

細菌分類学研究の過去，現在，そして未来

誌名	日本微生物資源学会誌
ISSN	13424041
著者名	花田, 智
発行元	日本微生物資源学会
巻/号	31巻1号
掲載ページ	p. 51-55
発行年月	2015年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat





細菌分類学研究所の過去，現在，そして未来

花田 智

国立研究開発法人産業技術総合研究所生物プロセス研究部門
〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 つくば中央第 6 事業所

Bacterial taxonomy — Its past, present, and future —

Satoshi Hanada

Bioproduction Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Tsukuba Central 6-10, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan

In 1872, bacteria were classified by Ferdinand J. Cohn, a botanist and microbiologist, for the first time in the world. This classification was based on morphology. Cohn's concept was reasonable to a point, but it soon became unsuitable because bacteria have quite low levels of morphological variation. At the beginning of the 20th century, Sigurd Orla-Jensen, a biochemist, proposed a new taxonomic system grounded in physiology, and by half a century later modern bacterial taxonomy based on polyphasic comparison of morphological, physiological, and biochemical characteristics had been established. At the end of the 20th century, bacterial taxonomy entered a new epoch thanks to the great insight of the molecular evolutionist Carl R. Woese. The ribosomal RNA that he noticed turned out to be a molecule useful for revealing phylogenetic relationships, not only among all living organisms but also within bacteria. Use of this excellent evolutionary marker also allowed scientists other than bacterial taxonomists to study bacterial classification and identification, thus accelerating progress in bacterial taxonomy. Today, a new era is again about to begin in this intersection of bacteriology, as a result of rapid progress in the development of DNA sequencing technology and computer science.

Key words: bacteria, phylogeny, polyphasic taxonomy, evolutionary marker, genome analysis, average nucleotide identity

はじめに (19 世紀：細菌学の黎明と初めての細菌分類体系の提唱)

初めて細菌の分類を提唱したのはプロイセンの植物学者であり微生物学者の Ferdinand J. Cohn であるといわれている。1872 年に自らが創刊した学術雑誌 *Beitäge zur Biologie der Pflanzen* (=Contributions to the Biology of Plants) に寄稿した論文において行われたのだという。残念ながら、筆者はこの歴史的な文献を手にとり読んでいたことはない (たとえ幸運にもその機会が訪れたとしても、ドイツ語に疎い私はその内容を一切理解することなどできないだろう。きっと、

失われた聖杯グラールを目の当たりにした考古学者の如く、唯々歓喜に打ち震えつつ見開く両目から涙滂沱として流すのみだ)。ただ原本を目にすることこそ叶ってはいないが、そこに記されたとされる内容は、様々な研究者によって、私にも理解可能な言語に翻訳され伝えられている。それによれば、この世界初の分類体系は細菌の細胞形態に基づくものであったという。*Micrococcus*, *Bacterium*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Spirillum*, そして *Spirochaete* の 6 つの属 (Genus) が 4 つの連 (Tribe), すなわち *Sphaerobacteria* (球形の細菌), *Microbacteria* (小型の細菌), *Desmobacteria* (手網状の細菌), *Spirobacteria* (螺旋状の細菌) に分類されたのだ。

E-mail: s-hanada@aist.go.jp

19世紀後葉といえ、細菌学上の発見や偉業が相次いで出現した「近代細菌学の黎明」といった時期である。Robert Kochの炭疽菌や結核菌の発見、Joseph Listerの乳酸桿菌（当時は*Bacterium lactis*と呼ばれた）の純粋培養の成功、北里柴三郎とEmil A. von Behringによる破傷風菌（後の*Clostridium tetani*）の純粋分離培養の成功、Martinus Beijerinckの根粒菌の純粋分離、志賀潔の赤痢菌（後に志賀の名に因んで*Shigella*と命名される）の発見、そして忘れてはいけない業績であるLouis Pasteurによる自然発生説の否定や低温殺菌法の開発、病原菌の弱毒化等々、枚挙に暇がない。ライツ社、ツァイス社による複式光学顕微鏡の開発生産と研究者への普及が進んだものこの時期であり、この技術革新が細菌学研究所の爆発的な発展を支えていたことに疑いはない。世界初の分類体系が細胞形態に基づくものとなったのは、Cohnが形態比較を旨とする当代の植物分類学者であったということだけでなく、高倍率で観察を可能とする顕微鏡というツールの出現があったからこそであろう。オランダのAntonie van Leeuwenhoekが手作りの単式（単レンズ）顕微鏡を用いて、世界で初めて細菌の存在を報告したのが17世紀後葉のことである。そこから200年という長きにわたる陰性期（eclipse）を挿んで、縮みきったバネが力強く弾けるがごとく近代細菌学は一気に花開いたのである。

