

環境中の細菌相の網羅的解析を 目指した系統アレイと病原体アレイ

岐阜大学大学院医科学研究科 病原体制御学分野 教授 江崎孝行 / 大楠清文



開発の背景

これまで学問的に記載された細菌種は約六千種あるが、環境中の

微生物を解析すると90-97%ぐらいが、まだ記載されていない細菌で占められることから、地球環境には未知の細菌が数百万種類存在すると推測されている。

一方、人や動物に病気を起こす可能性のある細菌は病原性の強いレベル2以上が350種程度、日和見病原体を含めると約一千種が記載されているが、これらが人以外の環境のどこに存在しているかは一部を除いて詳細には解析されていない。

我々の研究室では環境に生息する微生物の分布、及び病原微生物の生態に興味をもち、その解析方法を作成してきた。約一世紀をかけて確立された微生物学の知識の集積から、特定の環境の微生物を培養方法で網羅的に解析することは不可能に近いことがわかる。菌を培養する培養温度だけでも4度から100度まであり、微生物の増殖も使用する培地の種類が多種類ある。培養する際にはさらに酸素存在下、炭酸ガス存在下、あるいは偏性嫌気性培養など培養方法を組み合わせるだけでも膨大な種類の検査方法になる。

約30年前、わたしは学生時代に人の腸内細菌を培養方法で解析し、人腸管フローラを解析した経験がある。人の腸管という限られた環境でも使用する培地は30種類以上、定量培養するため一種類の培地を6枚使用するの

培地だけでも180枚が必要になる。さらに分離した菌株を同定するのに一株あたり、30-50種類の生化学検査をするために試験管に接種して、5000本から10000本の性状を分析して、一人の糞便の菌叢を解析していた。解析結果が出てから菌種名を自信を持って決定できないことも多く、フローラの解析方法に限界を感じていた。

1990年代から、この解析環境が変わった。菌株を分離する所までは同じだが分離した菌株の16SリボソームRNA配列を決定するだけで、大まかな細菌の同定が可能になってきた。この背景は1980年代から蓄積され始めた細菌の16SリボソームRNA(16S rRNA)のデータベースが集積し、細菌の系統分類体系が、この遺伝子配列を使って再構築されてきた。従来、形態と生化学的性状で分類されてきた細菌が16SrRNAの配列で分類が再構築され、同定できることから、解析方法が一変した。

このころから培養方法にかわる網羅的な遺伝子検査の可能性が出てきた。一つの遺伝子を使って、多種類の微生物の遺伝子を同時に解析する方法としてマイクロアレイが登場し、網羅的解析方法に実用化が見えてきた。

系統マイクロアレイと病原体マイクロアレイの作成

記載された6000菌種と未知の菌を含めた環境材料の系統解析をどのように行うかが最初の課題となった。6000種類の菌種は約一千種類の属に分類されている。各属にはその属の基準となる菌種 type species が決めら

著者略歴

1977年 岐阜大学医学部卒業
1982年 岐阜大学大学院医学研究科修了
1990年 岐阜大学教授(医学部微生物学講座)
現在 岐阜大学大学院医科学研究科
再生分子統御学講座、病原体制御学分野 教授
エーエムアール株式会社 代表取締役

表1 アレイに固定した系統と属の数

	Phylum	固定した属の数		Phylum	固定した属の数
1	Archaea	66	16	Fibrobacter	1
2	Actinobacteria	134	17	Nitrospira	2
3	Firmicutes	190	18	Nitrosomonad	1
4	Chlamydia	8	19	Planctomyceta	4
5	Cyanobacteria	39	20	Thermodesulfobacteria	1
6	CFB group	42	21	Thermomicrobia	1
7	Alfa Proteobacteria	121	22	Verrucomicrobia	2
8	Beta Proteobacteria	57	23	Aquifica	5
9	Gamma Proteobacteria	119	24	Thermotoga	5
10	Delta proteobacteria	49	25	Chlorobia	4
11	Epsilon proteobacteria	12	26	Deinococci	3
12	Spiral bacteria	19	27	Chrysiogena	1
13	Fusobacteria	12	28	Chloroflexa	5
14	Deferribactera	5	29	Dictyogloma	1
15	Acidobacteria	3		total	912

