

真菌の分類と同定 2

DNA 塩基配列を用いたカビ・酵母の同定

Identification of molds and yeasts by DNA sequence

ごとう けい いち
後藤 慶一
Keiichi GOTO

要 旨

近年、微生物の同定に DNA 塩基配列が、学術研究の分野に留まらず企業の品質管理の現場でも頻繁に用いられるようになってきた。DNA による同定はさまざまな長所を有しており、その利用が微生物同定を特別な技術から、微生物学や分子生物学の基本的な知識を有する者ならば手軽に行えるものにしたと言っても過言ではないが、その反面、長所のみが先行して、必要な知識や留意事項が忘れられがちである。特にカビにおいては、DNA を取り扱う上での知識は言うに及ばず、分類学的な背景や、結果を正しく解釈するバイオインフォマティクスの知識などが要求される。

そもそも DNA 塩基配列を用いた同定は、細菌において、16S rRNA 遺伝子および染色体 DNA の類似度の間に相関があり、同種であれば 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は同じで（あるいは酷似）、種が異なると塩基配列も異なる（例外もある）ことが明らかにされたことにより、その有効性が示された。酵母においても同じような過程を経て、リボゾーム関連遺伝子の塩基配列が有効であることが示された。一方、カビにおいては、リボゾーム関連遺伝子と染色体 DNA の類似度との関連性はあまり実証されてはいないが、同じ菌類である酵母で塩基配列を用いた同定の有効性が示されていることもあり、カビの同定にも応用されるようになってきている。

DNA 塩基配列が微生物の同定に利用されはじめて約 20 年が経過し、その間、実際に同定する場面でいろいろな問題が生じてきている。解決されているものも少なくないが、分類学上の概念にかかわる

事項など、依然として更なる議論・検討が必要な課題もある。このような背景を理解し、利便性の高い DNA 塩基配列を有効に微生物、特にカビの同定に利用されることが望ましい。

はじめに

同定とは、未知の生物を分類および命名により定義された既存の分類体系と比較して学名を決めることである。分類学に対する考え方には生物の種類や分類群ごとに諸説あるが、同定には合理的な分類体系を参照しなければならない。また、分類と同定の手法は結果的に重複する場合があるが、分類では分類群が対象であるのに対し、同定では個体が対象である。それゆえ、同定には概して生物の純粋な個体を得ることが大切となる。

さて、微生物の同定は、その微生物の形態的特徴に基づき、帰納的思考によって、段階的・複合的になされる。その指標は多数あるが、1960 年頃より DNA が着目され、これが非常に優れた分類指標であることが認められるようになった。そして、リボゾーム RNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統分類学的な研究の進展とともに、この遺伝子が微生物の同定指標としても広く用いられてるようになった。他方、生物の識別を一つの指標で行うと判断を誤る可能性があるため、複数の独立した指標に基づいて多面的に捉える多相分類学的なアプローチが近年提案されている。微生物の同定を行うに当たっても、複合的な同定指標により得られた結果を総合的に考察し、結論を得ることが望ましいが、実際的には、同定の対象となる微生物と求めるレベル（種、属など）に応じて、適切な同定指標が採用される（図 1）。す

指標	科	属	種	株
生理・生化学的性状	←.....	←.....▶
キノン	←.....▶		
菌体脂肪酸	←.....▶		
遺伝子	DNA塩基組成	←.....▶	
	染色体DNA類似度		←.....▶
	16S rDNA塩基配列	←.....▶	
	26/28S rDNA塩基配列	←.....▶	
	ITS1領域塩基配列	←.....▶	
	DNAの多型解析		←.....▶
	RAPD解析		←.....▶
	AFLP解析		←.....▶
	PCR法 (特定遺伝子検出)		←.....▶
	LAMP法		←.....▶

