

受賞総説

嫌気性グラム陰性桿菌の分類学的研究

(平成 20 年度日本微生物資源学会奨励賞受賞)

坂本光央

独立行政法人理化学研究所 バイオリソースセンター 微生物材料開発室 (JCM)
〒351-0198 埼玉県和光市広沢 2-1

Taxonomic studies of Gram-negative anaerobic rods

Mitsuo Sakamoto

Microbe Division/Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center
2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198, Japan

Gram-negative anaerobic rods, especially the genus *Bacteroides*, are part of the indigenous microbiota of the human and animal gastrointestinal tract, but different species in this group are commonly associated with a variety of human and animal infections. The genus *Bacteroides* is an important bacteria group in clinical bacteriology. In the past, because of poor definition of the genus, more than 50 species of *Bacteroides* have been included in this group. In the late 1980s, many techniques were applied and further reinforced the considerable inter- and intraspecies diversity of this genus. DNA base composition, which is considered the most reliable criterion for circumscribing the limits of a genus, provided the impetus to restructure the genus, which then comprised species that possessed mol% G+C contents of 28 and 61. Consequently the genus *Bacteroides* was redefined to encompass species that formed a cluster that was phenotypically and genetically akin to the type species, *B. fragilis*. Subsequently, two other large groups of species, *Porphyromonas* and *Prevotella*, were proposed together with several monospecific genera. In this study, we propose novel genera such as *Barnesiella*, *Parabacteroides* and *Tannerella*. In addition, nine novel *Bacteroides* species (*B. coprocola*, *B. coprophilus*, *B. barnesiae*, *B. dorei*, *B. finegoldii*, *B. gallinarum*, *B. intestinalis*, *B. plebeius*, and *B. salanitronis*) and seven novel *Prevotella* species (*P. copri*, *P. multiformis*, *P. multisaccharivorax*, *P. pleuritidis*, *P. salivae*, *P. shahii*, and *P. stercorea*) are proposed.

はじめに

嫌気性グラム陰性桿菌, 特に *Bacteroides* 属は, ヒトおよび動物の腸管内の常在菌として多数棲息しており, また時としてヒトおよび動物に様々な疾患を起こさせる菌種を含み臨床細菌学上重要な細菌群である. 従来, 形態学的特徴や生理・生化学的性質に基づいてその分類が行われ, 1980年代初めまでは本属の定義が曖昧であったため, *Fusobacterium* 属あるいは *Leptotrichia* 属に分類できない偏性嫌気性, 無芽胞性のグラム陰性桿菌のほとんどが *Bacteroides* 属に分類されていた (Holdeman *et al.*, 1984; Moore *et al.*, 1985). その後, Shah と Collins (1989) によって

Bacteroides 属の記載が修正され (*Bacteroides* 属は基準種 *B. fragilis* とその類縁種である *B. caccae*, *B. distasonis*, *B. eggerthii*, *B. merdae*, *B. ovatus*, *B. stercoris*, *B. thetaiotaomicron*, *B. uniformis* および *B. vulgatus* に限定された: 狭義の *Bacteroides* 属), 多くの菌種が本属から *Porphyromonas* 属 (Shah & Collins, 1988) および *Prevotella* 属 (Shah & Collins, 1990) へと移籍された (詳細は総説 (坂本, 2007) を参考にされたい). 細菌の分類に 16S rRNA 遺伝子配列の比較という手法が本格的に導入されていなかった当時, 前述の新属は, 主に終末代謝産物, DNA の G+C mol%, 各種脱水素酵素 (グルコース 6 リン酸脱水素酵素, 6 ホスホグルコン酸脱水素酵素, リンゴ酸脱水素酵素およびグルタミン酸脱水素酵素) の有無,

E-mail: sakamoto@jcm.riken.jp

菌体脂肪酸組成およびメナキノン組成などの違いに基づいて創設された。

本研究では、Shah と Collins による再分類後も長い間その分類学的位置付けが不明確であった *B. distasonis*, *B. merdae* および *B. forsythus* を 16S rRNA 遺伝子配列の比較のみならず、菌体脂肪酸組成やメナキノン組成などを詳細に比較検討した。さらに、ヒトおよびニワトリから分離された菌株について分類学的な考察を基に新種提案を行った。

