

# ΔTm を利用して DNA の非特異的結合を減らした マイクロプレートハイブリダイゼーション法

—*Mycobacterium szulgai* の DNA 相対類似度の分布と生物・生化学的性状の分布との比較—

深澤 豊

**要旨：** *Mycobacterium szulgai* の生化学的性状による同定法と DDH 法によって得られる結果を比較評価し、より良い同定方法を得るために、13 の指標形質 (key characters) を含む市販の生化学的性状による鑑別同定キットと、江崎らのマイクロプレートハイブリダイゼーション法を比較した。その結果、市販の生化学的性状による鑑別同定キットや江崎らの方法では、*M. szulgai* にも同定の難しい菌株が存在することがわかった。そこで、日本 DNA データバンク等に公開登録されている *M. szulgai* 16S rRNA 遺伝子塩基配列と Philip Kirschner らが提案した塩基配列領域で比較を行い、有意な差異のないことを確認した菌株が、DDH 法で確実に同定できるように条件を検討した。その結果、ハイブリダイゼーションを適切な温度と十分な時間行ってから非特異的 DNA フラグメントの再会合を避けるために温度を上げるとよいことがわかった。ハイブリダイゼーション中に温度を上げることは、ΔTm 測定と類似の効果をj得ているため、この条件で行う DDH 法を ΔDDH 法と名付けた。

**キーワード：** 抗酸菌、同定、分類、DDH、マイクロプレートハイブリダイゼーション、相対類似度、ΔTm

## はじめに

1987年にフランスのパスツール研究所で開催された系統分類細菌学国際命名委員会の Ad Hoc Committee の報告<sup>1)</sup>では、ゲノム DNA の再会合法 (ハイブリダイゼーションの一種) で、DNA-DNA 類似度 70% 以上、ΔTm 5℃未満であるものを同一菌種と定義した。1988年に今枝ら<sup>2)</sup>は、抗酸菌において各基準菌株 (type strain) の間でこの定義がほぼ成立することを報告している。1990年には、江崎ら<sup>3)</sup>が定量的マイクロプレートハイブリダイゼーション法を菌種の分類学的類似度を測定する方法として発表している。1991年には楠ら<sup>4)</sup>がこの定義に基づいた同定方法 (DDH 法) を提案し、キット化製品が国内で市販されている。しかし、現在なお臨床検査室で利用されている生化学的性状を中心にした鑑別同定キットでは鑑別同定できても、DDH 法では同定できない菌株

の存在が知られている。

前提として計数分類法のように「菌種は遺伝学的に連続した個体の集団」と考えて、市販の鑑別同定キットや現在の DDH 法が分類学的同定方法として適切であるかどうかを、結核研究所保存の *M. szulgai* 25 菌株を用いて追試した。その結果、現行の DDH 同定法を、①適切な温度条件に変更してハイブリダイゼーションを行い、②非特異的な DNA の再会合を取り除くために十分な時間をかけたハイブリダイゼーションの、最終の時点で 45℃ から 56℃ に温度を上げてから相対類似度を測定することにより、制度の高い分類学的同定結果が得られることを見出したので報告する。

## 方法と菌株

菌株：使用した菌株の概略を Table 1 に示す。Lab. #052, #054 の 2 菌株は結核研究所に以前に同定依頼された菌

Table 1 Mycobacterial strains used in this study

Strain	Source
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	NIHJ1603 (= ATCC25274)
<i>Mycobacterium avium</i>	ATCC25291
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	Japan BCG Laboratory; strain Tokyo 172
<i>Mycobacterium gordonae</i>	ATCC14470
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	ATCC13950
<i>Mycobacterium kansasii</i>	K-23; from Dr. Saitou; (= ATCC12478)
<i>Mycobacterium malmoense</i>	ATCC29571
<i>Mycobacterium marinum</i>	ATCC927
<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	ATCC19530
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	S-68; from Dr. Saitou; (= ATCC19981)
<i>Mycobacterium shimoidei</i>	ATCC27962
<i>Mycobacterium simiae</i>	from Dr. Saitou; (= ATCC25275)
<i>Mycobacterium szulgai</i> JATA 3201	ATCC35799
<i>Mycobacterium szulgai</i> KK 3201	SZ-1; from Dr. Saitou; (= NCTC10831 = ATCC35799)
<i>Mycobacterium szulgai</i> KK 3202	from NIHJ; (= NCTC10831 = ATCC35799)
<i>Mycobacterium triviale</i>	NIHJ1632; (= ATCC23292)
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	A.19423; from Dr. Tsukamura; (= ATCC19423)
<i>Mycobacterium xenopi</i>	NIHJ1638 (= ATCC19250)
SZ 12001~SZ 12044	from Dr. Tsukamura; identified as <i>M. szulgai</i> by Dr. Tsukamura
T-12104	from Dr. Tsukamura; identified as <i>M. gordonae</i> by Dr. Tsukamura
Lab. # 052	clinical isolate
Lab. # 054	clinical isolate

