

## *Mycobacterium szulgai* と *Mycobacterium malmoense* における 相対類似度と 16S rRNA 遺伝子部分配列ホモロジーの比較

深澤 豊

**要旨：**16S rRNA 遺伝子の前半部分(約500b)の公開塩基配列とのホモロジーと、条件を変えた DDH 法 ( $\Delta$ DDH法) による相対類似度から得た同定結果との比較を、結核研究所保存の *Mycobacterium szulgai* 24 菌株と *Mycobacterium malmoense* 15 菌株を用いて行った。比較実験の前提として「菌種は遺伝学的に連続した個体の集団,あるいは遺伝学的にわけるのが不適当な個体の集団である」と考えた。その結果,①16S rRNA 遺伝子配列約500bpの比較による市販ソフト GENETYX-MAC (version 8.0) によるホモロジーでは,遺伝子の領域によっては,過った結論を出してしまう菌株があること,②2 菌種の間では特定の位置の塩基の相違がみられた。

**キーワード：**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, 16S リボソーム遺伝子, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium malmoense*

菌種は,1987年の Ad Hoc Committeeの報告<sup>1)</sup>で「ゲノム DNA の再会合法で, DNA-DNA 類似度 70% 以上,  $\Delta T_m$  5°C 未満であるものを同一菌種」と定義されている。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 1988 年に報告している。その後,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的類似度を測定する方法として発表し,楠ら<sup>4)</sup>がこの定義に基づいた鑑別同定方法 (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と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。著者はより高い分類学的同定結果が得られるように条件を変えた DDH 法<sup>5)6)</sup>を報告した。他方で,16S rRNA の遺伝子の塩基配列の相違を利用した鑑別同定方法が Kirschner ら<sup>7)</sup>, Springer ら<sup>8)</sup>によって提案され,精度管理されたデータベースが Turenne ら<sup>9)</sup>によって提案されている。

そこで,条件を変えた DDH 法 ( $\Delta$ DDH 法<sup>5)6)</sup> による相対類似度から得た同定結果と,16S rRNA 遺伝子の前

半部分(約500b)の塩基配列の公開配列とのホモロジーとの比較を,結核研究所保存の *Mycobacterium szulgai* 24 菌株と *Mycobacterium malmoense* 15 菌株を用いて行った。その結果,16S rRNA 遺伝子配列約500bpの比較によるホモロジーでは,遺伝子の領域によっては過った結論を出してしまうことがあることを確認した。

まず,江崎らの方法を基に改良した  $\Delta$ DDH 法<sup>5)6)</sup> を利用して得た相対類似度の結果を Fig. に示す。ハイブリダイゼーションの最適温度とされている 40°C で一晩 (8 時間以上) マイクロプレートハイブリダイゼーションを行った後,続けて 53°C で約 1 時間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* 菌株間および *M. malmoense* 菌株間の相対類似度は 80% 以上の高い値であった (Fig.) が,他菌種の相対類似度も高く,最大で約 70% であった。ハイブリダイゼーションを 45°C で一晩行った後 53°C に上げると,他菌種の相対類似度は *M. asiaticum* の約 40% を除き,30% 以下と低くなったが,菌種内の相対類似度が約 50% から約 120% と値のばらつきが大きくなった (成績省略)。

次に,基本的に Kirschner らの方法<sup>7)</sup>に従い 16S rRNA

岐阜大学大学院医学研究科・独立専攻,再生医科学再生分子統御学講座,微生物・バイオインフォマティクス部門

連絡先: 深澤 豊,岐阜大学大学院医学研究科・独立専攻,再生医科学再生分子統御学講座,微生物・バイオインフォマティクス部門,〒500-8705 岐阜県岐阜市司町 40 (E-mail: h2801105@guedu.cc.gifu-u.ac.jp)

(Received 22 Oct. 2002/Accepted 15 Jan. 2003)

