

ΔTm を考慮したマイクロプレートハイブリダイゼーション (ΔDDH) 法による抗酸菌主要11菌種の相対類似度

深澤 豊

要旨：以前より生化学的性状、16S rRNA 遺伝子塩基配列とゲノム DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる相対類似度 (relative color index) でみられる *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium gordonae* と *Mycobacterium szulgai* の菌種内変異について検討し、一定温度のゲノム DNA-DNA 再会合では抗酸菌種の分類のためには不適當であること、ΔTm を応用するとよいことを確認してきた。この改良方法を ΔDDH 法と名付けた。

この報告では、1987年の Ad Hoc Committee の DNA-DNA 類似度による菌種の定義に従った今枝らの方法と比較するために、ΔDDH 法を用いて主要な抗酸菌 11 菌種の基準菌株間の相対類似度を測定した。その結果、主な菌種は十分低い相対類似度を示し、今枝らの結果とよく一致した。しかし、「*Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* コンプレックス」と「*M. marinum* と *M. ulcerans*」の結果は、さらなる検討の必要性を示した。

キーワード：非結核性抗酸菌、同定、分類、DDH、ΔTm、相対類似度

はじめに

現在の細菌分類体系はいくつもの方法論により築かれており、各方法により別の分類体系を構築することすら可能である。細菌学では国際命名委員会により、一つの分類体系を維持する努力が払われている。また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くることが多いといわれている¹⁾。

著者は「菌種は分類体系における最小集団で、これ以上遺伝学的には分けられない、あるいは分けるのが不適當な集団である」との前提に立って、結核研究所保存抗酸菌株を用いて分類 (同定) 方法についての検討を重ねてきた^{2)~5)}。その結果、楠らによる方法⁶⁾は鑑別同定に有用な方法であっても、分類 (同定) を目的とした時には問題があると思われたので、より適切な分類 (同定) を行うための方法を考案した。すなわち、ハイブリダイゼーションは適切な温度で行い、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

ゼーションの最後に温度を上げて、ゲノム DNA-DNA 類似度 (相対類似度) を測定するとよいことが分かり、この DDH 法の改良法を ΔDDH 法と名付けて報告した⁷⁾。本研究では、1987年の Ad Hoc Committee の DNA-DNA 類似度による菌種の定義に従った今枝らの方法⁸⁾と比較するために、ΔDDH 法を用いて主要な抗酸菌 11 菌種の基準菌株間の相対類似度を測定し、その成績から、楠らの方法では鑑別同定できなかった抗酸菌株の分類学的位置付け (同定) について考察を行った。

方 法

菌株：使用した菌株の概略を Table に示す。NS1, SY5 は結核研究所水道水より分離した。T-12104 は国立療養所中部病院の東村道雄博士が同定し、結核研究所に参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. gordonae* 16S rRNA 遺伝子塩基配列 (Accession No. X52923) と、NS1, SY5, T-12104 の 16S rRNA 遺伝子塩基配列とは、Philip Kirschner ら⁹⁾が提案

Table Mycobacterial strains used in this study

| Strain | Source |
|---------------------------------------|---|
| <i>Mycobacterium asiaticum</i> | NIHJ1603 (=ATCC25274) |
| <i>Mycobacterium avium</i> | ATCC25291 (Neotype) |
| <i>Mycobacterium bovis</i> BCG | Japan BCG Laboratory; strain Tokyo 172 |
| <i>Mycobacterium gordonae</i> | ATCC14470 (TMC1324) |
| <i>Mycobacterium intracellulare</i> | ATCC13950 (TMC1406) |
| <i>Mycobacterium kansasii</i> | K-23; from Dr. Saitou; (=ATCC12478=TMC1204) |
| <i>Mycobacterium marinum</i> | ATCC927 (TMC1218) |
| <i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> | ATCC19530 (TMC1481) |
| <i>Mycobacterium scrofulaceum</i> | S-68; from Dr. Saitou; (=ATCC19981=TMC1323) |
| <i>Mycobacterium simiae</i> | from Dr. Saitou; (=ATCC25275) |
| <i>Mycobacterium szulgai</i> JATA3201 | ATCC35799 (TMC1328) |
| <i>Mycobacterium ulcerans</i> | A. 19423; from Dr. Tsukamura; (=ATCC19423) |
| <i>Mycobacterium xenopi</i> | NIHJ1638 (=ATCC19250=TMC1482) |
| T-12104 | from Dr. Tsukamura; identified as <i>M. gordonae</i> by Dr. Tsukamura |
| NS 1 | environmental isolate |
| SY 5 | environmental isolate |