新属の創設

1) *Tannerella* 属

代表的な歯周病原性細菌である *B. forsythus* (Tanner *et al.*, 1986) は、1989 年の Shah と Collins の提案により狭義の *Bacteroides* 属から除外され、分類学的位置付けが不明確であった。また 16S rRNA 遺伝子配列による解析から、その他の *Bacteroides* 属菌種と系統学的に離れており、*Porphyromonas* クラスターに近い位置にあるが、それとは独立して新しいブランチを形成し、新属の可能性が示唆された (Paster *et al.*, 1994)。

我々は *B. forsythus* についてその分類学的検討を行った。*B. forsythus* は偏性嫌気性、無芽胞のグラム陰性細菌であり、この点は狭義の *Bacteroides* 属と一致しているが、20% の胆汁を含む培地に生育せず、*N*-acetylmuramic acid を生育に必須に要求する点で異なっていた。また、菌体脂肪酸組成中で iso-C_{15:0} に対する anteiso-C_{15:0} の比率が狭義の *Bacteroides* 属とは著しく異なっていることが最大の特徴であった。我々はこれらの結果に基づいて *B. forsythus* を新属として独立させることが妥当であると考え、新属・新組み合わせ、*Tannerella forsythensis* として命名提案した (Sakamoto *et al.*, 2002)。その後、属名の変更にともない、種名を *forsythensis* から *forsythia* に変更すべきであるとの提案がなされていたが (Maiden *et al.*, 2003)、国際細菌分類命名委員会裁定委員会最近になって漸く、種名を *forsythia* に変更すべきであるとの見解を発表した (Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes, 2008)。

2) *Parabacteroides* 属

B. distasonis および *B. merdae* は、1989 年の Shah と Collins の提案による狭義の *Bacteroides* 属に含まれるものの、16S rRNA 遺伝子配列による解析から、

その他の *Bacteroides* 属菌種と系統学的に離れており、新属の可能性が示唆された (Paster *et al.*, 1994)。Song らは前述の 2 菌種と系統学的に近縁である *B. merdae* 様菌株を、生理・生化学的性状が狭義の *Bacteroides* 属に合致し、新属としての鑑別性状が見出せないとして、本菌種を *Bacteroides* 属の新菌種 *B. goldsteinii* として提案した (Song *et al.*, 2005)。

我々は *B. distasonis*, *B. merdae* の 2 菌種と研究中に新種提案された *B. goldsteinii* を含めその分類学的検討を行った。3 菌種は *T. forsythia* (前述) と系統学的に近縁であるが、これら 3 菌種の菌体脂肪酸組成中で iso-C_{15:0} に対する anteiso-C_{15:0} の比率が *T. forsythia* とは著しく異なっていた。また、*T. forsythia* の主要なメナキノンは MK-10 および MK-11 であるのに対して、3 菌種は MK-9 および MK-10 を主要メナキノンとして有していた。3 菌種はいずれも、20% の胆汁を含む培地に良好に生育し、この点は狭義の *Bacteroides* 属と一致している。しかし、前述のとおり、その他の *Bacteroides* とは明らかに系統学的に離れており、さらに、*T. forsythia* と同様に主要なメナキノン組成 (その他の *Bacteroides* は MK-10 および MK-11) によって識別が可能であった。これは上記 3 菌種を既存の *Bacteroides* 属から独立させる重要な化学分類学的性状と考えられた。我々はこれらの結果に基づいて *B. distasonis*, *B. goldsteinii* および *B. merdae* を新属として独立させることが妥当であると考え、新属・新組み合わせ、*Parabacteroides distasonis*, *P. goldsteinii* および *P. merdae* として命名提案した (Sakamoto & Benno, 2006)。また我々は、*P. merdae* 菌株の収集過程で、菌種特異的プライマーを用いた PCR 法によって *P. merdae* と同定できなかった *P. merdae* 様菌株について、その分類学的検討を行った。本菌株は 16S rRNA 遺伝子配列の類似度が *P. merdae* と 98% と非常に近縁であった。しかし、前述のように ITS 領域を標的とする PCR 法 (Liu *et al.*, 2003) によっては本菌株は *P. merdae* と同定できなかった。本菌株と *P. merdae* は表現性状が類似していたが、L-アラビノースおよび L-ラムノースの糖分解性で両者の識別が可能であった。また、本菌株は *P. merdae* と異なり、*P. distasonis* と同様にカタラーゼ活性を有していた。さらに、*P. merdae* との DNA-DNA 相同性実験を行ったところ、*P. merdae* との相同性が 60% 以下であった。我々はこれらの結果に基づいて本菌株を *Parabacteroides* 属に属する新菌種であると考え、*P. johnsonii* として命名提案した