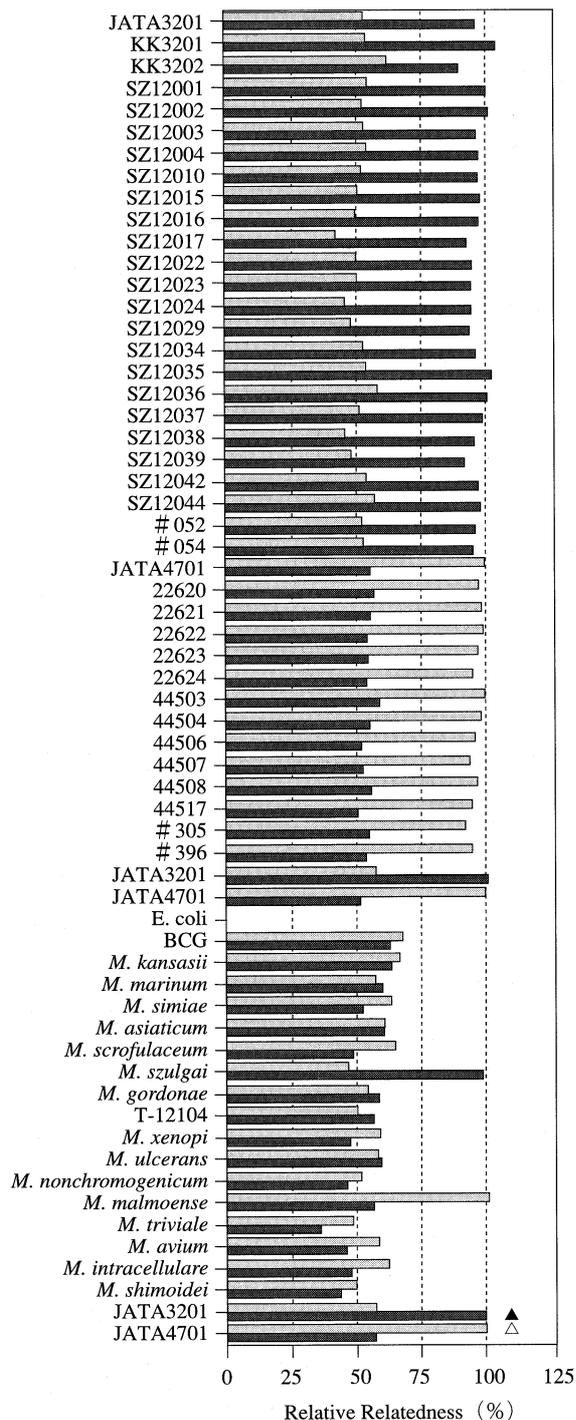


Fig. Relative Relatedness by  $\Delta$ DDH at 40°C–53°C

■ shows relative relatedness against *M. malmoense* JATA4701 (△).  
 ■ shows relative relatedness against *M. szulgai* JATA3201 (▲).

遺伝子の増幅および塩基配列を決定し、*M. szulgai*および*M. malmoense*の16S rRNA遺伝子の公開登録配列〔各々 X52926, X52930; 日本DNAデータバンク (DDBJ)よりインターネット (www.ddbj.nig.ac.jp) 経由で抽出〕と各菌種の16S rRNA遺伝子とのホモロジーを市販ソフ

ト GENETYX-MAC; version 8.0 (ギャップペナルティーは1, Nペナルティーは0.5)で求めた結果をTableに示す。塩基ポジション51~588を比較したところ、わずか0.2%ではあるが正しい菌種ではないほうに高いホモロジーを示す配列(44504, 44517, #305)がみられた。塩基ポジション31~568では、ほとんどの配列は正しい菌種の公開登録配列のほうに高いホモロジーを示したが、同値(96.0%)の配列(SZ12004)もあった。そこで、*M. szulgai*と*M. malmoense*の16S rRNA遺伝子配列を比較したところ、Kirschnerらが示した*M. malmoense*公開登録配列X52930のポジション134以外に2菌種の塩基相違がポジション38, 40, 47, 49にみられた。これらのポジションの塩基は調べた範囲内の菌株で保存されていた。系統分類学で利用されている解析ソフト、ClustalXで求めたphylip distanceでも、この傾向は変わらなかった(成績省略)。このように約500bpの塩基配列でも、領域が異なると正しい菌種が一番高いホモロジーを示すとは限らないという結果を確認した。なおRIDOMデータベース<sup>9)</sup>を利用したところ、今回調べた菌株のアクセッションナンバーX5930の塩基ポジション51~588に相当する部分塩基配列は正しい菌種名に対するスコアが一番高かった(成績省略)。