表2 Pathogen arrayに固定した病原体の系統と数

Actinobacteria	90
Mycobacteria	62
Streptococci	90
Staphylococci-clostridia	60
Anaerobic GNR	81
anaerobic cocci/clostridia	92
Flavobacteraia	90
Enterobacteriaceae	92
Legionella spp.	93
Pseudomonas Acinetobacter	78
Haemophilus -actinobacteria	60
Campylobacter-Spiral bacteria	72
Fungi	60
Total	1020

られているが、最初はその基準種の16SrRNAの遺伝子をクローン化しアレイに搭載した。属の中の菌種間の配列は多少の違いがあるが類似していることから、一種類を固定していればその属に分類される菌種のほとんどの配列を捕捉できると考えた。ところがこの方法はプラスミッドを精製し固定化するので膨大な時間と手間がかかることから、実用からほど遠いので最終的には属に良く保存されている配列領域を選択し、合成オリゴDNAをアレイに固定する方法に切り替えた。

属によっては菌種が多く一つの基準種では対応できない場合は複数の配列をアレイに搭載したアレイを作成した。現在、我々の研究室では920種類のオリゴDNAを搭載したアレイを使

用し、環境中の微生物のモニターを行っている(表1)。

オリゴDNAを使うことにより、plasmidクローンより捕捉する配列の多様性の幅は少なくなるが、陽性と陰性のシグナルがより鮮明に区別出来ることから、解析が容易である。今後は少なくとも記載された菌種をすべて捕捉できる幅のある配列を固定したアレイを作成したいと計画している。

病原体マイクロアレイは系統マイクロアレイと異なった考え方で作成した。各病原体の16SrDNA配列から菌種に特異的な配列を選択し、1020種類の人、動物、植物及び魚介類の病原体のシグナルを捕捉するマイクロアレイを作成している(表2)。

しかし、病原体によっては16SrDNA配列では類縁の非病原菌と区別出来ないことがしばしばある。たとえば炭疽菌、セレウス菌、およびBacillus thuringensisはほぼ同じ16SrDNA配列を保有しており、3菌種のシグナルがいずれも捕捉されという限界がある。

この問題は16SrDNA配列だけでは解決されない。病原体に特異的な配列

である毒素遺伝子や病原性遺伝子を検出する検査方法の組み合わせが必要になる。

我々はレベル2および3の病原体で土壌生息が予測される菌種を定量PCR法で解析している。表3にはカビの病原体がリストアップされているがカビの配列は特異的ではなく、病原体を含む類縁の菌のシグナルが増幅される。

微生物に共通な核酸の抽出法と共通の増幅法

ネットに付着させると腐敗酸のシリカへの付着率は悪いのでDNAを精製することが出来る。我々はこの方法でPCRの阻害物質を除去して遺伝子増幅を行っている。

遺伝子増幅とアレイとの反応

多種類の細菌の遺伝子を共通の方法で増幅させるには抽出した核酸をすべての細菌に共通な配列であるユニバーサル配列を使い増幅させることができる。16SrDNA配列にはこの目的に適した良く保存された配列が存在するので増幅は容易である。保存領域の配列からユニバーサルprimerをデザインし蛍光標識し、PCR法で増幅した産物をマイクロアレイと反応させる^{1),2)}。

生存し増殖を行っている細菌だけを測定する目的でrRNAを増幅するRT-PCRやT7 RNA PolymeraseでRNAを増幅する方法も試みているが、実際の土壌生息菌は増殖が緩やかで、rRNAのシグナルは弱く、利点はまだ確認していない。細菌のrRNAは不安定で速やかに分解されるので土壌解析より、活発に菌の増殖が見られるサン

ブルや水の分析では威力を発揮する。

ハイブリッドを形成したスポットを定量し、各菌のprobeのシグナルの強さを定量的にグラフで表示し、シグナルの分布を系統別に並べてポピュレーション解析を行う。920種類のprobeを搭載しているアレイで土壌を解析するとシグナルがバックグラウンドより高くなるスポットは数百種類に達する。