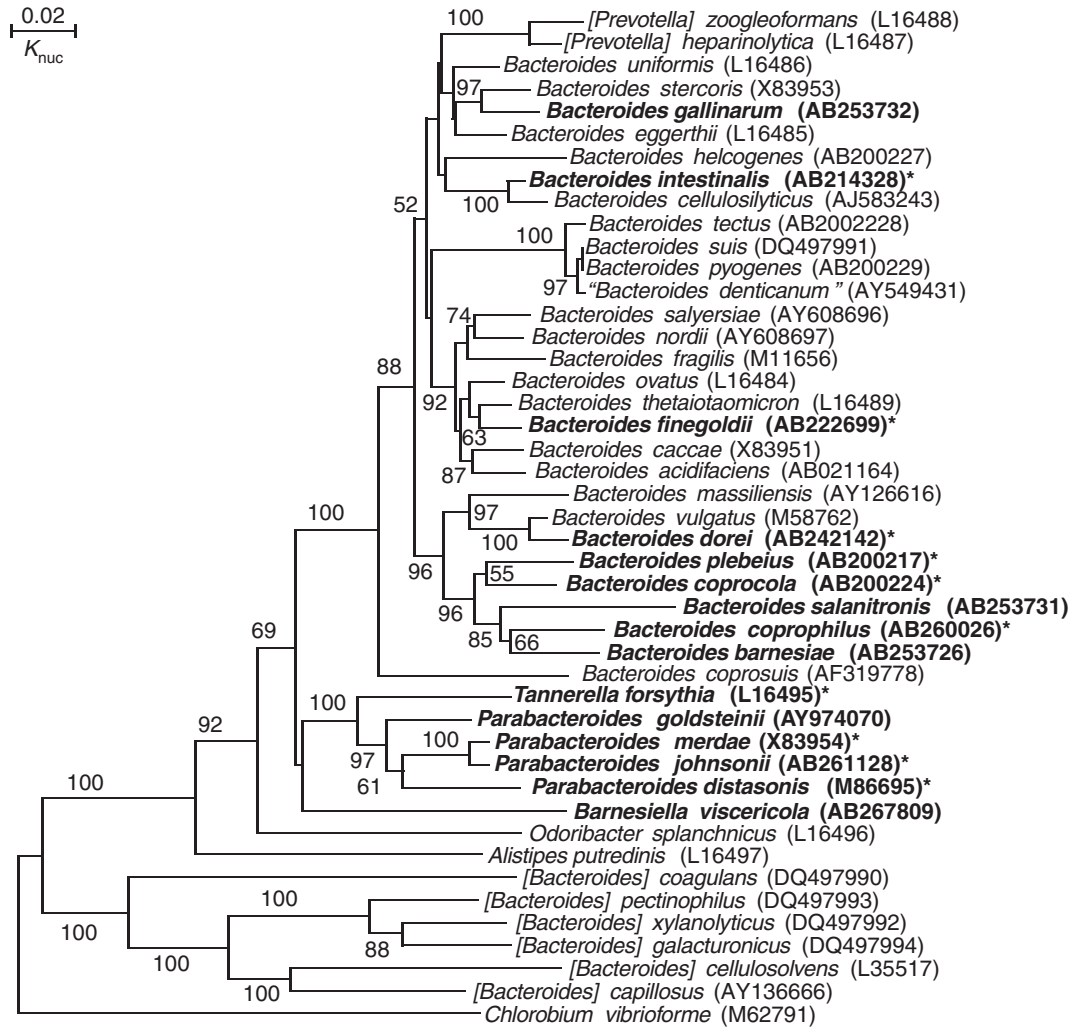


図1 *Bacteroides* 属と類縁細菌群の系統学的位置

太字で示した菌種は筆者らによって新種提案を行った菌種 (*が付いた菌種は現在ゲノムプロジェクトの対象菌種)。

(Sakamoto *et al.*, 2007a).