Stackebrandtら<sup>10)</sup>も16S rRNAの領域によりホモロジーが変わることは報告しているので、16S rRNA遺伝子の塩基配列で菌種を検索・鑑別同定するためには、ホモロジーよりも、Kirschnerらが示したように、特定のポジションの塩基の違いのほうがより確実であるかもしれないと思われる。また、RIDOMのように精度管理されたデータベースを利用すれば、16S rRNAの塩基配列を利用した検索・鑑別同定は可能かもしれない。データベースの精度管理のためには、計数分類法や菌種の定義であるゲノムハイブリダイゼーションを行って正しく同定された菌種の塩基配列を調べる必要があるのではないかと考えられる。なお、波多ら<sup>11)</sup>によりDNAマイクロアレイでゲノムDNAハイブリダイゼーションを行う方法が検討されており、稀な非結核性抗酸菌の鑑別同定には16S rRNA遺伝子の塩基配列比較よりも便利かもしれない。しかし、抗酸菌も菌種の数が増え、新しい稀な抗酸菌を1つの方法で検索・鑑別同定するのは至難となりつつあると考えられる。そこで、16S rRNA遺伝子の塩基配列は非常に多数の菌種や菌株のデータが公開データベースに登録・蓄積されているので、たとえ菌種まで正確に鑑別できなくても、鑑別同定するための対象グループを絞り込むための検索に16S rRNA遺伝子の塩基配列の利用を試みることは決して無駄ではないと考えられる。なお、基本的に16S rRNA遺伝子の塩基配列は分子系統分類には適さない<sup>12)13)</sup>が、機会

