

受賞総説

温泉、海洋環境等からの難培養性新規微生物の探索と その資源化に関する研究 (平成24年度日本微生物資源学会奨励賞受賞)

飯野隆夫

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
〒305-0074 茨城県つくば市高野台3-1-1

Isolation and the taxonomic characterization of uncultured microorganisms from hot spring- and marine-associated samples

Takao Iino

Japan Collection of Microorganisms, RIKEN BioResource Center
3-1-1 Koyadai, Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan

はじめに

微生物学は「培養」を基礎に発展し、現在に至る。90年代以降になると、分子生物学的手法の導入によって生物多様性が頻繁に議論されるようになり、自然界に膨大な数の微生物資源が眠っていることが明らかとなった (Barns *et al.*, 1994; Hugenholtz *et al.*, 1998; Ward *et al.*, 1990)。近年では、メタゲノム解析やシングルセル・ゲノミクスなどの開発・進歩により、難培養性微生物の生理機能や生態的役割が議論されるようになった (Edwards *et al.*, 2006; Venter *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2006)。しかし、それぞれが万能な技術とは言えず、各々に利点と欠点がある。例えば、培養技術によって得られた微生物は原則、保存・分譲が可能であり、永続的に研究を行なう上で培養法は有効な手段である。しかし、分離・培養に多大な労力を要する上、供試する培地の組成に大きく依存することから、培養できない微生物が存在する。分子生物学的手法は多検体を同時に処理することが可能であり、微生物群集全体の掌握には適しているが、系統分類学的位置が明らかになるのみで、微生物の生理機能や生死を把握できない難点がある。ゲノミクスは培養困難な微生物に対してアプローチが可能となる一方で、鋳型となるゲノム資源（特に完全長ゲノム）の品質を維持して保

存・分譲することはほぼ困難であり、継続して研究・開発する上での大きな障壁となる。これは身近な試料であればさほど問題にならないが、アクセスの困難な試料、環境変化を伴う試料となれば徐々に影響は拡大する。故に、それぞれの技術が共に発展することが重要である。その中で、永続的な微生物の有効利用の点では、微生物を培養可能にし、安定して保存・維持することが最善の方法であり、難培養性微生物をいかに培養・保存可能にするかは現代の大きな課題と言える。

一般に、難培養性微生物と言うと培養不可能な微生物だけを想像しがちであるが、概念には2種類ある。1つは（少なくとも現在の技術では）培養不可能な微生物であり、もう1つは分離・培養の困難な微生物である。そして、後者については、資源化（リソース化）の余地を多分に含んでいる。難培養性微生物の資源化は応用研究の重要な微生物資源となるだけでなく、そこで得られた知見は新たな難培養性微生物取得のための有益な情報となり得る。そこで、本研究では、温泉および海洋環境を中心に新規の難培養性微生物を探索し、資源化することを目的とした。

難培養性微生物の探索

2004-2007年にかけて、日本各地でサンプリングを実施した。近隣では研究所から数百メートル離れた地点の土壌や海岸の干潟土壌を収集した。遠方では温泉

E-mail: iino@jcm.riken.jp

郷の熱水や深海の堆積物などを収集した。新規微生物の分離・培養には、集積培養法と直接平板培養法を用いた。1試料あたり前者は5-12種類の、後者は12-15種類の培地を用いた。現場環境を参考に、炭素源、電子受容体、電子供与体、気相部、培養温度、pHなどの培養条件を変えた。得られた分離株の新規性の判断は、16S rRNA 遺伝子シーケンス解析を行ない、既知種との相同性が97.0%以下を指標に系統樹を作成した上で判断した。新規性が確認できた菌株はコロニー化を行ない、純粋分離を行なった。

結果として、高次分類群レベルで14門に属する新規の古細菌、細菌309株を純粋分離した(表1)。種類としては、メタン生成古細菌、好熱菌、好冷菌、好塩菌、発酵性菌(酢酸菌、乳酸菌など)、硫酸塩還元菌、硝酸塩還元菌、硫黄酸化細菌など多様な微生物を取得できた。また、これら分離株の約半数の150株は既知種との16S rRNA 遺伝子の相同性が95%未満、1割強の43株に至っては90%未満と低く、新規性が高いと考えられた。分離株の一部については詳細に解析を行なった。以下に温泉由来2種、海洋由来2種、陸上土壌由来1種について記述する。

Ignavibacterium album lino, Mori, Uchino, Nakagawa, Harayama & Suzuki (2010a)