3) *Barnesiella* 属

ニワトリの盲腸内細菌叢の研究の過程で、*Bacteroides* 様菌株が分離された (Lan *et al.*, 2002)。これら菌株は、16S rRNA 遺伝子配列による解析から、*Bacteroides* 属とは異なり *Porphyromonadaceae* 科内に既存の属とは独立したクラスターを形成した。また胆汁に対して感受性を示し、他属と異なり、MK-11 および MK-12 を主要メナキノンとして有していた。さらに DNA の G+C mol% が 52% と高いのが特徴であった。我々はこれらの結果に基づいてこれら菌株を新属・新菌種 *Barnesiella viscericola* として命名提案

した (Sakamoto *et al.*, 2007b)。近年の大規模なヒト腸内細菌叢の解析 (Eckburg *et al.*, 2005) によって得られた 16S rRNA 遺伝子配列の中で、本菌種と 96% の類似度を示す配列が多数存在し、本属に新たな菌種が存在することが示唆された。またこのことを裏付けるかのように、最近になって新種 *Barnesiella intestinalis* が発表された (Morotomi *et al.*, in press)。

Bacteroides 属および *Prevotella* 属の多様性

近年、16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法などの培養を介さない分子生物学的手法の応用により、腸内や口腔には未だ多くの *Bacteroides* 属や *Prevotella* 属に属する未知種が存在することが示唆され

