

受賞総説

Phylum *Bacteroidetes* と酢酸菌に関する分類学的研究 (平成 26 年度日本微生物資源学会奨励賞受賞)

村松由貴

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

Taxonomic studies of the phylum *Bacteroidetes* and acetic acid bacteria

Yuki Muramatsu

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

はじめに

NBRC は、2002 年の設立以来、財団法人発酵研究所 (IFO) から移管された株に加え、国内外研究者からの寄託、NBRC 職員による収集や海外との共同事業を行って、保存微生物株の充実を図ってきた。私は、NBRC の細菌担当者の一人として、菌株の受け入れ、保存、品質管理等の業務を行っており、コレクションの菌株担当者には、微生物取扱いについての技術だけでなく、分類学など微生物についての基礎的な知識も欠かせないと感じている。本稿では、私がこれらの業務に携わる中で見つけた Phylum *Bacteroidetes* に属する 1 新種及び 1 新属新種とタイ王国との共同事業で収集した酢酸菌に関する分類学的研究について述べる。

Phylum *Bacteroidetes* に関する分類学的研究

Phylum *Bacteroidetes* は、*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* (CFB) グループとも呼ばれ、2014 年 3 月時点では 18 科 265 属が記載されている (Kreig *et al.*, 2010)。CFB グループは、表現性状に基づく分類が困難であり、属の境界がきわめて曖昧であったが、16S rRNA 遺伝子配列に基づいた再分類が進められ、分類学的混乱はおおむね解決されてきた。また、分離株に基づく系統解析では、本菌群は従来考えられていたよりも多様性が大きいことが示唆されており (中川, 2004)、近年はこのグループに属す

る新属や新種が多数報告されている。本研究では、NBRC に保存されている未知微生物資源に情報を付加し NBRC 株として公開するために、国内から分離された CFB グループの菌株に注目し分類学的研究を行った。

新種 *Persicobacter psychrovidus* の提案

Persicobacter 属は 1997 年に [*Cytophaga*] *diffluens* について設立された新属で (Nakagawa *et al.*, 1997), *Persicobacter diffluens* 1 種のみが知られていた。我々は千葉県と神奈川県で採集した貝から *P. diffluens* と近縁な 3 株を分離し、分類学的研究を行った。Asr 22-19^T 株 (=NBRC 101262^T) の分離源は千葉県鋸南で採集したアサリ、MKT 1 (=NBRC 101035) 及び MKT 56 (=NBRC 101041) はそれぞれ神奈川県三崎のヒザラガイとヨメガカサである。16S rRNA 遺伝子配列解析の結果、これら 3 株の配列は同じであり、既知種 *P. diffluens* NBRC 15940^T との塩基配列相同性は 98.3% であった。DNA-DNA 相同性試験では、分離株 3 株は 68-100% と高い相同性を示し同種であることが示唆された一方、*P. diffluens* NBRC 15940^T とは 18-28% の相同性であったことから *P. diffluens* とは別種と考えられた。属レベルでの鑑別性状の指標となる主要キノンは *P. diffluens* と同様にメナキノン 7 (MK-7) であり、主要脂肪酸組成 (5% 以上) は iso-C_{15:0} 及び iso-C_{17:0} 3-OH と *P. diffluens* とは大きな違いが見られなかったことから、これら 3 株は、*Persicobacter* 属の新種として提案することが妥当で

E-mail: muramatsu-yuki@nite.go.jp

あると考えられた。分離株3株は、*P. diffluens* が15°C以下で生育しないのに対して5°Cでも生育し、carboxymethyl cellulose (CMC) や Yeast cell の分解能があるという特徴を持っていた。これらの結果に基づき、*Flammeovirgaceae* 科に属する *Persicobacter* 属の新種 *Persicobacter psychrovidus* を提案した (Muramatsu *et al.*, 2010b)。“*psychros*”は「冷たい」、*“vividus”*は「活発な」を意味し、種小名“*psychrovidus*”は、低温域でも生育する特徴にちなんでいる。

新属新種 *Salinirepens amamiensis* の提案

我々のグループでは、2000年から2001年に日本の亜熱帯各地域から *Cytophaga* 類縁細菌 115 株を分離し、これらが 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた系統解析で24のグループ (CFB 1-CFB 24) に分かれることを報告した (中川, 2004)。そのうち、CFB19は、*Flammeovirga* 属2つ目の新種 *Flammeovirga yaeyamensis* として報告された (Takahashi *et al.*, 2006a)。我々は、*Flavobacteriaceae* 科に含まれない6

