大学・生物): 藻類一五界説のはざま (特別講演)

18回研究会では下記6題の発表が行われた。

7) 須田彰一郎², 渡辺信² (¹地球人間環境フォーラム, ²国立環境研究所): 水の華を形成する Cyanobacteria 類 *Oscillatoria* の 16S rDNA シーケンスによる分類

8) 野崎久義¹, 太田にじ¹, 山田隆², 高野博嘉³ (¹東京大学理学系大学院生物, ²早稲田大学・人間科学, ³広島大学・発酵工学): 群体性ボルボックス目の葉緑体コード *rbcL* 遺伝子のイントロンの分類と進化

9) 河地正伸¹, 井上勲² (¹国立環境研究所, ²筑波大学・生物): ハプト藻 *Chrysochromulina* 属の分類に関する再考

10) 石田達也, 横田明, 杉山純多 (東京大学分子細胞生物学研究所): ユレモ目シアノバクテリアの系統解析

11) 本多大輔, 横田明, 杉山純多 (東京大学分子細胞生物学研究所): 単細胞ラン藻 *Synechococcus* 属の海産株の分子系統と表現形質の比較検討

12) 森田詠子¹, 都筑幹夫², 野崎久義¹ (¹東京大学理学系大学院生物, ²東京薬科大学・生命): 微細藻類 *Chlamydomonas* と *Chloromonas* における比較生物学的研究への分子系統解析の適用

19回大会では下記2題の発表があった。

13) 渡辺信 (国立環境研究所): 藍藻類 (シアノバクテリア) の生態と系統分類

14) 石田達也¹, 杉山純多^{1, 2}, 横田明¹ (¹東京大学分子細胞生物学研究所, ²

現エヌシアイエムビー・ジャパン) : 16S rDNA, および groEL 相同遺伝子に基づくシアノバクテリアの系統解析

藻類は、酸素発生型光合成を行う生物からコケ、シダ、裸子、被子植物の陸上植物を除いたものを総称したものであるが、このような消去法に基づいて認識された生物群には、しばしば系統的に全くことなる生物が含まれる。実際、藻類には藍藻類（シアノバクテリア）のような原核生物から様々な真核光合成生物まで多様な系統が含まれる。藻類には 11 の門と 22 の綱の存在が認められている。原核生物である藍色植物門と原核緑色植物門は細菌分類学の分野ではシアノバクテリアに統一されている (Bergey's Manual 1989)。最近の分子系統学的解析により、原核藻類は真正細菌類に位置づけられることがあきらかとなっており、原核藻類の分類と生物学は真核藻類のそれらと別に考えられるべきものである。ここでは原核藻類と真核藻類をわけ、それぞれについて系統分類研究の現状と今後の行方を探りつつ微生物分類研究会での発表課題の位置づけしていきたい。

シアノバクテリア

シアノバクテリアの分類の概念史

藍藻類の分類体系を最初に作り上げたのは、Geitler, L. (2) であった。そこでは 145 属 1500 種類が記載された。その後多くの藻類分類学者が藍藻類の分類体系を提案しているが、基本的には Geitler, L. (2) と大きく変わることはない。このことが、今でも植物分類学上で藍藻類の分類が Geitler, L. の体系といわれる所以である。1971 年にフランスのパスツール研究所の Stanier, R.

Y. 教授のグループは、藍藻類の分類は純粋培養株に基づく形態学的、生理学的、発生学的特性及び DNA 組成による分類にあらためるべきであるとした (14)。さらに原核生物であることから、藍藻類をシアノバクテリアとして国際細菌命名規約に従って命名すべきであることを提案した (15)。しかし、この提案は、藻類学者から多くの反論があって国際微生物科学連合 (IUMS) では採用されなかった。その後、細菌学者と植物学者の間で相当な論争があったが、現在では双方の間で合意が成立し、国際細菌命名規約あるいは国際植物命名規約で認知された種名は双方で有効なものとして認めていくこととなっている (16)。

Bergey's Manual vol. 3. (1989) でのシアノバクテリアの分類

Bergey's Manual vol. 3. (13) におけるシアノバクテリアの分類は、Rippka, R. ら (12) に基づいている。シアノバクテリアの分類に使われた形質は次の 2 つの範疇に分けられる。

1. 形態学的、発生学的形質：細胞分裂のタイプ、分裂面、ベオサイト（内生孢子）の形成、連鎖体の形成と構造、鞘の存否、細胞の形とサイズ、細胞糸の隔壁のくびれ、細胞糸の性質（螺旋状か直線状か、偽分枝あるいは真分枝をするか否か等）、異質細胞と休眠孢子の存在と位置関係、ガス胞の有無あるいは位置。
2. 化学的、遺伝的、生理学的形質：フィコピリン色素組成、好氣的嫌氣的窒素固定能、従属栄養性、DNA 塩基組成、ビタミン要求性、運動性及び送光性、温度・塩分耐性、特定のシアノファージによる溶解性。

これらの形質にもとづき、シアノバクテリアは、単細胞性で二分裂あるいは出芽(外生孢子)で増殖するもの(クロオコックス目 Chroococcales), ベオサイト形成を行うもの(プレウロカプサ目 Pleurocapsales), 糸状体で異質細胞をもたないもの(ユレモ目 Oscillatoriales), 異質細胞をもつ糸状体で、一つの分裂面で細胞分裂がおこるもの(ネンジュモ目 Nostocales), 一つ以上の分裂面で細胞分裂がおこるもの(スチゴネマ目 Stigonematales)の5目に分類され、37属が認められた(16)。1989年の Bergey's Manual vol. 3. では属レベルでの分類にとどめている。しかし、次版までは種名で掲載できるようにしたいとしている。そのため、Bergey's Manual (1989)では、細胞形態、微細構造、群体あるいは細胞糸の形態、遺伝的形質、生理学的・生化学的形質、培養条件、生息地・生態的特性をしらべることが必要であるとしている。このことは植物分類学者からみても異存のないもので、分類手法において細菌学者と植物学者の間での差はなくなってきている。

シアノバクテリアの分子系統

シアノバクテリアの系統が16S rDNA やフィコシアニン遺伝子で簡単に解析できるようになったことで、DNA 塩基配列の解析技術をもった多くの研究者がシアノバクテリアの遺伝子解析に基づく系統研究を行っている。特にフィコシアニン遺伝子解析は純粋培養を確立する必要がないことや進化速度が速いため種あるいは種内レベルでの分類群の区別が可能であることから、種の分類に適用できる遺伝子として注目されている。しかし、遺伝子解析は分類を行うために必要かつ重要なアプローチではあるが、表現形質と比較することによってはじ

めて分類学的な意味をもってくる。Bergey's Manual (1989)では、5目が認められているが、クロオコックス目とユレモ目は単系統ではないことが明らかとなっている。

このことは、東大・分子細胞生物学研究所の杉山先生のフループによる研究でさらに明らかにされ(発表3, 10, 11, 14), 単系統とされていたプレウロカプサ目も多系統であることが判明した。形態形質による分類は高次階級においても成立しないと思われる。

シアノバクテリアの種の分類体系を確立するためのアプローチ

シアノバクテリアの種レベルでの分類体系を確立するため、多面的なアプローチ、即ち形態学的、生理学的、生化学的、遺伝学的特性に基づく分類学的研究を展開する必要がある。このようなアプローチは他の細菌類では最早常識的なものとなっているにもかかわらず、シアノバクテリアでは全くみられていなかった。国立環境研究所の渡辺の研究グループは、東京大学農学生命科学研究科土壌研究室と共同して、富栄養湖沼でアオコを形成するシアノバクテリアである *Microcystis* について、その形態的特徴、温度・塩分耐性、脂肪酸組成、色素組成、DNA 塩基組成、16S rDNA 塩基配列情報解析、23S-16S ITS 塩基配列情報解析、DNA-DNA 交雑試験を行った結果、植物分類学上 *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii*, *M. viridis*, *M. ichthyoblabe*, *M. novacekii*, *M. flos-aquae* 及び *M. pseudofilamentosa* の7形態種に分けられていた *Microcystis* の種は同一種であると結論し、*M. aeruginosa* に統一した(5, 6, 7, 8, 9, 10)。また同様の研究は水の華を形成する *Oscillatoria* でもなされた。シアノバクテリアの分類に多面的アプロー

チを適用した最初の研究例であり、多くの優れた細菌分類学者や植物分類学者が待ち望んでいた研究報告であった（発表 2, 7, 13）。1971年に Stainier, R. Y. 教授がシアノバクテリアを細菌命名規約で分類すべきであると主張して以来、Rippka, R. 博士によるシアノバクテリアの化学分類研究が展開されたが（12）、それが中途のままに分子系統解析が隆盛して偽系統分類学が氾濫した1990年代がすぎて、どうにかシアノバクテリアの新しい分類体系確立にむけての健全な動きがはじまったといえる。同様のアプローチが多くのところで開催されていくことを切望する。

真核微細藻類

真核微細藻類の分類は外部形態あるいは微細構造に依存しているが、分子系統解析を行うことにより系統を反映した分類及び種の識別が可能となってきた（発表 4, 5, 8, 9）。また、茨城県土浦市で開催された第17回微生物分類研究会の特別講演で、筑波大学の井上は、真核藻類について、その多様性の様々な側面と、多様性をもたらしたものについて現在までに得られた知見を整理し、今後の真核藻類研究の行方を展望した（発表 6）。微細藻類分野でははじめての特別講演であり、その内容は共生進化にベースをおいたものであり、他の微生物ではやりたくてもできないものであった。下記にその発表の骨子を示しておきたい。

真核藻類の分類群

藻類の多くは、植物体の色調にもとづいて、色の名を冠して呼ばれる。藻類の認識のはじまりは1800年代前半にさかのぼる。1836年、当時英国の海藻の研究をしていたアイルランドの Harvey はさまざまな色