図1 分類・同定のための指標

すべての微生物に共通した同定法はないが、現在のところ、DNA (特にリボゾーム DNA) が最も普遍的に利用できる同定指標である。

本報では、カビと酵母を中心に、DNA 塩基配列を用いた同定の利点と課題、さらに実用面での注意事項などについて解説する。

I. DNA を用いた細菌の同定

細菌は非常に大きさが小さい上に形態的な特徴に乏しく、それらの差だけでは属や種を定義することが難しい。そのため、形態的な特徴に加え、細菌が有する酵素 (一次的) やその代謝産物 (二次的) に基づく表現形質 (生理・生化学的性状) の違いに基づいて細菌の分類、同定が行われてきた。これらの指標は現在でも分類や同定に用いられており、分類群によっては重要な項目に位置づけされている。しかし、表現形質はさまざまな人為的、生物学的な要因によって影響を受け、一元比較が困難であり、また一部の細菌には実用的でないことなどから、化学分類学の普及を経て、DNA 塩基配列が同定に利用されるようになった。DNA を利用する長所としては、① DNA は4種類のオリゴヌクレオチドからなる物質であり、②生物依存的な培養のばらつきが生じない、③データが客観的である、④再現性に優れている、⑤情報の共有が容易であることなどがあげられる。DNA を用いる手法には GC 含量測定法、DNA-DNA 交雑試験法、遺伝子タイピング法、16S

リボゾーム RNA 遺伝子 (以下 16S rDNA) の塩基配列解析法などがあるが、これらの中で全ての細菌を対象として利用できる手法が 16S rDNA 塩基配列解析法である。16S rDNA を利用する長所としては、①リボゾーム DNA は生命の維持に欠くことのできない必須遺伝子であるためすべての細菌が有している、②塩基配列中に共通する領域が比較的多く、系統間で比較することが可能である、③16S rDNA は解析する上で適当なサイズである、④データベースが充実している、⑤すべての菌種に有効なユニバーサルプライマーが設計されていることなどがあげられる。同じ種と判定する基準に関し、染色体 DNA の交雑試験での結果から、同一種の菌株間では 16S rDNA 塩基配列の相同性が 97%以上であることが示されており、絶対的ではないが、この数値が細菌を同定する場合の目安とされている^{1,2)}。細菌では、ほとんどすべての種の 16S rDNA 塩基配列が DDBJ/EMBL/GenBank が相補提供するデータベースに収録されており、既知種であれば、種の同定を比較的容易に行うことができる。一部、菌種間で 16S rDNA の塩基配列に違いがなく、候補菌種の列挙に留まることもあるが、諸面考慮した上で 16S rDNA が現時点で最も優れた同定指標といえる。

II. DNA を用いたカビ・酵母の同定

1. 概要

真菌 (菌類) とは、概率的に、栄養体が糸状で、光合成ではなく、外部から有機物を吸収して生育する好気性の真核微生物で、担子菌門、子囊菌門、接合菌門、ツボカビ門および不完全菌類からなる (直近の分類体系ではさらに細分化されている)³⁾。カビ、キノコおよび酵母は厳密な意味での学術用語とは言い難いが (俗称的)、古くからあらゆる分野で繁用されており、以下、便宜的にこれらの語句を使用する。

カビおよびキノコはその多様な形態的特徴に基づいて分類されてきており、現在でも形態は重要な分類指標である。一方、細菌と同様に形態的な特徴に乏しい酵母は生理・生化学的性状を主体にして分類が行われ、それら性状の組み合わせで定義付けされている。これらの特徴に基づき、カビ、キノコ、酵

母は分子系統学的にそれぞれ独立した系統として考えられてきたが、真菌の分類にもさまざまな長所を持つ DNA が利用されるようになり、リボゾーム RNA 遺伝子に基づく分子系統分類学的な側面から真菌の分類体系が再構築され、それぞれが独立した系統を形成しないことが明らかとなった。現在では形態に基づく分類体系との整合性を考慮しながら、分子系統に基づく体系が受け入れられている。