グループの中の1つCFB16に分類された AM11-6^T (= NBRC 101268^T) 株に注目し、分類学的検討を行った。AM11-6^T 株は、奄美大島の浦地区の海水から分離され、16S rRNA 遺伝子配列解析の結果から *Cryomorphaceae* 科に属した。*Cryomorphaceae* 科には *Fluviicola* 属、*Wandonia* 属などが報告されている (Bowman *et al.*, 2003; O'Sullivan *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010)。AM11-6^T 株は、16S rRNA 遺伝子配列に基づく系統樹において、*Wandonia haliotis* Haldis-1^T、*Fluviicola taffensis* RV262^T と1つのクラスターを形成し、これら2種に対して93.7%、91.8%の相同性しか示さなかった (図1)。AM11-6^T の主要脂肪酸 (5%以上) は iso-C_{15:0}、iso-C_{17:0} 3-OH、C_{14:0} 及び iso-C_{15:1} G であり、*Cryomorphaceae* 科の各属と異なっていた。さらに、*F. taffensis* と *W. haliotis* ではアルカリによる色素の変色として検出されるフレキシルビン反応が見られるのに対し、AM11-6^T 株では同反応を示さず、フレキシルビン色素の存在でも相違が見られたことから、新属として提案することが妥当であると考えられ

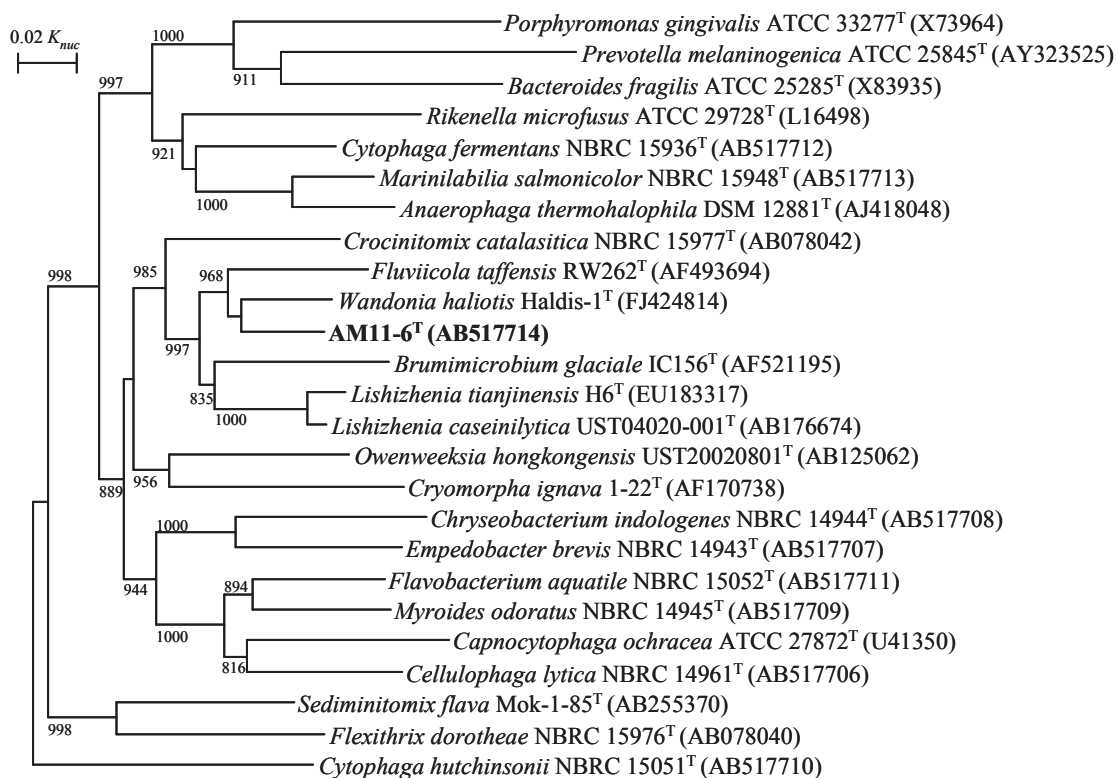


図1 Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic positions of *Salinirepens amamiensis* AM11-6^T, other members of the family *Cryomorphaceae* and other representative of the phylum *Bacteroidetes*. *Cytophaga hutchinsonii* NBRC 15051^T (AB517710) was used as an outgroup. Bar, 0.02 K_{nuc} . Bootstrap values greater than 700 in 1000 replicates are shown.

た。また、生育に必要な塩要求性において違いが見られた。AM11-6^T株は、生育にNaClが必須であり、それに加えてMgSO₄、MgCl₂、もしくはCaCl₂のいずれかが必要であるのに対し、*Fluviicola*属細菌は淡水から分離されており1%以上のNaCl存在下では生育せず、*Wandonia*属細菌は、海水から分離されたもののNaClは生育に必須ではなかった。これらの結果に基づき、AM11-6^T株に対して新属新種 *Salinirepens amamiensis* (Muramatsu *et al.*, 2012) を提案した。“*salinus*”は「塩」、*“repens”*は「這う」を意味し、属名“*Salinirepens*”は、生育に塩が必須であり、滑走運動する特徴にちなんでいる。