をした植物があることに注目し、現在でいう緑藻、褐藻、紅藻の三つの仲間を認識した。この時代には植物体の色の違いが光合成色素組成の違いに基づいていることは理解されていなかったが、これは陸上植物とは異なる植物の世界が存在することを示す重要な一步であった。今世紀初頭以降、遊走細胞の形態や生活環、体制についての知識が加えられることによって、独自の性質を持つ多数の藻群の存在が明らかにされた。主として Pascher (1914-1931) による業績である。さらに今世紀後半から電子顕微鏡の導入によって微細構造レベルの比較形態学が進められ、その結果、現在では真核藻類の9つの門、20の綱が認められるに至っている。これらの藻類門は、大部分が単細胞の体制をもつ仲間と占められている。これらは鞭毛装置構造、細胞外被、ミトコンドリア、葉緑体などの基本構造が互いに著しく異なり、また細胞の示すさまざまな作用においても多くの差違が認められている。そのために、おそらくそれらは起源の異なる生物の集まりであることが示唆されるようになった。

真核藻類の葉緑体の系統

近年の分子系統手法の導入により、広範な真核生物を対象としたリボソーム RNA 遺伝子の系統の研究がなされているが、これらの研究から真核藻類の門の階級の分類群はそれぞれ単系統群であり、またその多くは互いに独立に進化してきたものであることが示されている。すなわち、藻類は起源の異なる多系統の生物群であり、酸素発生型光合成を行う細胞小器官である葉緑体は藻類をまとめる共有派生形質ではありえないということになる。ここに葉緑体の複数起源の可能性が生じる。ミトコンドリア

と葉緑体が細胞共生によって獲得された小器官であることは現在では広くうけいれられており、膜進化説はほとんど省みられることがない。葉緑体にコードされている遺伝子の系統を調べることで、葉緑体の系統を調べる作業が続けられているが、16S rDNA の系統は葉緑体が単系統であることを強く示唆している (1)。また、葉緑体ゲノムにおける遺伝子の配列などの質的情報も、すべての真核光合成生物の葉緑体は単一の起源をもつことを支持している (11)。これが真実ならば、光合成の能力が真核生物の複数の系統で独立に出現したという見解との間に矛盾が生じる。藻類の多系統性と葉緑体の単系統性の間の矛盾はどのように解消されるだろうか。光合成が複数の系統に出現したことは、細胞共生による葉緑体の水平移動が複数回起こったことで説明されるようになった。クリプト藻とクロララクニオン藻におけるヌクレオモルフの発見とその分子生物学の進展によって、真核藻類が多くの従属栄養生物に共生することで光合成の能力が獲得される現象が起こることが明らかにされた。ヌクレオモルフは葉緑体を包む膜の内側にある DNA と RNA を含む構造で、孔のあいた二重膜をもつことから退化した核とみなされる小器官である。クリプト藻やクロララクニオン藻の細胞には起源の異なる二つの核ゲノムがあり、ともに機能しているのである。渦鞭毛藻では、黄色植物に由来する葉緑体、緑色植物に由来する葉緑体、さらにクリプト藻に由来する葉緑体など、さまざまな性質の葉緑体をもつ生物が発見されており、真核藻類の共生による葉緑体の水平移動は進化の中で比較的容易に起こり得ることが示されている。まぎれもなく、真核共生は

真核光合成生物の多様化を推進してきた原動力であると言える。

真核藻類の共生進化

形態と分子の両面の証拠から、真核藻類の複数起源は、いまではほとんど疑問を挟む余地がない事実として定着している。藻類には最初に葉緑体を獲得した生物の系統と、真核藻類の共生による葉緑体の水平移動によって光合成能力を獲得した生物が含まれている。だとすれば、最初に葉緑体を獲得した生物の系統は真の植物であるといえるだろう。まだ十分な証拠は得られていないが、共生したシアノバクテリアの形態的痕跡を残す葉緑体をもつ灰色植物 (Glaucophyta) と紅色植物 (Rhodophyta) そして緑色植物 (Chlorophyta) がこの系統に属すると考えられている。これらは葉緑体が二重の葉緑体膜だけに包まれ、葉緑体 ER など、それ以外の膜系をもたない、ミトコンドリアクリステが板状である、などの共通の特徴をもつ。板状クリステをもつクリプト藻もこの系統であることを示唆するデータもあるが、十分な証拠は得られていない (もしこれが真実であれば真核藻類の進化はさらに複雑であった可能性がでてくる)。門の階級で認識される他の藻類群は、独立に葉緑体を獲得し、いわば二次的に「植物化」した系統群と考えられる。現在残されている真核生物の多くの系統は、およそ 10 億年ほど前に急激に放散したグループ (古生物学の分野でクラウン生物群と呼ばれる) の名残であるらしい。動物や菌類、そして「植物」もクラウン生物で、その他に 100 に近い原生生物の仲間が含まれる。二次的に植物化した真核藻類の多くもまたクラウン生物である。爆発的に放散した従属栄養生物の複数の系統において真核藻類

の共生が起こり、その結果として藻類の多様なグループが生み出されてきたと考えられる。したがって、藻類のそれぞれのグループには葉緑体をもたない、おそらく現在の分類では原生動物として扱われている姉妹群が存在していることになる。現に、藻類のいくつかのグループでは、葉緑体を獲得する依然の生物を含む系統群の存在が認識され、自然分類群として理解されつつある。これらは動物、緑色植物、菌類のいずれとも異なる真核生物のなかまである。しかも、それぞれの系統では、葉緑体を獲得して独立栄養を営む生産者の他に、捕食や吸収によって生きる分解者、そして動物や植物の寄生者が分化したことがわかってきた。栄養様式の多様化と多彩な環境への進出は真核生物の複数の系統でくりかえされてきたらしい。Tripanosoma 類（眠り病原虫 *Tripanosoma* やリーシュマニア症の *Leishmania* : いずれも熱帯・亜熱帯の病原虫として重視される）を含む寄生者と自由遊泳性の鞭毛虫であるポド類（捕食者）はユーグレナ植物と同系統であり、この単系統群はユーグレノゾア (Euglenozoa) としてまとめられている。アピコンプレクサ類（マラリア原虫 *Plasmodium* や *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* を含む帰省者で微胞子虫と総称されていたグループ）と繊毛虫（捕食による水界の主要な分解者）は渦鞭毛植物と同系統であり、これらは共有派生形質と考えられる細胞表皮の構造アルベオール (alveole) の名をとってアルベオラータ (Alveolata) という分類群にまとめられる。さらに、ピコソエカ類（捕食による分解者）、卵菌類、ラビリンチュラ類（吸収による分解者、一部寄生者）そしてプラストキスティス類（アメーバ赤痢と同様の症状を示す

腸内原虫）は褐藻や珪藻など多くの黄色植物とともに単系統群を形成する。これらは前鞭毛に付随する管状の小毛を共有派生形質としてもつ仲間でストラメノパイル (Storamenopile) の名で呼ばれる。

五界説の問題点

現在最も普通に採用されている生物の五界説 (4) のよって立つところは、栄養様式の多様化であろう。動物と菌類と植物が捕食、分解・吸収そして独立栄養というエネルギー獲得様式のもとで多細胞化あるいは大型化を果たし、反映していったこと自体は正しい。しかし、同様な多様化は五界説のプロティスタ（プロトクティスタ）の中で、しかも多数の系統で繰り返しおこってきたことであり、これらは本質的に動物、菌類、植物のとった戦略と等価に評されるべきものであろう。五界説という生物界の見方の極端な単純化によって、真核生物の進化のなかで起こってきた多数の進化的なイベントとその結果生じた多数のユニークな生物群の存在が希薄になっていることは憂うべき事態であるといえる。希薄化は教育の不備、ひいては研究者の不足につながり、ますます希薄化を進めていく悪循環を生み出している。五界説のはざまに埋もれた生物には生物進化を解くキーになる生物が多数隠されているはずである。真核生物の全体像とその進化を正しく理解するためには、これらの埋もれた生物に光を当て、市民権を与えることが重要である。藻類の系統と分類を行い、その多様性を正しく認識していくには、葉緑体を獲得する以前の生物を視野に入れた研究が不可欠であることは、今では疑問の余地がない。もはや藻学という範囲で真核藻類のすべてを理解するのは困難で、原生動物と呼ばれる多くの

生物を加え、プロティストロジーという広がりの中でとらえていく必要がある。すでに世界の研究はそのような方向性をもって動いている。日本における最大の問題は、(病原性のある一部の種を除いて)プロティスタの分類が著しく立ち遅れていることである。わが国では、原生動物といえど多くの場合繊毛虫であるか、著名な病原虫であることが多いが、本当に研究の不足しているのは自由遊泳性の原生生物である。これらの生物を正しく理解することが真核生物全体の理解に大きく寄与することは、いまでは誰しも認めるところであろう。しかし、名もない繊毛虫やアメーバ類を対象とする研究者のための場所が日本のなかにどれだけあるだろうか。もっとニッチェを!

五界説の単純化の中に埋もれてしまった生物のなかでは、幸いなことに藻類は比較的日子のあたる場所に位置しており、いくつかの主要な大学と研究機関で研究が継承されている。現在風前の灯火ともいえるわが国の藻類の研究ではあるが、藻類の正しい認識の広がり、他の同様に重要だがほとんど省みられることのない多くのプロティスタへ眼を向ける契機になり得ることを考えれば、藻類の研究の継続は極めて重要であり、それに携わる者の責任は重大である。五界説から開放されたプロティストロジーの振興のために、そして真核生物の真の多様性の理解のために継続して主張を続ける必要がある。

文献

1. Bhattacharya, D. and Medlin, L. The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycol.* **31**, 489-498 (1995).
2. Geitler, L. Cyanophyceae. *In* Rabenhorst's Kryptogamenflora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz 14, Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H. Leipzig (1932).
3. 井上勲 微小藻の世界 藻類の多様性 新たな生物の世界が見えてきた 国立科学博物館刊 (2000).
4. Margulis, L. and Schwartz, K. V. Five kingdoms: An illustrated guide to the phyla of life on Earth, 2nd ed., New York, W. H. Freeman Co. (1988).
5. Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Hiroki, M., Mahakhant, A., Liu, Y., Matusmoto, S. and Watanabe, M. M. Phycoerythrin-containing *Microcystis* isolated from P. R. China and Thailand. *Phycol. Res.* **46** (Suppl.), 45-50 (1998).
6. Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiology Letters.* **164**, 119-124 (1998).
7. Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. Phylogenetic relationships between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequences. *FEMS Microbiology Letters.* **172**, 15-21 (1999).
8. Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M.

- Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification. *Phycological Research*. **47**, 189-197 (1999).
9. Otsuka, S., Suda, S., Li, R., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **46**, 39-50 (2000).
 10. Otsuka S., Suda, S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S. and Watanabe, M. M. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the Rules of the Bacteriological Code. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**. in press (2000).
 11. Reith, M. *Ann. Rev. Pl. Physiol. Mol. Biol.* **46**, 549-575 (1995).
 12. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M. and Stanier, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **111**, 1-61 (1979).
 13. Staley, J. T., Bryant, M. P., Pfennig, N. and Holt, J.G. *Bergey's manual of systematic bacteriology vol.3*, Williams & Wilkins, Baltimore (1989).
 14. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. and Cohen-Bazire, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* **35**, 171-205 (1971).
 15. Stanier, R. Y., Sistrom, W. R., Hansen, T.A., Whitton, B. A., Castenholz, R.W., Pfennig, N., Gorlenko, V. N., Kondratieva, E. N., Eimhjellen, K. E., Whittenbury, R., Gherna, R. L. and Trüper, H. G. Proposal to place the nomenclature of the cyanobacteria (blue-green algae) under the rules of the International Code of Nomenclature of Bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **28**, 335-336 (1978).
 16. 渡辺信 シアノバクテリアの分類に関する歴史的考察 日本微生物資源学会誌, **11**, 105-119 (1995).

4 これからの微生物系統分類学

21世紀の微生物系統分類の将来—日本の病原細菌株は絶えるのか—

藪内英子

古墳、古銭、世界遺産などだけでなく、菌株保存もまた重要な文化であり、この事業にどれだけの配慮をしているかは、その国の文化の程度を知る尺度の一つと考える。現在日本人が清潔で健康な日々を送ること出来るようになった背景に、日本の病原細菌学者のどれ程の貢献があったかを、どれだけの人が考えているのだろうか。これまで我々の先達が積み重ねた文化遺産、すなわち病原細菌株の多くが失われ、今また将来に向かって病原細菌株保存事業が存亡の危機にあると言わねばならない。米国では *Legionella pneumophila* の命名記載直後に、40年前の原因不明疾患患者を細菌学的にレジオネラ感染症と確定診断し、論文が発表された。日本では *Vibrio parahaemolyticus* の歴史は大阪府下のシラス中毒以前には遡れない。

昭和26年2月27日付けの文部省通達によって日本の微生物株保存事業は戦後急速に活性化され、同年3月9日に稲田清助大学学術局長のもと「培養微生物株の保存に関する懇談会」が文部省で開かれ、長谷川秀治東大伝染病研究所長を委員長とする微生物株保存連盟準備委員会が発足し、はやくも4月28日には日本微生物株保存機関連盟 (JFCC) が誕生し、その初代理事長は日本学術会議微生物学研究連絡委員会の田宮猛雄代表であったという。1993年になってJFCCは微生物資源学会として発展解散し、今日に至っている。

生物資源とそれに関連する情報が世界的に重視される情勢から、1974年、特殊法人・ライフサイエンス研究推進センターの設立が企画されたが、諸般の事情から1976年に理化学研究所にライフサイエンス研究情報室が設置されることになった。かねて日本学術会議が提案していた3機構のうちの1つ研究用微生物株保存利用機構—微生物センター（仮称）は、1979年、理化学研究所微生物系統保存施設 (JCM) として和光市に具体化することとなった。微生物センター〔仮称〕の件は昭和42年度第4回（日細菌誌 **23**: 371, 1968）、昭和43年度第4回（同誌 **24**: 213, 1969）および昭和44年度第1回（同誌 **24**: 300, 1969）の日本細菌学会理事会記録で微研連報告として残されているが、それ以後は立ち消え、昭和49年度第1回理事会〔日細菌誌 **29**: 636, 1974）以降は教育用菌株の議題になっている。JCMは国の要望により設立されたにも拘わらず、その業務内容はもとよりその設立についてさえ、1948年から1982年までの日本細菌学会理事会記録には現れない。日本細菌学会とJCMは協力も情報交換も必要なかったのだろうか。JFCCもJCMも医学分野の細菌学者と関連を保ってはいたが、その活動の主軸は病原微生物以外の有用微生物であり、JCMを含めて農芸化学分野の有用微生物株保存施設は病原菌株を受け入れていない。

我が国の国家予算によるヒト病原細菌系統保存施設は東京大学伝染病研究所（現医科学研究所）と大阪大学微生物病研究所に併設されてきたが、予算・人員・設備など、上記の各項目に照らして心寒い現状である。本邦医学部細菌学教室の多くは、建前上菌株保存の重要性を認識

してはいるが、それが国家予算を伴う本格事業に発展し得ないのは、実利に貢献しないからかと勘ぐらざるを得ない。病原細菌株の保存にかかわって来た研究者は、本務の傍ら、(その多くは個人的に蒐集した) ヒト病原細菌株を保存しているが、人的、時間的および経済的不如意から、保存と分譲の仕事をこなさきれないし、菌株保存台帳の整理もままならず、カタログ発行などは夢のまた夢であるのが現状である。

核酸の塩基配列を自動分析出来る装置が普及するなど、遺伝子診断・遺伝子治療などと並んで、殆どの若手研究者のみならず講座や研究分野の責任者に至まで病原細菌株保存業務を卑しめ、その役職に就くことを「窓際におかれる」と公言してはばからぬ人を生み出している。病原細菌株を見たことも扱ったこともない微生物学者が、急性細菌感染症に罹患されたら、どのような態度で我が身を処されるのであろうか。

この状況が続けば日本のヒト病原細菌株保存に関わる有能な人材はもとより、ヒト病原細菌保存株そのものも早晚枯渇し、教育・研究・診断・治療・予防に重大な影響が及ぶことは必定であり、深く憂慮される。

平成5年12月21日に条約第九号として公布された生物の多様性に関する条約では、

- ・ 諸国が自国の生物資源について主権の権利を有することを再確認する〔前文〕
- ・ 動物、植物、および微生物の生息域外保全および研究のための施設を設置・維持すること、その設置と維持は遺伝資源の原産国において行うことが望ましい〔第九条 (b)〕

と記されている。この条約は主として開発途上国を対象として、その国の動物・植物・微生物からの癌やエイズなどのウイルス病に有効な新薬の製造などにかかわる貴重な資源の国家権利を保護する目的で制定されたと聞いている。細菌分類学者としては、学名の安定と命名上の基準株はじめ重要菌株を公開するというこれまでの原則と、この法律とがどのように調和するのか理解できないでいる。応用微生物学分野では事業収益にかかわる問題が多いので、この条約に対する関心は高く、種々な活動が行われているようである。この条約に関係あるのか不明であるが、外国の公的菌株保存施設の中には、近年特に菌株蒐集に力をいれているところがあると聞いている。これに対し日本の医学分野ではこの問題についての認識が低く、応用微生物分野の研究者からは「医学の人は何を考えているのだ」という声も聞こえてくる。現に ATCC から菌株が供給されないという苦情が出始めているという噂も耳にする。アメリカはこの条約を批准しておらず、今のうちに出来るだけ自国に有利なしばりをかけておくことを目論んでいるという穿った見方もある。日本人は ATCC に菌株を寄託したり ATCC の菌株を使用することに誇りを感じて来た傾向がある。しかしこれからは、自分の大切な菌株は ATCC には寄託しないという時代になるかも知れない。現に新菌種の提案に際して命名上の基準株を恒久的菌株保存施設に寄託しておらず、原著者に依頼しても返信がなく、第三者がその菌株を入手出来ない事例も現れている。さらに、日本で病原細菌の新菌種を命名した時、重要な感染症起因菌株を分離・同定した時、その基準株を受け入れてもらえる恒久的菌株保存施設が日本国内にあるのだろうか。日本は先進国の部類に入るのであろうが、病原細菌株保存事業に関する限り、まさしく開発途上国またはそれ以下と言わざるを得ない。

21 世紀を目前にして東南アジア諸国とくにタイ国とベトナム国では政府支出のもとに病原細菌株保存施設を作る構想が実現しつつあるという。このままでは、病原細菌株保存事業において日本は世界で最後進国になるような気がしてならない。

「菌株保存のように費用がかかって面倒で古臭い仕事は外国に任せておけばよい」などと安易に考えていると、分子遺伝学やゲノム解析に必要な信頼できる菌株が入手できないという事態になりかねない。

応用微生物学のような「利益」は生まないであろうが、病原菌株保存事業の確立は病原微生物学の健全な育成と国民の健康保持にかかわる重要な社会および科学研究の基盤整備であり、重要な文化である。病原細菌といえども自ら試験管のフタを開けて外部へ出てくるものではない。汚染防止に対し物理学的にも、また外部からの侵入を防止する点にも十分配慮された施設であって、十分に研鑽を積み生活および研究の安定と将来への展望が保証された職員が確保された恒久的病原微生物保存施設が確立されることを、この国と国民の将来のため緊急且つ切実に希う。此のために、政界・財界・学会の有力者が「直接利益を生まない重要事業」に理解と断行を示されることを、半ば絶望に近い想いを以て、期待するものである。