DNA を用いた手法が導入されるまでは、カビおよびキノコは主に形態観察により、酵母は生理・生化学的性状試験により同定されてきた。それ故、真菌の同定には細かい差違を見分けるための技量と豊富な知識が必要とされた。現在ではカビや酵母を炭水化物などの資化性の差違に基づき同定するキットやシステムが市販されているが、環境中に存在する真菌の種類を多さを考慮した場合（現在、約 1 万属 10 万種が知られており、潜在的には 150 万種以上に達するといわれている⁴⁾、よく検出される菌種の一部しか同定できないのが実状である。このことから、分類体系を反映し、かつデータベースが充実している遺伝子情報を利用した同定法が汎用されつつある。対象としている遺伝子は細菌と同様にリボゾーム RNA 遺伝子が一般的で、ITS (Internal transcribed spacer) 領域あるいは 26/28S rRNA 遺伝子の D1/D2 (Domain 1 および 2 : 可変領域) 領域がよく用いられる^{5~15)} (図 2)。同じ種と判定する基準に関し、酵母の場合、染色体 DNA の交雑試験の結果から、同一種の菌株間では ITS 領域の塩基配列の相同性が 99% 以上であることが示されており、絶対的ではないが、この数値が同定の目安とされている¹⁰⁾。カビやキノコの場合、DNA 類似度に基づく知見はほとんどないが、多くの実験データに基づき概ねその数値が支持されている^{5~15)}。医学的あるいは食品衛生上重要なカビは対象菌種が限られているため、これらの遺伝子で概ね菌種を同定することができるが（酵母に関しては既知種のすべての DNA 塩基配列が収録されている）、データベースが充実

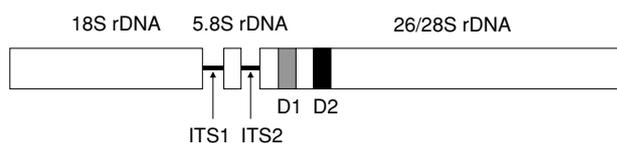


図 2 ITS1 および D1/D2 領域

していない分類群では必ずしも同定（あるいは近縁種を推定）できるわけではない（科の推定に留まる場合もある）。また、細菌の場合と同様、一部の菌種間では塩基配列に違いがなく、候補菌種の列挙に留まることもあるが、ある程度の知識があれば機械的に分離株の整理ができるため、これらの遺伝子が現時点で菌種を同定、あるいは推定するための最も優れた指標といえる。

2. 利点

DNA を用いた同定の利点としては、その手法の客観性、再現性、簡便性、安定性および迅速性が挙げられる（一部条件付きではあるが）。特にカビ（およびキノコ）においては次のような場面で有力な指標となり得る。

(1) 同定のための特徴的な表現形質が現れない場合
例えば胞子などの形成が見られず、菌糸のみの場合、概して形態観察に基づく同定は困難である。しかしながら、DNA は、その個体が示す特徴の礎となる一次情報が集約されたものであるため、DNA を比較することによって同定することが可能である。

(注)「3. 課題」の (1) の理由から、同定できない（新種の場合含む）、あるいは複数種の列記になる場合もある。

(2) 非常に細かい表現形質の差異で種が分けられている場合 (図 3)

例えば胞子表面の微細な構造の違いによって複数の種に分けられている場合、その差異を識別するには、培養や標本を作るための技量、微生物分類学に関する知識、そして適切な判断をするための経験が必要である。それらは、対象とする種が広範になるにつれ、その分類学的知識を習得するまでにはかなりの時間がかかる。一方、DNA の場合、塩基配列を決定し、相同性検索をするまでは同じ試薬や操作でルーティン的に試験が可能のため、比較的短時間でその習得が可能である。

(注) 微細な構造の違いが短い進化の過程で獲得されたものである場合、リボゾーム RNA 遺伝子で区別することができないことがある。また、相同性検索の結果を適切に解釈するためには、微生物分類学に加え、バイオインフォマティックスの知識と経験が必要となる（「3. 課題」の (3) の理由参照）。

(3) すでに死滅している、あるいは培養できない場合

菌体はあるものの、すでに死滅していたり、培養が難しい場合、その菌体の観察だけでは同定が困難である。DNAを用いた場合、前述の(1)の理由と同じく、対象の微生物を同定することが可能である。

(注) DNAの採取ができない場合や複数の菌種が混じっている場合、同定することはできない。また、前述の(2)および(3)の(注)の理由から、同定できない、あるいは複数種の列記になる場合もある。