酢酸菌に関する分類学的研究

1993年に発効した生物多様性条約では原産国の権利に配慮することが求められており、個々の研究者が海外の菌株を日本国内へ持ち込む際の制約となっている側面がある。私が所属している独立行政法人製品評価技術基盤機構(NITE)は、日本国内において利用可能な海外原産株を整備することを目的とし、アジアの各国と「微生物資源の保全と持続可能な利用に関する覚書」(MOU)及び共同研究契約(PA)を結び、現地での菌株収集や分離同定及び菌株移転を行っている。2005年からはタイ王国及び日本における生物遺伝資源の保全と持続的な利用を目的として、タイ王国のNational Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)と細菌、酵母、糸状菌それぞれについての共同研究を開始し、私は酢酸菌に関する研究に参加した。この共同研究では、タイ産微生物の分離、同定、保存等に関する共同研究や技術移転を行い、また、得られた微生物をNBRCに寄託した。

酢酸菌は、食酢醸造に利用される *Acetobacter* 属やビタミンC製造の中間体となるソルボース生産に利用される *Gluconobacter* 属、また、バクテリアセルロース膜産生能のある *Komagataeibacter xylinus* 等、食品製造や物質生産に関わる細菌が含まれる。近年にはインドネシア、タイ、フィリピンなどの熱帯地域から、*Acetobacteraceae* 科の新属や新種が報告されている (Sievers & Swings, 2005; Kersters *et al.*, 2006; 内村, 2007; Yamada & Yukphan, 2008)。新しい酢酸菌が、熱帯地域から更に発見される可能性を考え、本研究を行った (Muramatsu *et al.*, 2009)。

本研究で使用した酢酸菌302株は、タイ国各地 Bangkok, Pak Kret, Ratchaburi, Suratthani, Samutsakorn, Ayutthaya, Chiang Mai, Sakaerat, 及

び Thong Pha Phum (Kanchanaburi) で採集した果実、発酵した果実、花、種子、及びキノコから分離された。分離方法は、0.3% 酢酸を含むグルコース/エタノール/酢酸培地 (1.0% *d*-glucose, 0.5% ethanol, 0.3% acetic acid, 1.5% peptone, 0.8% yeast extract, 100 p.p.m. cycloheximide (w/v), pH 3.5)、ソルビトール培地 (2.0% *d*-sorbitol, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract 100 p.p.m. cycloheximide, pH 3.5) 及びシヨ糖培地 (2.0% sucrose, 0.3% peptone, 0.3% yeast extract, 0.3% acetic acid (v/v), pH 3.5) を用いて集積培養した菌液を、2.0% *d*-glucose, 0.5% ethanol (v/v), 0.3% peptone, 0.3% yeast extract, 0.7% CaCO₃ 及び 1.2% agar (w/v) から成る平板培地に接種しクリアゾーンを形成した株を分離した (Yamada *et al.*, 1976, 1999, 2000; Lisdiyanti *et al.*, 2002; Yukphan *et al.*, 2004c, 2005; Thi Lan Vu *et al.*, 2007)。分離された株について16S rRNA 遺伝子配列を決定し、系統解析を行った (図2)。分離株の多くは *Acetobacter* 属、*Asaia* 属、*Gluconacetobacter* 属あるいは *Gluconobacter* 属に含まれたが、既知属から系統的に独立している2つのグループ (シーケンスタイプ GA1 及び GA2) に属する5株が見つかった。これらについては2つの新属新種 *Tanticharoenia sakaeratensis*, *Ameyamaea Chiangmaiensis* を提案した (Yukphan *et al.*, 2008, 2009)。残りの297株は *Acetobacter* 属、*Asaia* 属、*Gluconacetobacter* 属あるいは *Gluconobacter* 属に含まれ、16S rRNA 遺伝子配列相同性から33のシーケンスタイプに分けられた (表1)。

Acetobacter 属に含まれた17株は、8つのシーケンスタイプ (AB1-8) に分けられた。AB1は、*A. cerevisiae* LMG 1625^T, *A. malorum* LMG 1746^T 及び *A. orleanensis* NBRC 13752^T とクラスターを構成し、*A. cerevisiae* と最も近縁だった。AB2は *Acetobacter* 属既知種18種と系統的に離れており、新種と考えられた。AB3, AB4, AB5 及び AB6 は、*A. indonesiensis* NRIC 0313^T, *A. lovaniensis* NBRC 13753^T, *A. orientalis*, 及び *A. peroxydans* NBRC 13755^T と近縁だった。AB7は、*A. ghanensis* 430A^T, *A. syzygii* 9II-2^T, 及び *A. lovaniensis* とクラスターを構成し、AB8は *A. tropicalis* NRIC 0312^T に最も近縁だった。

Asaia 属に含まれた150株は11タイプ (AS1-11) に分かれた。AS4に含まれた2株 BCC 15733^T (= NBRC 102526^T) 及び BCC 15734 (= NBRC 102528) は、*Asaia* 属既知種3種から系統的に離れており、新種 *Asaia lannensis* として提案された (Malimas *et al.*,