図1には土壌中の水を病原体アレイで解析した例を示した。グラフの縦軸はプローブと反応したPCR産物の蛍光シグナル強度を示してあり、横軸には病原体をアルファベット順に並べてある。図には全属名を表示出来ないがエクセルにデータが出力されるので一つのシグナルをウインドウを拡大すれば確認出来る。

図2では同じ場所の土壌から抽出したDNAを使って系統アレイデータの再現性を見たものである。ほぼ類似したパターンのシグナルが得られている。この表示方法では機能をもった微生物の分布がわからないので、今後は窒素固定酵素を保有している菌群、アンモニア酸化酵素保有菌群を含む属のリストなど、より詳細な解析が出来る解析情報を搭載する予定でいる。

一方、下水の解析になると大幅に菌の種類が減少し、我々の経験では陽性シグナルが100種類以下になることが多い。下水の場合、人の病原体の有無が興味の対象になることが多いのでアレイの解析より定量PCRで解析する方法を優先している³⁾。

今後の課題

環境中にいる特定の微生物をPCR法

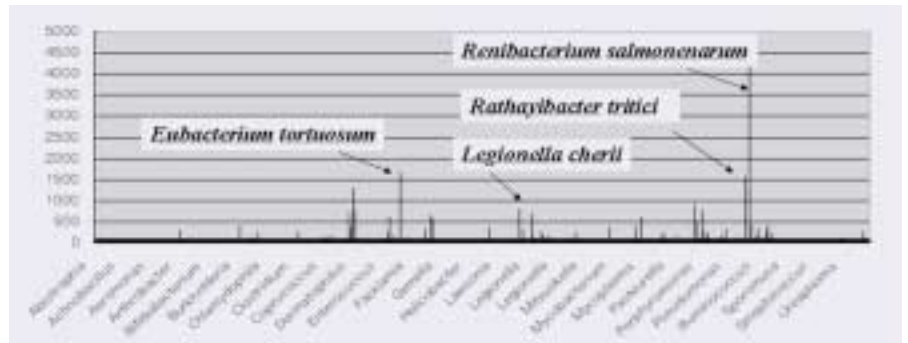


図1 水の病原体アレイを使った解析例

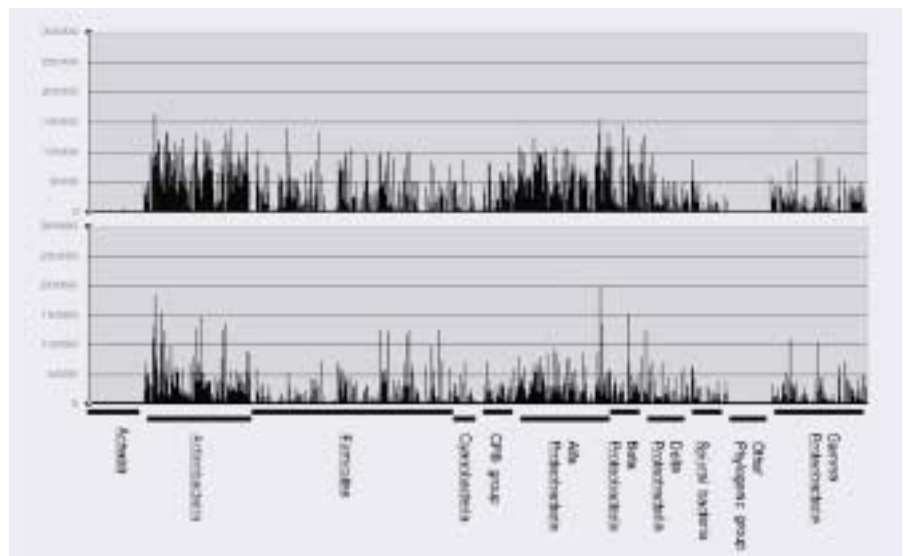


図2 同じ土壌の再現性評価 (X軸は系統名で表示した)

