

放線菌の系統分類 —過去, 現在, 未来—

浜田盛之

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8

Systematics of actinobacteria —Past, present, and future—

Moriyuki Hamada

Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (NBRC)
2-5-8 Kazusakamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818, Japan

Actinobacteria are Gram-stain-positive bacteria with a variety of morphologies. They produce various secondary metabolites and are therefore treated as distinct from other bacteria. Until the early 1970s actinobacteria were classified mainly on the basis of their morphological features, but they are currently classified by a combination of their chemotaxonomic characteristics and phylogenetic relationships based on 16S rRNA gene sequences. However, this classification is problematic, because the phenotypic diversity of actinobacteria has led to excessive division of genera and species. Recent taxonomic studies using whole-genome sequences have resulted in more reliable phylogenetic relationships than those based on 16S rRNA gene sequences and should therefore facilitate the reclassification of known species. Furthermore, recent increases in the sophistication of analytical instruments are enabling more detailed chemotaxonomic characterization and could lead to the discovery of new taxonomic indicators. Therefore, more appropriate classification systems will likely be built through a combination of detailed chemotaxonomic characterization and phylogenetic analysis based on whole-genome sequences.

Key words: actinobacteria, systematics, chemotaxonomy, 16S rRNA gene, whole-genome sequence

はじめに

放線菌は細菌の一分類群であるグラム陽性細菌に属し、ゲノム DNA の GC 含量が高い (55-75 mol%程度) という共通の特徴を有す。しかし、典型的な放線菌は基底菌糸や気菌糸を伸張させて増殖し、胞子を形成するという糸状菌に類似した多様な形態分化を示す。細菌でありながら、このような複雑な生活環を示すことは、放線菌の大きな特徴の一つである。一方、放線菌は多様な生理活性物質を生産することでも知られており、これまでに発見されている微生物由来の生理活性物質の多くは、放線菌の生産物である。このように、放線菌は複雑な形態分化と生産物の多様性・有用性か

ら他の細菌と区別されて取り扱われている。

放線菌が注目されるようになったのは、1944年に Waksman らのグループが *Streptomyces griseus* の培養液中から、抗結核剤であるストレプトマイシンを発見してからである (Schatz *et al.*, 1944)。以来、放線菌は抗生物質の探索源として活発に研究が進められ、これまでに *Streptomyces* 属を中心にクロラムフェニコール (Ehrlich *et al.*, 1947)、カナマイシン (Umezawa *et al.*, 1957)、エバーメクチン (Burg *et al.*, 1979) など数多くの生理活性物質が発見、実用化され、我々人類を様々な病魔から救ってきた。新規物質の探索が盛んになると、その過程で多くの放線菌が分離され、特許上の権利もからんで数多くの新種が提唱されていったため、*Streptomyces* 属の分類は混乱を極めていった。

E-mail: hamada-moriyuki@nite.go.jp

その後、*Streptomyces* 属以外の放線菌にも新規物質探索の対象が広がることで多くの新属が発見され、リボソーム遺伝子配列を用いた系統解析の導入による放線菌の範囲の拡大と相まって、今日では放線菌はグラム陽性細菌の一大分類群となっている。

本稿では、放線菌の分類における歴史と現状について概説するとともに、筆者らがこれまでに行ってきた分類学的研究、特に全ゲノム情報や化学分類を用いた分類研究を中心に紹介し、筆者が考える放線菌の系統分類における将来の展望について述べたい。

放線菌分類の歴史

1875年、Cohnによって放線菌は初めて記載されたが、注目を集め始めたのは前述のとおり、ストレプトマイシンの発見以降である。当初は放線菌の分類指標として、コロニーの色調などの培養性状、胞子または孢子嚢形成の有無とその形状や着生位置、連鎖する胞子の数やその形状といった形態学的特徴、胞子の運動性の有無、生理・生化学的性状などが主に用いられていた。しかしその後、放線菌の選択分離培地や選択分離手法に関する研究が活発に行われ、*Streptomyces* 属以外の自然界における分布数が少ない希少放線菌が数多く発見されてくると、これまでの指標だけでは分類が困難となっていった。