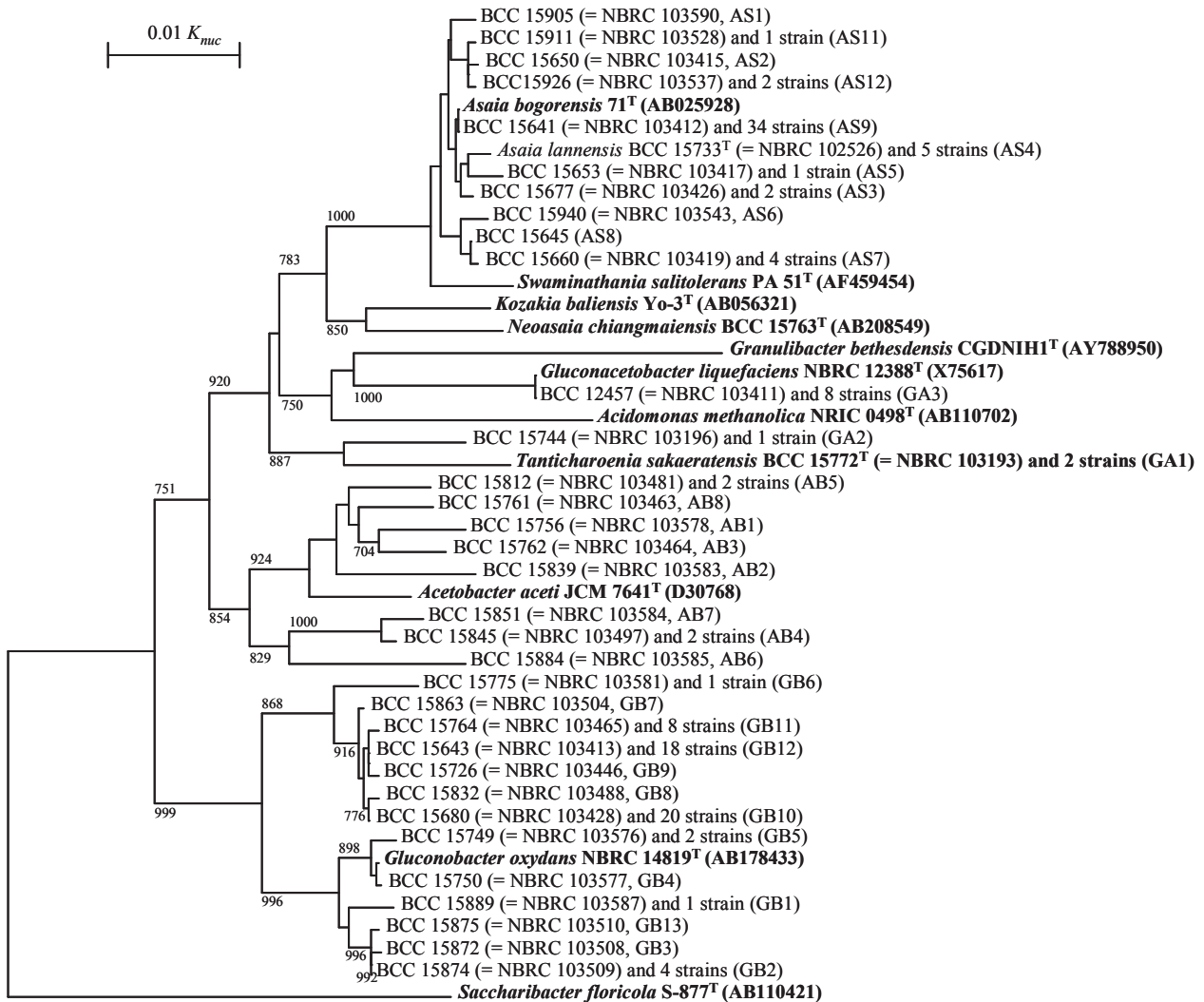


図2 A neighbor-joining tree showing the phylogenetic positions of the family *Acetobacteraceae* based on the 16S rRNA gene sequences. *Saccharibacter floricola* S-877^T (AB110421) was used as an outgroup. Bar, 0.01 K_{nuc} . Bootstrap values greater than 700 are shown in 1000 replicates.

2008a). 残りのシーケンスタイプは, *Asaia* 属既知種と高い相溶性 99.5% 以上を示した。

Gluconacetobacter 属に含まれた 9 株は全て 1 つのシーケンスタイプ GA3 に属し, *Gluconacetobacter liquefaciens* NBRC 12388^T と 100% の相溶性を示した。

Gluconobacter 属に含まれた 121 株は 13 タイプ (GB1-13) に分かれた (図 3)。GB2, GB3 及び GB13 は, *G. albidus* 及び *G. kondonii* とクラスターを形成した。GB1 に含まれた 2 株 BCC 15889^T (=NBRC 103587^T) 及び BCC 15890 (=NBRC 103588) は, *G. albidus* と最も高い相溶性を示したが, 詳細な分類学的研究の結果, 新種であることが明らかとなったため,