NIHJ: National Institute of Health, Japan

ATCC: American Type Culture Collection, USA

NCTC: National Collection of Type Cultures, England

株である。菌株 SZ12001~SZ12044 は国立療養所中部病院の東村道雄博士が *M. szulgai* と同定し、結核研究所に分与された菌株である。日本 DNA データバンク等に公開登録されている *M. szulgai* 16S rRNA 遺伝子塩基配列 (Accession No. X52926 と M61665) と、Lab. # 052, # 054, SZ12001~SZ12044 の 16S rRNA 遺伝子塩基配列とは、Philip Kirschner ら<sup>5)</sup>が提案した塩基配列領域で比較を行い、有意な差異のないことを確認している (成績省略)。T-12104 は国立療養所中部病院の東村道雄博士が *M. gordonae* と同定し、結核研究所に分与された菌株である。公開登録されている *M. gordonae* 16S rRNA 遺伝子塩基配列 (Accession No. X52923) と T-12104 の 16S rRNA 遺伝子塩基配列とは、Philip Kirschner らが提案した塩基配列領域<sup>5)</sup>で比較を行い、有意な差異のないことを確認している (成績省略)。KK3201 (SZ-1) と KK3202 は *M. szulgai* 基準菌株 (NCTC10831) 由来菌株としてそれぞれ鳥根医大の斉藤肇博士と国立予防衛生研究所 (現感染研究所) より結核研究所に分与された菌株である。*M. marinum*, *M. szulgai* (JATA3201), *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum*, *M. malmoense*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. shimoidei* は ATCC より結核研究所が購入した基準菌株 (各々 ATCC927, ATCC35799, ATCC14470, ATCC19530, ATCC29571, ATCC25291 (neotype), ATCC13950, ATCC27962) を使用した。*M. kansasii* (K-23), *M. simiae*,

*M. scrofulaceum* (S-68) は鳥根医大の斉藤肇博士より基準株 (各々 ATCC12478, ATCC25275, ATCC19981) 由来菌株として結核研究所が分与を受けた菌株である。*M. xenopi* (NIHJ1638), *M. triviale* (NIHJ1632) は国立予防衛生研究所 (現感染研究所) より基準株 (各々 ATCC19250, ATCC23292) 由来菌株として結核研究所に分与された菌株である。*M. ulcerans* (A.19423) は、国立療養所中部病院の東村道雄博士より結核研究所に分与された基準株 (ATCC19423) 由来菌株である。国立予防衛生研究所 (現感染研究所) より分与された *M. asiaticum* (NIHJ1603) は ATCC25274 由来菌株で、基準菌株ではなく参照菌株である。BCG は Tokyo 172 菌株由来株を使用した。

DNA の精製: DNA の精製は、今枝らの方法<sup>2)</sup>に従った。その要点を述べると、2%変法小川培地に増殖した菌塊を 70%エチルアルコール・1%ツイーン 80 溶液に懸濁後、遠心集菌し、半乾燥させた。この遠心管に直径 4 mm のビーズ約 10 個を加えてヴォルテックスミキサーで攪拌溶菌し、フェノールクロロフォルム抽出後、核酸分画をエタノール沈殿した。0.4 M の NaCl 溶液に溶解し、RNase 処理を行い、CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) 沈殿を行った。沈殿を 1M の NaCl 溶液に溶解後、クロロフォルム抽出を行い、エタノール沈殿を行った。精製度の指標として、260 nm と 280 nm の吸光度比を利用し、この比が 1.8 以上になるまで、CTAB 沈殿と、

