

細菌迅速同定支援システム「*microForce-ID*」*'microForce-ID'*, Rapid Identification Support System for Agro-Environmental Bacteria篠原弘亮<sup>1</sup>・西山幸司<sup>2</sup>・小坂橋基夫<sup>1</sup>・吉田重信<sup>1</sup>・對馬誠也<sup>1</sup>

Hirosuke Shinohara, Nishiyama Koushi, Koitabshi Motoo, Shigenobu Yoshida, Seiya Tsusima

## はじめに

植物病原細菌を含む細菌の同定では、従来から多数の細菌学的性質を調査し、その結果を基に細菌種を決定するのが一般的である（後藤・滝川，1984；西山・篠原，2001）。しかし、近年、DNA シークエンサー等の機器の進歩による膨大な遺伝子情報などから、細菌の分類に有効とされているいくつかの遺伝子の塩基配列情報から同定する手法も一般化されつつある。一方、植物の病原細菌や、環境中から分離された有用な細菌の同定では、しばしば迅速な同定を求められることが多く、そうした場合には、可能な限り少ない情報で迅速に同定ができる手法が求められている。しかしながら、インターネットを通じて日々情報が蓄積されている遺伝子情報に比べて、細菌学的性質に関する情報を蓄積することは難しく、このことが細菌の迅速な同定を行う上で大きな支障となっている。こうした問題を克服し細菌の迅速な同定を行うため、微生物分類研究室では、すでに学会等でも有効性が確認されている「細菌検査キット」を利用して細菌学的性質の情報を蓄積し、遺伝子情報と組み合わせて両者を一体化して同定を可能にする「細菌迅速同定支援システム（仮称）」（以下、迅速同定支援システム）を開発し、これを核とした「細菌同定依頼対応システム（仮称）」（以下、迅速同定システム）を開発することにした。迅速同定システムの考え方は、同定の目的に応じた3段階の試験項目を設定する。第1段階は、既知病害や既知細菌種の同定を目的として、「簡易同定 96」を基に主に「細菌検査キット」を用いた試験結果に基づいた同定を行う。第2段階は、新病害の報告や微生物インベントリー研究等から得られた有用菌株の特許取得等を目的とした同定に対応するため、第1段階の試験の他にさらに詳細な細菌学的性質の調査や遺伝子情報等を加えて同定を行う。第3段階は、新種記載等に対応するもので、前者2つの段階に加えて全遺伝子の相同性検定試験等を行うものである。

この迅速同定システムの特徴の一つとして、第1段階の同定に関しては、市販のキット等の確立された手法を組み合わせているため、ある程度の訓練期間を経ることにより、専門家以外でも比較的簡単に試験を行うことができる。また、同定が依頼された際に、試験結果とそれに基づく同定の結果、およびバイオセーフティーレベル（日本細菌学会作成）等のニーズに応じた関連情報が依頼者に提供される。なお、その書式、具体的内容等々について検討中である。

植物病原細菌を簡便に同定する手法に関しては、古くは、蛍光色素産生性 *Pseudomonas* 属細

\* 農業環境インベントリーセンター微生物分類研究室（1 現東北農業研究センター，\*\* 元生物環境安全全部微生物評価研究官） Microbial Systematics Laboratory, Natural Resources Inventory Center  
インベントリー，第4号，p.2-6 (2005)

菌の検索法 (LOPAT 試験) (Leliott, 1996) から Bradbury の検索法 (Bradbury, 1970) や Schaad らの検索法 (Schaad, 1988) が海外で開発されている。国内でも簡易同定 78 (西山, 1978) が開発され広く活用されていた。その後、市販の「細菌検査キット」を利用した API 法と 7 つの炭素源と 4 つの細菌学的性質を検査する MUC 法を組み合わせた「簡易同定 96」(西山, 1996) が開発、利用され既知病害の診断に貢献している。これらの手法の共通点は、菌株の同定を必要とする研究者等が自らマニュアルに従って試験を行い同定を行うものである。しかしながら、研究現場において細菌を扱う場面は、糸状菌と比べて非常に少ない。そのため、経験不足から細菌の取り扱いや試験結果の判定に苦慮することも少なくない。さらに、試薬類の使用期限などからそれらの常備も難しい。このように、細菌の同定は、完全にマニュアル化されていても、以上にあげた問題点を依然多く抱えている現状にある。そこで、これら問題の解決策の一案として、新たな同定手法として細菌同定システムを公開するのではなく、むしろ微生物分類研究室で罹病サンプルや菌株を受け付けて細菌の同定を行い、依頼者に対応するシステム (前述) を考えた。

本論文では、迅速同定システムの核として開発した迅速同定支援システム「*microForce-ID*」について報告する。迅速同定支援システムは、植物病原細菌を中心とした既存の「簡易同定 96」の微生物情報に、微生物インベントリー研究によって明らかになった各種植物の微生物フローラを構成している細菌種について、新たに「細菌検査キット」に基づく情報を追加し、さらに、データ管理システムを充実させることによって、従前に増して迅速でより広範な細菌の同定に対応可能なシステムである。この「*microForce-ID*」により、同定依頼への対応がより迅速になるばかりでなく、精度の向上により、微生物分類研究室で推進している植物に生息する微生物の同定にも大きく貢献できる。