Gluconobacter kanchanaburiensis として提案した (Malimas *et al.*, 2009a)。GB4 及び GB5 は, *G. oxydans* NBRC 14819^T に最も近縁だった。 *G. frateurii* NBRC 3264^T と 99.1% の相溶性しかなく, 既知種とは系統的に離れていた GB6 に含まれた 2 株 BCC 15775^T (=NBRC 103581^T) 及び BCC 15780 (=NBRC 103582) については, 新種 *Gluconobacter wancherniae* を提案した (Yukphan *et al.*, 2010)。GB7 から GB11 は, *G. frateurii* NBRC 3264^T 及び *G. japonicus* NBRC 3271^T とクラスターを構成した。 *Gluconobacter* 属においては, 16S-23S ITS 領域による系統解析や 16S-23S ITS 領域制限酵素処理パターン解析による同定が有用との

表1 List of sequence groups of Thai isolates

Phylogenetic group		Number of strains	Closest species based on 16S rRNA sequence similarities ^a
New genus	GA1	3	Proposed as <i>Tanticharoenia sakaeratensis</i>
	GA2	2	Proposed as <i>Ameyamaea Chiangmaiensis</i>
<i>Acetobacter</i>	AB1	1	<i>A. cerevisiae</i> (99.6)
	AB2	1	<i>A. orientalis</i> (97.9)
	AB3	1	<i>A. indonesiensis</i> (99.3)
	AB4	6	<i>A. lovaniensis</i> (99.4)
	AB5	5	<i>A. orientalis</i> (99.9)
	AB6	1	<i>A. peroxydans</i> (99.4)
	AB7	1	<i>A. syzygii</i> (99.7)
<i>Asaia</i>	AB8	1	<i>A. tropicalis</i> (99.8)
	AS1	1	<i>A. bogorensis</i> (99.7)
	AS2	2	<i>A. siamensis</i> (99.9)
	AS3	6	<i>A. lannensis</i> (99.5)
	AS4	7	Proposed as <i>Asaia lannensis</i>
	AS5	12	<i>A. lannensis</i> (99.5)
	AS6	1	<i>A. krungthepensis</i> (99.5)
	AS7	13	<i>A. krungthepensis</i> (99.7)
	AS8	3	<i>A. krungthepensis</i> (99.9)
	AS9	95	<i>A. bogorensis</i> (100)
	AS10	6	<i>A. krungthepensis</i> (99.5)
AS11	4	<i>A. bogorensis</i> (99.6)	
<i>Gluconacetobacter</i>	GA3	9	<i>G. liquefaciens</i> (100)
<i>Gluconobacter</i>	GB1	2	Proposed as <i>Gluconobacter kanchanaburiensis</i>
	GB2	6	<i>G. albidus</i> (100)
	GB3	2	<i>G. albidus</i> (99.9)
	GB4	1	<i>G. oxydans</i> (99.9)
	GB5	3	<i>G. oxydans</i> (99.7)
	GB6	2	Proposed as <i>Gluconobacter wancherniae</i>
	GB7	1	<i>G. frateurii</i> (99.8)
	GB8	1	<i>G. frateurii</i> (99.9)
	GB9	1	<i>G. frateurii</i> (99.9)
	GB10	41	<i>G. frateurii</i> (99.9)
	GB11	20	<i>G. frateurii</i> (99.9)
	GB12	39	<i>G. frateurii</i> (100)
	GB13	2	<i>G. kondonii</i> (100)

^a 16S rRNA sequence similarities (%) are shown in parenthesis.

報告もあることから (Yukphan *et al.*, 2004a, 2004b; Takahashi *et al.*, 2006b), 系統関係については、これらの手法を用いて更なる解析が必要と考えられた。

本研究において、*Acetobacter* 属、*Asaia* 属、*Gluconacetobacter* 属、*Gluconobacter* 属に広がりを持つ多様なタイ産酢酸菌が分離された。これらの株には、既知種から系統的に離れている株が存在し、2つの新属新種及び3つの新種を提案した。分離された302株のうち155株について、16S rRNA 遺伝子配列、採集地、分離源の異なる株を選抜してNBRCに寄託した。また、NBRCで保存し公開している *Gluconobacter* 属細菌の最高生育温度を調査し、その情報をNBRC

web ページから公開している (<http://www.nbrc.nite.go.jp/gluconobacter.html>)。 *Gluconobacter* 属細菌には、発酵による物質生産に利用される株が知られている (Deppenmeier *et al.*, 2002)。発酵反応では熱が発生するため、反応中においても菌の活性を維持するためには発酵槽の温度管理が重要になるが、比較的高温域で生育する株であれば、発酵槽冷却の負荷が抑えられる利点がある (Moonmangmee *et al.*, 2000)。NBRC 804 培地 (0.5% Polypepton, 0.5% yeast extract, 0.5% glucose, 0.1% MgSO₄·7H₂O, pH 6.6-7.0) または NBRC 350 培地 (0.5% Polypepton, 0.5% yeast extract, 0.5% glucose, 0.5% mannitol, 0.1%