長野県の湯俣温泉郷で黄色と緑色のバイオマット(37°C)を採取し、寒天培地に塗抹した後、3ヶ月の培養を経てコロニーが形成された。当初は、寒天培地上に薄く小さなコロニーを形成する程度で、かろうじて爪楊枝で継代作業が行なえる程度であった。そのため、本菌がどのような微生物で、どのような培養条件を至適とするか全くわからず分離作業が難航したが、1年半の歳月を経て本菌の培養株“Mat9-16株”の純粋分離に成功した。その後の解析から、分離の過程で0.2% (w/v) 酵母エキス、30 mM/l 炭酸塩、10 mM/l D-グルコースを追加したことが、資源化への起因になったと推測できた。Mat9-16株は2.0-15.5 μmの糸くず状の細長い桿菌で、酸素濃度2% (v/v)を指摘とする通性嫌気性細菌であった。至適生育温度、pH、塩濃度は、それぞれ45°C、7.0-7.5、1% (w/v)であった。糖類発酵性として21種類の糖類を供試した結果、D-グルコースなどの六単糖類を利用したが、五単糖類、二糖類、三糖類、糖アルコールを利用できなかった。Mat9-16株は酵母エキスを必須に要求したが、その濃度は0.2-0.5% (w/v)と限定されていた。16S rRNA 遺伝子シーケンスに基づく系統解析を行なった結

表1 分離株の分類群

分類群 (門もしくは綱)	株数
1. <i>Euryarchaeota</i>	
<i>Methanococci</i>	1
<i>Methanomicrobia</i>	1
2. <i>Actinobacteria</i>	54
3. <i>Aquificae</i>	1
4. <i>Bacteroidetes</i>	54
5. <i>Chlorobi</i>	2
6. <i>Deferribacteres</i>	1
7. <i>Deinococci-Thermus</i>	1
8. <i>Firmicutes</i>	119
9. <i>Fusobacteria</i>	3
10. <i>Nitrospira</i>	1
11. <i>Planctomycetes</i>	1
12. <i>Proteobacteria</i>	
<i>Alphaproteobacteria</i>	8
<i>Betaproteobacteria</i>	4
<i>Gammaproteobacteria</i>	24
<i>Deltaproteobacteria</i>	15
<i>Epsilonproteobacteria</i>	10
13. <i>Spirochaetes</i>	6
14. <i>Thermotogae</i>	3
Total	309

果、Mat9-16株は*Chlorobi*門に含まれたが、*Chlorobea*綱の緑色硫黄細菌(GSB)とは系統的に独立し、未培養系統群ZB1(Elshahed *et al.*, 2003)に含まれた(図1)。GSBとの16S rRNA 遺伝子の相同性は77.4-82.7%と極めて低かった。Mat9-16株を含む未培養系統群の遺伝的多様性を解析した結果、GSBの多様性が16.5%であったのに対し、未培養系統群の多様性は少なくとも23.0%に達した。この値はDojka *et al.* (2000)の報告に基づく*Proteobacteria*門の多様性に匹敵することが明らかとなった。よって、Mat9-16株は綱レベルで新規の細菌であると結論した。Mat9-16株が属する*Chlorobi*門は光合成菌のみで構成される分類群(Garrity & Holt, 2001a)であったことから、Mat9-16株が光合成能を有するか検討を行なった。その結果、細胞の色はGSBが緑もしくは茶色であるのに対し、Mat9-16株は白色であった。GSBが絶対光合成細菌であるのに対し、Mat9-16株は化学合成従属栄養性細菌であった。また、超薄切片を作製し電子顕微鏡で観察したが、光補修系のクロロゾームは観察されなかった。光補修系に関与する遺伝子(*aclB*, *bchG*, *fmoA*, *pscB*)もPCR法で検出されなかった。以上のことから、Mat9-16株は光合成細菌ではなく、*Chlorobi*門初の従属栄養細菌であると推定