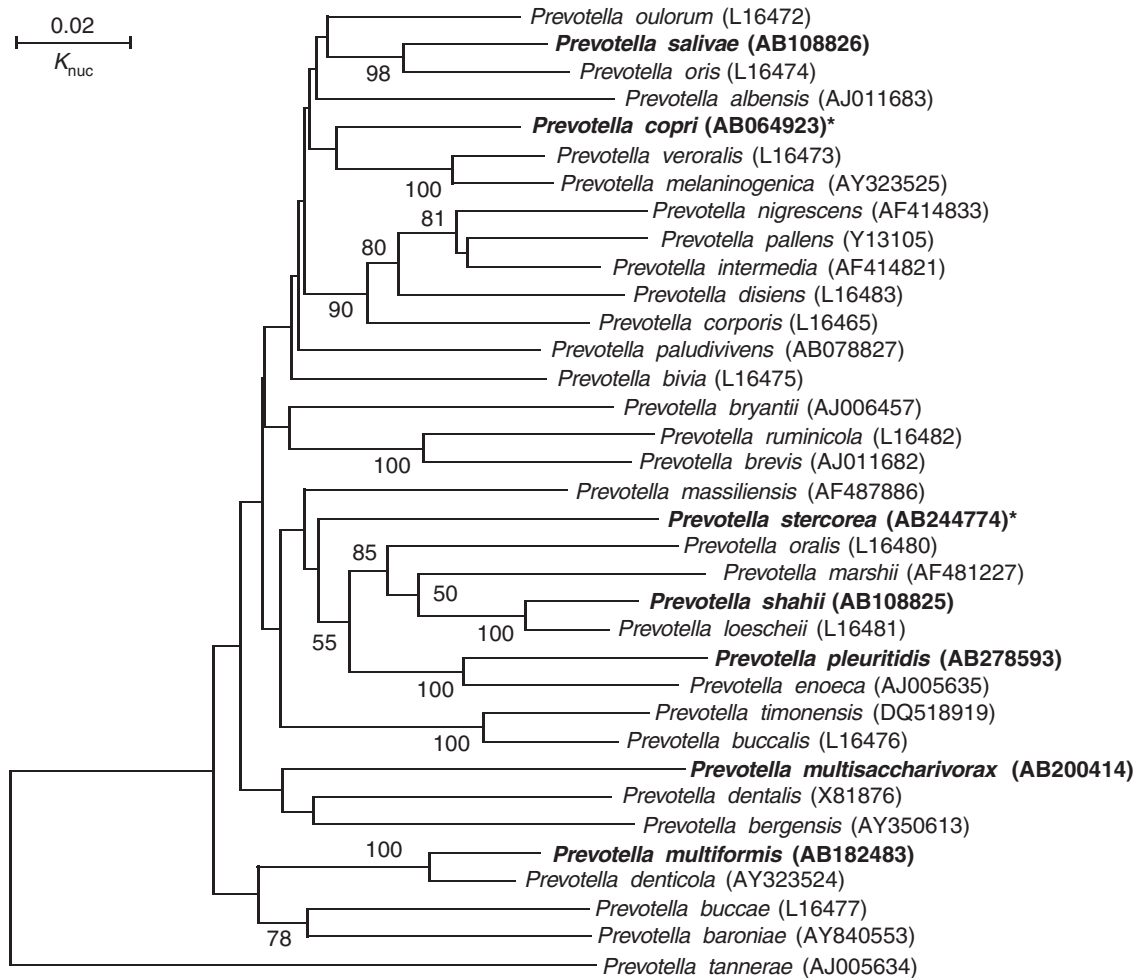


図2 *Prevotella* 属菌種の系統学的位置

太字で示した菌種は筆者らによって新種提案を行った菌種 (*が付いた菌種は現在ゲノムプロジェクトの対象菌種)。

た (Eckburg *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2002a, 2002b; Hold *et al.*, 2002; Kibe *et al.*, 2004; Lan *et al.*, 2002; Ozutsumi *et al.*, 2005; Paster *et al.*, 2001; Suau *et al.*, 1999). 我々はこのことを裏付けるかのように既知種とは異なる菌株を数多く分離し, これらについて分類学的な考察を基に *Bacteroides* 属 (図1) および *Prevotella* 属 (図2) の新種として発表した (*Bacteroides* 属9種: *B. coprocola*, *B. coprophilus*, *B. barnesiae*, *B. dorei*, *B. finegoldii*, *B. gallinarum*, *B. intestinalis*, *B. plebeius* および *B. salanitronis*; *Prevotella* 属7種: *P. copri*, *P. multiformis*, *P. multisaccharivorax*, *P. pleuritidis*, *P. salivae*, *P. shahii* および *P. stercorea*) (Bakir *et al.*, 2006a, 2006b, 2006c; Hayashi *et al.*, 2007a, 2007b; Kitahara *et al.*, 2005; Lan *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2004, 2005a, 2005b, 2007c). こ

のうち, *B. coprocola*, *B. coprophilus*, *B. dorei*, *B. finegoldii*, *B. intestinalis*, *B. plebeius*, *P. copri* および *P. stercorea* の8種においては, 現在, ワシントン大学ゲノムシーケンスセンター (米国) のプロジェクトの一つ, “Human Gut Microbiome Initiative” (http://genome.wustl.edu/hgm/HGM_frontpage.cgi) において標的ゲノムとされ, ゲノム解析が進行している. 今後, ヒトの健康と前述の菌種を含めたヒト常在菌叢との関連が明らかにされることを期待する.

おわりに

長い間, その分類学的位置付けが不明確であった *B. distasonis*, *B. merdae* および *B. forsythus* の再分類がなされ, 分類学的混乱はおおむね解決されつつある. しかし, 総説 (坂本, 2007) で紹介したように