これからの微生物系統分類学

菅原秀明

分類の手法は実験手段の進歩と共に進化してきた。遺伝子配列を容易に決定できるようになり、リボソームを代表とする情報高分子の配列を利用した系統分類が定着した。これによって、それが真実が否かは別として、系統分類における客観的で再現性のある「軸」を得ることができた。一方、2000年9月の段階で36種類の微生物ゲノムが公開されている。これらのデータをもとにオーソログ・パラログ解析が行われ、水平移動や遺伝子欠失の議論も展開されている。そこで、系統樹に表現される系統進化の見方に加えて、ゲノム全体の比較から、個々の種のダイナミックな進化を論ずることができるのではなかろうか。

これからの微生物系統分類学

西田洋巳

先日、新聞紙上において、通産省製品評価技術センターの二人の研究者が8日間で黄色ブドウ球菌の全ゲノム塩基配列を決定したというニュースを見ました。特定の遺伝子ではなく、全ゲノム塩基配列に基づき微生物の特徴付けを行い、その系統進化的な位置を示すことが、これからの微生物系統分類学に求められるでしょう。

微生物化学分類研究会、微生物分類研究会開催記録

開催年度	開催月日	開催場所	世話人	特別講演
第1回	昭和55年 1980.10.9-10	箱根姥子温泉(林野庁姥子保養所)	東大応微研	駒形和男(内田欣哉、加藤清昭)
第2回	昭和56年 1981.4.17-18	山梨県勝沼町(ぶどうの丘センター)	東大応微研	駒形和男(後藤昭二、藪内英子、 杉山純多) C.W.Moss
第3回	昭和58年 1983.11.12-13	山梨県河口湖(富士桜荘)	東大応微研	駒形和男(杉山純多)
第4回	昭和60年 1985.2.9	高山市(高山グリーンホテル)	岐阜大医	藪内英子(江崎孝行) 矢野郁也
第5回	昭和60年 1985.10.11	山梨県河口湖(富士桜荘)	理研JCM	金子太吉 堀寛、小柳津広志
第6回	昭和61年 1986.10.8	山梨県河口湖(富士桜荘)	東大応微研	駒形和男(杉山純多) 藪内英子
第7回	昭和62年 1987.11.27	伊東市(ヤクルト本社研修センター)	静岡大農	山田雄三 森脇和郎
第8回	昭和63年 1988.11.25	熱海市(湯河原厚生年金会館)	東京農工大	倉石 衍(片山葉子) J.DeLeY
第9回	平成元年 1989.12.1	神戸市(舞子ピラ)	(財)発酵研	飯島貞二(長谷川 徹) 駒形和男
第10回	平成2年 1990.11.28	大洗町(ホテルかもめ荘)	東大応微研	山里一英
第11回	平成3年 1991.11.15-16	熱海市(MOA瑞雲会館)	東京農大	金子太吉(岡田早苗) 長谷川政美
第12回	平成4年 1992.11.20	大阪市(大阪ガーデンパレス)	大阪市大医	矢野郁也 藪内英子
第13回	平成5年 1993.11.25-26	和光市(理研鈴木梅太郎記念ホール)	理研JCM	中瀬 崇 K.Kerstens
第14回	平成6年 1994.12.9	伊東市(ヤクルト本社研修センター)	静岡大農	山田雄三
第15回	平成7年 1995.10.6-7	山梨県河口湖(富士桜荘)	東大分生研	杉山純多(横田 明) R.Vilgalys、三中信宏
第16回	平成8年 1996.11.15-16	京都市(コミュニティー-嵯峨野)	(財)発酵研	竹内昌男(波多野和徳) 山本 敏
第17回	平成9年 1997.11.7-8	土浦市(サンレイク土浦)	国立環境研	渡辺 信(広木幹也) 井上 勲
第18回	平成10年 1998.10.30-31	山梨県河口湖(富士桜荘)	東大分生研	杉山純多(横田 明) 斎藤成也
第19回	平成11年 1999.10.29-30	大阪市(コスモスクエア国際交流センター)	阪大国際交流センター	関 達治(川崎浩子) 駒形和男
第20回	平成12年 2000.10.27-28	東京都(東京大学山上会館)	NCIMBジャパン	杉山純多 駒形和男, H.Prillinger R.Rippka, P.A.R.Vandamme

第1回～第3回 : 微生物の化学分類の勉強会

第4回～第14回 : 微生物化学分類研究会

第15回～ : 微生物分類研究会

第 1 回から第 20 回までの発表論文

第 1 回 微生物の化学分類の勉強会 (1980.10.9-10)

一般講演

1. 嫌気性細菌の脂肪酸組成
宮川栄一 (家衛試)
2. *Thiobacillus* の化学分類
藤村葉子 (農工大)
3. グラム陰性メタノール資化性細菌の分類
浦上貞治 (三菱ガス化学)
4. Coryneform-nocardioform-mycobacteria の細胞壁アシル型
内田欣哉 (東大・応微研)
5. 放線菌の化学分類
清野昭雄 (科研化学株)
6. 酵母の菌体脂肪酸組成
須藤恒二 (日本獣医畜産大)
7. シェリー酒について
後藤昭二 (山梨大)

第 2 回 微生物の化学分類の勉強会 (1981.4.17-18)

一般講演

1. Significance of cellular fatty acid composition, quinone system and GC-content of DNA on the taxonomy on the genus *Thiobacillus*
Y. Katayama-Fujimura
2. Cellular fatty acid composition in coryneform bacteria
K. Suzuki
3. Taxonomic study on the genus *Alcaligenes* and allied bacteria
K. Yamasato, M. Akagawa, K. Miyazaki, H. Kurose, Y. K. Fujimura, and H. Kuraishi
4. Taxonomic studies on acetic acid bacteria, especially the polarly flagellated intermediate strains
Y. Yamada, and Y. Tahara
5. Genus *Sphingobacterium*: their phenotypic characteristics, deoxyribonucleic acids and pyrolysis
T. Kaneko, E. Yabuuchi, and I. Yano
6. Microbial hunting in Oceania and South America
J. Sugiyama

特別講演

- General chemotaxonomy in microbiology---A marriage of chemistry and microbiology: Past, present, and future
C. W. Moss (CDC, USA)

第3回 微生物の化学分類の勉強会 (1983.11.12-13)

一般講演

1. Chemotaxonomic studies on the genus *Thiobacillus*
Y. Katayama-Fujimura
2. Biochemical basis on cellular fatty acid profile and quinone pattern as criteria for microbial classification
K. Uchida
3. Taxonomic significance of electrophoretic comparison of enzymes in the yeasts
S. Yamazaki
4. Heterogeneity of *Debaryomyces hansenii*-*Candida famata*
T. Nakase
5. Coenzyme Q system in ascomysetous fungi
H. Kuraishi
6. Characterization of the eight pilot strains for eight "new serogroups" (G-L, N, and O) of *Flavobacterium meningosepticum* reported by Richard
N. Miyoshi, and E. Yabuuchi
7. Graphic demonstration of similarity between bacterial strains
T. Kaneko
8. Oligopeptidase profiles of gram positive cocci: Useful for their rapid identification
T. Ezaki, and E. Yabuuchi

特別講演

- Current view on the present classification of gram-positive, catalase positive cocci
M. Kocur (Chekoslovac collection of microorganisms, Chekoslovac)

第4回 化学分類研究会 (1985.2.9)

一般講演

1. 高速液体クロマトグラフィによる DNA GC 含量測定用標準試薬の調整と分析条件検討
熊谷真男, 藤本正雄, 国中 明 (ヤマサ醤油研究所)
2. 逆相 HPLC を用いた GC 含量測定法
玉岡 迅 (東大・応微研)
3. 高速液体クロマトグラフィを用いた微生物 GC 含量測定法
藤村葉子, 倉石 衍, 金子太吉¹ (東農工大, ¹理研)
4. *Alcaligenes* および *Achromobacter* グループの化学分類
大石奈々子 (東大・応微研)
5. *Alteromonas putrefaciens* の化学分類学的研究について
伊藤 隆 (東農工大)
6. *Trichosporon beigelii* の化学分類について
原 稔生, 斎藤京子, 須藤恒二 (日本獣医畜産大)
7. *Gluconobacter cerinus* (ex Asai 1935) Yamada and Akita sp. nov., nom. Rev.
山田雄三 (静岡大・農・応用微生物)
8. *Peptostreptococcus* 属および類縁菌属を構成する各菌種の菌体脂質について
江崎孝行 (岐阜大・医・微生物)

9. 豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) の菌体糖脂質による分類と同定
後藤公吉, 金田研司, 矢野郁也 (新潟大・医・細菌)

特別講演

- ミコール酸の分子種組成による *Mycobacterium* およびその関連細菌の化学分類
矢野郁也 (新潟大・医・細菌)

第5回 微生物化学分類研究会 (1985.10.11.)

一般講演

1. ヒトから分離される *Candida* 菌種の酵素の電気泳動パターンの比較
鈴木基文 (理研)
2. *Rhodotorula* および *Rhodospiridium* 属の分類学的研究
浜本牧子 (東大・応微研)
3. 好熱性メタン酸化菌より分離された新規キノン, メチルユビキノンの構造
玉岡 迅 (東大・応微研)
4. *Fellomyces* gen. Nov., *Conidium* を形成する不完全酵母の新属
山田雄三, 坂野 勲¹ (静岡大・農・応用微生物, ¹助発酵研)
5. *Chaetomium funicola* JS525 より見いだされた Q-10 [H4] の化学構造および菌類における Q-10 [H4] の分布
柴むつみ (農工大・農)
6. コリネフォルム細菌の分類学上の問題点
鈴木健一郎 (理研)
7. 5S - rRNA の分子進化によるコリネフォルム細菌の分類学的研究
朴 勇河 (東大・応微研)
8. rRNA 塩基配列決定の迅速化
小柳津広志 (富山大・教養)
9. 5S - rRNA と微生物の進化
堀 寛 (名大・理)

第6回 微生物化学分類研究会 (1986.10.8.)