NIHJ: National Institute of Health, Japan

ATCC: American Type Culture Collection, USA

TMC: Trudeau Mycobacterial Culture Collection, USA

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)。*M. marinum*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum*, *M. avium*, *M. intracellulare* は ATCC より結核研究所が購入した基準株〔各々 ATCC927 (TMC1218), ATCC35799 (TMC1328), ATCC 14470 (TMC1324), ATCC19530 (TMC1481), ATCC 25291 (Neotype), ATCC13950 (TMC1406)〕を使用した。*M. kansasii* (K-23), *M. simiae*, *M. scrofulaceum* (S-68) は 島根医大の斉藤肇博士より基準株〔各々 ATCC12478 (TMC1204), ATCC25275 (今枝らと異なる), ATCC 19981 (TMC1323)〕由来菌株として結核研究所に分与された菌株である。*M. xenopi* (NIHJ1638) は国立予防衛生研究所(現感染研究所)より基準株〔ATCC19250 (TMC 1482)〕由来菌株として結核研究所に分与を受けた菌株である。*M. ulcerans* (A.19423) は、国立療養所中部病院の東村道雄博士より基準株(ATCC19423)由来菌株として結核研究所に分与された。国立予防衛生研究所(現感染研究所)より分与を受けた *M. asiaticum* (NIHJ1603) は ATCC25274 (TMC803) 由来菌株で、基準株ではなく参照菌株である(今枝らと異なる)。BCG は Tokyo 172 株由来菌株を使用した。

DNA の精製: DNA の精製は、前報告⁷⁾と同じである。要約すると、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4mmのビーズ約10個を加えてヴォルテックスミキサーで溶菌し、フェノールクロロホルム抽出後、核酸分画をエタノール沈殿した。0.4M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、クロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿を行った。精製度の指標として、260nmと280nm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、クロロホ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。

ΔDDH法: フォトビオチンラベルし、変性したDNAを50%ホルムアミド、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100μlずつ分注した。ハイブリダイゼーションは温度45℃で1晩行った後、ウォーターバスの温度を56℃にリセットして30分以上1時間ほど、さらにハイブリダイゼーションを行った。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-βガラクトシダーゼ溶液を1000倍にPBSで希釈した溶液を100μl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-β-D-ガラクトピラノシド) をPBSで1μg/mlに希釈した溶液を100μlずつマイクロプレートのウェルに分注し、25℃で静置して、黄色の発色の程度を、マイクロプレートリーダーで波長405nmで測定した。

結 果

抗酸菌基準株11菌株、BCG, *M. asiaticum* 参照菌株間の相対類似度をΔDDH法で測定した結果をFig. 1およびFig. 2に示す。Fig. 1で示した菌種、BCG, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. asiaticum*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M.*