Bacteroides 属には未だ多くの分類学的に整理し終わっていない菌群が存在している。これら残された分類群に関しては、早急に整理していかなければならないと考えられる。細菌の分類は1980年代頃より16S rRNA 遺伝子配列に基づいて行われてきたが、近年になって数多くの分類群において16S rRNA 遺伝子だけでなく、その他多くの遺伝子を使った解析が行われている。今後 *Bacteroides* 属と類縁細菌群においても、複数の遺伝子を使った分類が提案されていくであろう。また、遺伝子レベルでの分類とともに、*Barnesiella* 属、*Parabacteroides* 属および *Tannerella* 属の創設でも明らかなように、表現形質を含む分類学的データの蓄積が、嫌気性グラム陰性桿菌、特に *Bacteroides* 属とその類縁細菌群の分類体系を再構築するために極めて重要であると考えている。今後さらに本分類群の分類体系を再構築するとともに、より多くの新規分類群を提案し、本分野において先導的な立場を築いてゆきたい。

謝 辞

今回の奨励賞受賞に際し、御指導を頂きました辨野義己室長（独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室）に深く感謝いたします。また本研究に協力してくださいました共著者の学生・研究員の方々にこの場を借りて感謝を申し上げます。

文 献

- Bakir, M.A., Kitahara, M., Sakamoto, M., Matsumoto, M. & Benno, Y. (2006a). *Bacteroides intestinalis* sp. nov., isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 151-154.
- Bakir, M.A., Kitahara, M., Sakamoto, M., Matsumoto, M. & Benno, Y. (2006b). *Bacteroides finegoldii* sp. nov., isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 931-935.
- Bakir, M.A., Sakamoto, M., Kitahara, M., Matsumoto, M. & Benno, Y. (2006c). *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 1639-1643.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. & Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. Science **308**: 1635-1638.
- Hayashi, H., Sakamoto, M. & Benno, Y. (2002a). Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. Microbiol. Immunol. **46**: 535-548.
- Hayashi, H., Sakamoto, M. & Benno, Y. (2002b). Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. Microbiol. Immunol. **46**: 819-831.
- Hayashi, H., Shibata, K., Sakamoto, M., Tomita, S. & Benno, Y. (2007a). *Prevotella copri* sp. nov. and *Prevotella stercorea* sp. nov., isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 941-946.
- Hayashi, H., Shibata, K., Bakir, M.A., Sakamoto, M., Tomita, S. & Benno, Y. (2007b). *Bacteroides coprophilus* sp. nov., isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 1323-1326.
- Hold, G.L., Pryde, S.E., Russell, V.J., Furrrie, E. & Flint, H.J. (2002). Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Ecol. **39**: 33-39.
- Holdeman, L.V., Kelley, R.W. & Moore, W.E.C. (1984). Genus I. *Bacteroides* Castellani and Chalmers 1919, 959^{AL}, In Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 1, p. 604-631, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes (2008). The adjectival form of the epithet in *Tannerella forsythensis* Sakamoto *et al.* 2002 is to be retained and the name is to be corrected to *Tannerella forsythia* Sakamoto *et al.* 2002. Opinion 85. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **58**: 1974.
- Kibe, R., Sakamoto, M., Hayashi, H., Yokota, H. & Benno, Y. (2004). Maturation of the murine cecal microbiota as revealed by terminal restriction fragment length polymorphism and 16S rRNA gene clone libraries. FEMS Microbiol. Lett. **235**: 139-146.
- Kitahara, M., Sakamoto, M., Ike, M., Sakata, S. & Benno, Y. (2005). *Bacteroides plebeius* sp. nov. and *Bacteroides coprocola* sp. nov., isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**: 2143-2147.
- Lan, P.T.N., Hayashi, H., Sakamoto, M. & Benno, Y. (2002). Phylogenetic analysis of cecal microbiota in chicken by the use of 16S rDNA clone libraries.

