

# アラスカ永久凍土の氷楔から単離された細菌の分類と同定について

生命分子化学講座 応用菌学分野

加藤 知子

【 背景 】 環境中から多くの微生物を単離し、それらを分類・同定する場合、一般に形態、生理、細胞成分などの表現形の特徴、及び 16S リボソーム RNA 遺伝子配列が指標として用いられている。一方、近年では特に医療分野において、種以下のレベルで迅速簡便に細菌を識別する手段として、質量分析を用い、リボソームタンパクなどに由来するマスペクトルを指標とする方法が注目されている。当研究室では、アラスカ永久凍土中の 2 万 5 千年前の氷楔(ひょうせつ)から、270 株の真正細菌を単離した。これら氷楔単離株は、16S リボソーム RNA 遺伝子の部分配列に基づく系統解析により、67 の OTU (operational taxonomic unit; 配列が同一のものを 1OTU とした) に分けられ、多くが放線菌に属することが明らかになった。また、このうち 23OTU は、データベース上の基準株との相同性が 97% に満たなかったため、新種の可能性があると考えられた。

【 目的 】 本研究では、この 23OTU に属する 49 株について、16S rRNA 遺伝子全長、約 1,500 bp の配列に基づく系統解析、及び表現形の特徴を調べることにより、新種株の選択と新種であることの確認を行った。さらに、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-TOF MS) によって得られるマスペクトルが、属以上のレベルでの分類指標となり得るかどうかを検討した。

【 方法・結果 】 16S rRNA 遺伝子配列全長に基づく系統解析の結果、単離株 AHU1791、及び AHU1810 株が *Microbacteriaceae* 科の中で他の属とは独立したクラスターを形成し、新属である可能性が示唆された。そこで、この科の放線菌の分類方法に従い、これら 2 株の形態、生理及び細胞成分などの特徴を調べた。AHU1791 は、好気性、無芽胞、極鞭毛を有するグラム陽性桿菌で、-5°C から 25°C で増殖する低温菌であった。細胞壁は B2 $\gamma$  型、ジアミノ酪酸を有し、主要メナキノン は MK-12 と 13、または MK-12 と 11 であった。主要なリン脂質はホスファチジルグリセロール及びジホスファチジルグリセロールだった。これらの特徴は、系統的に最も近縁な *Agreia* 属及び *Subtercola* 属とは異なっていたので、新属新種 *Glaciibacter superstes* (基準株 AHU1791<sup>T</sup>) として命名提案した。

質量分析では、前述の *G. superstes* AHU1791<sup>T</sup> 株、及び同種の単離株 AHU1811 の全菌体を試料として、MALDI-TOF MS での分析条件の検討を行った。その後、最適と思われた一定の分析条件において、上記 2 株を含む 10 株の氷楔単離株を分析し、得られたマスペクトルに基づいて樹形図を作成した。これを 16S rRNA 遺伝子の部分配列に基づく系統樹と比較した。実験に用いた 10 株は、種レベル、属レベル、及び科レベルでの分類の評価を目的として、*Microbacteriaceae* 科、及びこの科と系統的に近い *Micrococcaceae* 科に属する氷楔単離株の中から選択した。

その結果、2 つの樹形図の分岐はよく一致しており、得られたマスペクトルが、種レベルのみならず、属レベル、及び科レベルの分類指標として有効であることが示唆された。比較に使用した菌株が少ないが、本研究の結果からは、MALDI-TOF MS による全菌体の分析により、環境中から単離された多数の細菌の分類が、遺伝子配列を読むことなく簡便に行えることが明らかとなった。