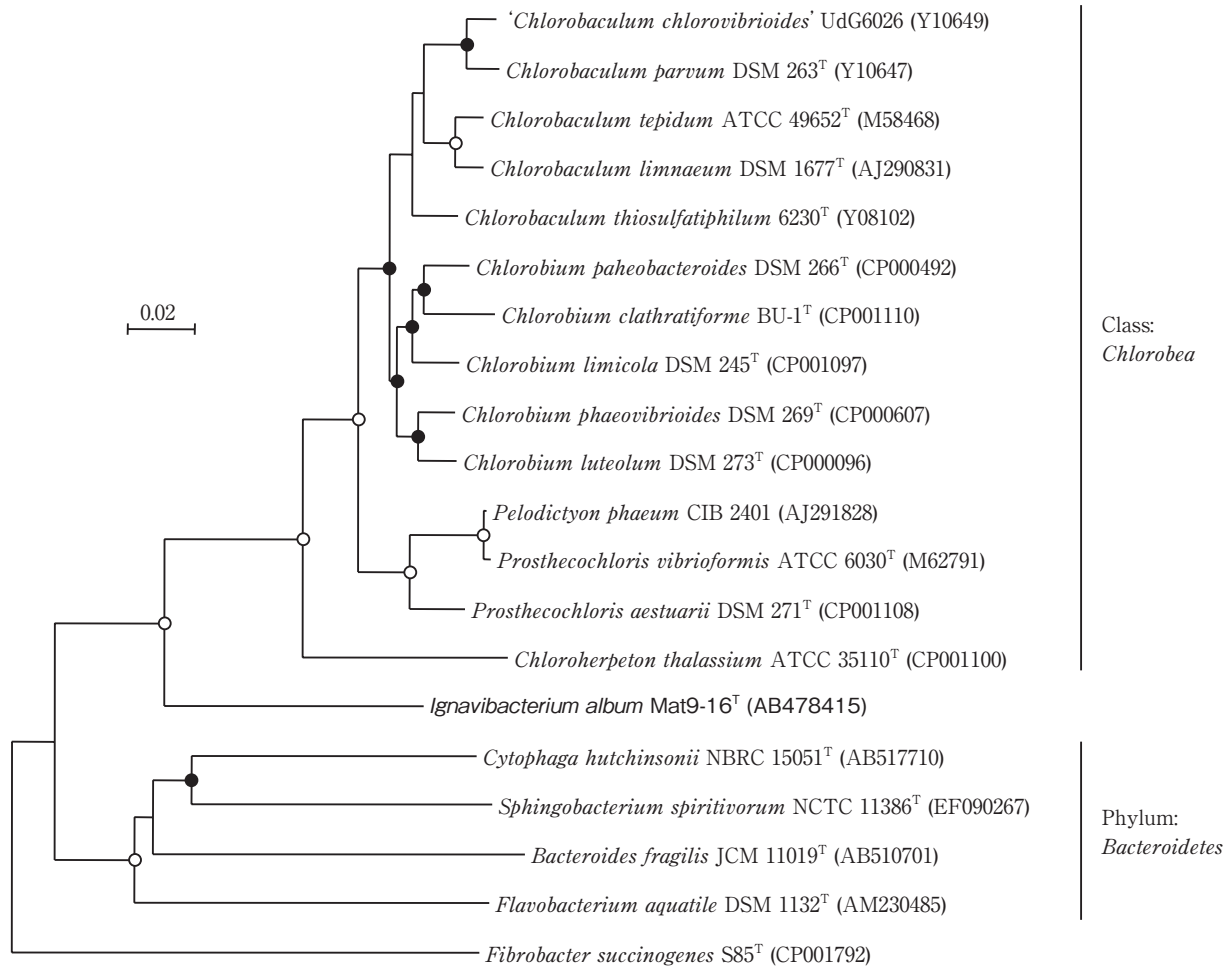


図1 *Ignavibacterium album* Mat9-16^T の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析

○は2種類の解析法 (NJ, ML) でブートストラップ値が95%以上, ●は一方の方法でブートストラップ値が85%以上を示す。

した。以上の結果から、本菌に対し、新属新種 *Ignavibacterium album* を命名し、*I. album* を含む系統群に対し、*Ignavibacteria* 綱、*Ignavibacteriales* 目、*Ignavibacteriaceae* 科を設けた。

GSBが偏性嫌気性、独立栄養性の光合成細菌であるのに対し、*I. album*は通性嫌気性の化学合成従属栄養性細菌と生理機能が大きく異なった。そこで、GSBとの相違をゲノムレベルで比較する目的で、全ゲノム解析を行なった (Liu *et al.*, 2012)。その結果、*I. album* Mat9-16^Tのゲノムサイズは3.66 MbpでGSB (1.97-3.13 Mbp)より若干大きかった。GSBに類似の遺伝子はわずか15%で、光合成遺伝子を含め、GSBが共有する273個の遺伝子を*I. album*は保持していないことが明らかとなった。また、GSBとの違いに着目すると、興味深い点として以下の点が明らか

となった。1) *I. album*は光合成の変わりにRNF complexで主に電子伝達を行なう。2) 3タイプのオキシダーゼを保持し、これらが酸素代謝/防除に機能することで好気条件下での生育を可能にする。3) 2つのオキシドレダクターゼが嫌気呼吸で機能する。4) 解糖系、糖新生、TCA回路の遺伝子は揃っているが、還元的TCA回路は不完全である。5) アミノ酸合成系は不完全で独立栄養的には生育できない。6) 鞭毛、走化生の遺伝子がほぼ完全に揃っている。7) 遺伝子調節系が非常に豊富で、環境変化に応じて遺伝子発現を調節できる。上記に加え、RNFコンプレックス、NADH-1デヒドロゲナーゼなどの遺伝子を系統解析に供した結果、*I. album*とGSB間で、これらの遺伝子が欠損、部分的に欠損、置換などを起こしていることが明らかとなった。これは、*Chlorobi*門内で遺伝

子の獲得/欠損が繰り返されていることを意味する。すなわち, 旧来, *Chlorobi* 門は光合成細菌のみで構成されると考えられてきたが (Garrity & Holt, 2001b), *Chlorobi* 門の先祖型は既存の GSB とは大きく異なり, *Chlorobi* 門は生理機能が多様な系統群であると考えられる。