3. 課題

DNAを用いた同定の課題として、カビを中心に、一般的な内容も含めて以下に示す。

(1) カビの分類・生態

カビの分類に関する詳細は割愛するが(本誌 第55巻8号掲載「真菌の分類と同定」矢口貴志博士の

総説を参照のこと)、これまでの形態に基づく分類体系とDNA塩基配列に基づく分類体系とが整合しないことにより、適切な同定ができないことがある。また、細菌や酵母では染色体DNAの交雑試験が種の区別に広く用いられているが、カビの場合も有効な指標ではあるものの、それだけでは解決できないこともあり、あまり浸透してはいない。形態的な特徴が多い菌群や社会的ニーズが高い菌群は種の数が多く(微妙な差異で種が分けられていることがある、**図3**)、リボゾーム関連遺伝子では一つの種に絞り込むことができないことがある(タンパク質遺伝子とその区別に有効なことがある)。目下、DNA塩基配列をベースに分類群や種の再分類が行われており、近い将来、より整理されたものとなろう。

カビや酵母には有性世代と無性世代があるが、その区別をDNA塩基配列ではすることができない。一般に有性世代の最新の知見に基づく菌種名でデータが登録されており、菌学的な知識が必要となる。

(2) 指標とするDNAの種類

カビにおいても、多くの場合、リボゾームRNA遺伝子が分類・同定指標とされている。一般的にはITS1やD1/D2領域が多く使われるが、18S rRNA遺伝子やITS2、あるいはタンパク質遺伝子なども分類群によっては指標とされている。必ずしもそれらのすべての指標の塩基配列が登録されているわけではなく、用いた指標によっては同定できないことがある。

カビの場合、リボゾーム関連遺伝子よりも進化速度が速いタンパク質遺伝子が分類・同定指標として使われることもあり、分類群が限定されるが、ミトコンドリア・チトクロームb遺伝子¹⁶⁾、β-チューブリン遺伝子¹⁷⁾、アミノアジピン酸還元酵素大サブユニット遺伝子(*lys2*)^{18,19)}などのデータベースが拡充されている(**図4**)。タンパク質遺伝子の場合、すべての菌種に有効なユニバーサルプライマーの構築が難しく、また、稀にイントロンの挿入などが同定の支障となることがある。

(3) データベース

DDBJ(日本: www.ddbj.nig.ac.jp/)/EMBL(ヨーロッパ: www.ebi.ac.uk/embl/)/GenBank(アメリカ: www.ncbi.nlm.nih.gov/)のDNA塩基配列データベースは公開された最大規模のものである(組織は独立しているが、相互的な維持・管理を実施して

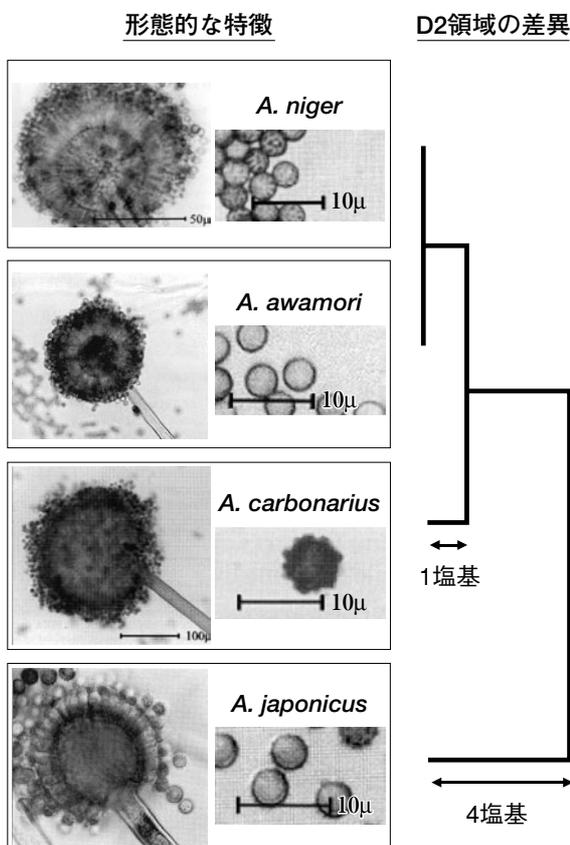


図3 *Aspergillus niger* 近縁種間の形態および塩基配列の差異

Aspergillus niger および近縁3種の分生子(4~5μm)ならびに分生子形成構造(80~150μm)とD2領域の塩基配列解析に基づく系統樹を示す。枝(両端矢印で表示)の長さはD2領域の塩基配列の不一致数に相当する(塩基配列が同一の場合、枝は生じない)。形態的な特徴では鑑別が難しいこれらの菌種も、D2領域の塩基配列により、客観的にその差異を確認することができる。