Table Homology

Species	Strain number	16S rRNA gene					Homology Search by GENETYX-MAC					
		Position					Position 31–568		Position 51–588		Position 31–588	
		38	40	47	49	134	to X52930	to X52926	to X52930	to X52926	to X52930	to X52926
<i>M. malmoense</i>	JATA4701	T	N	A	A	A	94.7	93.7	95.0	94.8	94.7	93.7
<i>M. malmoense</i>	22620	T	T	A	A	A	95.4	94.1	91.7	91.7	95.4	94.1
<i>M. malmoense</i>	22621	T	T	A	A	A	92.3	91.6	92.9	92.9	92.3	91.6
<i>M. malmoense</i>	22622	T	T	A	A	A	95.9	95.0	95.8	95.8	95.9	95.0
<i>M. malmoense</i>	22623	T	T	A	A	A	92.8	92.2	92.9	93.3	92.8	92.2
<i>M. malmoense</i>	22624	T	T	A	A	A	95.6	94.7	95.8	95.8	95.9	94.7
<i>M. malmoense</i>	44503	T	T	A	A	A	95.6	94.7	95.4	95.4	95.6	94.7
<i>M. malmoense</i>	44504	T	T	A	A	A	98.0	97.2	98.0	98.2	98.0	97.2
<i>M. malmoense</i>	44505	T	T	A	A	A	95.3	94.4	95.1	95.1	95.3	94.4
<i>M. malmoense</i>	44506	T	T	A	A	A	95.8	94.7	95.6	95.4	95.8	94.7
<i>M. malmoense</i>	44507	T	T	A	A	A	95.8	94.7	95.6	95.4	95.8	94.7
<i>M. malmoense</i>	44508	T	T	A	A	A	96.5	95.6	96.3	96.3	96.5	95.6
<i>M. malmoense</i>	44517	T	T	A	A	A	94.9	94.2	94.7	94.9	94.9	94.2
<i>M. malmoense</i>	#305	T	T	A	A	A	98.0	97.2	98.1	98.3	98.0	97.2
<i>M. malmoense</i>	#396	ND	ND	ND	ND	A	96.5	96.5	96.1	96.1	96.5	96.5
<i>M. szulgai</i>	JATA3201	C	C	G	G	G	98.5	99.1	99.1	99.4	98.5	99.1
<i>M. szulgai</i>	KK3201	C	C	G	G	G	97.6	98.1	98.1	98.5	97.6	98.1
<i>M. szulgai</i>	KK3202	C	C	G	G	G	95.7	96.5	96.3	96.9	95.7	96.5
<i>M. szulgai</i>	SZ12001	C	C	G	G	G	94.9	95.4	95.4	95.8	94.9	95.4
<i>M. szulgai</i>	SZ12002	C	C	G	G	G	98.1	98.7	98.7	99.1	98.1	98.7
<i>M. szulgai</i>	SZ12003	C	C	G	G	G	97.6	98.1	98.1	98.5	97.6	98.1
<i>M. szulgai</i>	SZ12004	C	C	G	G	G	96.0	96.0	96.5	96.3	96.0	96.0
<i>M. szulgai</i>	SZ12010	C	C	G	G	G	96.1	96.5	96.7	96.8	96.1	96.5
<i>M. szulgai</i>	SZ12015	C	C	G	G	G	89.3	89.8	89.8	90.2	89.3	89.8
<i>M. szulgai</i>	SZ12016	C	C	G	G	G	97.8	98.3	98.3	98.7	97.8	98.3
<i>M. szulgai</i>	SZ12017	C	C	G	G	G	97.2	97.8	97.8	98.1	97.2	97.8
<i>M. szulgai</i>	SZ12022	C	C	G	G	G	98.1	98.7	98.9	99.3	98.1	98.7
<i>M. szulgai</i>	SZ12023	C	C	G	G	G	98.0	98.5	98.5	98.9	98.0	98.5
<i>M. szulgai</i>	SZ12024	C	C	G	G	G	96.8	97.4	97.4	97.8	96.8	97.4
<i>M. szulgai</i>	SZ12029	C	C	G	G	G	97.2	97.8	97.8	98.1	97.2	97.8
<i>M. szulgai</i>	SZ12034	C	C	G	G	G	96.8	97.4	97.4	97.8	96.8	97.4
<i>M. szulgai</i>	SZ12035	C	C	G	G	G	98.1	98.7	98.7	99.1	98.1	98.7
<i>M. szulgai</i>	SZ12036	C	C	G	G	G	97.4	98.0	98.0	98.3	97.4	98.0
<i>M. szulgai</i>	SZ12037	C	C	G	G	G	97.8	98.1	98.3	98.5	97.8	98.1
<i>M. szulgai</i>	SZ12038	C	C	G	G	G	97.8	98.7	98.3	99.1	97.8	98.7
<i>M. szulgai</i>	SZ12039	C	C	G	G	G	97.2	97.8	98.0	98.3	97.2	97.8
<i>M. szulgai</i>	SZ12042	C	C	G	G	G	97.0	98.0	97.6	98.3	97.0	98.0
<i>M. szulgai</i>	#052	C	C	G	G	G	95.7	96.3	96.8	97.2	95.7	96.3
<i>M. szulgai</i>	#054	C	C	G	G	G	98.5	99.1	99.1	99.4	98.5	99.1
<i>M. gordonae</i>	M29563	C	–	G	G	A	94.6	95.4	95.5	95.5	94.6	95.4
<i>M. gordonae</i>	X52923	C	C	G	N	A	96.5	96.1	97.4	96.7	96.5	96.1
<i>M. tuberculosis</i>	X52917	T	T	A	A	G	97.2	96.7	97.0	97.4	97.2	96.7
<i>M. szulgai</i>	X52926	C	C	G	N	G	98.3	100.0	99.3	100.0	98.3	100.0
<i>M. malmoense</i>	X52930	T	T	A	A	A	100.0	98.3	100.0	99.3	100.0	98.3

M29563: accession number of public DNA database, M29563 is *M. gordonae* 16S rRNA gene

X52923: accession number of public DNA database, X52923 is *M. gordonae* 16S rRNA gene

X52917: accession number of public DNA database, X52917 is *M. tuberculosis* 16S rRNA gene

X52926: accession number of public DNA database, X52926 is *M. szulgai* 16S rRNA gene

X52930: accession number of public DNA database, X52930 is *M. malmoense* 16S rRNA gene

ND: no data, because decided sequence data is short.