一般講演

1. DNA 塩基組成・DNA-DNA 相同性
玉岡 迅 (東大・応微研)
2. キノン系
倉石 衍 (東農工大・農)
3. 菌体脂肪酸組成
鈴木健一郎 (理研)
4. 細胞壁組成 - 細菌
内田欣哉 (東大・応微研)
5. 細胞壁組成 - 菌類
中瀬 崇 (理研)
6. 5S rRNA 塩基配列
加藤慎一郎 (キリンビール(株)医薬開発研)

特別講演

医学細菌における簡易同定キットについて
藪内英子（岐阜大・医）

第7回 微生物化学分類研究会（1987.11.27.）

一般講演

1. C₁化合物資化性細菌の分類
浦上貞治（三菱瓦斯化学(株)新潟研）
2. *Sporolactobacillus* とその類縁細菌
柳田藤寿（東農大・農化）
3. グラム陰性好気性海洋細菌の化学分類
赤川昌世（東大・応微研）
4. *Sphingobacterium* とその周辺
藪内英子（岐阜大・医・微生物）
5. 酸化発酵と呼吸鎖からみた酢酸菌の分類
飴山 実（山口大・農化）
6. *Saitoella* gen. nov.
後藤昭二（山梨大・工・発研）
7. 射出孢子形成酵母の分類
鈴木基文（理研・系統保存）
8. 植物病原性 *Pseudomonas* 属とその関連細菌の化学分類
滝川雄一（静岡大・農）

特別講演

ハツカネズミ亜種分類の遺伝学に基づく再検討
森脇和郎（国立遺伝研）

第8回 微生物化学分類研究会（1988.11.2.）

一般講演

1. Rapid determination of DNA GC content and its application to classify alkalophilic strains of the genus *Bacillus*.
玉岡 迅（理研）
2. Phylogenetic relations of methanol-utilizing bacteria to other gram negative bacteria deduced from their 5S rRNA sequences.
安藤 進（東大・応微研）
3. Phylogenetic relationship of aerobic, motile cocci deduced from 5S rRNA sequences and chemosystematic data.
J. S.Park（東大・応微研）
4. *Klebsiella ornithinolytica* sp. nov., formerly known as ornithine-positive *Klebsiella oxytoca*.
小迫芳正（理研）
5. Taxonomic relationship between "*Achromobacter*" CDC group Vd from clinical sources and "*Alcaligenes* sp. 1" from soil.
土居奈々子（東大・応微研）

6. Cloned rRNA genes of *Agrobacterium tumefaciens* as a hybridization probe.
鈴木 誠, 赤川昌世¹, 山里一英, 倉石 衍 (東農工大, ¹東大・応微研)
7. Fluorometric hybridization in microdilution wells for the identification of both gram-positive and negative bacteria
江崎孝行 (岐阜大・医)
8. Tentative studies on the differentiation of cell morphology and some chemotaxonomic natures in dimorphic *Actinomycetes*
島津 昭 (東大・応微研)
9. Occurrence of novel polyunsaturated mycolic acids and unusual unsymmetric trehalose esters in *Rhodococcus aurantiacus* (Tsukamura and Yano, 1985) and their significance in chemotaxonomy.
矢野郁也 (大阪市大・医)

特別講演

Evolution of bacteria.

Josef DeLey (ゲント州立大学, ベルギー)

第9回 微生物化学分類研究会 (1989.12.1.)

一般講演

1. *Rhizobiaceae* 細菌の菌体脂肪酸組成とその分類学的意義
横田 明, 坂根 健 (助発酵研)
2. “*Sphingomonas paucimobilis*” のリポ多糖様脂質の構造とその分類学的意義
川原一芳, 松浦基博, 檀原宏文 (北里研究所・細菌)
3. キノン系の生物学的意義と細菌分類学とのかかわり
平石 明 (東大・応微研)
4. *Deleya* 属海洋細菌の分類学的検討
赤川昌世¹, 山里一英 (東大・応微研, ¹現, 産業医科大学)
5. C₁化合物資化性細菌の化学分類学的研究
安藤 進 (東大・応微研)
6. 16S rRNA シーケンスに基づく非好熱イオウ細菌の系統分類
高桑 進, 横田 明¹, 小柳津広志², 増地-小柳津矢恵子²
(京都女子大・生物, ¹助発酵研, ²富山大・生物)
7. 16S リボソーム RNA 部分塩基配列による *Vibrio* 科細菌の分類
塚本久美子 (東大・海洋研)
8. 嫌気性グラム陽性球菌の Molecular Systematics
江崎孝行 (岐阜大・医・微生物)
9. 好アルカリ性 *Bacillus* 属細菌の系統分類
玉岡 迅 (理研・微生物生態)
10. 抗酸菌糖脂質による種及び血清型の分類と迅速診断について
矢野郁也 (大阪市大・医・細菌)
11. 担子菌酵母 *Rhodsporidium*, *Leucosporidium* 両属酵母の交配システム, 化学分類学的特徴及び系統
朱 尤洪 (東大・応微研)
12. 担子菌酵母の微細構造とその系統分類学的意義
徐 聖義 (東大・応微研)

13. *Mortierella* 属 (真正菌門・接合菌亜門) の化学分類学的研究

- 特に菌体脂肪酸組成の分類学的意義について -

天野典英, 川島 洋, 天地輝夫, 清水 昌¹, 山田秀明¹
(サントリー(株)基礎研究所, ¹京大・農)

特別講演

化学分類学との出会い

駒形和男 (東農大・農)

第 10 回 微生物化学分類研究会 (1990.11.28)

一般講演

1. 16S rRNA 部分塩基配列に基づいたメタン生成細菌の系統的關係と同定
川崎浩子, 小柳津広志¹, 遠藤銀朗², 中村和憲³, 鎌形洋一³, 古賀洋介⁴,
大神真美⁴, 森永 豪⁵, 山里一英 (東大・応微研, ¹富山大・生物, ²東北学院大・工,
³微工研, ⁴産業医科大・化学, ⁵ダイセル化学工業・生化研)
2. 海洋環境から分離した *Vibrio* 科細菌の 16S rRNA による系統關係
塚本久美子 (東大・海洋研)
3. 16S rRNA に基づく好アルカリ性 *Bacillus* 属の分類
玉岡 迅 (理研・微生物)
4. Phylogenetic relationships among *Aspergillus* taxa determined from the partial sequences of 18S ribosomal RNA.
張 志銘 (東大・応微研)
5. Electrophoretic comparison of enzymes as an aid for the chemotaxonomic study of osmophilic *Aspergillus* taxa.
Endang Sutriswati Rahayu (東大・応微研)
6. 18S および 26S rRNA の部分塩基配列に基づく酵母の分子系統分類
山田雄三 (静岡大・農)
7. 電気泳動核型と DNA 類似度による *Saccharomyces bayanus* 保存株の再吟味
金子嘉信, 坂野 勲 (助発酵研)
8. *Zoogloea* 属細菌の化学分類と分子系統
辛 鏞國 (東大・応微研)
9. 通常のリポ多糖をもたないグラム陰性細菌 *Sphingomonas paucimobilis* の糖脂質の化学構造
川原一芳, 松浦基博, 檀原宏文 (北里研究所・細菌)
10. *Nocardia asteroides*, *N. nova* および *N. farcinica* のミコール酸分子種組成による分類と type strain の是非について
馬場恒子¹, 東村道雄, 西内由紀子², 矢野郁也²
(松蔭女子学院短大, ¹国立中部病院, ²大阪市大・細菌)
11. *Actinomadura* 属, *Microbispora* 属, *Microtetraspora* 属の化学分類と DNA 相同性
宮道慎二, 越智幸三¹ (明治製菓(株)・探索研, ¹藤沢薬品(株)・探索研)
12. *Acinetobacter* 属菌の分離と *genospecies* 同定
長谷川伸作 (北海道立衛生研)
13. PCR と DNA-DNA Hybridization による *Legionella* の同定
山本啓之, 橋本安弘, 江崎孝行 (岐阜大・医)

ワークショップ

微生物分類学へのコンピューターの利用

- 菅原秀明, 玉岡 迅¹, 塚本久美子², 山本啓之³, 片山葉子⁴
(理研・ライフサイエンス情報室, ¹理研・微生物, ²東大・海洋研,
³岐阜大・微生物, ⁴農工大・環境・資源)

第11回 微生物化学分類研究会 (1991.11.15-16)

一般講演

1. ポリアミン構成から見たグラム陰性細菌群の化学分類
浜名康栄, 松崎 茂¹ (群馬大学医療技術短期大学部, ¹同内分泌研究所)
2. コリネフォルム細菌における細胞壁糖組成の分類学的意義
武内真理子, 横田 明 (助発酵研)
3. ソフトイオン化質量分析による細菌脂質 intact 分子種の解析と化学分類への応用
矢野郁也, 堀田 (原) 久子, 藪内英子 (大阪市大・医)
4. 微生物分類学におけるパーソナルコンピューターの利用
〈分類データのハイパーテキスト化について〉
玉岡 迅, 志村純子¹, 菅原秀明¹
(理研・微生物, ¹理研・ライフサイエンス研究情報室)
5. 酵母の菌体糖組成の化学分類学的意義と HPLC 分析法
鈴木基文 (理研・系統保存)
6. メタン生成細菌におけるエーテル型脂質構成残基成分の分布の分類学的意義
古賀洋介, 赤川昌世, 大神真美 (産業医科大学・化学)
7. 腸管出血性大腸菌の同定 (PCR による毒素遺伝子の検出と型別)
長谷川伸作 (北海道立衛生研究所)
8. *Bacillus brevis* の数値分類と化学分類
信太 治, 駒形和男¹, 鶴高重三²
(ヒゲタ醤油(株)研究所, ¹東農大・総研, ²名大・農食工化)
9. Family *Streptosporangiaceae* に属する新しい放線菌とその化学分類
工藤卓二, 伊藤 隆¹, 清野昭雄², 宮道慎二³, 庄村 喬³
(¹理研・系統保存・現: 科研製薬, ²理研・系統保存・現: 萬有製薬, ³明治製薬(株))

特別講演

分子系統学の方法

長谷川政美 (文部省・統計数理研究所)