***Calditerrivibrio nitroreducens* lino, Nakagawa, Mori, Harayama & Suzuki (2008)**

上述の湯俣温泉郷で 60°C の熱水を採取し, 集積培養を行なった結果, FWB 培地 (無機塩培地) 中でわずかに微生物の増殖が確認された。本培地にいくつかの電子受容体, 電子供与体, 炭素源を追加した結果, 硝酸塩と酢酸塩を追加した培養区で本菌の優位な増殖が確認でき, 最終的にコロニー化によって培養株 “Yu37-1 株” の純粋分離に成功した。Yu37-1 株は風変わりな増殖を示し, 48 時間の誘導期を経た後, 対数増殖期に移行し, その後 4 時間程度で定常期に達した。Yu37-1 株は湾曲した桿菌で, 硝酸塩を唯一の電子受容体とする硝酸塩還元菌であった。至適の生育温度と pH は, それぞれ 55°C, 7.0-7.5 であった。16S rRNA 遺伝子シーケンスに基づく系統解析を行なった結果, Yu37-1 株は 4 属 7 種のみで構成される *Deferribacteres* 門に含まれる希少な細菌であることが明らかとなった。既存種との 16S rRNA 遺伝子の相性は 83.2-86.2% と極めて低く, 表現性状も一致しなかったことから, 本菌に対し, 新属新種 *Calditerrivibrio nitroreducens* を命名した。

現在, *Deferribacteres* 門は好熱菌と中温菌で構成されており, 分離源は陸上温泉, 海底熱水, 排水溝の堆積物, げっ歯類の胃腸管と幅広い (Garrity & Holt, 2001b)。しかし, 既知種は 8 種と少なく, 微生物資源としての価値は過小評価されていると言わざるを得

ない。*Deferribacteres* 門の生態的役割を解明する上でも, リソースの充実は今後も必要不可欠である。

***Oscillibacter valericensis* lino, Mori, Tanaka, Suzuki & Harayama (2007)**

島根県の神西湖で採取したヤマトシジミの消化管から 2 ヶ月の培養期間を経て Sjm18-20 株のコロニー化に至り, その後, 純粋分離した。Sjm18-20 株は細い鞭毛を 2-3 本有する 2.5-6.0 μm の湾曲した桿菌で, グラム陰性, 化学合成従属栄養性の偏性嫌気性細菌であった。特徴としては, 利用できる糖類が D-グルコースと五単糖類 (L-アラビノース, D-リボース, D-キシロース) のみと少なく, D-グルコース以外の六単糖類, 二糖類, 三糖類, 多糖類, 糖アルコールなどを利用することはできなかった。また, 倍加時間が 18.3 時間と増殖は緩やかであった。16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行なった結果, Sjm18-20 株は *Firmicutes* 門の Clostridial cluster IV に含まれた。近縁の培養株は *Clostridium viride* T2-7^T や *Flavonifractor plautii* CCUG 28093^T であったが, 最も近縁な微生物は *Oscillospira guilliermondii* (Chatton & Pérard, 1913; Gibson, 1974) であった。*Oscillospira guilliermondii* は 1913 年に Chatton と Pérard によって記載された細菌で, 牛や羊のルーメンに棲息するルーメン細菌と認知されているものの, 未だ培養株の得られていない難培養性細菌である。そこで, Sjm18-20 株が *Oscillospira* 属細菌であるか性状比較を行なった (表 2)。Sjm18-20 株は 2-3 本の鞭毛を有するグラム陰性の偏性嫌気性桿菌で, これらの点は *O. guilliermondii* の記載と一致した。また, Sjm18-20 株の細胞は通常 2-5 μm であったが, 3 ヶ月ほど培養すると 30 μm まで伸長することが明らかとなった。この点も *O. guilliermondii* が 10-40 μm の巨大細菌であるとの記

表 2 Sjm18-12 株と *O. guilliermondii* の性状の比較

	Sjm18-20	<i>O. guilliermondii</i> ^a
細胞形状	Rods	Rods
細胞構造	None	Disk-shaped
大きさ	0.5×2-5 (30) μm	3-6×10-40 μm
鞭毛	Peritrichous	Peritrichous
孢子	None	Variable
グラム染色性	Negative	Negative
嫌気度	Obligately	Obligately
分離源	Alimentary canal of Japanese corbicula	Alimentary tract of herbivorous animals

^aChatton & Pérard, 1913; Gibson, 1974

載と類似した。しかし、*O. guilliermondii* に特徴的な格子状の細胞内構造は確認できなかった。系統的には、フローサイトメトリーで分画された *Oscillospira* のクローンクラスターの中に Sjm18-20 株は含まれた (Yanagita *et al.*, 2003; Mackie *et al.*, 2003) (図2)。生態的には、分離当初はヤマトシジミの消化管と草食動物の腸管といった差があったが、近年ではヒトやマウスの腸管からも Sjm18-20 株様のクローンが検出されており (Lam *et al.*, 2012; Mondot *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2011), Sjm18-20 株は *Oscillospira* と棲息域が類似していると考えられた。このように、Sjm18-20 株は *Oscillospira* との類似点は多くあるが、原著記載にある格子状構造など相違点がある点是否めなかった。しかしながら、*O. guilliermondii* の培養株が実在しないため、これ以上の検討が行なえなかった。故に、Sjm18-20 株は *Oscillospira* かもしれないが、現時点では *Oscillospira* と区別することが妥当であると結論し、Sjm18-20 株に対し、新属新種 *Oscillibacter valericigenes* を提唱した。