–: deletion

Position: nucleotide position corresponding X52930

があれば生物種<sup>14)</sup>の概念だけでなく、分子進化学理論を適用したい。

### 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、岐阜大学大学院医学研究科に進学後まとめたものである。この場を借りて各先生方に謝意を表すものである。

### 文 献

- 1) 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.
- 2) Imaeda T, Broslawski G, Imaeda S: Genomic relatedness among mycobacterial species by nonisotopic blot hybridization. *Int J Syst Bacteriol.* 1988; 38: 151-156.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 深澤 豊:  $\Delta T_m$ 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. *結核.* 2002; 77: 539-546.
- 6) 深澤 豊:  $\Delta T_m$ を考慮したマイクロプレートハイブリダイゼーション( $\Delta DDH$ )法による抗酸菌主要11菌種の相対類似度. *結核.* 2002; 77: 547-554.
- 7) 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.
- 8) Springer B, Stockman L, Teschner K, et al.: Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 296-303.
- 9) Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al.: Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence database: identifying nontuberculous *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3637-3648.
- 10) Stackebrandt E, Goebel BM: Taxonomic Note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol.* 1994; 44: 846-849.
- 11) 波多宏幸, 河村好章, 江崎孝行: DNAマイクロアレイを用いた全染色体DNA-DNA類似度の計測条件について(第75回日本細菌学会総会演題発表)平成14年; *日本細菌学雑誌.* 2001; 57: 219.
- 12) 堀 寛, 大沢省三: メタバクテリア(後生細菌). 「分子進化学入門」, 初版, 木村資生編, 培風館, 東京, 1984, 154-160.
- 13) 長谷川政美, 岸野洋久: リボソームRNAの系統樹と問題点. 「分子系統学」, 初版(第4刷), 岩波書店, 東京, 1996(1998), 224-226.
- 14) Liu W-T, Stahl DA: Molecular Approaches for the Measurement of Density, Diversity, and Phylogeny. In: *Manual of Environmental Microbiology*, 2nd ed., Hurst CJ (Chief editors), ASM PRESS, Washington DC, 2002, 114-134.

## Short Report

COMPARISON BETWEEN RELATIVE ANALOGY AND HOMOLOGY  
OF 16S rRNA PARTIAL SEQUENCES BETWEEN  
*MYCOBACTERIUM SZULGAI* AND *MYCOBACTERIUM MALMOENSE*

Yutaka FUKASAWA

**Abstract** A lot of nucleotide sequences of some genes, especially 16S rRNA gene, are registered in the public database. In order to identify clinical mycobacterial strains, 16S rRNA gene partial nucleotide sequences from 15 strains of *Mycobacterium malmoense* and 24 strains of *Mycobacterium szulgai* which are stored in the Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti-Tuberculosis Association were determined. Then homology of the sequences to the data of type strains submitted to public database were determined. Relative analogy to type strains by  $\Delta$ DDH was also measured.

In the area of nucleotide position 51–588 corresponding accession number X52930 which is *Mycobacterium malmoense* type strain 16S rRNA gene sequence data, the homology of some partial sequences with *Mycobacterium malmoense* strains to data of accession number X52930 were lower than that with *Mycobacterium szulgai* type strain data, accession number X52926. In the area of nucleotide position 31–568 or nucleotide position 31–588, the homology of all nucleotide sequence data to collect species data of type strains were higher than the homology to another species data. Nucleotide position 38, 40, 47 and 49 might be differential nucleotides conserved between *Mycobacterium malmoense* strains and *Mycobacterium szulgai* one.

These results suggest that homology of about 500bp's 16S rRNA gene nucleotide sequence data may not be enough for differential identification. Nevertheless, database of RIDOM, Ribosomal differentiation of Medical Microorganisms, identified partial nucleotide sequences between nucleotide position 51–588 corresponding accession number X52930 correctly, though some were lower than 97% homology (data not shown). Therefore quality-controlled 16S rRNA gene nucleotide sequence database could be used for differential identification.

**Key words:** Microplate hybridization, Relative analogy, 16S rRNA gene, *Mycobacterium szulgai*, *Mycobacterium malmoense*

Department of Microbiology and Bioinformatics, Gifu University Graduate School of Medicine

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)