20世紀前葉～中葉：細菌分類学の新展開

形態に基づくCohnによる細菌分類は部分的には的を射ていた。特有な螺旋状の細胞形態を持つことで*Spirochaete*とされた一群は現在でも、そのまま*Spirochaetes*門にまとめられている。だが、細菌の分類を形態のみで行うことは適切であろうか。植物とは異なり、基本的に単細胞生物である細菌の細胞形態は多様性を持っていない（すなわち、球菌か、短桿菌か、長桿菌か、螺旋菌か、または連鎖しているかなどのバリエーションしかない）からだ。また、珪藻のように特徴的な形態を示す被殻（frustule）のようなものも持ってはいない。確かに形態は分類において重要なファクターのひとつであることに疑いはない。しかし、すべての細菌を分類するにはそれ以外の基準が必要となるのは自明だろう。

20世紀に入って、細菌分類に関して新たなコンセプトを提示したのがSigurd Orla-Jensenである（Orla-Jensen, 1909）。それは、「細菌の生理学的性質こそが分類基準として重要である」という考え方だった。た

とえば、培養においてどのような糖で酸生成が見られるか（つまり、糖の資化と有機酸生成のプロファイル比較）によって分類するなど様々な生理的な性質を調べ、それに基づいて分類を行うのだ。比較生化学の創始者であるAlbert J. Kluyverや彼に師事したCornelis B. van NielそしてRoger Y. Stanierらによってさらに押し進められ、現代細菌分類学の素地が固まることになる。生理学的な性質のみならず、細菌の持つ生体分子の種類や組成（たとえば、細胞壁の構成成分やゲノムDNAのグアニン—シトシン含有比、呼吸鎖の電子運搬体であるキノンの種類など）といった生化学的性質も分類指標として用いられるようになり（このようなアプローチは「化学分類」と呼ばれる）、細菌分類の客観性と信頼性はさらに高まることとなった。加えて、生理学的・生化学的性質を多岐にわたって分析することによって得られる機能や構成成分に関する膨大な情報を比較検討することにより、系統進化学的な視点で細菌全体を捉えることも可能になった。ある機能、またはある細胞構成成分の偏在から、細菌群の系統的距離（どれだけ近縁か）を推測することができるし、それらの多様化がどのような過程を経て進化してきたのか議論することもできる。細胞形態に基づく分類を行った19世紀のCohnらを細菌分類学の「第一世代」とするならば、多相な形態情報を用いて客観性の高い細菌系統分類手法を築き上げたこの時代の立役者達を「第二世代」と呼ぶこともできよう。

この「第二世代」が細菌分類学に果たした貢献は体系的な研究手法の構築だけに止まらない。その研究推進のための基礎固めを確実に行ったのもこの世代である。1975年に細菌の分類や分類名の提案に必須である国際細菌命名規約（International Code of Nomenclature of Bacteria）を定め、細菌の分類名の提案には「生きている標本（菌株）」が不可欠であると規定した。形態のみで分類することが困難な細菌の場合、その生理学的性質の比較を行う必要がある。そのためには、生きている菌株の存在が必須だからだ。更には、1980年1月1日に細菌学名承認リスト（Approved Lists of Bacterial Names）が発効され、290属、亜種を含む1922種の細菌（とアーキア）が整理された（Skerman *et al.*, 1980）。また、1987年には、曖昧であった「種の定義」に関して、ゲノムDNA同士の相同性、すなわちDNA-DNAハイブリダイゼーション（交雑試験）の交雑形成率が70%を超えるものを種とするという「種の基準」も示された（Wayne *et al.*, 1987）。今日、現代細菌分類学体系が