クロロフォルム抽出を繰り返した。この精製 DNA を、マイクロプレートハイブリダイゼーションのプレートへの固定およびラベリングに用いた。

生化学的性状検査：生化学的性状検査は、極東抗酸菌鑑別セットを利用し、添付書に従った。なお、硝酸塩還元試験は、上記セットには陽性の場合に黄色に発色する東村法が組み込まれているが、東村法以外に Virtanen 法<sup>6)</sup>を用いた。本論文では硝酸塩還元試験で陽性の場合黄色に発色する東村法を「T method」、赤色に発色する Virtanen 法を「V method」と示した。Virtanen 法を簡潔に述べると、3.4 mg 硝酸ナトリウム/4 ml PBS に菌を懸濁し、37℃ 温浴を 2 時間した後、塩酸水 2 滴、2 mg/ml スルファニルアミド溶液 4 滴、1 mg/ml N-ナフチルエチレンジアミン二塩酸溶液を 4 滴加え、赤色に変化したものを陽性とした。必要に応じて 1 mg/ml N-ナフチルエチレンジアミン二塩酸溶液を追加した<sup>7)</sup>。

マイクロプレートハイブリダイゼーション：今枝ら<sup>2)</sup>は特殊な分光光度計を使って DNA-DNA 類似度を測定しているが、結核研究所にその測定器がないため、マイクロプレートハイブリダイゼーション法でゲノム DNA の相対類似度を測定した。

マイクロプレートハイブリダイゼーション法にもハイブリダイゼーションの条件の異なるいくつかの方法がある。この報告で江崎ら<sup>3)</sup>の方法と呼んでいるのは、ハイブリダイゼーションの時間を 8 時間以上一晩としたものである。ハイブリダイゼーションの温度は、40℃、45℃、56℃で行った。要点を述べると、フォトビオチンラベルし、変性した DNA を 50% フォルムアミド、2×SSC のハイブリダイゼーション溶液で 10 倍に希釈し、すでに参照 DNA が固定されているマイクロプレートのウェルに 100  $\mu$ l ずつ分注した。ハイブリダイゼーションの条件は 40℃、45℃または 56℃で 8 時間以上一晩とし、ウォーターバスで行った。その後 1×SSC で 4 回プレートを洗浄し、ストレプトアビジン- $\beta$  ガラクトシダーゼを PBS で 1000 倍に希釈した溶液を、100  $\mu$ l ずつマイクロプレートのウェルに分注した。約 15 分、37℃で静置後、1×SSC で 4 回プレートを洗浄した。pNPG (パラ-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド) を PBS で 1  $\mu$ g/ml に希釈した溶液を 100  $\mu$ l ずつマイクロプレートのウェルに分注し、25℃で静置した。黄色の発色の程度を、マイクロプレートリーダーを使い波長 405 nm で測定した。今回の改良法 ( $\Delta$ DDH と名付けた) は、江崎らの方法を基に改良したものである。改良点はハイブリダイゼーションを 45℃ (または 40℃) で一晩行い、その後インキュベーターの温度を 56℃にリセットして 30 分以上 1 時間程度、さらにハイブリダイゼーションを行うことである。これにより、以下に述べるごとく菌種内

相対類似度を 70% 以上に保ったまま、菌種間の相対類似度を下げることができた。

## 結 果

生化学的性状検査：結核研究所保存 *M. szulgai* 菌株の主な表現形質を極東抗酸菌鑑別キットで調べた結果を Table 2 に示す。コロニー性状は、多くが R 型コロニーを示したが、3 菌株が S 型コロニーを示した。硝酸塩還元試験 (T method) では、25 菌株中 14 菌株が陰性を示した。しかし、硝酸塩還元試験 (V method) では、25 菌株全菌株が弱陽性以上を示した。ツィーン 80 水解試験では、7 日判定時には 25 菌株全菌株が陰性であったが、14 日判定時には 25 菌株中 17 菌株が陽性になった。