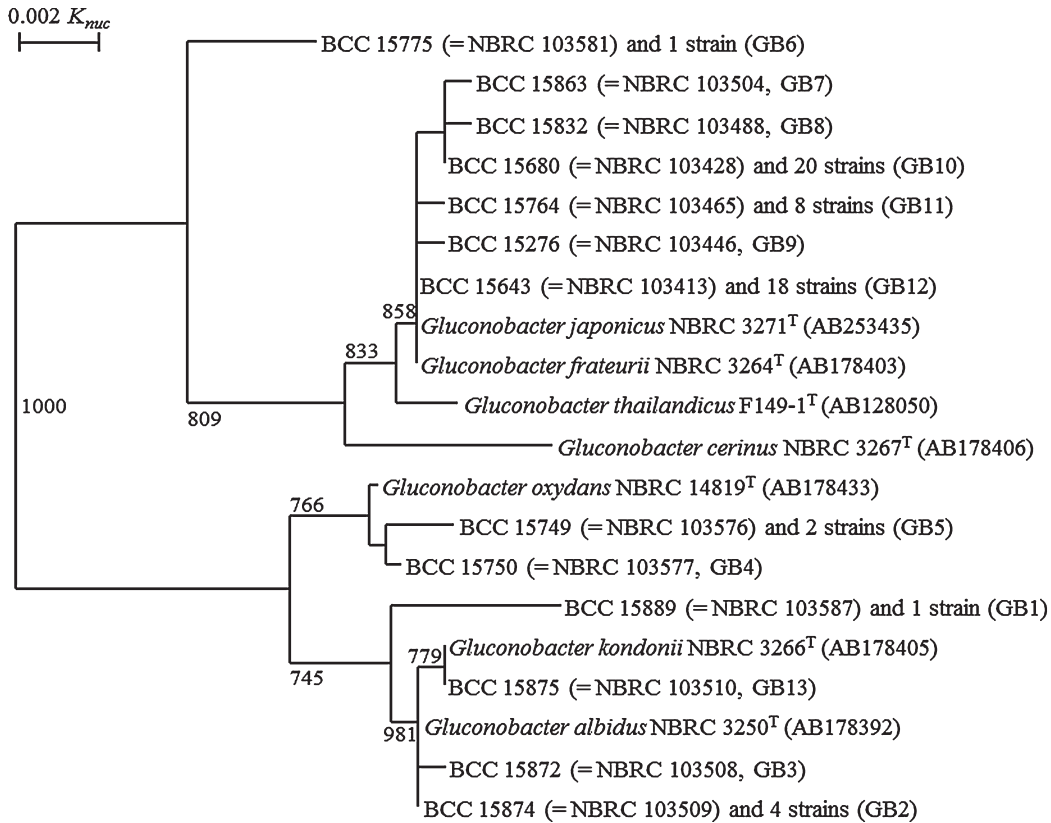


図3 A neighbor-joining tree showing the phylogenetic positions of the genus *Gluconobacter* based on the 16S rRNA gene sequences. Bar, 0.002 K_{nuc} . Bootstrap values greater than 700 are shown in 1000 replicates.

MgSO₄·7H₂O, 0.5% ethanol, pH 6.6-7.0) を用いて 25, 30, 35, 37, 40℃ で試験した。40℃ で生育した株はなかったが、最高生育温度が 37℃ であったタイ産の株は、70 株中 57 株 (81%) であったのに対し、日本産の株は 35 株中 13 株 (37%) であった。タイ産の株の方が高温で生育できる株が多かったことから、タイなどの熱帯地域からは発酵生産などの工業利用に適した株が分離できることが期待される。

上記の他、タイから分離した酢酸菌として、2つの新属新種 *Neokomagataea thailandica* と *Neokomagataea tanensis* 及び *Swingsia samuiensis* と、4つの新種 *Asaia spathodeae*, *Gluconobacter nephelii*, *Acetobacter farinalis* 及び *Gluconobacter uchimurae* の報告も行った (Kommanee *et al.*, 2010, 2011; Tanasupawat *et al.*, 2011a, 2011b; Yukphan *et al.*, 2011; Malimas *et al.*, 2013)。また、日本国内から分離され NBRC にて保存されていた *Gluconobacter* 属細菌株について分類学的再検討を行い、*G. oxydans* NBRC 3990 に対して *G. roseus*, *G. oxydans* NBRC

12467 に対して *G. sphaericus*, *G. frateurii* NBRC 3271, NBRC 3272, *G. cerinus* NBRC 3260, NBRC 3263, NBRC 3269 に対して、*G. japonicus* を提案した (Malimas *et al.*, 2008b, 2008c, 2009b)。更に、*Gluconacetobacter* 属 17 種のうち、11 種を新属 *Komagataeibacter* 属に分類することを提案した (Yamada *et al.*, 2012; Yamada, 2014)。これらの新属新種、新種及び新組合せの提案は、共同研究先である BIOTEC 及びタイ王国チュラロンコーン大学において精力的に進められたものである。