第12回 微生物化学分類研究会 (1992.11.20)

一般講演

1. Domain Bacteria の系統樹のなかで独自の進化をとげる *Peptostreptococcus* について
李 娜, 橋本安弘, 江崎孝行 (岐阜大・医・微生物)
2. *Bacillus brevis* グループの化学分類
信太 治, 高木広明, 門脇 清, 駒形和男¹, 鶴高重三²
(ヒゲタ醤油(株)研究所, ¹東農大・農, ²名大・農)
3. 海水から分離されたいくつかの新規光合成細菌
平石 明 (コニシ(株)環境バイオ研究所)

4. *Sphingomonas paucimobilis* の細胞表面構造
川崎聡子, 川原一芳 (北里研究所・細菌)
5. 16S rRNA 塩基配列に基づく *Flavobacterium-Cytophaga Complex* の系統分類
中川恭好, 山里一英 (東大・応微研)
6. リボゾーム蛋白 AT-L30 の解析による *Nocardia, Mycobacterium* 及び関連属の分類学的研究
越智幸三 (農水省・食品総合研究所)
7. *Zoogloea* 属及び関連細菌の分子系統
辛 鏞國, 平石 明¹, 杉山純多 (東大・応微研, ¹コニシ(株)環境バイオ研究所)
8. 18S リボゾーム RNA 塩基配列からみた担子菌酵母の系統
徐 聖義, 杉山純多 (東大・応微研)
9. 酵母情報ベースの設計
菅原秀明, 宮崎 智, 中瀬 崇 (理研)
10. 抗酸菌の化学分類とその臨床的意義について
矢野郁也 (大阪市大・医・細菌)

特別講演

- 細菌分類の鍵としての菌体脂質・脂肪酸組成
藪内英子 (大阪市大・医, 愛知医科大学)

第 13 回 微生物化学分類研究会 (1993.11.25-26)

一般講演

1. キャピラリー GC/MS 及び FAB/MS によるミコール酸分子種の分離・同定
矢野郁也, 西内由紀子, 上田定男, 藤井平 (大阪市大・医)
2. Gigapite を使用した新しい DNA の精製方法
江崎孝行 (岐阜大・医)
3. 16S rRNA 塩基配列解析の効率化
平石 明 (コニシ(株)環境バイオ研究所)
4. グラム陽性球菌におけるポリアミン分布
浜名康栄 (群馬大学医療技術短期大学部)
5. *Bacillus brevis* グループの菌体タンパク質電気泳動パターンによる分類
信太 治, 高木広明, 門脇 清, 矢野 博¹, 駒形和男²
(ヒゲタ醤油株, ¹農林水産省・種苗管理センター, ²東農大)
6. 植物から分離された 3- ケトラクトース生成能を示す *Sphingomonas* 属細菌の分類学的検討
武内真理子, 坂根 健, 柳美代子, 山里一英¹, 横田 明 (財発酵研, ¹東大・応微研)
7. ヒト歯周ポケット由来 *Treponema* 属の性状と分類について
子関健由, 梅田 誠, 石川 烈, 辨野義己¹ (東京医歯大, ¹理研・系統保存)
8. *Trichosporon cutaneum* の血清型別および DNA 相同性による再分類
杉田 隆, 横田真理子, 池田玲子, 西川朱寛, 篠田孝子 (明治薬大)
9. 5S rRNA 塩基配列による放線菌の系統分類
工藤卓二 (理研・系統分類)
10. 射出孢子形成酵母 *Udeniomyces* 属の分類学的及び系統学的位置
徐 聖義, 竹松明子, 高島昌子, 中瀬 崇 (理研・系統保存)

11. 18S rRNA シークエンスに基づく接合菌類の分子系統

四本能尚, 中島伸介, 三川 隆 (三菱化成総研)

12. 酵母情報ベースの実装

宮崎 智, 菅原秀明 (理研・研究情報室)

特別講演

Classification and identification of microorganisms by computer-assisted protein electrophoretic fingerprinting.

K. Kersters (Gent University, Belgium)

シンポジウム「微生物の同定 - 各分野の現状」

1. MRSA の同定と分子疫学

平松啓一 (順天堂大・医)

2. 分離培養が消えた検出同定法

山本啓之 (岐阜大・医)

3. メタン生成細菌の同定-最近の動向

古賀洋介 (産業医科大学)

4. 病原真菌の同定 - 形態学および生物学的性状を中心に

西村和子 (千葉大・真核微生物)

第 14 回 微生物化学分類研究会 (1994.12.9)

一般講演

1. *Sphingomonas* 属細菌および関連細菌の化学分類と分子系統

辛 鏞國 (北里研究所・基礎研・細菌部)

2. 光合成細菌の進化と表現型

永島賢治 (都立大・理・生物)

3. メタン生成細菌における極性脂質の簡易分析による化学分類学的特徴と 16S rRNA の塩基配列にもとづく分子系統群との関連

森井宏幸 (産業医科大学・化学)

4. 菌体抗血清及び菌体外アミラーゼ・プロテアーゼ遺伝子を用いた *Bacillus* 属の分類と同定

信太 治 (ヒゲタ醤油(株)研究所)

5. 接合菌の分類と系統：無性・有性生殖器官の多様性と 18S rRNA シーケンス解析を中心に

三川 隆 (三菱化学(株)横浜総研・応用生物研)

6. 好乾性菌種 *Aspergillus penicillioides* のアイデンティティ：遺伝形質と表現形質から探る

田村美貴 (東大・分生研)

7. リボゾーム蛋白のアミノ酸配列解析による *Pseudomonas* の属および種レベルでの分類

越智幸三 (農水省・食品総合研)

8. 抗酸菌群の種の提案に必要な分類指標

: IWGMT (国際抗酸菌研究グループ) の国際会議の結果を踏まえて (追加講演)

江崎孝行 (岐阜大・医・微生物)

第15回 微生物分類研究会 (1995.10.6-7.)

一般講演

1. 植物根に棲息する蛍光性 *Pseudomonas* の生活と種分化について
長岡一成, 村上浩二, 小柳津広志, 松本 聰 (東大大学院・農・生命科学研)
2. α -Proteobacteria に属する光合成細菌の分類と系統
川崎浩子 (東大・分生研)
3. 新しい分類学的指標としてのリボソーム蛋白の2次元電気泳動パターン
: *Arthrobacter* 属細菌における応用
落合恵子, 鈴木 誠¹, 安藤勝彦, 川本 勲²
(協和発酵・東京研, ¹海洋バイオ研, ²筑波研)
4. Actinobacteria における細胞壁組成の分類学的意義
武内真理子, 横田 明¹, 坂根 健 (財発酵研, ¹東大・分生研)
5. グラム陽性細菌の細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸組成分析法とその分類への応用
佐々木淳子, 鈴木健一郎, 千々松昌男¹ (理研・系統保存, ¹理研・生体分子)
6. 菌体抗血清及び菌体外酵素遺伝子を用いた *Paenibacillus* 属の分類と同定
信太 治, 高木広明, 門脇 清, 駒形和男¹ (ヒゲタ醤油(株)研究所, ¹東農大・農化)
7. *Pyrococcus shinkai* の系統解析: Elongation factor *Tu* を中心にして
増地矢恵子 (東大・先端技術研)
8. 接合菌類 *Basidiobolus* 属菌種の分子系統
長濱統彦, 杉山純多 (東大・分生研)
9. *Thamniaceae* 及び関連接合菌の分類と分子系統
三川 隆, 大原亜紀子, 四本能尚 (三菱化学(株)総合研究所)
10. 葉緑体から見た植物の進化
大塚重人, 多田信夫, 小柳津広志, 松本 聰 (東大大学院・農・生命科学研)

特別講演

1. Understanding speciation in fungi: molecular phylogenetic approaches
Rytas Vilgalys (Dept. Botany, Duke Univ., USA)
2. 分子情報を用いた系統解析
三中信宏 (農水産省・農業環境技術研究所)

第16回 微生物分類研究会 (1996.11.15-16)

一般講演

1. 水田土壌中のメタン生成細菌の生存戦略
宮木太郎, 柴田 哲, 小柳津広志 (東大大学院・農・生命科学研)
2. 韓国海水から分離した *Vibrio alginolyticus* 菌株の DNA-DNA hybridization による類縁関係
朴 眞淑, 朴 準奉¹, 朴 秦亭¹, 鈴木健一郎
(理研・培養生物部, ¹韓南大・微生物)
3. 放線菌の 16S rRNA 塩基配列に基づく系統分類
田村朋彦 (財発酵研)
4. 植物病原性 *Xanthomonas* 属細菌の系統分類の試み
落合弘和, 加来久敏 (農水省・農業生物資源研)
5. 下等菌類の系統 (その1) : 18S rRNA 遺伝子から分子系統を探る
三川 隆, 大原亜紀子, 四本能尚 (三菱化学・横浜総研)

6. 下等菌類の系統（その2）：Elongation Factor 1 α から分子系統を探る
大原亜紀子, 三川 隆, 四本能尚（三菱化学・横浜総研）
7. von Willebrand 因子阻害剤, Sulfobacin A 及び B の生産菌の同定
澤入佐代子, 田中ひとみ, 高谷弘樹, 安齋洋次郎（日本ロシユ(株)・研究所）
8. 好熱性真正細菌と好熱性古細菌のポリアミン構成
浜名康栄（群馬大・医・保健学科）
9. Small subunit rRNA 遺伝子における group I intron の挿入位置とその特徴
- *Tilletiopsis flava* JCM 5186 の SSU rDNA の 3 つの group I intron を中心に
高島昌子, 中瀬 崇（理研・系統保存）
10. *Candida albicans* の染色体核型から見た多様性
岩口伸一, 鈴木孝仁（奈良女子大・理・生物科学）
11. *Dipodascus* 属, *Galactomyces* 属及び *Geotrichum* 属の 18S rRNA 遺伝子塩基配列による系統分類, 及び遺伝子コピー間に見いだされた多型配列
上田久美子, 見方洪三郎（助発酵研）
12. 不完全菌類 *Geosmithia* 属菌種の多系統的起源：18S, 5S, 28S 遺伝子塩基配列からの証拠
小川裕由, 杉山純多（東大・分生研）