表3 Realtime PCRで定量的に検出する人病原体リスト

病原体	危険度	遺伝子	系統
Acholeplasma spp.	1	16S rDNA	alfa-proteobacteria
Actinomadura madurae group	2	16S rDNA	Actinobacteria
Actinomyces bovis group	2	16S rDNA	Actinobacteria
Aeromonas hydrophila	2	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Anaplasma marginalis group	2	16S rDNA	alfa-proteobacteria
Arcanobacterium haemolyticum	2	16S rDNA	Actinobacteria
Bacillus anthracis	3	Capsular gene:CapA	Firmicutes
Bacillus anthracis	3	Protective antigen	Firmicutes
Bacillus anthracis	3	S-layer	Firmicutes
Bacillus cereus	2	Haemolysin	Firmicutes
Bacillus cereus-antacis group	1,2,3	16S rDNA	Firmicutes
Bacillus thuringensis	2	Toxin	Firmicutes
Bacteria universal	1,2,3	16S rDNA	Eubacteria
Bartonella spp.	2,1	16S rDNA	alfa-proteobacteria
Bilophila-Lawsonia group	2	16S rDNA	Delta-proteobacteria
Borrelia group	2,1	16S rDNA	Spiral
Brucella_melitensis	2	16S rDNA	alfa-proteobacteria
Burkholderia cepacia group	2,1	16S rDNA	beta-proteobacteria
Burkholderia pseudomallei /mallei	3,2	Flagellin	beta-proteobacteria
Burkholderia pseudomallei /mallei	3,2	16S rDNA	beta-proteobacteria
Burkholderia pseudomallei /mallei	3,2	GroEL	beta-proteobacteria
Cardiobacterium hominis group	1,2	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Chlamydomphila /Chlamydia spp.	3	Group(16SrRNA)	Chlamydia
Chromobacterium violaceum	2	16S rDNA	beta-proteobacteria
Clostridium bifermentans group	2	16S rDNA	Firmicutes
Clostridium botulinum E	2	BONT	Firmicutes
Clostridium botulinum 16S rDNA(ABF)group	2	16S rDNA	Firmicutes
Clostridium botulinum 16S rDNA(EFB)group	2	16S rDNA	Firmicutes

Clostridium botulinum F non BONT	2	BONT	Firmicutes
Clostridium botulinum G group 16S rDNA	2	BONT	Firmicutes
Clostridium botulinum NTNH(ABF)group	2	NTNH	Firmicutes
Clostridium difficile	2	16S rDNA	Firmicutes
Clostridium perfringens	2	16S rDNA	Firmicutes
Clostridium perfringens	2	toxin(cpe)	Firmicutes
Clostridium tetani	2	Tetanospasmin	Firmicutes
Clostridiumperfringens -tetani-botulinum group	2	16S rDNA	Firmicutes
Corynebacterium diphtheriae group	2,1	16S rDNA	Actinobacteria
Corynebacterium diphtheriae	2	Toxin	Firmicutes
Cowdria_ruminantium	1,2	16S rDNA	alfa-proteobacteria
Coxiella burnetii	3	Specific antigen	alfa-proteobacteria
Cryptosporidium parvum	2	HSP70	Protozoa
Ehrlichia-Anaplasma spp.	2,1	16S rDNA	alfa-proteobacteria
Enterobacteriaceae(major)	12,	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Enterococcus spp	1,2	16S rDNA	Firmicutes
Escherichia coli	2	virB	gamma-proteobacteria
Escherichia coli	2	Shiga 1	gamma-proteobacteria
Escherichia coli	2	Shiga 2	gamma-proteobacteria
Escherichia coli	2	ST1	gamma-proteobacteria
Escherichia coli	2	LT	gamma-proteobacteria
Escherichia group	1,2	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Francisella group	3,2	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Francisella tularensis	3	OMP	gamma-proteobacteria
Haemobartonella canis group	2	16S rDNA	Firmicutes
Haemophilus influenzae	2	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Haemophilus-Pasteurella group	2,1	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Klebsiella pneumoniae group	2	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Legionella group	2	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Leptospira interrogans group	1,2	16S rDNA	Spiral
Listeria monocytogenes	2,1	16S rDNA	Firmicutes
Mycobacterium avium		16S rDNA	Actinobacteria
Mycobacterium intracellulare		16S rDNA	Actinobacteria
Mycobacterium spp.	1,2,3	16S rDNA	Actinobacteria
Mycobacterium tuberculosis	3	dnaJ	Actinobacteria
Mycoplasma mycoides-pneumoniae group	1	16S rDNA	Firmicutes
Neorickettsia-E.sennetsu	2	16S rDNA	alfa-proteobacteria
Nocardia group	2	16S rDNA	Actinobacteria
Orientia tsutsugamushi	3	16S rDNA	alfa-proteobacteria
Orientia tsutsugamushi	3	Specific(virulence)	alfa-proteobacteria
Pseudomonas aeruginosa group	2	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Rickettsia/Ehrlichia spp.	3	Group(16SrRNA)	alfa-proteobacteria
Rochalimea quintana	2	16S rDNA	alfa-proteobacteria
Salmonella spp.	2	Enterotoxin	gamma-proteobacteria
Salmonella typhi	3	virulence :vipR	gamma-proteobacteria
Shigella spp.	2	virG(lcsA)	gamma-proteobacteria
Staphylococcus aureus	2	mecA	Firmicutes
Streptobacillus moniliformis	2	16S rDNA	Firmicutes
Streptococcus spp.	1,2	16S rDNA	Firmicutes
Streptomyces group	1,2	16S rDNA	Actinobacteria
Vibrio cholerae	2	CT	gamma-proteobacteria
Vibrio group	2	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Vibrio parahaemolyticus	2	Tdh	gamma-proteobacteria
Yersinia group	3,2	Group 16S rDNA	gamma-proteobacteria
Yersinia pestis	3	Virulence:pesticin	gamma-proteobacteria
Yersinia pestis	3	Plasminogen activator	gamma-proteobacteria
Yersinia pseudotuberculosis/pestis	2,3	16S rDNA	gamma-proteobacteria
Ajellomyces capsulatus/dermatitidis	3,2	28S rRNA	fungi
Aspergillus group	1,2	18S rDNA	fungi
Blastomyces dermatitidis	3,2	WI-1 adhesin	fungi
Candida spp.	1,2	18S rDNA	fungi
Coccidioides immitis group	3	28S rRNA	fungi
Cryptococcus spp.	1,2	16S rDNA	fungi
Fungal universal	1,2,3	18S rDNA	fungi
Histoplasma capsulatum	3,2	H antigen	fungi
Paracoccidioides brasiliensis.	3,2	28S rRNA	fungi
Penicillium marnieffei group	3	18S rDNA	fungi