Oscillibacter valericigenes が限りなく *Oscillospira* に近縁であることから、Sjm18-20 株のゲノム解析を行なった (Katano *et al.*, 2012)。その結果、*O. valericigenes* Sjm18-20^T は染色体 DNA の他にプラスミドを1つ保有し、それぞれのゲノムサイズは4.4 Mbpと60 Kbpであった。興味深かった点として、*O. valer-*

icigenes Sjm18-20^T には解糖系末端のエノラーゼ (EC4.2.1.11, 2-ホスホグリセリン酸とホスホエノールグリセリン酸の過程を修飾) の遺伝子がないことが明らかとなった。本酵素が欠損しているとは考え難いため酵素学的な検討が必要である。しかし、利用できる糖類の少なさも考慮すると、*Oscillospira/Oscillibacter* はエネルギー獲得が非効率的で、これがリソース化を困難にする要因の可能性がある。また、*O. valericigenes* は Na⁺ 駆動型の鞭毛遺伝子、*Bacillus cereus* グループと類似の細胞吸着因子を保持しており、*O. valericigenes* は選択的に消化管内で棲息していることが推定できた。これは *O. guilliermondii* がルーメン細菌である知見を支持するものでもあった。ゲノム解析以外にも、近年では、*Oscillibacter* に関する知見が得られるようになった。ヘルス・イノベーション分野の事例として、飽和脂肪酸摂取区で *Lactobacillus* 属細菌が減少し、*Oscillibacter* 属細菌が増加する知見が得られた (Lam *et al.*, 2012)。また、クローン病患者との比較で、健常者からは *Oscillibacter* のクローンが検出されたり (Mondot *et al.*, 2011)、腸内環境改善を目的として、難消化性澱粉を摂取することで *Oscillibacter* が増加する知見が得られている (Walker *et al.*, 2011)。このように、ヘルス・イノベーション分野で *Oscillibacter* 属細菌の検出が健康/病気の指標の一つになりつつある。

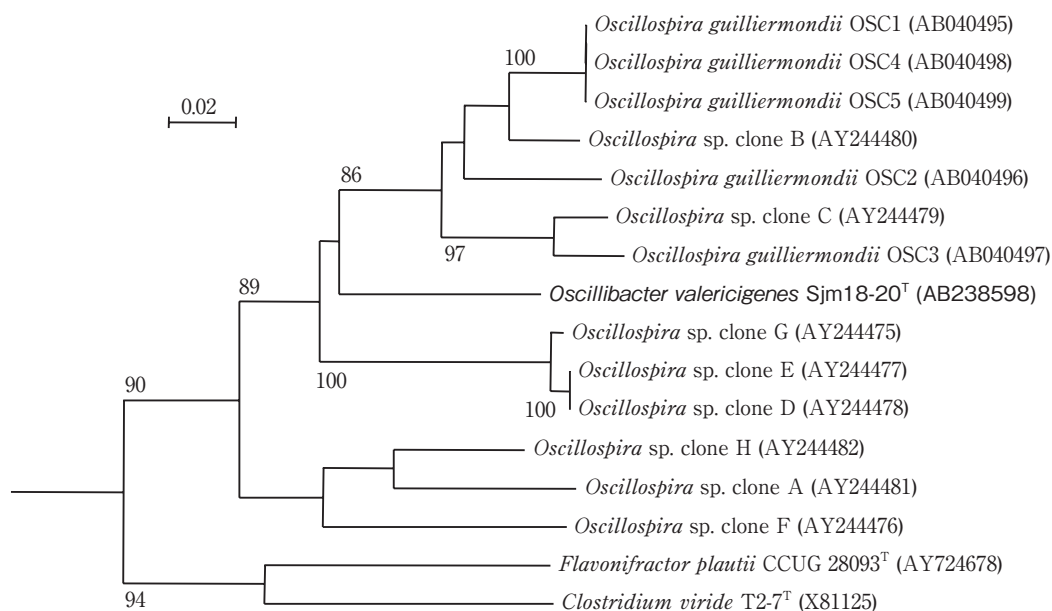


図2 *Oscillibacter valericigenes* Sjm18-20^T の16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析
数値はブートストラップ値 (NJ, 85% 以上) を示す。

Lacticigenium naphthae lino, Suzuki & Harayama (2009)

秋田県の石油備蓄基地で採取した原油を嫌氣的に集積培養した後、集積培養物を好氣的に培養することで MIC1-18 株を純粋分離した。MIC1-18 株は化学合成従属栄養性細菌で、代謝産物として L-乳酸を生成する乳酸菌であった。乳酸菌は非運動性のグラム陽性細菌が一般的であるが、MIC1-18 株は 2-3 本の鞭毛を有する運動性のグラム陰性細菌であった。500 種以上存在する乳酸菌の中で同様の性質をもつ乳酸菌は、*Alkalibacterium olivoapovliticus* の一部の菌株のみで (Ntougias & Russell, 2001)、MIC1-18 株は希少な乳酸菌と考えられた。また、塩耐性が非常に強く、至適は 2% であったが、17% まで増殖が可能であった。系統的には *Firmicutes* 門 *Lactobacillales* 目 *Carnobacteriaceae* 科に含まれたが、既存の乳酸菌とは独立していた。そこで、本菌に対し、新属新種 *Lacticigenium naphthae* を命名した。