- Microbiol. Immunol. **46**: 371-382.
- Lan, P.T.N., Sakamoto, M., Sakata, S. & Benno, Y. (2006). *Bacteroides barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov., isolated from chicken caecum. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 2853-2859.
- Liu, C., Song, Y., McTeague, M., Vu, A.W., Wexler, H. & Finegold, S.M. (2003). Rapid identification of the species of the *Bacteroides fragilis* group by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers. FEMS Microbiol. Lett. **222**: 9-16.
- Maiden, M.F.J., Cohee, P. & Tanner, A.C.R. (2003). Proposal to conserve the adjectival form of the specific epithet in the reclassification of *Bacteroides forsythus* Tanner *et al.* 1986 to the genus *Tannerella* Sakamoto *et al.* 2002 as *Tannerella forsythia* corr. gen. nov., comb. nov. Request for an Opinion. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **53**: 2111-2112.
- Moore, W.E.C., Cato, E.P. & Moore, L.V.H. (1985). Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 Approved Lists of Bacterial Names (1 January 1980 to January 1985). Int. J. Syst. Bacteriol. **35**: 382-407.
- Morotomi, M., Nagai, F., Sakon, H. & Tanaka, R. (in press). *Dialister succinatiphilus* sp. nov. and *Barnesiella intestinhominis* sp. nov., isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.
- Ozutsumi, Y., Hayashi, H., Sakamoto, M., Itabashi, H. & Benno, Y. (2005). Culture-independent analysis of fecal microbiota in cattle. Biosci. Biotechnol. Biochem. **69**: 1793-1797.
- Paster, B.J., Dewhirst, F.E., Olsen, I. & Fraser, G.J. (1994). Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. J. Bacteriol. **176**: 725-732.
- Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F.E. (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. J. Bacteriol. **183**: 3770-3783.
- 坂本光央 (2007). *Bacteroides* 属と類縁細菌群の分類の現状. Microbiol. Cult. Coll. **23**: 1-16.
- Sakamoto, M. & Benno, Y. (2006). Reclassification of *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides goldsteinii* and *Bacteroides merdae* as *Parabacteroides distasonis* gen. nov., comb. nov., *Parabacteroides goldsteinii* comb. nov. and *Parabacteroides merdae* comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **56**: 1599-1605.
- Sakamoto, M., Suzuki, M., Umeda, M., Ishikawa, I. & Benno, Y. (2002). Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner *et al.* 1986) as *Tannerella forsythensis* corr. gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 841-849.
- Sakamoto, M., Suzuki, M., Huang, Y., Umeda, M., Ishikawa, I. & Benno, Y. (2004). *Prevotella shahii* sp. nov. and *Prevotella salivae* sp. nov., isolated from the human oral cavity. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **54**: 877-883.
- Sakamoto, M., Huang, Y., Umeda, M., Ishikawa, I. & Benno, Y. (2005a). *Prevotella multiformis* sp. nov., isolated from human subgingival plaque. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**: 815-819.
- Sakamoto, M., Umeda, M., Ishikawa, I. & Benno, Y. (2005b). *Prevotella multisaccharivorax* sp. nov., isolated from human subgingival plaque. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **55**: 1839-1843.
- Sakamoto, M., Kitahara, M. & Benno, Y. (2007a). *Parabacteroides johnsonii* sp. nov., isolated from human faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 293-296.
- Sakamoto, M., Lan, P.T.N. & Benno, Y. (2007b). *Barnesiella viscericola* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium in the family *Porphyromonadaceae* isolated from chicken caecum. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 342-346.
- Sakamoto, M., Ohkusu, K., Masaki, T., Kako, H., Ezaki, T. & Benno, Y. (2007c). *Prevotella pleuritidis* sp. nov., isolated from pleural fluid. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **57**: 1725-1728.
- Shah, H.N. & Collins, M.D. (1988). Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. Int. J. Syst. Bacteriol. **38**: 128-131.
- Shah, H.N. & Collins, M.D. (1989). Proposal to restrict the genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and closely related species. Int. J. Syst. Bacteriol. **39**: 85-87.
- Shah, H.N. & Collins, M.D. (1990). *Prevotella*, a new

- genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**: 205-208.
- Song, Y., Liu, C., Lee, J., Bolanos, M., Vaisanen, M.-L. & Finegold, S.M. (2005). "*Bacteroides goldsteinii* sp. nov." isolated from clinical specimens of human intestinal origin. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4522-4527.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.-J., Gibson, G.R., Collins, M.D. & Doré, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4799-4807.
- Tanner, A.C.R., Listgarten, M.A., Ebersole, J.L. & Strzempko, M.N. (1986). *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing, fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**: 213-221.