危険度 1. 個体及び地域社会に対する低危険度 2. 個体に対する中等度危険度、地域社会に対する軽微な危険度
3. 個体に対する高い危険度、地域社会に対する低危険度

など遺伝子増幅法でモニターする技術は既に確立しているが、未知の菌を含めて全体の菌相を網羅的に解析する方法はまだ一般化されていない。モニターする対象が一般細菌であれば我々が行っている系統アレイで、人病原体であれば病原体アレイが網羅的な解析に威力を発揮できると考えている。ところが環境が対象であるので植物病原体、魚介類体の網羅的な解析も今後は要求されるようになるかと推測している。

病原体だけではなく、汚染土壌の機能回復も解析するには土壌に特定の機能をもった微生物がどのように変動するかも解析の対象になる。硝酸還元酵素、アンモニア酸化酵素、窒素固定、あるいはメタン酸化酵素をもった菌群の解析なども要望される情報であると考えている。

現在、我々の解析リストには人病原性カビが一部搭載されているが、まだ十分な識別能力がない。土壌の病原性カビに関してはまだアレイを作成するには情報が不足しており、配列データの蓄積が必要である。今後は1700種とされている土壌中の植物病原性カビのモニターをするためのアレイの試作を重要な課題として位置づけている。

文 献

- 1) 江崎孝行. 2004 ゲノム情報を使った感染症の網羅的診断法. 微生物はなぜ病気をおこすのか. 日本細菌学会 クバプロ. 187-195.
- 2) 江崎孝行. 大楠清文, 河村好章. 2004 DNAマイクロアレイを用いた環境サンプル中の微生物群集の解析. 難培養微生物研究の最新技術. 工藤俊章, 大熊盛也編. シーエムシー出版. 94-100.
- 3) 江崎孝行. 2003 Realtime PCRと系統アレイを用いた微生物相の網羅的解析方法, バイオインフォマティクスがわかる, 105-111. 羊土社.