確立したのも、このような「第二世代」の粉骨碎身の行動があればこそである。

20 世紀終盤：リボソーム RNA という細菌分類の新たな客観的分類指標

細菌分類学の第一世代である Cohn は植物分類学者であったが、第二世代の分類学はそれとは異なる生化学的素地を持った研究者によって進められたことに注目すべきである。研究を一気に転換し得る画期的なコンセプトは異分野の研究者からもたらされることが常だからだ。20 世紀の終盤に起きた細菌分類学への「新しい波」もまた、異なる研究分野に属する系統進化学者によるものだった。Carl R. Woese によるリボソーム RNA (rRNA) を分子進化マーカーとした研究がそれである。すべての生物に存在し、その機能は同一であり、進化速度がそれほど速くないという特徴を持つ rRNA は「分子時計」として全生物の系統関係を明らかにすることができる。Woese はその解析を行い、古細菌 (アーキバクテリア) が真正細菌と異なる分類群であることを示し、全生物が真核生物 (Eucarya) と細菌 (Bacteria), そしてアーキア (Archaea) の三つのドメインに分けられることを明らかにしたのだ (Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990)。この rRNA は細菌分類の指標のひとつとして用いることができるのは無論である。しかし、70 年代にはすでに始められていた (Woese & Fox, 1977) が細菌分類研究に一般的に使われるようになるのには若干の時間を要した。というのも、初期の解析方法は分離したリボソーム RNA (rRNA) の酵素切断断片の泳動プロファイル比較であり、後には 16S rRNA 塩基配列を逆転写酵素で決定した上での比較となるが、このような解析は手間と根気を要するものであったからだ。しかし、PCR による遺伝子増幅技術の発達と増幅機器の普及、加えて細菌の 16S rRNA 遺伝子配列のほぼ全長を増幅可能とする universal primer の開発 (Weisburg *et al.*, 1991 等) によって一般化することになる。そして、90 年代には多くの研究室で解析が可能となり、細菌分類における重要な分類指標のひとつと位置付けられたのである。

分子時計である 16S rRNA (遺伝子) 配列は細菌間の系統距離を算出し得る極めて客観性の高い系統分類指標である。細菌分類における強力なツールであったということのみならず、この登場が細菌分類学に与えたインパクトは甚大であった。というのも、多くの細菌の 16S rRNA (遺伝子) 配列が解析され、その膨大

な配列情報がデータベース化されていく過程で、やがて「逆引き」が可能となったからだ。つまり、未知細菌の配列を決定しデータベースと照合することにより、その細菌の同定ができるようになったということだ。従来の細菌同定は、形態学的、生理学的、生化学的性質の詳細な比較によって行われてきた。それには多岐にわたる実験や解析手法に対する知識と経験が必要であり、細菌分類学者でなければかなりの困難を覚悟しなければならないものだったはずである。しかし、今や配列のデータベース照合という簡単な操作で概ね正確な同定が完了してしまうようになってしまったのだ。換言すれば、細菌分類学の知識がほとんどない者であっても、簡易的に細菌の分類同定を行えるようになったということになる (細菌分類学事典である Bergey's Manual of Systematic Bacteriology には、かつて細菌同定のための「Determinative Bacteriology」という別冊があったが、1992 年の第 9 版を以て以後の改訂版の出版は行われなくなった。系統進化学に基づく客観的な分類指標である rRNA 配列比較の登場によって、この別冊はその役目を終えたのだ)。こうして、ある意味職人芸的であった細菌分類学分野に、分子進化学的バックグラウンドを持つ研究者である (=新たな血) が流入してくるようになった。それこそ、細菌分類学における「認識の枠組みの大きな転換 (=パラダイム・シフト)」であると私は考えている。そして、この合流した「新たな血」こそ「第三世代」と呼ばれるべき者達なのだろう。

21 世紀：第三世代の自由で軽快な研究展開

かつては敷居が高かった細菌分類学の研究分野に rRNA 配列比較という分類指標を足がかりにして「第三世代」は飛び込んできた。彼らは「第二世代」が整備した分類体系に従い、その手法を学びながら分類学の発展に大きく寄与することになった。しかし、そればかりではなく分子進化的視点を持ち、コンピュータ解析に秀でた「第三世代」は細菌分類学に新たなアプローチを提供してくれる。主に 16S rRNA 配列だけではなく、ゲノム中の生命活動に不可欠な共通遺伝子 (common housekeeping genes) を数多く選別して解析することにより細菌間の系統関係をより正確に把握しようという試み (Ciccarelli *et al.*, 2006 等) や、種の基準となる DNA-DNA ハイブリダイゼーションの交雑形成率を決定されたゲノム情報の比較 (the average nucleotide identity: ANI) から割り出そうとする試み (Goris *et al.*, 2007) など興味深い研究が多い。