特別講演

- gryB 遺伝子による細菌の系統分類に関する研究
山本 敏（海洋研・釜石研）

第 17 回 微生物分類研究会（1997.11.7-8）

一般講演

1. 水の華を形成するシアノバクテリア, *Microcystis* 属の分類に関する再考
大塚重人¹, 須田彰一郎², 李 仁輝³, 渡辺真之⁴, 小柳津広志¹, 松本 聡¹,
渡辺 信⁵（¹東大, ²地球人間環境フォーラム, ³筑波大・生物, ⁴国立科学博物館,
⁵国立環境研）
2. 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づくユレモ目シアノバクテリアの系統解析
石田達也, 横田 明, 杉山純多（東大・分生研）
3. *Microbacterium* 属と *Aureobacterium* 属の統合, 及び *Microbacterium* 属の 7 新種について
武内真理子（助発酵研）
4. 遺伝子型による好気性有胞子細菌の分類学的研究
信太 治, 高木広明, 門脇 清, 駒形和男¹（ヒゲタ醤油(株)研究所, ¹東農大・農）
5. DNA-DNA 相同性によりまとめられた *Leuconostoc mesenteroides* 菌株の種内多様性について
鈴木正人, 岡田早苗¹, 内村 泰, 駒形和男（東農大・農, ¹東農大・菌株保存）
6. 生成乳酸の異性体比に基づく *Lactobacillus sake* の特徴
馬目 章, 岡田早苗¹, 内村 泰, 駒形和男（東農大・農, ¹東農大・菌株保存）
7. マユハキタケ科菌類の分子系統分類
小川裕由, 杉山純多（東大・分生研）
8. SSU 及び LSU rRNA に基づく不等毛ベン毛菌の分子系統
三川 隆, Daniel Lim¹, 大原亜紀子（三菱化学(株)横浜総研, ¹McMaster University）
9. 無色鞭毛藻の形態 捕食特性と系統分類
張 曉明, 野崎久義¹, 三沢計二¹, 渡辺 信（国立環境研, ¹東大大学院・理・生物）

10. 単細胞緑藻 *Chlorogonium* 属の客観的な種の識別基準と種レベルの自然分類体系の確立
野崎久義, 渡辺 信¹ (東大大学院・理・生物, ¹国立環境研究所)
11. 微生物学名データベース ProkaryoBase から地球生物多様性情報へ
志村純子, 一柳義広, 小迫芳正, 弁野義巳, 中瀬 崇 (理研・系統保存)

特別講演

- 藻類：五界説のはざま
井上 勲 (筑波大・生物科学研)

第18回 微生物分類研究会 (1998.10.30-31)

一般講演

1. 水の華を形成する Cyanobacteria 類 *Oscillatoria* の 16S rDNA シーケンスによる分類
須田彰一郎, 渡辺 信¹ (財地球人間環境フォーラム, ¹国立環境研究所)
2. *Arthrobacter* 属細菌の *crystites* 形成について
田中尚人, 内村 泰, 駒形和男 (東農大・応生・微生物)
3. 構造遺伝子配列情報を用いた *Cytophaga/Flavobacterium/Bacteroides* 関連細菌の系統解析及び *Marinilabilia* 属菌種の分類学的研究
鈴木 誠, 中川恭好¹, 山本 敏, 原山重明 (株海洋研・釜石研, ¹財発酵研)
4. インドネシア試料より分離した新しい酢酸菌
山田雄三, 駒形和男 (東農大・応生・微生物)
5. Taxonomic problems with *Helicobacter* spp. - a new and rapidly expanding bacterial genus
Brownwyn Robertson, Adrian Lee (国立環境研)
6. 海洋から分離した好圧性細菌の分類
能木裕一, 加藤千明, 掘越弘毅 (海洋科学技術センター・海洋環境フロンティア)
7. CYBR Green と Light cyclor を使用した GC% の新しい迅速測定方法の開発
許化溪, 江崎孝行, 李 那, 周 振英, 趙 立成, 李 鉄民, 李 治宇, 焦 振全, 河村好章 (岐阜大・医・微生物)
8. 群体性ボルボックス目の葉緑体コード *rbcL* 遺伝子のイントロンの分類と進化
野崎久義, 太田にじ, 山田 隆¹, 高野博嘉² (東大・理, ¹早稲田大・人間科学, ²広島大・醗酵工学)
9. ハプト藻 *Chrysochromulina* 属の分類に関する再考
河地正伸, 井上 勲¹ (国立環境研, ¹筑波大)
10. タイ植物から分離した射出胞子形成酵母-*Tilletiopsis* 属-
高島昌子, 中瀬 崇 (理研・系統保存)
11. *Segenomella* 属子囊菌類の分子系統学的解析
遠藤 稔, N.T. Thanh, 横田明, W. Gams¹, 杉山純多 (東大・分生研, ¹CBS, Netherlands)
12. 18S rDNA 塩基配列に基づく *Ustilaginomycetes* の分子系統関係 (Ustigo 属を中心に)
指田玲子, 三川隆, 柿嶌 眞¹ (三菱化学(株)横浜総研, ¹筑波大・農林)

ポスターセッション

1. フィリピンの一温泉から分離された新規桿菌状好熱性古細菌の分類学的研究
伊藤 隆, 鈴木健一郎, Priscilla C. Sanchez¹, 中瀬 崇
(理研・系統保存, ¹フィリピン大)

2. タイ国熱帯雨林土壌より分離したグラム陽性球菌の分類学的研究
長井信諭, 横田 明, 杉山純多 (東大・分生研)
3. 部分 16S rRNA 遺伝子を用いた *Bacillus* 属細菌の同定法
後藤慶一, 大村朋子, 原 征彦, 定家義人¹ (三井農林株, ¹国立遺伝研)
4. メバロン酸経路は放線菌の分類の指標となりうるか?
葛山智久, 瀬戸治男 (東大・分生研)
5. 特異的阻害剤を用いた非メバロン酸経路の分布の解析
清水知宏, 葛山智久, 瀬戸治男 (東大・分生研)
6. 光合成細菌と非光合成細菌の分類学的接点
内野佳仁, 平田愛子, 横田 明, 杉山純多 (東大・分生研)
7. ユレモ目シアノバクテリアの系統解析
石田達也, 横田 明, 杉山純多 (東大・分生研)
8. 単細胞ラン藻 *Synechococcus* 属の海産株の分子系統と表原形質の比較検討
本多大輔, 横田 明, 杉山純多 (東大・分生研)
9. 微細藻類 *Chlamydomonas* と *Chloromonas* における比較生物学的研究への分子系統解析の適用
森田詠子, 都筑幹夫¹, 野崎久義 (東大・理, ¹東京薬大・生命)
10. Phylogenetic position of rust fungi: evidence from the 18S rDNA sequence analysis
Wellyzar Sjamsuridzal, 西田洋巳, 小川裕由, 柿島 眞¹, 杉山純多
(東大・分生研, ¹筑波大・農林)
11. 接合菌類トリモチカビ目の系統解析
田辺雄彦, K. O'Donnell¹, 犀川政稔², 杉山純多
(東大・分生研, ¹USDA-ARS・NRRL, ²東京学芸大・生物)
12. 酵母を担子菌類, 半子囊菌類, 古生子囊菌類に分類できる PCR プライマーセット
西田洋巳, 杉山純多 (東大・分生研)
13. *Protomyces pachydermans* のイントロンに含まれる ORF の機能をさぐる
小倉 淳, 西田洋巳, 杉山純多 (東大・分生研)
14. 熱帯産耐塩・耐糖性酵母の分離と同定
川崎浩子, 永塚由佳, Savitree Limtong¹, Sri Narki², Bjoko Wibowo², 関 達治
(大阪大学・ICBiotech, ¹Kasetsart Univ., ²Gadjah Mada Univ.)

特別講演

- 分子系統学から遺伝子進化学への展開
齋藤成也 (国立遺伝学研)

第 19 回 微生物分類研究会 (1999.10.29-30)

一般講演

1. ラビリントチュラ類とスラウストキトリウム類の 18S rRNA 遺伝子による分子系統解析
本多大輔^{1,2}, 横地俊弘², 中原東郎², Seshagiri Raghukumar³, 中桐 昭⁴,
Karsten Schaumann⁵, 東原孝規² (¹海洋バイオ研, ²工技院・生命研,
³National Institute of Oceanography, India, ⁴財発酵研,
⁵Alfred-Wegener-Institute für Polar- und Meeresforschung, Germany)

2. 16S rDNA, および groEL 相同遺伝子に基づくシアノバクテリアの系統解析
石田達也¹, 杉山純多^{1,2}, 横田 明¹
(¹東大・分生研, ²現エヌシーアイエムビー・ジャパン)
3. Characterization of new haloalkaliphilic archaeal strains isolated from soda lakes
Huawei Xin^{1,2}, Takashi Itoh¹, Ken-ichiro Suzuki¹, Peijin Zhou², Takashi Nakase¹ (¹Japan Collection Microorganisms, Riken, and ²The Institute of Microbiology, CAS, China)
4. 海洋環境に適合して生息する新規乳酸菌
石川森夫, 中島和之, 山里一英 (東農大・生物・醸造)
5. *Sphingomonas* 属の分割と3新属の提案
武内真理子¹, 浜名康栄², 平石 明³
(¹助発酵研, ²群馬大・医, ³豊橋科技大・エコロジー工)
6. プロテオバクテリアに属する光合成および非光合成細菌の分類
内野佳仁¹, 浜名 徹², 杉山純多^{1,3}, 横田 明¹
(¹東大・分生研, ²海洋バイオ研・釜石研, ³エヌシーアイエムビー・ジャパン)
7. 家庭コンポストから分離された微生物の同定
高桑 進¹, 郭 樹凡¹, 川崎浩子², 関 達治²
(¹京都女子大・自然科学, ²阪大・ICBiotech)
8. PCR 法を用いた環境中微生物の検出法における問題点の検証
井藤大作, 川崎浩子, 関 達治 (阪大・ICBiotech)
9. A new DNA-DNA hybridization method in free solution to determine genetic relatedness among bacterial strains
Hua-Xi Xu, Yoshiaki Kawamura, Na li, Licheng Zhao, Tie-Min Li, Zhi-Yu Li, Shinei Shu, 江崎孝行 (岐阜大・医学部・微生物)