1970年代になると、菌体成分の多様性に着目した化学分類が重要視されるようになった。放線菌は化学分類性状が他の細菌と比べて非常に多様であったため、化学分類による分類に適していた。化学分類性状も表現性状であるが、分類に用いられている多くの生理・生化学性状が代謝能力に依存しており、再現性が問題になりやすいのに対して、化学分類は細胞成分を分析することでデータを得るため、データの安定性が高く、手法の汎用性も高いのが利点である。主な化学分類指標としては、細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸組成やその配列、細胞壁あるいは全菌体に含まれる還元糖、細胞膜構成成分であるリン脂質や脂肪酸の組成、呼吸系の補酵素であるイソプレノイドキノン等が挙げられる。これらの化学組成の差異は主に属レベルの分類において有効である (Goodfellow & Minnikin, 1985; 駒形, 1982)。放線菌の分類において、これらの化学分類性状の重要性は現在でも変わっておらず、1970年代に研究が進められた多くの化学分類性状は今もなお、放線菌の新規分類群提唱において必須の項目となっている。特に、細胞壁ペプチドグリカンのアミノ酸構造は放線菌の化学分類における最重要項目で

あり、Lechevalier & Lechevalier (1970) による細胞壁化学型や Schleifer & Kandler (1972) によるペプチドグリカンタイプは、現在でも広く用いられている。

1990年代に入ると、放線菌の分類にも系統分類が導入されていった。ご承知のとおり、現在では16S rRNA 遺伝子の塩基配列が放線菌を含む原核生物の系統分類において用いられており、ほぼ全ての原核生物の基準株の配列が公共データベースに登録されている。

分類は進化の道筋、すなわち系統を反映したものでなければならぬが、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析により、化学分類性状が系統関係と高い相関を示し、分類学上重要な指標であることが立証された。一方で形態的な差異は系統関係と相関があるとは必ずしも言えず、その分類指標としての価値は相対的に下がる結果となった。放線菌の属は、系統的にクラスターを形成するというだけでなく、化学分類性状によって明確に特徴付けができる場合が多い。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析において、放線菌は比較的コンパクトにまとまっているグループであるにも関わらず、属の数が極めて多いのは、その化学分類性状をはじめとする表現型の多様さによるものである。すなわち、放線菌は区別できるという意味で、分類学者にとって「仕事がしやすい」分類群であると筆者は感じている。

放線菌の範囲

これまでは、菌糸状に生育する典型的な放線菌について述べてきたが、高GC含量グラム陽性細菌の中には菌糸状の形態を示さないもの、あるいは特定の培養条件によってのみ菌糸状に生育する分類群も存在する。現在これらは「アクチノバクテリア」と総称されることが多く、さらに細分化してコリネ型細菌あるいはノカルディア型細菌と呼ばれることもあり、伝統的に菌糸状放線菌とは区別して考えられてきた。しかしながら、分類学的研究が進められていく過程で、菌糸状放線菌とアクチノバクテリアの化学分類性状が非常に類似していることが明らかとなった。また、前述のとおり培養条件によって菌糸状にも球菌・桿菌状にもなる、形態的に菌糸状放線菌とアクチノバクテリアの中間に位置するような分類群も存在している。先に述べたとおり、1990年代に16S rRNA 遺伝子塩基配列による分子系統学的研究が活発に行われるようになると、菌糸状の放線菌とアクチノバクテリアは系統的に混在することが明らかとなった。この状況を踏まえて、Stackebrandt *et al.* (1997) は、16S rRNA 遺伝子塩

基配列に基づく分子系統を用いて高次分類群を定義することを提唱し、*Actinobacteria* 綱を新設した。そしてこの中に菌糸状放線菌とアクチノバクテリアの両方を包含したため、現在では *Actinobacteria* 綱の中の *Actinomycetales* 目に含まれる菌群全てのことを広義の「放線菌」と定義することが一般的となった(宮道, 2001)。この放線菌の範囲の拡大により、結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) やグルタミン酸生産菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、ニキビの原因菌であるアクネ菌 (*Propionibacterium acnes*) などの球菌・桿菌状のアクチノバクテリアも放線菌とみなされるようになった。現在では、放線菌 (*Actinomycetales* 目) は 14 亜目 43 科を擁する巨大分類群となっている。放線菌に含まれる属の数は優に 280 を超えており、原核生物の中で最大級の目である。ちなみに *Actinomycetales* 目の中で、*Actinomycineae* 亜目、*Corynebacterineae* 亜目、*Micrococccineae* 亜目、*Propionibacterineae* 亜目に含まれるほとんどの属は菌糸状に生育しない。これらは属の数でいえば全放線菌の約半数にもなり、「カビのように菌糸状に生育する細菌の仲間が放線菌」というかつてのイメージは、現在においては適切でないと言えよう。現在の放線菌の定義において共通する性状は、DNA の GC 含量が高いことと、グラム染色陽性であるという二点である。