おわりに

これまで述べた Phylum *Bacteroidetes* や酢酸菌の他にも、*Alphaproteobacteria* 綱に属する *Ruegeria mobilis* や *Betaproteobacteria* 綱に属する *Silvimonas iriomotensis* 及び *Silvimonas amylolytica* など、2つの新属新種、7つの新種をこれまでに発表した (Muramatsu *et al.*, 2007, 2010a; Thi Lan Vu *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2012, 2013; Islam *et al.*, 2008; Otsuka

et al., 2011; Nutaratat *et al.*, 2013). これらの細菌を分類し同定する中で、細菌は単純な見かけに反して分類群ごとにそれぞれ特徴が異なり、改めてその多様性に驚かされるとともに、限られた手法を用いて菌の特徴を探り、鑑別する細菌分類学の奥深さを感じている。これまでの細菌分類学では生理生化学的性状、キノンや脂肪酸組成のような細胞構成成分、16S rRNA 遺伝子などの遺伝子塩基配列の情報が利用されてきたが、今では全ゲノム情報が用いられるようになってきた。分類手法が多様化し、より緻密に細菌を識別することが可能になる一方で、迅速かつ精度の高い同定手法も求められている。例えば、*Gluconobacter* 属においては、16S rRNA 遺伝子配列相同性が非常に高く、表現性状も似ている別種が存在する。これらの種は、DNA-DNA 相同性試験や ITS 領域の制限酵素処理パターン等の情報を用いて識別されるが、複数の手法を用いて分類する必要があるため、迅速に同定結果が得られるとは言い難い。近年、細菌の同定においては、MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry) を用いた迅速同定法が利用されるようになり、主に臨床分野において普及してきている。病原菌に限らず、より広い範囲の細菌に対して MALDI-TOF MS を用いた迅速同定法を適用するためには、データベースの整備をする必要があるものの、本法は菌株の簡易同定を行う際に有用な手段と目されている。今後もその動向を注視していきたい。また、本稿ではタイ産酢酸菌に注目して共同研究を実施し、新規株の報告を行ったが、日本において分離された酢酸菌 *Asaia astilbes*, *Asaia platycodi* 及び *Asaia prunellae*, *Komagataeibacter kakiaceti*, *Gluconacetobacter takamatsuzukensis* 等も報告されており、日本産酢酸菌の多様性についても興味を持たれるところである (Suzuki *et al.*, 2010; Iino *et al.*, 2012; Yamada, 2014; Nishijima *et al.*, 2013)。今後は、NBRC 保存株の充実を図るとともに、新しい同定手法も取り入れながら情報を付加し、生物遺伝資源の整備に貢献していきたい。

謝 辞

本研究は、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本部遺伝資源保存課へ配属後、鈴木健一郎博士及び中川恭好博士のご指導のもと行いました。今回の受賞は、ご両名のご指導、ご鞭撻の賜物と深く感謝しております。タイ王国 National Center for Genetic Engineering and Biotechnology の山田雄三

先生、Dr. Pattaraporn Rattanawaree, Mr. Taweesak Malimas, タイ王国チュラロンコーン大学の Dr. Somboon Tanasupawat をはじめとする共同研究者の方々には、大変お世話になりました。NBRC で一緒に仕事をしている宮下美香さん、資延淳二さん、杉本昌子さん、鎌倉由紀さんをはじめとする NBRC の皆様からは、様々な視点からの確なご助言及びご意見をいただき、大いに刺激を受けています。お世話になっている皆様に、この場を借りてお礼申し上げます。最後に、これまで私を支えてくれている家族と友人に感謝します。

文 献

- Bowman, J.P., Nichols, C.M. & Gibson, J.A.E. 2003. *Algoriphagus ratkowskyi* gen. nov., sp. nov., *Brumimicrobium glaciale* gen. nov., sp. nov., *Cryomorpha ignava* gen. nov., sp. nov. and *Crocinitomix catalasitica* gen. nov., sp. nov., novel flavobacteria isolated from various polar habitats. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1343-1355.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M. & Prust, C. 2002. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 233-242.
- Iino, T., Suzuki, R., Tanaka, N., Kosako, Y., Ohkuma, M., Komagata, K. & Uchimura, T. 2012. *Gluconacetobacter kakiaceti* sp. nov., an acetic acid bacterium isolated from a traditional Japanese fruit vinegar. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 1465-1469.
- Islam, M.S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. & Seki, T. 2008. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 1416-1429.
- Kersters, K., Lisdiyanti, P., Komagata, K. & Swings, J. 2006. The family *Acetobacteraceae*. In Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E. (eds.), *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, third edition. vol. 6, p. 163-200, Springer, New York.
- Kommanee, J., Tanasupawat, S., Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. & Yamada, Y. 2010. *Asaia spathodeae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the *alpha-Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**: 81-87.