マイクロプレートハイブリダイゼーション：Fig. 1 には、江崎らの方法の結果を示す。ハイブリダイゼーションの最適温度とされている 40℃でマイクロプレートハイブリダイゼーションを行うと、*M. szulgai* 菌株間は 80% 以上の高い菌種内相対類似度を示したが (Fig. 1A)、*M. szulgai* と他菌種の基準菌株との菌種間相対類似度が約 50~75% とかなり高い値を示した (Fig. 1B)。江崎らはハイブリダイゼーションの最適温度として、GC% が 60% の時に約 40℃を提案しているが、類縁菌種が存在する場合には温度を上げることも提案しているため、45℃、56℃でも行った。ハイブリダイゼーション温度 45℃では、40℃より基準菌株間相対類似度は低くなり約 50% 以下となったが、菌種内相対類似度も低くなり、最低の相対類似度が約 65% となった (成績省略)。ハイブリダイゼーション温度 56℃では *M. szulgai* 基準菌株 (JATA3201) と比較して、基準菌株間相対類似度は 25% 以下と低くなった (Fig. 1D)。しかし、*M. szulgai* の菌種内相対類似度は 75% 付近を中心に最低が 25% までとかなり大きなばらつきがみられた (Fig. 1C)。

一方 40℃一晩後 56℃に温度を上げて測定した  $\Delta$ DDH 法では、菌種内相対類似度は全菌株が 80% 以上 (Fig. 2A) を示したが、基準菌株間相対類似度は 70% 以下と低い値を示した (Fig. 2B)。45℃一晩後 56℃に温度を上げて測定すると、*M. szulgai* 菌種内相対類似度は全菌株 70% 以上と高い値を示したが (Fig. 2C)、基準菌株間相対類似度は 25% 以下と低い値を示した (Fig. 2D)。これらの結果から、45℃-56℃による  $\Delta$ DHH 法が最も優れていると思われる。

## 考 察

細菌学では国際命名委員会により、分類体系を 1 つのものとする努力が払われている。実際に各方法論による分類 (同定) も、詳細に比較検討するとよく一致してることが多いといわれている。しかし、臨床検査レベル

Table 2 Chemotaxonomic characters

	Growth after 3 days	Colony morphology	Colony colour	Niacin production	Tolerance to 0.5 mg/ml PNB	Scotchromogenicity	Photochromogenicity	Nitrate reduction (T method)	Nitrate reduction (V method)	Tween 80 hydrolysis (7 days)	Tween 80 hydrolysis (14 days)	Tolerance to 5 µg/ml ethanbutol	Tolerance to 0.1% picric acid	Degradation of PAS (7 days)	Degradation of PAS (14 days)	Tolerance to NH <sub>2</sub> OH.HCl	Growth at 25 °C	Growth at 37 °C	Growth at 42 °C	Growth at 45 °C
SZ12001	-	R	Y	-	+	+	-	±	+	-	-	+	-	-	-	±	+	+	-	-
SZ12002	-	R	Y	-	+	+	-	±	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12003	-	R	Y	-	+	+	-	±	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12004	-	R	Y	-	+	+	-	±	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
SZ12010	-	R	Y	-	+	+	-	+	±↑	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12015	-	R	Y	-	+	+	-	±	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12016	-	R	Y	-	+	+	-	±	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12017	-	R	Y	-	+	+	-	±	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12022	-	R	Y	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12023	-	R	Y	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12024	-	R	Y	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12029	-	R	Y	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
SZ12034	-	R	Y	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12035	-	R	Y	-	+	+	-	+	±↑	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12036	-	R	Y	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	±	+	+	-	-
SZ12037	-	S	Y	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12038	-	SR	Y	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12039	-	R	Y	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	±	+	+	-	-
SZ12042	-	R	Y	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
SZ12044	-	R	Y	-	+	+	-	-	±↑	-	-	-	-	-	-	±	+	+	-	-
KK3201	-	S	Y	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
KK3202	-	R	Y	-	+	+	-	-	±↑	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
JATA3201	-	S	Y	-	+	+	-	-	±↑	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
# 052	-	R	Y	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
# 054	-	R	Y	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>M. gordonae</i>	-	S	Y	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	±	+	+	-	-