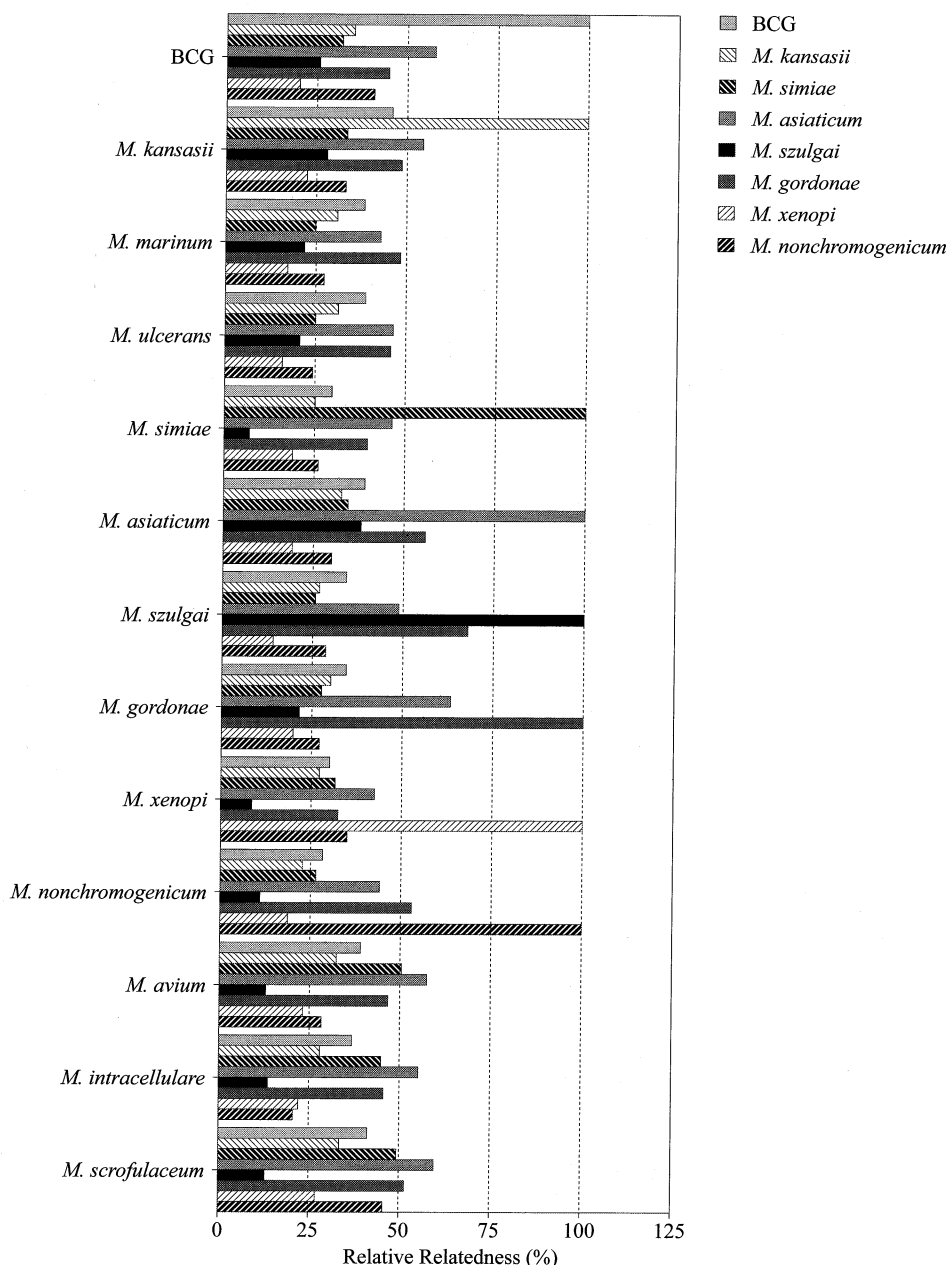


Fig. 1 Relative relatedness among mycobacterial type strains by Δ DDH (1)

xenopi, *M. nonchromogenicum* は、今回調べた範囲では、他菌種株との相対類似度は多くの場合50%以下で、高くても約70%である。これに対して、Fig. 2で示してある *M. marinum* と *M. ulcerans* では *M. marinum* に対して *M. ulcerans* は約90%、逆に *M. ulcerans* に対して *M. marinum* は約65%の相対類似度となった。また、*M. avium* complex (MAC) では、*M. avium* に対して *M. intracellulare* は75%以上、*M. intracellulare* に対して *M. avium* は約75%の相対類似度を示した。さらに、*M. scrofulaceum* に対して、*M. avium* と *M. intracellulare* は約70%という高い相対類似度を示した。しかし、*M. avium* や *M. intracellulare*