近年、放線菌における高次分類に変更が加えられた。2012 年に出版された *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 第 2 版 Vol. 5 において、亜綱と亜目という分類階級は用いられず、それぞれ綱と目に格上げする形で掲載されたのである。これに従うと、*Actinobacteria* 綱は 6 綱 (*Acidimicrobiia*, *Actinobacteria*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria*, *Thermoleophila*) に再分類されることになり、実際、2013 年に *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (IJSEM) の validation list に記載された。従って、これまでの *Actinobacteria* 綱は、一つ上の分類階級である *Actinobacteria* 門に置き換えて考える必要がある。一方、亜目を目に置き換える点に関する変更は、現在のところ IJSEM において正式に承認されていない。この変更が validation list に記載されると、これまで放線菌の定義として用いていた *Actinomycetales* 目は 14 目に再分類されることになり、変更後の *Actinomycetales* 目は *Actinomyces* 属などごく一部の放線菌のみを含む分類群になってしまう。近年再定義された *Actinobacteria* 綱が従来の *Actinomycetales* 目

に最も近い「放線菌」の再定義は「*Actinobacteria* 綱に含まれる菌群」とするのが最も受け入れやすいと思うが、この綱にはヨーグルトでお馴染みのビフィズス菌などが所属する *Bifidobacteriales* 目も含まれることになるため、議論が分かれるかもしれない。近年の系統学的研究の進展から、放線菌に類縁であるが、従来の放線菌の定義には含まれない菌群の全体像も少しずつ明らかになってきている。これらの菌群も含めた形で放線菌の範囲を拡大し、「*Actinobacteria* 門に含まれる菌群全て」を放線菌と定義付けるべきではないかというのが筆者の私見である。

近年の放線菌分類研究と将来展望

これまで述べたとおり、放線菌はその多様な化学分類性状により、明確に分類群が特徴付けられている場合が多い。さらに、分類指標となる表現性状として化学分類性状のみならず、古くから用いられている形態や培養性状、生理活性物質の生産能などの性状も変わらず多様であるため、それらを総合して解釈することによって分類群の特徴付けがしやすいため、系統的には非常に近い関係であっても、属や種を細かく分けることができてしまっているのが実情である。例えば *Streptomyces* 属は古くから研究が盛んに行われ、その生産物の多様性も相まって、現在 550 種を超える種が記載されている。*Streptomyces* 属は非常に大きな属であるが、系統的にはそれほど広がりがある訳ではなく、16S rRNA 遺伝子配列が僅か 1% 違うだけで、数十種という数の種がひしめいているクラスターもあり、従来の 16S rRNA 遺伝子を主とした分類では解像度的に限界がある。ここでは、近年放線菌の分類においても少しずつ広がりを見せ始めている全ゲノム情報を用いた分類研究と、分析機器の進歩に伴う化学分類性状の再評価について、いくつか実例を紹介する。

1) ゲノム情報を用いた分類研究

16S rRNA 遺伝子は保存性が高く、原核生物全般の系統関係を明らかにするのに適している。しかしながら、分類群によっては 16S rRNA 遺伝子では解像度が低く、安定した系統関係を得られないことがある。このような場合、16S rRNA 遺伝子に加えて、より多くのハウスキープング遺伝子の配列を用いて系統分類を行う試みとして multilocus sequence analysis (MLSA) が多くの原核生物の属において行われている。また、従来の DNA-DNA ハイブリダイゼーションの代わりとして、全ゲノム配列を用いて比較を行う