R: rough, S: smooth, Y: yellow

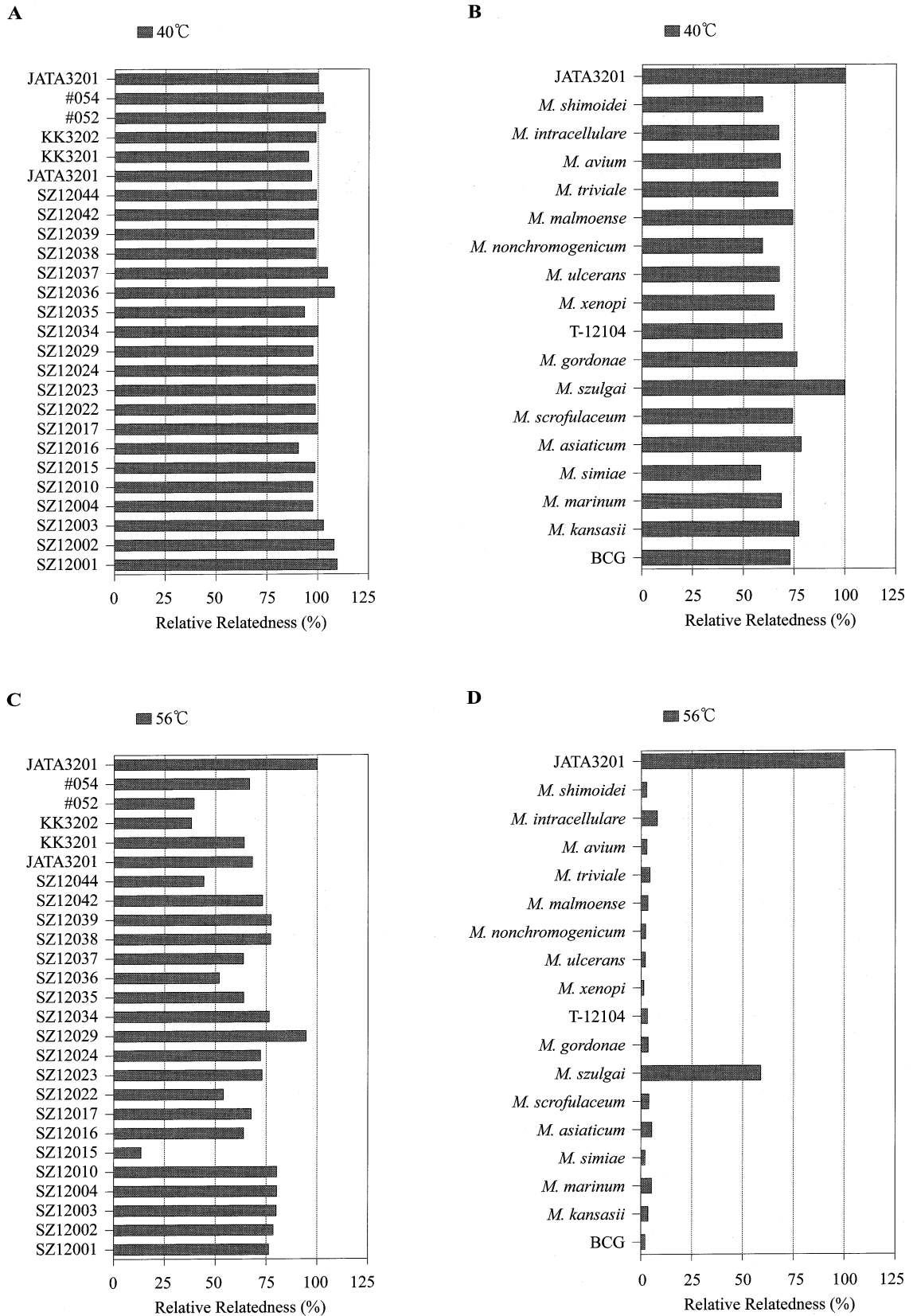
↑: After addition of powdered zinc, it appears red colour.