に対して *M. scrofulaceum* は50%以下の相対類似度しか示さなかった。

Fig. 3では、T-12104, NS1, SY5を例にとり、 Δ DDH法で同定を試みた例を示す。*M. gordonae* 基準株のDNAをラベルしてハイブリダイゼーションを行うと、T-12104とNS1の相対類似度は基準株の相対類似度を100%とした場合に各々約70%と約75%であった。T-12104のDNAをラベルして行うと *M. gordonae* 基準株とNS1の相対類似度はT-12104を対照として100%とした場合にどちらも約85%だった。NS1のDNAをラベルして行うと *M. gordonae* 基準株とT-12104の相対類似度は各々

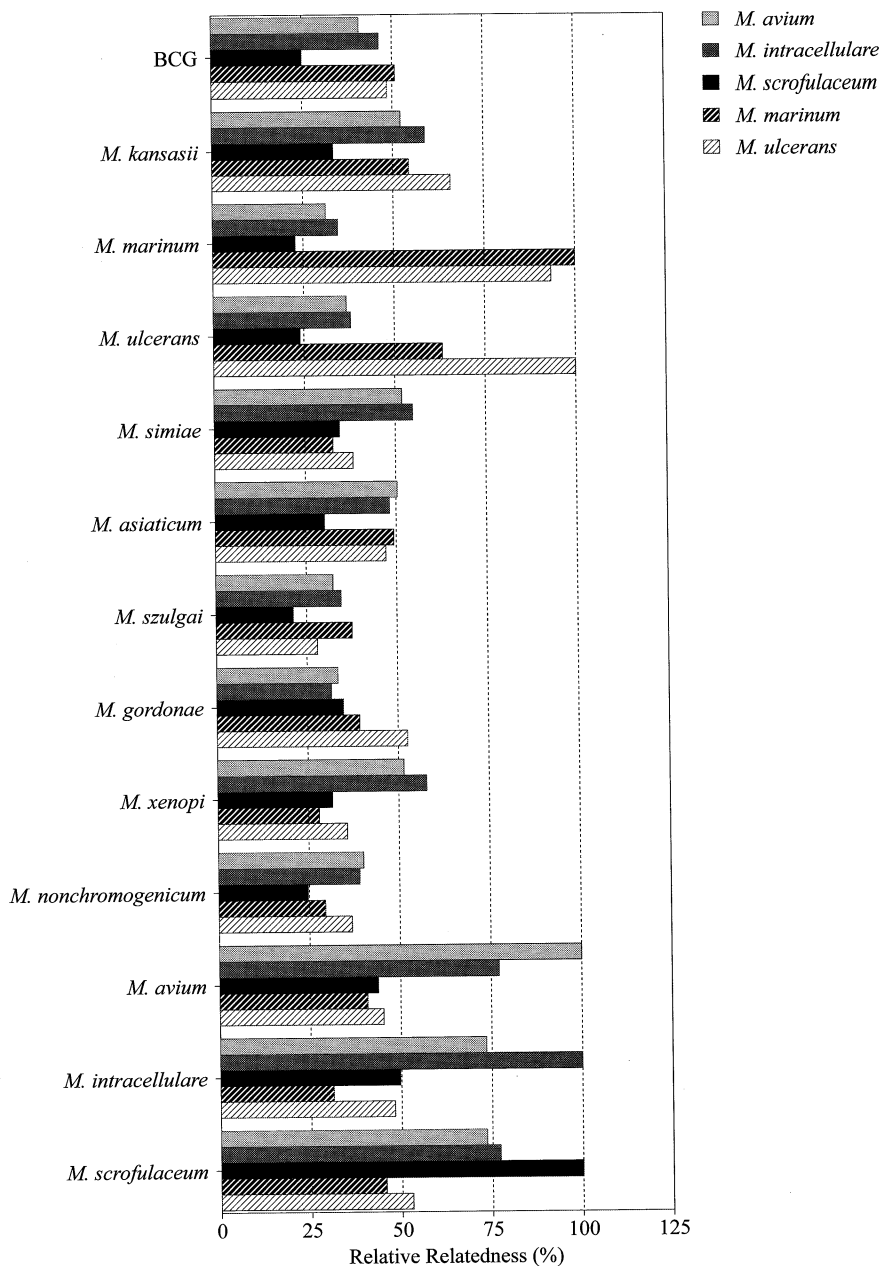


Fig. 2 Relative relatedness among mycobacterial type strains by Δ DDH (2)