手法も開発されている。例えば、average nucleotide identity (ANI; Goris *et al.*, 2007), DNA maximal unique matches index (MUMi; Deloger *et al.*, 2009), genome-to-genome distance calculator (GGDC; Auch *et al.*, 2010) などがあるが、近年においては ANI が主流となっている。放線菌はそのゲノムサイズの大きさ故にゲノム解析が難しく、他の細菌と比べると MLSA や ANI を用いた分類研究が遅れている。筆者らのグループは、いくつかの放線菌分類群において、ドラフトゲノムシーケンスを用いた新規分類群の提唱や既知分類群の再分類などを行っているので、ここで 2 つの事例を紹介する。

Nocardia 属は病原菌を多く含む属であるが、抗生物質等の生理活性物質生産菌も多く知られており、現在およそ 90 種が記載されている。筆者らのグループは、NBRC で保有する *Nocardia* 属の株のうち、71 種 73 株のドラフトゲノムを決定し、ANI 等を用いた解析を行った。なお、ANI 値 96% が DNA-DNA ハイブリダイゼーションによる類似度 70% に相当すると報告されており、種の識別に用いることができる (Goris *et al.*, 2007; Richter & Rosselló-Móra, 2009)。この研究の結果、*Nocardia* 属の既知種には ANI 値 96% を超える種の組み合わせが 4 グループあることが明らかとなり、これらはそれぞれ同種となることが示唆された (Tamura, 2014; Tamura *et al.*, 2012)。古くに発表された放線菌の種は、生産物や病原性に基づいて作られたケースが多く、現在の分類学的基準で比較、検討されていないものが今もなお数多く存在する。DNA-DNA ハイブリダイゼーションは実験手法の難しさや手間から、多くの種の間で網羅的に行うのは困難である。しかし、ゲノムさえ解読されていれば、ANI 値を算出するのは容易である。公共データベースに全ゲノム情報が登録されている種は、今のところごく一部である。しかし、DNA シーケンサーの進歩により、今後加速度的に増えることは間違いないだろう。全ゲノム情報の充実に伴って、今回の *Nocardia* 属のケースのような属レベルの網羅的な再分類が進むことが期待される。

次に、*Herbidospira* 属と *Acrocarpospora* 属の例を紹介する。これら 2 つの属は化学分類性状が類似しているが、形態学的特徴で区別されている属であり、種数が少なかった間は系統的にも明確に分かれていた。しかし、新種が次々と発見されてくると、系統的に両属は混在するようになった。これら 2 つの属に含まれる全ての種は 16S rRNA 遺伝子の配列において

97% 以上の相同値を有している。ゲノム情報を用いて両属に含まれる種の間 ANI を算出したところ、*Herbidospira* 属内の種間では 87.4–93.9% と非常に高い値を示したが、*Acrocarpospora* 属の種とでは 76.4–77.6% と低かった。同様に *Acrocarpospora* 属内の種間で 86.0–93.7% と高く、*Herbidospira* 属の種とでは 76.7–77.8% と低かった (Tamura, 2014)。すなわち、両属は 16S rRNA 遺伝子による系統関係ではもはや見分けがつかなくなっていたにも関わらず、全ゲノム情報を用いた ANI で解析することにより明確に区別され、さらにそれらの形態的特徴とも見事に一致したのである。ANI のようなゲノムを比較する手法は、原則的には非常に近縁な種の比較において有効であり、属レベル以上の分類群の比較には適さないが、今回のケースは ANI が属レベルの分類において適用できた例といえる。このように、ゲノム情報を用いた手法は新種提唱において DNA-DNA ハイブリダイゼーションの代わりとして用いることができるだけでなく、既知分類群の再分類や各種表現性状と組み合わせた属の定義付けにおいても有効な場合がある。特に種間の 16S rRNA 遺伝子配列相同性が高い放線菌においては有効な手法であると言えよう。

さらに、放線菌は多様な生理活性物質の生産菌を含むため、ゲノム情報はその株における生産物の新規性や多様性を遺伝子レベルで明らかにしてくれる。一方で、放線菌はプラスミドのみならず染色体 DNA もダイナミックな欠失や組換えを起こすことが知られており、同種の基準株であっても菌株の来歴の違いによって、いくつかの生合成遺伝子クラスターが欠落している例があることが報告されている (Komaki *et al.*, 2014)。このように、ゲノム情報は学術的な分類学だけではなく、菌株の産業利用のための情報としての分類学においても重要な意味を持つてくるのではなかろうか。今後の研究の進展により、ゲノム情報が放線菌分類の世界において、さらに有効活用されていくことが期待される。