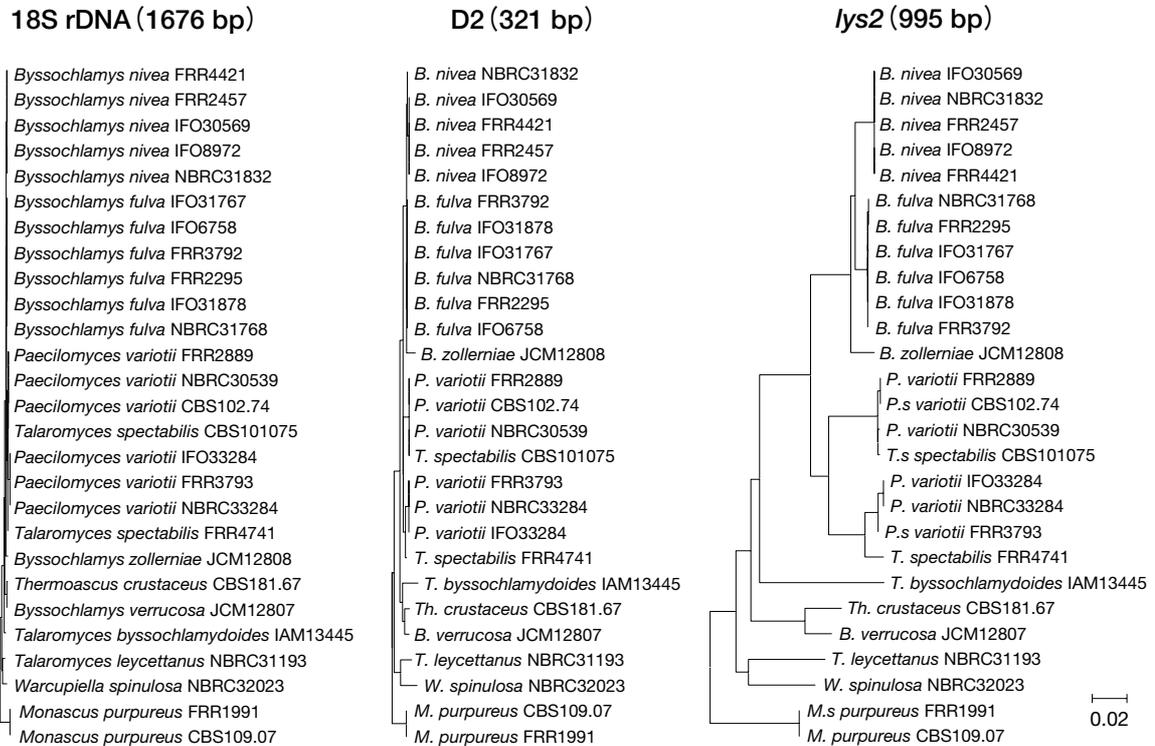


図4 *Byssochlamys* 関連菌種の18S rDNA、D2領域および *lys2* 塩基配列に基づく系統樹¹⁸⁾

いる)。細菌や酵母については、これらのデータベースにほとんどすべての種のデータが登録されている。一方、カビについても、多くのITS1やD1/D2領域の塩基配列が登録されているが、前述の(2)の理由により、分類群によって登録されているDNAの種類に偏りがある。さらに、種としては認められているが、何の塩基配列も登録されていない種も少なくない。また、概して登録年が古い場合に質が低い塩基配列が見られ、それが原因で相対値を下げ、判断に迷うことがある。最近では難培養cDNAクローンのデータも多く、それが障害となって菌種の絞り込みが難しいこともある。

(4) 同定に要する費用

ランニングコストは、利点を考慮した場合、他の手法と比べても大差ないが、サーマルサイクラーやDNAシーケンサーなど、高額な機器の初期投資が必要となる(以前に比べては安価になってきている)。