約75%と約85%であった。これらは Ad Hoc Committee の提案である「70%以上のホモロジーのあるものを同菌種とする」定義¹⁰⁾にあてはまる。ただし、SY5 は表現形質や 16S rRNA 配列の比較から現分類体系では *M. gordonae* 以外には該当する菌種はないと思われるが (成績省略), *M. gordonae* 基準株, T-12104, NS1 の DNA をラベルして行くと SY5 の相対類似度は70%以下, SY5 の DNA をラベルして行くと *M. gordonae* 基準株が約70%, T-12104 が約100%, NS1 が約80%の相対類似度を示した。この菌株の分類学的位置については今後検討する余地がある。

考 察

今枝ら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、可能なかぎり今枝と同じ菌株を使い、今枝らが報告した類似度⁸⁾と Δ DDH 法で得た相対類似度との比較を試みた。その結果、今回調べた基準菌株は今枝らが報告した類似度と同様に相対類似度でもよく分かれている。今枝らが報告した類似度と相対類似度の数値の違いは、ハイブリダイゼーション条件と類似度の算出法の違いによると思われる。

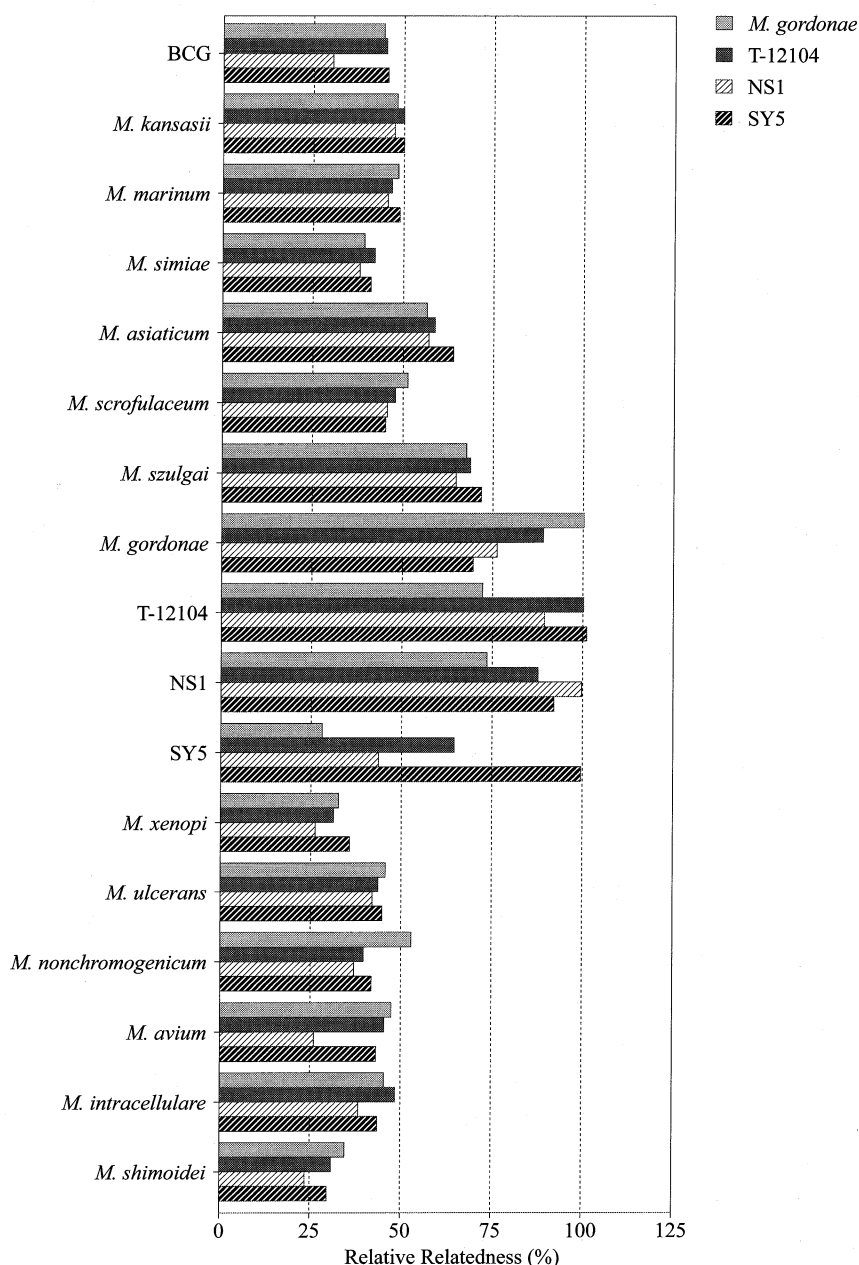


Fig. 3 Relative relatedness against *M. gordonae* variation strains by Δ DDH

現在の抗酸菌の分類体系は、主に4種類の分類学的方法論に基づく考え方を背景に作り上げられていると思われる。まず第1に「菌種を特徴付ける性状」で菌種を決めていく方法 (systematics and new systematics, 伝統的 分類法とこの論文では呼ぶ) では、「その菌種を特徴付 ける性状 (形質) を持つ個体の集団」と理解できる。