2) 化学分類性状の再評価

既に広く用いられている化学分類性状の中には、近年の分析機器の進歩に伴って、より詳細に調べることが可能となっているものもある。ペプチドグリカンのアミノ酸組成を例として紹介する。

細胞壁の主要構成成分であるペプチドグリカンは、*N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルムラミン酸が交互に結合したグリカン層と、*N*-アセチルムラミン

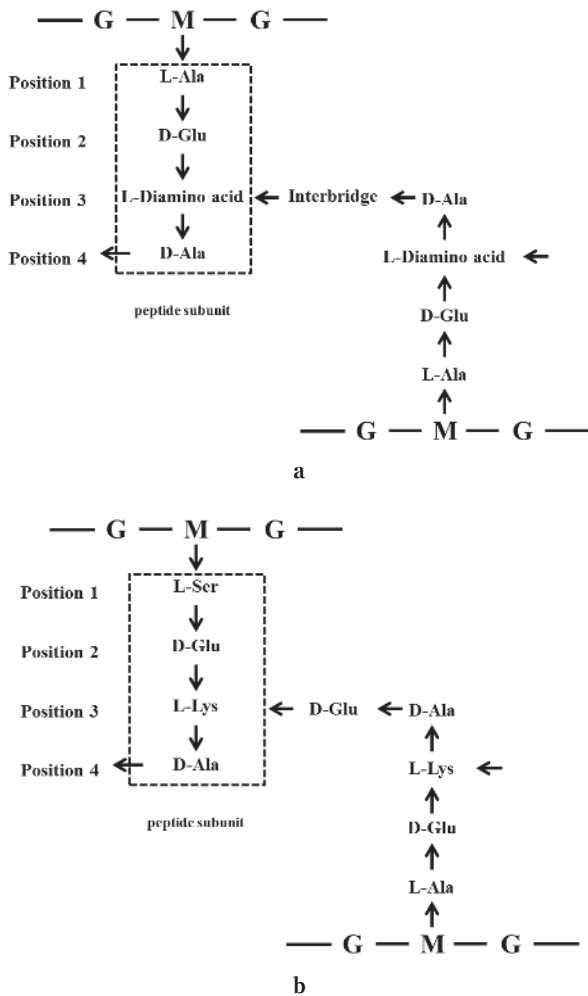


図1 典型的な細菌のペプチドグリカン構造 (a) と *Serinibacter* 属のペプチドグリカン構造 (b). G, N-acetyl-glucosamine; M, N-acetyl-muramic acid

酸から伸びるテトラペプチドで構成される (図1). Schleifer & Kandler (1972) は、このペプチドグリカンのアミノ酸構造について詳細に研究し、ペプチドグリカントイプを提唱した。他の細菌と比べると放線菌 (特に菌糸状に生育しないアクチノバクテリア) はペプチドグリカンのアミノ酸組成が極めて多様であるため、重要な化学分類指標として用いられている。テトラペプチドで構成されるペプチドサブユニットは、原則として1位にL-アラニン (一部の菌群はグリシン)、2位にD-グルタミン酸、3位にL体のジアミノ酸 (リジン, オルニチン, 2,6-ジアミノピメリン酸, 2,4-ジアミノ酪酸など)、4位にD-アラニンという順番でペプチド結合しており、3位のジアミノ酸が何かという点が最も重要な指標となる。一方で、1位、2位、4

位のアミノ酸はどの分類群においてもほとんど違いがないため分類指標にはなっていない。筆者らはHPLCを用いたペプチドグリカン構成アミノ酸の定量分析にLCMSを用いた各アミノ酸の異性体分析を組み合わせることで、詳細なペプチドグリカン構造の推定を行っている。その過程で、本来1位に入るべきL-アラニンもグリシンも含まず、代わりにL-セリンが1位に入ると予測されるアクチノバクテリアを発見し、新属 *Serinibacter* として提唱した (図1) (Hamada *et al.*, 2009)。このペプチドグリカン構造は過去に *Salana* 属においてのみ報告があったものである (von Wintzingerode *et al.*, 2001)。従来、大部分の放線菌分類学者はTLCもしくはHPLCのみを用いてアミノ酸分析を行っているため、このような細かな部分の特徴まで見いだすことはできなかった。実際、その後筆者らが研究を進めていくと、同様に1位がL-セリンと考えられる株が *Demequina* 属 (Hamada *et al.*, 2013), *Lysinimicrobium* 属 (Hamada *et al.*, 2012), *Miniimonas* 属 (Hamada, 2014), *Branchiibius* 属 (Tomida *et al.*, 2011) にも分布していることが明らかとなり、系統との相関性も示唆されている。筆者らがこれまでにペプチドグリカン分析を行った僅か数十株の中からも、これだけの株がこの特徴を有していたという事実は、放線菌のペプチドグリカンを詳細に調べ直せば、相当数の分類群がこの性状を有している可能性を示唆している。筆者は、この性状が属あるいは科レベルの新たな分類指標になり得ると考えている。