乳酸菌は産業有用上重要な細菌の 1 つで、ヒト・動物腸管や発酵食品を中心に研究が進められている。近年になり、海洋棲生物や堆積物などからも乳酸菌が分離されるようになったが (Collins *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002; Toffin *et al.*, 2005)、原油からの分離例は過去になく、乳酸菌の棲息域の多様さを示すものと考えられる。*Lacticigenium naphthae* は原油環境内で有機化合物の分解者としての役割を担っていると考えられるが、実態は不明である。原油のような疎水環境での生存戦略機構にも興味はもたれる。

Methanospirillum lacunae lino, Mori & Suzuki (2010b)

難培養微生物は身近な環境にも存在する。房総半島を中心とする関東平野南部は日本最大規模の天然バイオガスを埋蔵・産出することで知られている。そこで、新規メタン生成古細菌の探索を目的として、千葉県かずさアカデミアパーク内の湛水土壤から Ki8-1 株の集積培養に成功した。その後、アンピシリンで混在する細菌を除去した後、6 ヶ月を要したもののコロニー化によって純粋分離に至った。本菌は系統的に *Methanospirillum* 属に含まれたが、唯一の種 *Methanospirillum hungatei* とは 95.1% の相同性であった。*Methanospirillum* 属は Ferry *et al.* (1974) によって提唱された水素資化性のメタン生成古細菌で、長年にわたり *M. hungatei* の 1 種のみで構成されていた希

少なメタン生成古細菌の一つである (Boone *et al.*, 2001)。*Methanospirillum hungatei* は時に 100 μm 以上のらせん体を形成する特徴を有するが、Ki8-1 株は 11-25 μm の桿菌であった。生育温度や pH なども *M. hungatei* とは異なっていた。以上の結果から、本菌に対し、新種 *Methanospirillum lacunae* を提唱した。*Methanospirillum lacunae* は 36 年ぶりとなる *Methanospirillum* 属第 2 の種となる。

おわりに

温泉および海洋環境を中心に難培養性微生物の探索を試み、上述の新規微生物を含め、現在までに 1 綱 1 目 1 科 9 属 22 種を新規提唱した (Hamada *et al.*, 2009a, 2009b, 2010; Iino *et al.*, 2012a, 2012b; Mori *et al.*, 2012a, 2012b; Muramatsu *et al.*, 2010; Nakagawa *et al.*, 2006; Suzuki *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2011)。これらの資源化によって、近縁の未培養微生物もしくは微生物集団の生理機能や多様性を解明する一助を担ったのではないかと考える。このような知見の蓄積が新たな難培養微生物の資源化実現のための糧となることを期待したい。また、徐々にではあるが、資源化した微生物が応用研究分野で貢献しつつあり、分離・命名者としては喜ばしいことである。近年、新規微生物の提唱が急速に進み、原核生物 (古細菌および細菌) に限定しても、記載された承認種はまもなく 10,000 種に達する。しかし、難培養性微生物に着目すると、その数はまだ少ない。発展途上の研究分野を支える上でも、難培養性微生物の資源化・実態解明が必要となる。今後も、1 種でも多く難培養微生物を発掘し、様々な研究分野に貢献できるよう努めたい。

謝 辞

本学会奨励賞受賞に際し、御指導を頂きました鈴木健一朗氏 (独立行政法人製品評価技術基盤機構) に深く感謝致します。また、森 浩二氏 (同製品評価技術基盤機構)、岩見貴裕氏 (同製品評価技術基盤機構) をはじめ、本研究に協力して下さいました多くの研究員の皆様にこの場を借りて感謝を申し上げます。

文 献

Barns, S.M., Fundyga, R.E., Jeffries, M.W. & Pace, N.R. 1994. Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 1609-1613.