T method: Tsukamura's method for nitrate reduction test

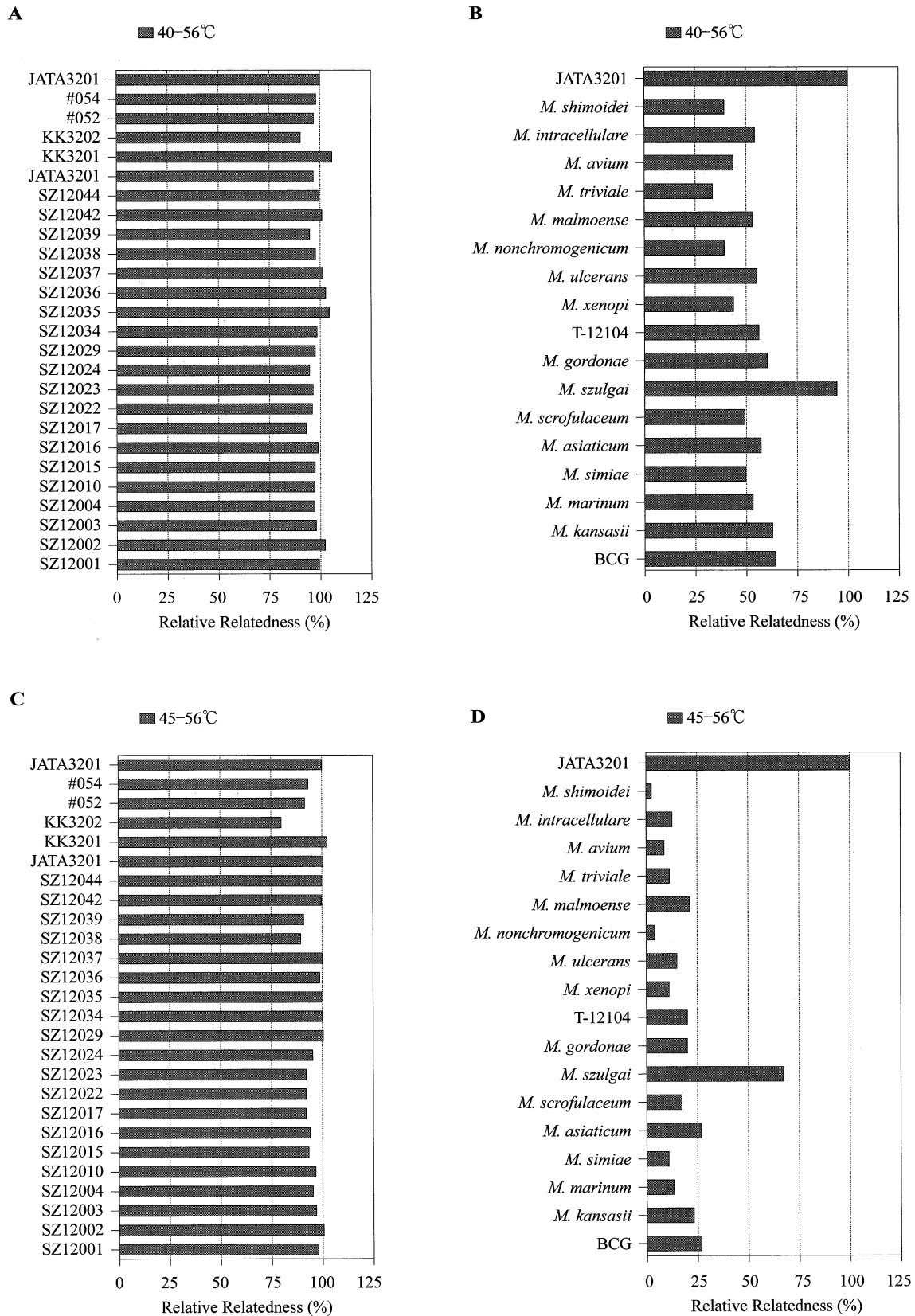
V method: Virtanen's method for nitrate reduction test

では、同定には多数の検体を扱え、なおかつ作業のしやすい鑑別法が一般的に使われている。このため、判定できない菌株が生じても、鑑別同定法の精度が問題なのか、新菌種なのか、菌種の定義が問題なのか判らない。たとえば、伝統的分類法に従った極東抗酸菌鑑別キットでは、*M. gordonae* と *M. szulgai* とはコロニー性状、硝酸塩還元試験、ツィーン80水解試験の成績で鑑別することになっているが、今回の検討では Table 2 で示したように *M. szulgai* には S 型 R 型両方のコロニー性状があり、硝酸塩還元試験が T method では陽性と陰性と両方存在し、判定基準から外れる菌株が存在することが示された。なお *M. szulgai* の硝酸塩還元試験を V method で調べるとすべての菌株が弱陽性以上を示した。

同様の不確かさはこれまでのマイクロプレートハイブリダイゼーション法でも認められる。著者は結核研究所保存菌株で相対類似度の菌種内変動幅がどの程度かを江崎らの方法で調べてきた<sup>7-9)</sup>。その結果、ハイブリダイゼーションの条件次第では、菌種内相対類似度の変動幅が30%を超えることが判った。ハイブリダイゼーションに十分低い温度で十分な時間をかければ、菌種内変動幅は30%以下になり、全株が80%以上の相対類似度を示した (Fig. 1A)。しかし、このような条件下では他菌種と同菌種との相対類似度の差が小さくなり (Fig. 1B)、鑑別判定が困難となる。異菌種 DNA の非特異的再会合を減らすためにハイブリダイゼーションの温度を上げると、鑑別判定できない菌株が生じてしまう (Fig. 1C)。



**Fig. 1** Relative relatedness by Ezaki's method at 40°C and 56°C  
 A and C show intra-species relative relatedness against *M. szulgai* JATA3201.  
 B and D show inter-species relative relatedness against *M. szulgai* JATA3201.