また、結核菌やノカルディアなど *Corynebacterineae* 亜目に含まれる放線菌は、細胞壁の外側に多量のミコール酸が結合しており、そのミコール酸の総炭素数の分布が属レベルの指標として用いられている。この性状も、多くの分類学者はTLCを用いて既知の分類群のミコール酸と比較するという大まかな分析しか行っていない場合が多いが、HPLCやGC/MSなどによる分析方法も開発されてきている。最近では生体関連試料を分解せずに質量分析できるMALDI-TOF MSを用いた詳細なミコール酸分析が試みられており (Teramoto *et al.*, 2013; Lanéelle *et al.*, 2012)、正確な総炭素数の分布のみならず、酸化型ミコール酸の有無や不飽和の数など、これまで分類において考慮されてこなかった部分の詳細なデータが得られるようになってきている。これらのデータは分類指標としての応用が期待されるのみならず、ミコール酸と病原性との関係解明にも寄与するであろう。

このように、分析機器の進歩により得られる新たなデータは、各種化学分類指標の価値をより高める可能性を秘めている。また、MLSA や ANI を用いた解析結果と化学分類や形態といった表現性状を組み合わせることにより、従来の 16S rRNA 遺伝子による系統関係とは相関が見いだせず分類指標としての価値を失っていった性状であっても、実は分類群の特徴付けにおいて有用であるという例がたくさん出てくると筆者は考えている。ゲノム情報全盛の時代になると、菌そのものを見ない微生物学者が現れてくるかもしれない。しかし、生物を分類する以上は系統を考慮しつつも、可能な限り表現性状によって裏付けられた分類を心がけていくべきであろう。

おわりに

放線菌分類の歴史と将来展望という筆者にとっては非常に大それたテーマをいただき、ここまで偉そうなことを述べてきた。しかし、筆者は放線菌分類の世界に身を置いて間もない新参者である。こうして放線菌分類の歴史を振り返ると、数多くの先人たちにより、形態、化学分類、系統と時代とともに視点を移しながら積み重ねられてきた放線菌分類学の重みを改めて痛感する。

DNA シーケンサーの進歩により、全ゲノムの解読が今後ますます容易になるのは確実である。しかし、そこから得られる膨大なデータをどう分類に活用していくかは、これからの微生物分類学者に課せられた共通の課題であろう。放線菌は、多様な形態、化学分類性状、生産物を有する非常に興味深い分類群である。これらの豊富な表現性状の分類学における重要性は今後も変わることはなく、むしろゲノム情報と組み合わせることでその価値は高まっていくであろう。分類学は体系も指標も確立され、固定されたものではない。そのため、新たな機器や手法によって得られた詳細な化学分類データと、ゲノム情報から得られるより確かな系統解析の結果を、既知分類群に適用し、評価することを繰り返すことによって、さらなる有用な指標に基づく分類体系が生まれてくるであろう。