## 材料および方法

### 1. 細菌迅速同定支援システム「*microForce-ID*」の作成

微生物分類研究室に保存している細菌の API20NE (日本ビオメリュー) による検定結果を用いて 21 項目の細菌学的性質 [生化学的性質: 硝酸塩の還元 (NIT), インドールの産生 (TRP), 発酵性試験 (FER), アルギニンデヒドロラーゼ活性 (ADH), ウレアーゼ活性 (URE),  $\beta$ -グルコシダーゼ活性 (ESC), ゼラチンの液化 (GEL),  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性 (PNG) およびオキシダーゼ活性 (OXI); 同化試験: グルコース (GLU), L-アラビノース (ARA), D-マンノース (MNE), D-マンニトール (MAN), N-アセチル-D-グルコサミン (NAG), マルトース (MAL), グルコン酸カリウム (GNT), n-カプリン酸 (CAP), アジピン酸 (ADI), dl-リンゴ酸 (MLT), クエン酸ナトリウム (CIT) および酢酸フェニル (PAC)] を調査した。

API20NE による調査結果をデータベースソフトウェア Microsoft Access 2003 で作成したデータベースに入力した。さらに、このデータベースを用いて細菌の同定に関する膨大な情報を効率的に管理し、未同定株の同定を支援するためのシステムを構築した。未同定株の同定に用いる計算方法は西山の方法 (西山, 1997) に準じて行った。

### 2. 細菌迅速同定支援システム「*microForce-ID*」の検証

微生物分類研究室で保存しているいくつかの細菌株を供試して、構築された細菌迅速同定支援システムの信頼性等を検証した。

## 結果

細菌の同定に必要な各種試験結果等の情報を活用するためのデータベースを構築した(図1, 2)。前述した第1段階に対応した部分に関しては、十分に利用可能である。これには、微生物分類研究室に保存されている植物病原細菌(その後MAFF登録した細菌を含む)を中心とした2,458株を対象に、細菌検査キットAPI20NEを用いて21項目の細菌学的性質を調査した結果がデータベース化されている。得られた検査結果は本キットのマニュアルに従って、7桁のプロフィールインデックスが付けられている(基礎データ1)。菌株の由来情報として、学名、菌株名、分離年月日、同定者、分離源、分離源情報(品種および分離部位等)、分離場所(地名および地目等)が入力されている(基礎データ2)。この2つの基礎データをデータベース化した。未同定株の同定のための計算を、未同定株のプロフィールインデックスとデータベース化した2,458株のデータを用いて行い、計算結果を候補菌種とともに画面に表示するプログラムを作成した。

培養細菌が準備されていれば、2日で未同定菌株の候補菌種の絞り込みが可能となった。システムの信頼性等の検証を行った一例として、ニガウリ青枯病菌(篠原, 2005)を検査対象とした場合の検索結果を示す。検査対象株のプロフィールインデックスは1040445であり、これを細菌迅速同定支援システム「*microForce-ID*」のメインメニュー(図1)から同定支援→API20NE→簡易同定96-API→入力画面の順に進み検査対象株のプロフィールインデックスを入力し、同定計算ボタンをクリックすると候補菌種が表示(図2)される。候補菌種として3種が表示される。候補菌種と検査対象株の由来情報(病徴やコロニー性状など)を考慮すると、検査対象株が青枯病菌である*Ralstonia solanacearum*と判断できる。

## 考察

細菌迅速同定支援システム「*microForce-ID*」が作成されたことにより、同定に際しては、微生物分類研究室の研究職員は、「*microForce-ID*」の結果から、得られた候補菌種と検査対象株の由来情報を基に、さらなる追試の必要性などの判断と、必要と判断された試験を行うだけであるため、研究職員の労力軽減を図ることが可能である。

この「*microForce-ID*」により、年間を通して受ける同定依頼への対応がより効率的になるばかりでなく、現在、微生物分類研究室で16S rRNA遺伝子のみを指標として推進している、植物に生息する微生物のインベントリー研究における同定作業が飛躍的に向上することが考えられる。「*microForce-ID*」には現在のところ、遺伝子の塩基配列情報はまだ収録されていないが、現時点で少なくとも第1段階の同定への対応は十分可能であると考えられる。

今後は、微生物分類研究室が作成している「微生物インベントリー」に蓄積されている植物生息細菌群、微生物農薬として有望な細菌群および窒素固定細菌群などを基礎データ1として蓄積し、一層の信頼性を目指す。さらに、現在使用している1種類の「細菌検査キット」に加えて、複数の細菌検査キット等を用いて詳細な細菌学的性質の情報を蓄積するとともに、遺伝子情報も加えて、第2段階(前述)の高精度、迅速、低コストな「同定システム」を完成させ、農業環境に生息する細菌群の同定を網羅的に支援できるようにしたい。