おわりに

リボゾームRNA遺伝子といった非常に優れた分子指標が導入されたことによって、微生物の系統分類学が新たな発展を迎え、それに伴い同定手法も進

歩した。その結果、簡便性、客観性、普遍性などを兼ね揃えたりボゾームRNA遺伝子に基づく同定法はさまざまな分野で活用されるようになった。しかしながら、諸般の理由(微生物の多様性、データベース不足、分類学的な問題など)から、リボゾームRNA遺伝子の解析だけでは明確な同定結果が得られず、近縁な微生物種あるいは所属する微生物群の推定に留まる場合もある。その様な場合、近縁な微生物種との鑑別性状を文献などから得て、追加試験の結果をふまえながら最終的な判断を行う必要がある。今後、分類学や遺伝子工学が更なる進歩を遂げ、先の諸問題も徐々に解決されていくと予想されるが、現時点でもリボゾームRNA遺伝子はさまざまな長所を有する同定指標であり、その性状をよく理解した上での活用は実用面で大きなメリットをもたらすと考えられる。

文 献

- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR and 9 other authors. International committee on systematic bacteriology. Report on the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, 37: 463-464, 1987.

- 2) Stackebrandt E and 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*, **44** : 846-849, 1994.
- 3) Hibbett et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res*, **111** : 509-547, 2007.
- 4) Hawksworth, DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Res*, **95** : 641-55, 1991.
- 5) 杉田隆, 西川朱實. DNA塩基配列解析による病原真菌の分類・同定. *Jpn J Med Mycol*, **45** : 55-58, 2004.
- 6) 杉田隆. DNA塩基配列解析による真菌の同定～MicroSeq® systemを用いた環境および臨床材料由来真菌の同定例～. *Bio WAVE* **24**.
- 7) Makimura K, Tamura Y, Kudo M, Uchida K, Saito H and Yamaguchi H. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Med Microbiol*, **49** : 29-35, 2000.
- 8) Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, Hasegawa A, Tajiri Y, Hanazawa R, Uchida K, Saito H and Yamaguchi H. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol*, **37** : 920-924, 1999.
- 9) Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, Uchida K, Saito H and Yamaguchi H. Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol*, **36** : 2629-2633, 1998.
- 10) Peterson SW and Kurtzman CP. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *System Appl Microbiol*, **14** : 124-129, 1991.
- 11) Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, Shinoda T. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J Clin Microbiol*, **37** : 1985-1993, 1999.
- 12) Sugita T and Nishikawa A. Fungal identification method based on DNA sequence analysis: Reassessment of the methods of pharmaceutical society of Japan and the Japanese pharmacopoeia. *J Health Sci*, **49** : 531-533, 2003.
- 13) Šlapeta JR, Modrý D, Kyselová I, Horejš R, Lukeš J and Koudela B. Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. *Veterinary Parasitology*, **109** : 157-167, 2002.
- 14) Hall L, Wohlfiel S and Roberts GD. Experience with the MicroSeq D2 Large-Subunit Ribosomal DNA Sequencing Kit for identification of filamentous fungi encountered in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, **42** : 622-626, 2004.
- 15) Verkley GJM, Starink-Willemse M, van Iperen A and Abeln ECA. Phylogenetic analyses of *Septoria* species based on the ITS and LSU-D2 regions of nuclear ribosomal DNA. *Mycologia*, **96** : 558-571, 2004.
- 16) Wang L, Yokoyama K, Takahashi H, Kase N, Hanya Y, Yashiro K, Miyaji M, Nishimura K. Identification of species in *Aspergillus* section *Flavi* based on sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene. *Int J Food Microbiol*, **4** : 75-86, 2001.
- 17) Crous PW, Kang JC, Schoch CL, Mchou GRA. Phylogenetic relationships of *Cylindrocladium pseudogracile* and *Cylindrocladium rumohrae* with morphologically similar taxa, based on morphology and DNA sequences of internal transcribed spacers and beta-tubulin. *Can J Bot*, **77** : 1813-1820, 1999.
- 18) An KD, Nishida H, Miura Y, Yokota A. Aminoadipterectase gene: a new fungal-specific gene for comparative evolutionary analyses. *BMC Evol Biol*, **2** : 6, 2002.
- 19) 渡辺麻衣子, 加藤裕子, 戸上敬子, 山中実喜子, 若林佳子, 小川裕由, 植田裕子, 後藤慶一, 工藤由起子, 天野典英, 横田明. *Byssochamys* spp.同定のための遺伝子指標の評価. *食品衛生学雑誌*, **49** : 82-87, 2008.