- Boone, D.R., Whitman, W.B. & Koga, Y. 2001. Family III. *Methanospirillaceae* fam. nov. In Boone, D.R. & Castenholz, R.W. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition. vol. 1, p. 264-267, Springer-Verlag, New York.
- Chatton, E. & Pérard, C. 1913. Schizophytes du caecum du cobaye. I. *Oscillospira guillermondi* n. g., n. sp. C. R. Soc. Biol. (Paris) **74**: 1159-1162.
- Collins, M.D., Wiernik, A., Flasen, E. & Lawson, P.A. 2005. *Atopococcus tabaci* gen. nov., sp. nov., a novel gram-positive, catalase-negative, coccus-shaped bacterium isolated from tobacco. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1693-1696.
- Dojka, M.A., Harris, J.K., & Pace, N.R. 2000. Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1617-1221.
- Edwards, R.A., Rodriguez-Brito, B., Wegley, L., Haynes, M., Breitbart, M., Peterson, D.M., Saar, M.O., Alexander, S., Alexander Jr., E.C. & Rohwer, F. 2006. Using pyrosequencing to shed light on deep mine microbial ecology. *BMC Genomics* 2006 **7**: 57.
- Elshahed, M.S., Senko, J.M., Najar, F.Z., Kenton, S.M., Roe, B.A., Dewers, T.A., Spear, J.R. & Krumholz, L.R. 2003. Bacterial diversity and sulfur cycling in a mesophilic sulfide-rich spring. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5609-5621.
- Ferry, J.G., Smith, P.H. & Wolfe, R.S. 1974. *Methanospirillum*, a new genus of methanogenic bacteria, and characterization of *Methanospirillum hungatii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **24**: 465-469.
- Garrity, G.M. & Holt, J.G. 2001a. Phylum BIX. Defferibacteres *phy. nov.* In Boone, D.R. & Castenholz, R.W. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition, vol. 1, p. 465-471, Springer-Verlag, New York.
- Garrity, G.M. & Holt, J.G. 2001b. Phylum BXI. Chlorobi *phy. nov.* In Boone, D.R. & Castenholz, R.W. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition. vol. 1, p. 601-623, Springer-Verlag, New York.
- Gibson, T. 1974. Genus *Oscillospira* Chatton and Pérard 1913, 1159^{AL}. In Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. (eds.), *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, eighth edition. p. 573-574, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hamada, M., Iino, T., Iwami, T., Tamura, T., Harayama, S. & Suzuki, K. 2009a. *Arsenicicoccus piscis* sp. nov., a mesophilic actinobacterium isolated from the intestinal tract of a fish. *Actinomycetologica* **23**: 40-45.
- Hamada, M., Iino, T., Tamura, T. & Suzuki, K. 2009b. *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., Iino, T., Iwami, T., Harayama, S., Tamura, T. & Suzuki, K. 2010. *Mobilicoccus pelagius* gen. nov., sp. nov. and *Piscicoccus intestinalis* gen. nov., sp. nov., two new members of the family *Dermatophilaceae*, and reclassification of *Dermatophilus chelonae* (Masters et al. 1995) as *Austwickia chelonae* gen. nov., comb. nov. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**: 427-436.
- Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K.L. & Pace, N.R. 1998. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J. Bacteriol.* **180**: 366-376.
- Iino, T., Mori, K., Tanaka, K., Suzuki, K. & Harayama, S. 2007. *Oscillibacter valericigenes* gen. nov., sp. nov., a valerate-producing anaerobic bacterium belonging isolated from the alimentary canal of a Japanese corbicula clam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1840-1845.
- Iino, T., Nakagawa, T., Mori, K., Harayama, S. & Suzuki, K. 2008. *Calditerrivibrio nitroreducens* gen. nov., sp. nov., a novel thermophilic nitrate-reducing bacterium isolated from a terrestrial hot spring in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1675-1679.
- Iino, T., Suzuki, K. & Harayama, S. 2009. *Lactigenium naphthae* gen. nov., sp. nov., a novel halotolerant and motile lactic acid bacterium isolated from crude oil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 775-780.
- Iino, T., Mori, K., Uchino, Y., Nakagawa, T., Harayama, S. & Suzuki, K. 2010a. *Ignavibacterium*