**Fig. 2** Relative relatedness by  $\Delta$ DDH  
 A and C show intra-species relative relatedness against *M. szulgai* JATA3201.  
 B and D show inter-species relative relatedness against *M. szulgai* JATA3201.

ここで、国際分類委員会の1987年の定義「DNA-DNA類似度70%以上で $\Delta T_m$  5℃以下」に従えば、 $\Delta T_m$ を測定することになる。 $\Delta T_m$ とは「一般に非特異的なDNAの再会合は、特異的な再会合をしたDNA断片よりも低い温度で変性するが、この温度差を測定した値」である。 $\Delta T_m$ は国際分類委員会の菌種の定義の項目でありながら、測定の煩雑さや費用などのために特別の場合を除き、実際には測定されていない。結核研究所にも $\Delta T_m$ 測定器がないことと、 $\Delta T_m$ 測定では多数の検体を扱うことが難しいことから、著者はマイクロプレートハイブリダイゼーション法に $\Delta T_m$ の意味を付け加えた相対類似度測定法( $\Delta DDH$ と名付けた。なお結核病学会では温度上昇 $DDH$ と名付けて報告したが<sup>7)</sup>、その後「 $\Delta T_m$ を考慮した $DDH$ 」ということから $\Delta DDH$ とした)を考案した。実際にハイブリダイゼーションの最後に温度を上げてみると、同菌種の菌株のみが高い相対類似度を示すことが明らかとなり、非特異的な再会合を減らすことに成功した(Fig. 2)。

ハイブリダイゼーションの条件次第では、相対類似度の菌種内変動幅が30%を超える理由としては、①ゲノムDNAのすべてが機能を持った遺伝子ではないことと、②抗酸菌の増殖様式が無性生殖であるため、有性生殖を行う生物種にみられる遺伝的浮動(genetic drift)のような集団内変異を抑えるシステムが存在しないこと、③菌種の進化メカニズムとして提案されている水平遺伝子伝達(horizontal gene transfer)<sup>10)11)</sup>等により、DNAが一度細胞に取り込まれても脱落も起こりやすいことなどが可能性として考えられる。

この報告で、「菌種は遺伝学的に連続な個体の集団であり、個々の個体の表現形質は多様である」という仮説の視覚化と実証とを試みた。しかし、国際分類委員会の1987年の定義「DNA-DNA類似度70%以上で $\Delta T_m$  5℃以下」を用いた時の結果と、今回の $\Delta DDH$ 法による結果との比較は、別に行う必要があるかもしれない。なお、主な遅発抗酸菌基準菌株間の $\Delta DDH$ 法による測定結果は次報で示す。また、今回は調べなかった他の抗酸菌群や、最近報告され表現形質が*M. gordonae*に似ている*M. interjectum*<sup>12)13)</sup>についても、 $\Delta DDH$ 法適用により、菌種の定義や概念に役立つ結果が得られるのか否かも、検討課題として残されている。*M. gordonae*の血清型と $\Delta DDH$ 法で測定した相対類似度との相関を、各基準菌株で調べることも必要であろう。

## 謝 辞

本研究は、著者が財団法人結核予防会結核研究所細菌学科(所長森亨先生、基礎研究部長阿部千代治先生、同

細菌学科長高橋光良先生)に勤務時に行った研究を、本部総務部に人事異動後まとめたものである。また、投稿に当たり、結核研究所顧問の岩井和郎先生、同免疫学科総括主任の土井教生先生に御指導をいただいた。この場を借りて各先生方に謝意を表すものである。