ポスターセッション

1. 微生物とそのゲノム情報：実験科学とコンピュータの協調
西田洋巳 (東大・分生研)
2. *Asaia siamensis* sp. nov. in α -Proteobacteria
桂 一茂¹, 川崎浩子², Wanchern Potacharoen³, 山田雄三¹, 内村 泰¹, 駒形和男¹
(¹東農大・微生物, ²阪大・ICBiotech, ³National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok)
3. Taxonomic heterogeneity of strains comprising *Gluconacetobacter hansenii*
Richard R. Navarro, Tai Uchimura and Kazuo Komagata (東農大・微生物)
4. Systematics of ballistoconidium-forming yeasts isolated from plants in Thailand, and proposal of *Bensingtonia thailandica* sp.nov.
Bundit Fungsin^{1,2}, Makiko Hamamoto², Vullapa Arunpairajana¹, Poonsook Attasampunna¹ and Takashi Nakase² (¹TISTR・Thailand, ²理研・系統保存)
5. Molecular systematic studies of phototrophic bacteria using farnesyl diphosphate synthase
Jose Jason L. Cantera, 小崎真司, 川崎浩子, 関 達治 (阪大・ICBiotech)
6. タイより分離した新しい耐塩性酵母 *Citeromyces siamensis*
永塚由佳¹, 川崎浩子¹, Savitree Limtong², 見方洪三郎³, 関達 治¹
(¹阪大・ICBiotech, ²Kasetsart Univ., ³助発酵研)

7. 熱帯産マメ科樹木根粒形成菌の分子系統解析

- 16S rDNA, *nodA*, *nodD*, *nifH* 遺伝子の比較-

西田 寛¹, 遊佐宏介¹, Titik K. Prana², 川崎浩子¹, 阿部美紀子³, 関 達治¹

(¹ 阪大・ICBiotech, ² Indonesian Ins., Sci., R&D Center Biotech.,

³ 鹿児島大・理・生命科学)

招待講演

Delft school と細菌分類学

駒形和男 (東農大・生物・微生物)

特別講演

1. 細菌の迅速同定法 ; マイクロアレイ法と迅速シーケンス法を使った同定方法

江崎孝行 (岐阜大・医・微生物)

2. 好気性有孢子細菌の新しい分類体系と 16S rRNA 遺伝子および酵素遺伝子の細菌分類学への応用

信太 治 (ヒゲタ醤油(株)・研究開発部)

課題講演

1. マングローブ域に棲息する微生物の多様性とその収集

中桐 昭 (財発酵研)

2. 日本およびフィリピンの温泉から分離した新規好熱性古細菌

伊藤 隆¹, 鈴木健一郎¹, Priscilla C. Sanchez², 中瀬 崇¹

(¹ 理研・系統保存, ² フィリピン大・ロスパニョス校)

3. 藍藻類 (シアノバクテリア) の生態と系統分類

渡辺 信 (国立環境研)

4. 微生物探索同定システム バイオログ

原田勝一郎, 久富康志 (ゲンゼ産業(株))

5. 細菌同定検査キット : アピ シリーズの紹介

高島一雅 (日本ピオメリユー(株))

6. 16S rDNA 配列によるバクテリアの同定・系統解析システム

駒峯律子 (PE バイオシステムズジャパン(株))

第 20 回 微生物分類研究会 (2000.10.27-28)

基調講演

Microbial Systematics - Today and Tomorrow

Kazuo Komagata (Tokyo Univ. of Agriculture)

一般講演

1. Systematic study of basidiomycetous yeasts: (1) Progress through the introduction of molecular phylogenetic perspectives, and (2) Species diversity of ballistoconidium-forming yeasts: the Temperate Zone vs. the Torrid Zone to the subtropics

Makiko Hamamoto and Masako Takashima (JCM, RIKEN)

2. Systematics of the anamorphic yeast genus *Candida*: (1) CUG codon usage, and (2) Chemotaxonomy and molecular phylogeny
Takashi Sugita¹ and Motofumi Suzuki² (¹Meiji Pharm.Univ., ²JCM, *RIKEN*)
3. Phylogenetic diversity of the lower fungi
Takashi Mikawa (Mitsubishi Chem. Co.)
4. What is characteristic of fungal lysine synthesis through the aminoadipic acid pathway?
Hiromi Nishida (Univ. of Tokyo)
5. Species taxonomy and diversity of water bloom-forming cyanobacteria, *Microcystis* spp.
Shigeto Otsuka (Univ. Tokyo)
6. Systematics of the green algae
Takeshi Nakayama (Univ. Tsukuba)
7. The Pinguiphyceae *classis nova*, a new class of chromophyte algae whose members produce large amounts of omega-3 fatty acids
Masanobu Kawachi (NIES)
8. Taxonomic significance of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences in the classification of phototrophic bacteria
Akira Hiraishi (Toyohashi University of Technology)
9. Development of Mol% G+C and quantitative DNA/DNA hybridization methods during 20 years of Japan Society for Microbial Systematics
Takayuki Ezaki (Gifu Univ. School of Medicine)
10. Classification of *Streptomyces* species based on *gyrB* sequences
- Comparative studies of phylogenetic classification based on *gyrB* sequence and phenotypes in the genus *Streptomyces* -
Kazunori Hatano (Institute for Fermentation, Osaka)
11. Chemotaxonomic view of hyperthermophilic archaea
Takashi Ito (JCM, *RIKEN*)

特別講演

1. Molecular phylogeny and systematics of the fungi with special reference to the Asco- and Basidiomycota
Hansjörg Prillinger (Univ. f. Bodenkultur, Austria)
2. Cyanobacteria: In search of an international identity card
Rosmarie Rippka (Pasteur Institute, France)
3. Polyphasic taxonomy in practise: the *Burkholderia cepacia* challenge
Peter A.R. Vandamme (Lab. of Microbiology, Univ. of Ghent, Belgium)



第1回 微生物の化学分類の勉強会 箱根姥子温泉にて (1980.10.9-10)



第3回 微生物の化学分類の勉強会 山梨県河口湖富士桜荘にて (1983.11.12-13)



第2回 微生物の化学分類の勉強会 山梨県勝沼町ぶどうの丘センターにて (1981.4.17-18)



第5回 微生物化学分類研究会 山梨県河口湖富士桜荘にて (1985.10.11)



第6回 微生物化学分類研究会 山梨県河口湖富士桜荘にて (1986.10.8)



第8回 微生物化学分類研究会 熱海市湯河原厚生年金会館にて (1987.11.25)



第7回 微生物化学分類研究会 伊東市ヤクルト本社研修センターにて (1987.11.27)



第9回 微生物化学分類研究会 神戸市舞子ピラにて (1989.12.1)



第10回 微生物化学分類研究会 大洗町ホテルかもめ荘にて (1990.11.28)



第14回 微生物化学分類研究会 伊東市ヤクルト本社研修センターにて (1994.12.9)



第11回 微生物化学分類研究会 熱海市MOA瑞雲会館にて (1991.11.15-16)



第15回 微生物分類研究会 山梨県河口湖富士校にて (1995.10.6-7)



第18回 微生物分類研究会 山梨県河口湖富士桜荘にて (1998.10.30-31)



第19回 微生物分類研究会 大阪市コスモスクエア国際交流センター (1999.10.29-30)

編集後記

私事ながら、大阪大学工学部醗酵工学科の学生時代に箕浦久兵衛先生（故人）の工業微生物学の講義を受けたとき、この分野の仕事だけはすまいと思ったことが今でも鮮明に残っている。しかし、博士課程を中途退学し助手になって何と分類の仕事を拝命して、更に博士論文は DNA 相同性による *Bacillus* 属細菌の分類となってしまった。その後、長らく分類学の仕事から遠ざかっていたが、分類学の講義をする先生が退官で担当することになり、少しは関連した分野の研究もしなくてはとっていた矢先、上田久美子さん（現発酵研究所勤務）が驚くべき馬力で研究をしてくれた。その後、川崎浩子さんに東京大学から助手に来てもらい、研究室の半分を分類の研究に当てることになった。自分が最も苦手とする分野に足をつっこんだのだから人生とは分からないものである。今回、この分類研究会の 20 周年記念誌の編集に携わることができたのも不思議な人生の一つかも知れない。

お忙しい中、非常に限られた期間の中でお願いをした執筆者の方々には心より感謝している。また、編集長である駒形先生には、総ての原稿に目を通していただいたが、それよりもコンピュータで連日校正までお願いし心苦しい限りである。勿論この記念誌ができあがったのは実行委員長である杉山純多先生の情熱のお陰であることを申し上げたい。さらに実行委員の諸先生の多大なるご援助があったことは勿論である。

歴史は、時にはアア歴史と軽んじられることもあるが、歴史は我々先輩が築いた大いなる遺産である。若い研究者の皆さんが、この分類研究会の諸氏が世界にも誇れる業績を残したことをこの記念誌から汲み取って、さらなる発展に結びつけていただければ、編集に携わったものとして大いに喜びとするところである。

（関 達治）

日本の微生物分類学 この20年

2000年10月27日

(非売品)

編集者 微生物分類研究会
創立20周年記念事業
出版委員会
発行者 微生物分類研究会

東京大学分子細胞生物研究所
微生物微細藻類研究分野
〒113-0032
東京都文京区弥生1-1-1
電話 03-5841-7827