特に後者は比較のために生菌の DNA を十分量必要とする時間も手間もかかる DNA-DNA ハイブリダイゼーション試験を平易に行えるデータベース上のゲノム情報比較で置き換えようとする研究であり、種同定作業の時間短縮や簡便化に資するユニークなコンセプトといえる。

DNA シーケンシング技術の爆発的な発展に伴い、細菌の全ゲノム決定は時間的にもコスト的にも手軽になり、それを分類学的研究に用いることに対しても今や障害はなくなりつつある。米国 JGI (Joint Genome Institute) では細菌ゲノムの配列決定を網羅的に行っており、2015 年の現時点で 3 万種類を超えるゲノム情報(細菌だけではなくアーキアのものを含む)がデータベースに登録されている (<https://img.jgi.doe.gov>)。今後、細菌分類学における分子系統解析も特定の分子進化マーカーのみではなくゲノム情報全領域を対象とした比較解析が必要となってくるのかもしれない。このようなゲノム全体を対象とした系統学的研究は phylogenomics と呼ばれるが、これの研究の進展により細菌の系統関係をより正確に表せるだけでなく、細菌間でしばしば見られる「遺伝子の水平伝搬 (horizontal gene transfer: HGT)」のゲノム上での比率と発生頻度から、細菌の進化過程における HGT の貢献度を見積もることも可能となるだろう (加えて、この研究によって機能不明の遺伝子の役割が明らかになる可能性もある)。近縁種間での、または門を超えての HGT は明らかに「種間の遺伝子交換」であり、その頻度によっては分類学 (の種の定義や基準、種形成) に影響を与えないとも限らない。

また、環境中で発見された細菌ゲノムの情報を解析して生理学的機能を推定した情報に基づいて未培養細菌を提案しようとする報告も今世紀に入ってから多くなってきた。「第三世代」の研究者には生態学的な興味から環境微生物を研究対象とする者も多く、環境中に存在する「培養が極めて困難な細菌 (または、そのゲノム)」を発見する機会に恵まれているからであろう。代表的なものとして、活性汚泥中のポリリン酸蓄積菌 *Candidatus Accumulibacter phosphatis*、地下環境に優先する *Candidatus Desulforudis audaxviator* を挙げておくと、この紙幅では列記できないほど多数の未培養菌株が報告されてきている。これらはすべて *Candidatus* (「候補」の意) が冠されており、学名がイタリック体でないことから分かるように正式なタクソンではない。それは、これらが純粋分離に成功していない細菌であり「生きている標本」が得られていな

いことによる。しかし、ゲノム情報から新属新種であることが明白であるため「暫定的な地位」としての発表が認められているのだ (Candidatus の発表に関しては [Murray & Schleifer, 1994] を参照して頂きたい、また同件に関しては 1996 年に改訂された国際細菌命名規約にも附則して記されている)。環境中に存在する多様なゲノムを対象とした研究が精力的に進んでいる昨今、このような未培養細菌の Candidatus としての発表はますます増えていくものと予想される。そして、そのほとんどが新規性の極めて高い、機能的または生態学的に興味深い細菌である。「種」としてこそ認められてはいないが、今後の分類学研究において無視できない存在になっていくことに疑いはない。

未来：第四世代はコンピュータサイエンスの研究分野から現れる？

細菌分類学の未来はどのようなものになるのだろうか？ 系統進化的解析に秀でた「第三世代」は今後どのように研究を展開させていくのだろうか？ 未来を予見させる手がかりは、更なる塩基配列決定技術の発展とその波及効果を予測することにあるだろう。新世代の DNA シーケンサーは更にハイスループット化され、今とは比べものにならないほどの大量の配列情報を迅速且つ正確に研究者に提供するようになっていくだろう。phylogenomics 研究により既存菌株のすべてのゲノムがデータベース化されるにあたり、新規に発見された菌株の新種提案に関しても全ゲノム情報の提出が (命名規約で) 求められることになるのかも知れない。