- album* gen. nov., sp. nov., a moderately thermophilic anaerobic bacterium isolated from microbial mats at a terrestrial hot spring and proposal of *Ignavibacteria* classis nov. for a novel lineage at the periphery of the green sulfur bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1376-1382.
- Iino, T., Mori, K. & Suzuki, K. 2010b. *Methanospirillum lacunae* sp. nov., a methane-producing archaeon isolated from a puddly soil, and the emendation of the genus *Methanospirillum* and *Methanospirillum hungatei*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 2563-2566.
- Iino, T., Suzuki, R., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K. & Uchimura, T. 2012a. *Acetobacter okinawensis* sp. nov., *Acetobacter papayae* sp. nov., and *Acetobacter persicus* sp. nov.; novel acetic acid bacteria isolated from stems of sugarcane, fruits, and a flower in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **58**: 235-243.
- Iino, T., Suzuki, R., Tanaka, N., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K. & Uchimura, T. 2012b. *Gluconacetobacter kakiaceti* sp. nov., a novel acetic acid bacterium isolated from kaki vinegar, Japanese traditional fruit vinegar. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 1465-1469.
- Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y. & Yamasato, K. 2003. *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 711-720.
- Katano, Y., Fujinami, S., Kawakoshi, A., Nakazawa, H., Oji, S., Iino, T., Oguchi, A., Ankai, A., Fukui, S., Terui, Y., Kamata, S., Harada, T., Tanikawa, S., Suzuki, K. & Fujita, N. 2012. Complete genome sequence of *Oscillibacter valericigenes* Sjm18-20^T (=NBRC 101213^T). *Stand. Genomic Sci.*, **6**: 406-414.
- Lam, Y.Y., Ha, C.W.Y., Campbell, C.R., Mitchell, A.J., Dinudom, A., Oscarsson, J., Cook, D.I., Hunt, N.H., Caterson, I.D., Holmes, A.J. & Storlien, L.H. 2012. Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PLoS One* **7**: e34233.
- Liu, A., Frigaard, N.-U., Vogl, K., Iino, T., Ohkuma, M., Overmann, J. & Bryant, D.A. 2012. Complete genome of *Ignavibacterium album*, a metabolically versatile, flagellated, facultative anaerobe from the phylum *Chlorobi*. *Front. Microbiol.* **3**: 185-199.
- Liu, J.-R., Tanner, R.S., Schumann, P., Weiss, N., McKenzie, C.A., Janssen, P.H., Seviour, E.M., Lawson, P.A., Allen, T.D. & Seviour, R.J. 2002. Emended description of the genus *Trichococcus*, description of *Trichococcus collinsii* sp. nov., and reclassification of *Lactosphaera pasteurii* as *Trichococcus pasteurii* comb. nov. and of *Ruminococcus palustris* as *Trichococcus palustris* comb. nov. in the low-G+C Gram-positive bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1113-1126.
- Mackie, R.I., Aminov, R.I., Hu, W., Klieve, A.V., Ouwerkerk, D., Sundset, M.A. & Kamagata, Y. 2003. Ecology of uncultivated *Oscillospira* species in the rumen of cattle, sheep, and reindeer as assessed by microscopy and molecular approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6808-6815.
- Mondot, S., Kang, S., Furet, J.P., Aguirre de Carcer, D., McSweeney, C., Morrison, M., Marteau, P., Doré, J. & Leclerc, M. 2011. Highlighting new phylogenetic specificities of Crohn's disease microbiota. *Inflamm. Bowel. Dis.* **17**: 185-192.
- Mori, K., Iino, T., Ishibashi, J., Kimura, H., Hamada, M. & Suzuki, K. 2012a. *Meiothermus hypogaeus* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from a hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 112-117.
- Mori, K., Iino, T., Suzuki, K., Yamaguchi, K. & Kamagata, Y. 2012b. Aceticlastic and NaCl-requiring methanogen "*Methanosaeta pelagica*" sp. nov., isolated from marine tidal flat sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 3416-3423.
- Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Iino, T., Suzuki, K. & Nakagawa, Y. 2010. *Persicobacter psychrovividus* sp. nov., isolated from shellfish, and emended descriptions of the genus *Persicobacter* and *Persicobacter diffluens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1735-1739.
- Nakagawa, T., Iino, T., Suzuki, K. & Harayama, S. 2006. *Ferrimonas futtsuenseis* sp. nov. and *Ferrimonas kyonanensis* sp. nov., selenate-reducing

- bacteria belonging to *Gammaproteobacteria* isolated from Tokyo Bay. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2639-2645.
- Ntougias, S. & Russell, N.J. 2001. *Alkalibacterium olivoapovliticus* gen. nov., sp. nov., a new obligately alkaliphilic bacterium isolated from edible-olive wash waters. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 1161-1170.
- Suzuki, R., Zhang, Y., Iino, T., Kosako, Y., Komagata, K. & Uchimura, T. 2010. *Asaia astilbes* sp. nov., *Asaia platycodi* sp. nov., *Asaia prunellae* sp. nov., novel acetic acid bacteria isolated from flowers in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**: 339-346.
- Tanaka, N., Romanenko, L.A., Iino, T., Frolova, G.M. & Mikhailov, V.V. 2011. *Cocleimonas flava* gen. nov., sp. nov., a novel gammaproteobacterium isolated from sandy snail (*Umbonium costatum*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 412-416.
- Toffin, L., Zink, K., Kato, C., Pignet, P., Bidault, A., Bienvenu, N., Birrien, J.-L. & Prieur, D. 2005. *Marinilactibacillus piezotolerans* sp. nov., a novel marine lactic acid bacterium isolated from deep sub-seafloor sediment of the Nankai Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 345-351.
- Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K.E., Nelson, W., Fouts, D.E., Levy, S., Knap, A.H., Lomas, M.W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y.-H. & Smith, H.O. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.
- Walker, A.W., Ince, J., Duncan, S.H., Webster, L.M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M.D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A.M., Lobley, G.E., Parkhill, J. & Flint, H.J. 2011. Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *ISME J* **5**: 220-230.
- Ward, D.M., Weller, R. & Bateson, M.M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**: 63-65.
- Yanagita, K., Manome, A., Meng, X.-Y., Hanada, S., Kanagawa, T., Tsuchida, T., Mackie, R.I., & Kamagata, Y. 2003. Flow cytometric sorting, phylogenetic analysis and *in situ* detection of *Oscillospira guilliermondii*, a large morphologically conspicuous but uncultured ruminal bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1609-1614.
- Zhang, K., Martiny, A.C., Reppas, N.B., Barry, K.W., Malek, J., Chisholm, S.W. & Church, G.M. 2006. Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. *Nat. Biotechnol.* **24**: 680-686.