## 文 献

- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, et al.: Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol.* 1987; 37: 463-464.
- Imaeda T, Broslawski G, Imaeda S: Genomic relatedness among mycobacterial species by nonisotopic blot hybridization. *Int J Syst Bacteriol.* 1988; 38: 151-156.
- 江崎孝之, Shatha Adnan, 三宅正実: 菌種の分類学的類似度を測定する定量的マイクロプレートハイブリダイゼーション法. *日本細菌学会誌.* 1990; 45: 851-857.
- Kusunoki S, Ezaki T, Tamesada M, et al.: Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 Mycobacterium Species. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 1596-1603.
- Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al.: Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 2882-2889.
- Virtanen S: A study of nitrate reduction by mycobacteria. *Acta. Tuberc Scand Suppl.* 1960; 48: 1-119.
- 深澤 豊, 高橋光良, 阿部千代治, 他: *M. szulgai* の鑑別同定. 第71回実験結核研究会演題発表. 平成13年; 抄録集, 8-9.
- 深澤 豊, 高橋光良, 阿部千代治, 他: *M. xenopi* の16S rRNA gene 配列変異菌株について. 第69回実験結核研究会演題発表. 平成11年; 抄録集, 12.
- 深澤 豊, 高橋光良, 阿部千代治, 他: 水道水より分離した非結核性抗酸菌を用いての同定方法の比較. 第70回実験結核研究会演題発表. 平成12年; 抄録集, 40-41.
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA: Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature.* 2000; 405: 299-304.
- Lawrence JG, Ochman H: Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 9413-9417.
- Springer B, Kirschner P, Rost-Meyer G, et al.: *Mycobacterium interjectum*, a new species isolated from a patient with chronic lymphadenitis. *J Clin Microbiol.* 1993; 31: 3083-3089.
- Wayne LG, Good RC, Boettger EC, et al.: Semantide- and chemotaxonomy-based analyses of some problematic phenotypic clusters of slowly growing mycobacteria, a cooperative study of the international working group on mycobacterial taxonomy. *Int J Syst Bacteriol.* 1996; 46: 280-297.

## Original Article

MICROPLATE HYBRIDIZATION METHODS OF  
REDUCED UNSPECIFIC REASSOCIATION CONSIDERING  $\Delta T_m$   
—Comparison between Relative Relatedness of DNA and  
Key Characters for *Mycobacterium szulgai*—

Yutaka FUKASAWA

**Abstract** It has been recognized that colorimetric microdilution plate hybridization method (DDH) shows equivocal identification results for some strains of *Mycobacterium gordonae*, and that chemotaxonomic identification method reveals some intermediate pattern between *Mycobacterium szulgai* and *M. gordonae*. In the present study, the results obtained by chemotaxonomic identification method on 25 strains of *M. szulgai* were compared with those obtained by DDH method. In chemotaxonomic methods, 8 of 25 *M. szulgai* strains showed negative results on 14 days' tween 80 hydrolysis, 14 strains revealed negative nitrate reduction by the Tsukamura's method but all were positive by the Virtanen's method. Smooth colonies were found in 3 strains including *M. szulgai* type strain, JATA 3201 (ATCC 35799).

Relative relatedness (relative color index) of genomic DNA was measured by DDH instead of spectrophotometric genomic DNA-DNA relatedness. A relative relatedness of 25 *M. szulgai* strains tested showed higher levels than 80%, but the inter-species relatedness to the other mycobacteria also showed high levels of 50–75%, when hybridizing temperature was set at 40 °C. At 56 °C, intra-species relative relatedness in 4 strains were lower than 50%, indicating that this condition is not appropriate.

When hybridization temperature raised to 56 °C after overnight at 40 °C, a relative relatedness among 25 strains were again high (>80%), and those to the other Mycobacterial species were lower than 70%. When hybridized at 56 °C after overnight at 45 °C, an intra-species relative relatedness again showed higher levels than 70% in all 25 strains, and inter-species percentiles were lowered satisfactorily to <25%.

In conclusion, through avoiding reassociation of nonspecific DNA fragments during the hybridization process, 45 °C overnight followed by 56 °C hybridization ( $\Delta$  DDH method) was found to be the better condition for identification and classification of *Mycobacterium szulgai*.

**Key words:** *Mycobacterium*, Identification, Classification, DDH, Microplate hybridization, Relative relatedness,  $\Delta T_m$

Main Office, Japan Anti-tuberculosis Association

Correspondence to : Yutaka Fukasawa, Department of Microbiology and Bioinformatics, Gifu University Graduate School of Medicine, 40, Tsukasa-machi, Gifu-shi, Gifu 500-8705 Japan. (E-mail: h2801105@guedu.cc.gifu-u.ac.jp)