第 2の方法論として計数 (数値・数量) 分類法 (numerical classification) がある。特定の形質に重点を置くのでは なく、数多くの性状を測定し、そのクラスター化から客 観的に菌種を定義しようとした方法¹¹⁾で、「菌種はクラ スターを形成する集団」と理解できる。第3に化学的分

類法をあげることができる。この方法は菌体の各種構成 成分の構造、分布、含有率の測定結果を基に、菌種相互 の相同性・類似度を求める方法論である。ミコール酸分 類やゲノム DNA のハイブリダイゼーションで測定され る DNA-DNA 類似度による分類などがある。1987年の Ad Hoc Committee の報告¹⁰⁾では、ゲノム DNA の再会合 法でホモロジー70%以上、 ΔT_m 5℃未満のものを同一 菌種と定義している。第4の方法論として、特定の遺伝 子に着目した方法があり、多くの生物種で16S rRNA の 遺伝子の塩基配列の相違から種を定義する試みが行われ ている⁹⁾。しかし、比較する遺伝子あるいは遺伝子の領

域によって、異なる系統図(分岐図)が推定される場合がある^{12)~14)}。系統分類を行うにあたり、ゲノムの全塩基配列を決定して比較することができればよいが¹⁰⁾、現実にはまだ無理といえる。そこで特定の遺伝子や遺伝子領域だけの塩基配列の比較や、ゲノム DNA のハイブリダイゼーション法などによって、ゲノムの全塩基配列の比較による分類(同定)の代用をしていると推測できる。特定の遺伝子の塩基配列比較法とゲノム DNA のハイブリダイゼーション法とは、どちらの方法も系統分類法としては一長一短で、一概には優劣はつけられない。なお、臨床検査で行う同定方法は、経済性(採算)等を全く考慮していない系統分類法ではなく、検体の種類と検査に必要な時間と費用、同定方法の技術的難易度などの問題を考慮した検索表や鑑別法等を利用するのが妥当と考えている。その例として、市販の鑑別同定キットや特異核酸プローブ等をあげることができる。

