

DNAの相同性による *Bacillus* 属の分類

(阪大・工・醗酵) 関 達治, 大嶋泰治

1. 目的 従来細菌の分類は形態的および生理的性質を基に決定されて来たが、最近諸形質の遺伝情報を持つDNAの相同性を含め種々の化学分類が試みられている。我々はSmith, Gordonらによって比較的分類法が整理され、かつ工業的利用度の高い *Bacillus* 属についてDNA相同性を検討して来た。今回は *Bacillus* 属全般に渡り総合的に分類的考察を行った。

2. 方法 供試株として *Bacillus* 属の16種97株を用いた。標準株としては *B. subtilis* 168株, W23株, *B. amyloliquefaciens* KA-63株, *B. licheniformis* IFO 12107株, S207株, *B. pumilus* IFO 12092株, *B. megaterium* IAM 1030株, *B. cereus* T株, *B. coagulans* ATCC 7050株, *B. firmus* ATCC 14575株, *B. circulans* ATCC 4513株, *B. sphaericus* ATCC 14577株の10種12株からの4ミン要求株を用いた。DNAはMarmurの方法に準じ調製したが、*B. cereus*, *B. thuringiensis* および *B. sphaericus* の各株は通常の印白リソチーム、SDS処理では溶菌しなかったので、培養の対数増殖後期にペニシリンGを3g/l加え、さらに2~3時間培養したのち、リソチーム、SDS処理を行い溶菌させた。DNAの相同値はMcConaughyらのmembran filterを用いたDNA hybrid形成法により求めた。すなわち通常はnitrocellulose membran filterに固定した25 μ gの一本鎖DNAと、³H-チミンで標識した0.5 μ gの標準株からの一本鎖DNAとを1mlの6XSSC-formamide (50%)中で、37℃、22.5時間反応させDNA hybridを形成させた。その後このfilterを3 $\times 10^{-3}$ M Tris-HCl緩衝液(pH 9.0)で洗滌、乾燥し、hybridしたDNAの放射活性から相同値を求めた。形質転換はSpizizenらの方法を改変して行った。

3. 結果 (1) *B. subtilis* と *B. amyloliquefaciens* の相異 従来分類法で *B. subtilis* と同定された27株のDNA相同値は *B. subtilis* 168株を標準とした場合、67~100%と17~33%の値を示し、二つのグループに大別された。前者のグループは遺伝実験によく用いられるMurburg株を含み、後者には *B. amyloliquefaciens* F株を含んでいた。後者のグループに属するKA-63株を標準とした場合、このグループの各株のDNA相同値は65%以上であり、168株に近縁な前者の各株に対する値は18~30%であった。しかしこの両者を区別できる生理学的性質は見出せなかった。一方これら二グループ間での遺伝子交換能を検討するため、5種の栄養要求マーカー (*purA*, *cysA*, *hisA*, *leuA*, *metB*)、4種の薬剤耐性マーカー (*nov^R*, *str^R*, *ery^R*, *lin^R*) および増殖温度感受性マーカー (*ts18*, *ts62*) について、KA-63株のDNAによる *B. subtilis* Murburg株への形質転換を行った。*cysA*を除く4種の栄養要求マーカーおよび *nov^R*, *lin^R* の薬剤耐性マーカーは形質転換されず、いわゆる保存遺伝子群またはその近傍に位置する *cysA*, *str^R*, *ery^R*, *ts18*, *ts62* のマーカーが形質転換された。以上の結果よりDNA相同値によって分けられた二つのグループは遺伝的にも異なり、それぞれ異種として独立させるのが適当であると考えられた。そこで168株に近縁なものを *B. subtilis*, KA-63株に近縁なものを *B. amyloliquefaciens* と呼ぶたい。またDNA相同値と遺伝学的結果からDNA相同値が約50%以上の菌株群を種と規定した。

(2) *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans* の種の単一性 従来分類法でそれぞれ *B. licheniformis*,

シンポジウム (微生物の化学分類)

B. pumilus, *B. coagulans*と同定された株についてDNA相同値を調べたところ、各々の標準株(*B. licheniformis* IF012107株, *B. pumilus* IF012092株, *B. coagulans* ATCC 7050株)に対していずれも61%, 51%, 76%以上の値を示した。このことより各々の種は(1)で述べた種の規定により単一種を形成していると思われ、従来の分類法とDNA相同性による分類とは良く一致した。

(3) *B. sphaericus*のDNA相同値 *B. sphaericus*はATCC 14577株を標準とした場合、1株は98%、他の3株は18%のDNA相同値を示した。この関係は*B. subtilis*と*B. amyloliquefaciens*の関係と類似しており、2種から成立している可能性が高くさらに多くの株で検討する必要がある。

(4) 異種間のDNA相同性 異種間でのDNA相同値を求めたところ、二つの組合せを除きDNA相同値は2~4%と低く、明らかな類縁性は認められなかった。種間で高い類縁性が認められた二つの組合せの一つは、*B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*であり、*B. subtilis* 168株に対するDNA相同値は各々約20%, 15%, 8%の関係であった。さらに*B. subtilis* Murburg株を用いた形質転換では、前述の*B. amyloliquefaciens*の他に*B. licheniformis*, *B. pumilus*からのDNAでも保存遺伝子群の形質が転換されたので、これら4種間での高いDNA相同性は保存遺伝子群に負うところが大きいと思われた。他の組合せは*B. cereus*と*B. thuringiensis*であり、*B. cereus* T株を標準とした場合、3株の*B. cereus*は79~88%のDNA相同値を示したが、3株の*B. thuringiensis*も54~80%の値を示した。このように両種間に大差は認められず、また我々の種の規定から考えてこの2種は同一種に属すると考えられた。

B. lentus および *B. pantothenicus* は各々 *B. firmus*, *B. circulans*と生理学的に類似しているため、Bergey's Manual 8版では基準種から除外されている。しかし *B. lentus*のDNA相同値は *B. firmus* ATCC 14575株に対し3%と低く、同一種とは認められなかった。また *B. pantothenicus*のDNA相同値も *B. circulans* ATCC 4513株に対し4%と低く、同一種とは認められなかったが、用いた他の2株の *B. circulans*も ATCC 4513株に対し2%のDNA相同値しか示さず、このことから *B. circulans*の種内での異質性が示唆された。以上の結果から *Bacillus*属各種の類縁性を模式的に下図に示した。種間のDNA相同値はそれぞれの分枝点で示したが、破線で示した

種は³H-チミンで標識したDNAを用いていないため、これらの種間DNA相同値は推定できなかった。また調べた限りの種内DNA相同値は梨形の範囲で示した。