図1. 細菌迅速同定支援システム *microForce-ID* のメインメニュー画面

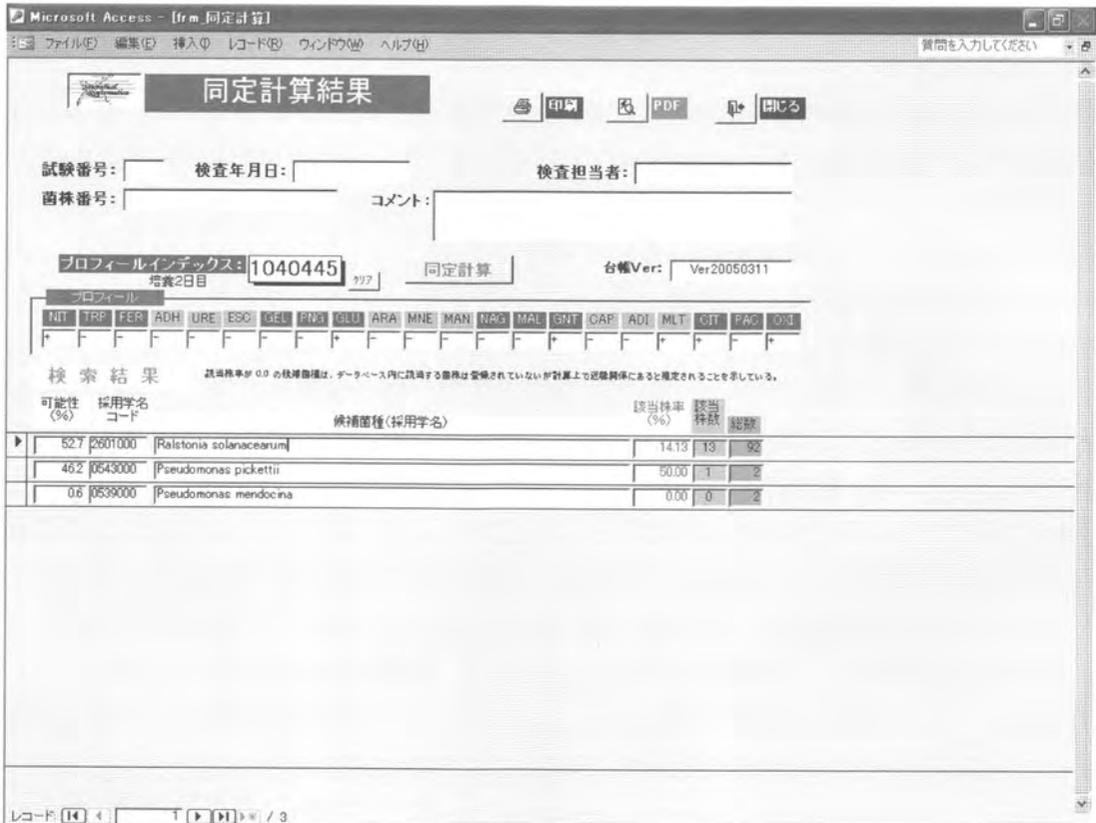


図2. 細菌迅速同定支援システム *microForce-ID* の候補菌種表示画面

## 参考文献

- 1) Bradbury, J. F. (1970) : Isolation and preliminary study of bacteria from plants. *Rev. Plant. Pathol.*, 49, 213-217
- 2) 後藤正夫・瀧川雄一(1984a) : 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方(1). *植物防疫*, 38, 339-344
- 3) 後藤正夫・瀧川雄一(1984b) : 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方(2). *植物防疫*, 38, 385-389
- 4) 後藤正夫・瀧川雄一(1984c) : 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方(3). *植物防疫*, 38, 432-47
- 5) 後藤正夫・瀧川雄一(1984d) : 植物病原細菌同定のための細菌学的性質の調べ方(4). *植物防疫*, 38, 479-484
- 6) Leliott, R. A., E. Billing, and A. C. Hayward(1996) : A determinative schema for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bact.*, 29, 470-489
- 7) 西山幸司(1978) : 植物病原細菌簡易同定法の試案. *植物防疫*, 32, 283-288
- 8) 西山幸司(1996) : パソコンを用いた植物病原細菌同定システム「簡易同定 96」の使い方. *農業環境技術研究所資料*, 第19号
- 9) 西山幸司(1997) : 鑑別表データを利用した植物病原細菌の簡易同定. *農業環境技術研究所報告*, 14, 36-48
- 10) 西山幸司・篠原弘亮(2004) : 作物の細菌病 -病徴診断と病原の同定-2004年追補3版(西山幸司ほか編). CD-ROM版, 植物防疫協会, 東京
- 11) Schaad, N. W. ed.(2001) : *Laboratory Guide for identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd. ed. 6p. APS Press, Minnesota
- 12) 篠原弘亮(2005) : *Ralstonia solanacearum* によるニガウリ青枯病の発生. *日植病報*, 71, 20-22