謝辞

本稿の執筆にあたり、ご助言を賜りました(独)製品評価技術基盤機構 鈴木健一朗博士ならびに田村朋彦博士に深く感謝申し上げます。

文献

- Auch, A.F., von Jan, M., Klenk, H.P. & Goker, M. 2010. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. *Stand. Genomic Sci.* **2**: 117-134.
- Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hatman, R., Kong, Y.L., Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J.B., Wallick, H., Stapley, E.O., Oiwa, R. & Ōmura, S. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**: 361-367.
- Deloger, M., El Karoui, M. & Petit, M.A. 2009. A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between mosit bacterial species and genera. *J. Bacteriol.* **191**: 91-99.
- Ehrlich, J., Bartz, Q.R., Smith, R.M. & Joslyn, D.A. 1947. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science* **106**: 417.
- Goodfellow, M. & Minnikin, D.E. 1985. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, Academic Press, London.
- 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**: 81-91.
- Hamada, M., Iino, T., Tamura, T., Iwami, T., Harayama, S. & Suzuki, K. 2009. *Serinibacter salmoneus* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from the intestinal tract of a fish, and emended descriptions of the families *Beutenbergiaceae* and *Bogoriellaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 2809-2814.
- Hamada, M., Tamura, T., Yamamura, H., Suzuki, K. & Hayakawa, M. 2012. *Lysinimicrobium mangrovi* gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from the rhizosphere of a mangrove. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 1731-1735.
- Hamada, M., Tamura, T., Yamamura, H., Suzuki, K. & Hayakawa, M. 2013. *Demequina flava* sp. nov. and *Demequina sediminicola* sp. nov., isolated from sea sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 249-253.

- Hamada, M. 2014. The family *Beutenbergiaceae*, In Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. & Thompson, F. (eds.), *The Prokaryotes: Actinobacteria*, fourth edition. p. 133-140, Springer, New York.
- 駒形和男 (編) 1982. 微生物の化学分類実験法, 学会出版センター. 東京.
- Komaki, H., Ichikawa, N., Sekine, M., Kitahashi, Y., Fujita, N. & Suzuki, K. 2014. *Streptomyces avermitilis* NBRC 14893^T has complestatin and oxazolomycin analog biosynthetic gene clusters, which do not exist in the reported genome sequence of *S. avermitilis* MA-4680^T. *Microbiol. Cult. Coll.* **30**: 1-11.
- Lanéelle, M.A., Launay, A., Spina, L., Marrakchi, H., Laval, F., Eynard, N., Lemassu, A., Tropis, M., Daffé, M. & Etienne, G. 2012. A novel mycolic acid species defines two novel genera of the *Actinobacteria*, *Hoyosella* and *Amycolicococcus*. *Microbiol.* **158**: 843-855.
- Lechevalier, M.P. & Lechevalier, H.A. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435-443.
- 宮道慎二 2001. 放線菌の基本的特徴, 日本放線菌学会 (編), 放線菌の分類と同定, p. 3-8, 日本学会事務センター, 東京.
- Richter, M. & Rosselló-Móra, R. 2009. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 19126-19131.
- Schatz, A., Bugle, E. & Waksman, S.A. 1944. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **55**: 66-69.
- Schleifer, K.H. & Kandler, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**: 407-477.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A. & Ward-Rainey, N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 479-491.
- Tamura, T., Matsuzawa, T., Oji, S., Ichikawa, N., Hosoyama, A., Katsumata, H., Yamazoe, A., Hamada, M., Suzuki, K., Gono, T. & Fujita, N. 2012. A genome sequence-based approach to taxonomy of the genus *Nocardia*. *Antonie van Leeuwenhoek* **102**: 481-491.
- Tamura, T. 2014. *Micromonosporaceae* strains isolated from mangrove forest at Iriomote Island Japan. XVII. International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Book of abstracts, p. 73.
- Teramoto, K., Tamura, T., Hanada, S., Sato, T., Kawasaki, H., Suzuki, K. & Sato, H. 2013. Simple and rapid characterization of mycolic acids from *Dietzia* strains by using MALDI spiral-TOFMS with ultra high mass-resolving power. *J. Antibiot.* **66**: 713-717.
- Tomida, J., Sakamoto, D., Sugita, T., Fujiwara, N., Naka, T., Hamada, M., Morita, Y. and Kawamura, T. 2011. *Branchiibius cervicis* sp. nov., a novel species isolated from patients with atopic dermatitis. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**: 503-507.
- Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Yagishita, K., Kondo, S., Okami, Y., Utahara, R., Osato, Y., Nitta, K. & Takeuchi, T. 1957. Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J. Antibiot.* **10**: 181-188.
- von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., Siddiqui, R.A., Rösick, U., Schumann, P., Frühling, A., Rohde, M., Pukall, R. & Stackebrandt, E. 2001. *Salana multivorans* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated from an anaerobic bioreactor and capable of selenate reduction. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1653-1661.