遺伝子(DNA)レベルでの最近のゲノム研究から、細菌の進化メカニズムとして水平遺伝子伝達(Horizontal gene transfer)¹⁵⁾¹⁶⁾が提案されている。今回の実験で、その例かもしれない分類群が抗酸菌にも存在することが示された。まず *M. marinum* に対して *M. ulcerans* は約90%、逆に *M. ulcerans* に対して *M. marinum* は約65%の相対類似度となった(Fig. 2)。この結果から、*M. marinum* に水平遺伝子伝達により新たな遺伝子を含めた DNA を獲得したのが *M. ulcerans* である可能性が考えられる。あるいは逆に *M. ulcerans* のゲノムに大規模な DNA の脱落が起こったのが *M. marinum* であるのかもしれない。また、かつて *M. avium-intracellulare-scrofulaceum* (MAIS) complex が提唱されたこともあるが、今回の検索でもそのような近縁関係を示すかのように、*M. scrofulaceum* に対して *M. avium* と *M. intracellulare* は約70%という高い相対類似度を示した。しかし、*M. avium* や *M. intracellulare* に対して *M. scrofulaceum* は50%以下の相対類似度を示した。*Escherichia coli* などの腸内細菌では、病原性因子の水平伝達あるいは抵抗性因子の脱落により病原性が獲得されてゆくという見方が報告¹⁵⁾されている。*M. avium* complex の人に対する病原性は *M. scrofulaceum* より高いことと考え合わせると、*M. scrofulaceum* のある個体に病原性遺伝子(群)の水平伝達が起こり *M. avium* complex へと分化したのかもしれない。同様に、Fig. 1 に示してある *M. gordonae* と *M. szulgai* の関係にも水平遺伝子伝達か脱落が関与していることが可能性として考えられる。抗酸菌の病原性が遺伝子レベルの研究で明確にされることが望まれる。

M. avium と *M. intracellulare* とは、相対類似度が互いに70%と高い値を示していたが、この2つのグループは亜菌種の関係か、あるいは別菌種なのか、今回の基準

菌株だけの結果では判断できない。*M. avium* と *M. intracellulare* との間には、中間の性状を示す中間型と呼ばれる菌株が存在するといわれているので、今後菌株数を増やして検討してみたい。

Fig. 3 で検討の対象とした4菌株については、他菌種との相対類似度を求めた。*M. gordonae* 基準菌株、T-12104, NS1 は、Ad Hoc Committee が提案した定義にあてはまり、*M. gordonae* と同定して問題はないと思われる。しかし、SY5 菌株は16S rRNA 遺伝子塩基配列比較から *M. gordonae* 以外には該当する菌種はないと思われるのに、*M. gordonae* 基準菌株、T-12104, NS1 の SY5 に対する相対類似度は70%以下となり、SY5 の *M. gordonae* 基準菌株、T-12104, NS1 に対する相対類似度は70%以上を示した。SY5 もまた、*M. gordonae* から水平遺伝子伝達により進化した菌株かもしれない。獲得した遺伝子は、進化的時間ではすぐに脱落してしまう確率が高いことも示唆されている¹⁶⁾ため、SY5 の分類学的位置付け(同定)は慎重に検討してみたい。病原性 *M. gordonae* として近年報告されている菌株についても、SY5 のような相対類似度のパターンを示すのかどうか、あるいは水平遺伝子伝達によって病原性因子を獲得した系統であるのかどうか、機会があれば検討してみたい。

最後に「菌種は分類体系における最小集団で、これ以上遺伝学的には分けられない、あるいは分けるのが不適當な集団である」という実験の前提について、少し説明したい。基準菌株を決めるときには、可能なかぎりもっとも典型的な性状のものを選ぶように慎重にしておき、基準菌株はその菌種の象徴あるいは代表である。しかし、タイプ標本とは異なり、基準菌株は継代培養されることがある。継代培養によって菌株の性状が変わることが報告されており¹⁷⁾¹⁸⁾、この事実は抗酸菌でも牛型結核菌のBCG 菌株でよく知られている。そこで計数分類法では、菌種の特定の形質、性状、遺伝子等に高い分類学的意味を置かず、「各菌株の多数の形質や性状を比較し、類似の程度を数値化した結果、クラスターを形成する集団」として表現されている¹¹⁾¹⁹⁾。ここで述べるまでもなく、属以上の高次分類群では特定の形質、性状、遺伝子等に高い分類学的意味が置かれている。しかし種レベルの分類群では、伝統的分類法のように特定の性状、形質、遺伝子等に分類学的意味をおいた菌種の定義ではなく、計数分類法や Δ DDH法のように性状、形質、遺伝子を集団的にとらえた菌種の定義のほうが系統分類学の方法として妥当ではないかとも考えられる。

謝 辞

本研究は、著者が結核予防会結核研究所細菌学科(研究所長森亨先生、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に御指導いただいた。この場を借りて各先生方に深謝する。