また、その頃には計算速度などのハードウェア性能が著しく向上しているのみならず、提供される多量のゲノムデータを解析するソフトウェアも洗練されて使いやすいものとなっているはずである。ともすると、解析されたゲノム情報に基づきその細菌が持つ代謝経路のすべてが瞬時に決定され、その菌株の生理学的特徴だけでなく構成成分などの生化学的性質もある程度の正確さを持って予測することが可能となるかもしれない。当然、遺伝型と表現型には密接な関係はあるものの、完全に一対一対応するものではないことは明らかである。しかし、phylogenomics 研究の進展によって拡充される膨大なゲノム情報と、形態学、生理学、生化学的表現型情報との詳細な比較研究が、複雑な発現調節のパターンに一般則を見出すことも決して可能性がないとはいえない。もしそうなれば、アルゴリズム化された発現パターンを用いて、ゲノム情報

という単なる配列データからその細菌の菌学的情報のすべてをシリコン・ウエハー上で再構築できることになる。

仮にそのような状況が訪れたとしたら、細菌分類において「菌株の分離培養」は重要度を失うことになるのかもしれない。環境中から分離されたゲノムから得られた遺伝情報のみで、菌株のすべての性状がコンピュータ内でシミュレートし得るからだ。いたずらに時間を要する「分離培養」という研究アプローチは、その時代においては「研究進歩を阻む行為に他ならない」と揶揄される可能性は十分にある。研究の進展速度に追いつくことができずに、「分離培養」は細菌分類研究の分野から容易にスピニングアウトしてしまうかもしれない。こうなった場合、細菌分類学は大きな転機を迎えることになるだろう。20世紀に初めて定められた国際細菌命名規約の根幹である「生きている標本(菌株)が不可欠である」というルールに変更が求められることになるからだ。「全ゲノム情報が重要であり、生きている標本の要求はオプションである」との判断が行われたのだとしたら、それこそ細菌分類学史上最大のパラダイム・シフトであり、それを境にして細菌分類学はまた新たな時代に突入することになる。そして、この変革を推進する「第四世代」はきっとコンピュータサイエンス分野の研究者(たとえば、生命活動をシミュレートするアルゴリズムを開発するソフトウェア研究者)であろうと、私は想像している。

コンピュータサイエンスの世界では「コンピュータが人間を超える日」という意味で「シンギュラリティ(特異点)」という言葉をまことしやかに用いる。もし、細菌分類学の命名規約から「生きている標本」という枢要が消える日がくるのであれば、それを「細菌分類学のシンギュラリティ(特異点)」の到来と呼んでいいだろう。果たして近い将来にそれはやってくるのだろうか? まるでSFのような話で恐縮だが、環境メタゲノムや一細胞ゲノム決定などの研究の急速な発展を鑑みるに、あながちそれを笑い話として済ませることはできないような気がしているのだが、如何だろうか?

文 献

Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey,

- C.J., Snel, B. & Bork, P. 2006. Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* **311**: 1283-1287.
- Cohn, F.J. 1872. Untersuchungen über Bacterien. *Beitäge zur Biologie der Pflanzen*. **1**: 127-224.
- Orla-Jensen, S. 1909. Die Hauptlinien des natürlichen Bacteriensystems. *Centralblatt für Bakteriologie*. **22**: 305-346.
- Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme P. & Tiedje, J.M. 2007. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 181-191.
- Murray, R.G.E. & Schleifer, K.H. 1994. Taxonomic Notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 174-176.
- Skerman, V.B.D., McGowan, V. & Sneath, P.H.A. 1980. Approved Lists of Bacterial Names. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**: 225-420.
- Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., Grimont, P.A.D., Kandler, O., Krichevsky, M.I., Moore, L.H., Moore, W.E.C., Murray, R.G.E., Strackebrandt, E., Starr, M.P. & Trüper, H.G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 463-464.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**: 697-703.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
- Woese, C.R. & Fox, G.E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5088-5090.
- Woese, C.R., Kandler, O. & Wheelis M.L. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 4576-4579.