文 献

- 1) 東村道雄：抗酸菌の分類学の現状と問題点。臨床検査。1990；34：395-399。
- 2) 深澤 豊，高橋光良，阿部千代治，他：マイクロプレートハイブリダイゼーション法による抗酸菌の鑑別一種内の相対類似度の変化一。第15回臨床抗酸菌研究会演題発表。平成4年；講演内容，16-19。
- 3) 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。
- 4) 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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 深澤 豊： ΔT_m 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一。結核。2002；77：539-546。
- 8) Imaeda T, Broslawski G, Imaeda S: Genomic relatedness among mycobacterial species by nonisotopic blot hybridization. Int J Syst Bacteriol. 1988；38：151-156。
- 9) 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。
- 10) 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。
- 11) Tsukamura M: Appendix. In: Identification of mycobacteria, The Mycobacteriosis Research Laboratory of the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474, Japan, in 1984。
- 12) Gingeras TR, Ghandour G, Wang E, et al.: Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition of genetic *Mycobacterium* DNA arrays. Genome Res. 1988；8：435-448。
- 13) Stone BB, Nietupski RM, Breton G, et al.: Comparison of *Mycobacterium* 23S rRNA sequences by high-temperature reverse transcription and PCR. Int J Syst Bacteriol. 1995；45：811-819。
- 14) Pitulle C, Dorsch M, Kazda J, et al.: Phylogeny of rapidly growing members of the genus *Mycobacterium*. Int J Syst Bacteriol. 1992；42：337-343。
- 15) Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA: Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature. 2000；405：299-304。
- 16) Lawrence JG, Ochman H: Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. Proc Natl Acad Sci USA. 1998；95：9413-9417。
- 17) Cooper VS, Lenski RE: Population genetics of ecological specialization in evolving *Escherichia coli* populations. Nature. 2000；407：736-739。
- 18) Holt RD: Use it or lose it. Nature. 2000；407：689-690。
- 19) 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

RELATIVE RELATEDNESS OF 11 MYCOBACTERIA SPECIES
BY MICROPLATE HYBRIDIZATION METHODS CONSIDERING ΔT_m

Yutaka FUKASAWA

Abstract Intra-species variance within *Mycobacterium xenopi*, *Mycobacterium gordonae* or *Mycobacterium szulgai* has been reported in identification employing chemotaxonomic characteristics, 16S rRNA gene sequences or relative relatedness (relative color index) of genomic DNA-DNA Hybridization. Genomic DNA-DNA reassociation at the constant temperature was found to be unreliable for classification of mycobacterial species. However, nonspecific DNA reassociation could be avoided by hybridization at 56 °C after 45 °C overnight, and this technique was named Δ DDH method in the preceding paper.

The present report shows relative relatedness (relative color index) of genomic DNA in Δ DDH method among mycobacterial species. Relative relatedness was below 70% among BCG, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. asiaticum*, *M. szulgai*, *M. gordonae*, *M. xenopi* and *M. nonchromogenicum*. The results satisfied the criteria for bacterial classification, which was proposed by the International Committee for Systematic Bacteriology in 1987. In regard to *Mycobacterium avium* complex, relative relatedness between *M. avium* and *M. intracellulare* were approximately 75%. It appeared that *M. avium* and *M. intracellulare* could be classified into one species. It has been recognized, moreover, that there are

intermediate strains between *M. avium* and *M. intracellulare*.

Previously, numerical classification raised a concept of *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum* complex. The present study revealed that relative relatedness of *M. avium* and of *M. intracellulare* to *M. scrofulaceum* were around 75%, while the percentiles of *M. scrofulaceum* relative to *M. avium* and that to *M. intracellulare* were both less than 50%. The relative relatedness of *M. ulcerans* against *M. marinum* was nearly 65%, whereas the relative relatedness of *M. marinum* against *M. ulcerans* was approximately 90%. The data may be partly explained by the horizontal gene transfer mechanism.

Key words: Mycobacterium, Identification, Classification, Microplate hybridization, ΔT_m , Relative relatedness

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)