- Kommanee, J., Tanasupawat, S., Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. & Yamada, Y. 2011. *Gluconobacter nephelii* sp. nov., an acetic acid bacterium in the class *Alphaproteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 2117-2122.
- Kreig, N.R., Ludwig, W., Euzéby, J. & Whitman, W.B. 2010. Phylum *Bacteroidetes*, In Krieg, N.R., Ludwig, W., Whitman, W., Hedlund, B.P., Paster, B.J., Staley, J.T., Ward, N., Brown, D. & Parte, A. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* vol. 4, p. 25. Springer, New York.
- Lee, D.-H., Choi, E.-K., Moon, S.-R., Ahn, S., Lee, Y.S., Jung, J.S., Jeon, C.O., Whang, K.-S. & Kahng, H.-Y. 2010. *Wandonia haliotis* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium of the family *Cryomorphaceae*, phylum *Bacteroidetes*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 510-514.
- Lisdiyanti, P., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Yamada, Y., Uchimura, T. & Komagata, K. 2002. *Kozakia baliensis* gen. nov., sp. nov., a novel acetic acid bacterium in the *α-Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 813-818.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2008a. *Asaia lannaensis* sp. nov., a new acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *Biosci Biotechnol Biochem.* **72**: 666-671.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2008b. *Gluconobacter roseus* (ex Asai 1935) sp. nov., nom. rev., a pink-colored acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **54**: 119-125.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2008c. *Gluconobacter sphaericus* (Ameyama 1975) comb. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **54**: 211-220.
- Malimas, T., Yukphan, P., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2009a. *Gluconobacter kanchanaburiensis* sp. nov., a brown pigment-producing acetic acid bacterium for Thai isolates in the *Alphaproteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **55**: 247-254.
- Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Muramatsu, Y., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2009b. *Gluconobacter japonicus* sp. nov., an acetic acid bacterium in the *Alphaproteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 466-471.
- Malimas, T., Chaipitakchonlatarn, W., Thi Lan Vu, H., Yukphan, P., Muramatsu, Y., Tanasupawat, S., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2013. *Swingsia samuiensis* gen. nov., sp. nov., an osmotolerant acetic acid bacterium in the *α-Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **59**: 375-384.
- Moonmangmee, D., Adachi, O., Ano, Y., Shinagawa, E., Toyama, H., Theeragool, G., Lotong, N. & Matsushita, K. 2000. Isolation and characterization of thermotolerant *Gluconobacter* strains catalyzing oxidative fermentation at higher temperatures. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 2306-2315.
- Muramatsu, Y., Uchino, Y., Kasai, H., Suzuki, K. & Nakagawa, Y. 2007. *Ruegeria mobilis* sp. nov., a member of the *Alphaproteobacteria* isolated in Japan and Palau. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1304-1309.
- Muramatsu, Y., Yukphan, P., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Malimas, T., Potacharoen, W., Yamada, Y., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Suzuki, K. 2009. 16S rRNA gene sequences analysis of acetic acid bacteria isolated from Thailand. *Microbiol. Cult. Coll.* **25**: 13-20.
- Muramatsu, Y., Suzuki, K. & Nakagawa, Y. 2010a. *Silvimonas iriomotensis* sp. nov. and *Silvimonas amylolytica* sp. nov., new members of the class *Betaproteobacteria* isolated from the subtropical zone in Japan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 174-178.
- Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Iino, T., Suzuki, K. & Nakagawa, Y. 2010b. *Persicobacter psychrovidus* sp. nov., isolated from shellfish, and

- emended descriptions of the genus *Persicobacter* and *Persicobacter diffluens*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1735-1739.
- Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kamakura, Y., Suzuki, K. & Nakagawa, Y. 2012. *Salinirepens amamiensis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Cryomorphaceae* isolated from seawater, and emended descriptions of the genera *Fluviicola* and *Wandonia*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**: 2235-2240.
- Nakagawa, Y., Hamana, K., Sakane, T. & Yamasato, K. 1997. Reclassification of *Cytophaga aprica* (Lewin 1969) Reichenbach 1989 in *Flammeovirga* gen. nov. as *Flammeovirga aprica* comb. nov. and of *Cytophaga diffluens* (ex Stanier 1940; emend. Lewin 1969) Reichenbach 1989 in *Persicobacter* gen. nov. as *Persicobacter diffluens* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 220-223.
- 中川恭好 2004. *Cytophaga* 類縁細菌群の分類学的研究. *日本微生物資源学会誌* **20**: 41-51.
- Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Tomita, J., Kigawa, R., Sano, C. & Sugiyama, J. 2013. *Gluconacetobacter tumulisoli* sp. nov., *Gluconacetobacter takamatsuzukensis* sp. nov. and *Gluconacetobacter aggeris* sp. nov., isolated from Takamatsuzuka Tumulus samples before and during the dismantling work in 2007. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 3981-3988.
- Nutaratat, P., Srisuk, N., Duangmal, K., Yurimoto, H., Sakai, Y., Muramatsu, Y. & Nakagawa, Y. 2013. *Roseomonas musae* sp. nov., a new bacterium isolated from a banana phyllosphere. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **103**: 617-624.
- O'Sullivan, L.A., Rinna, J., Humphreys, G., Weightman, A.J. & Fry, J.C. 2005. *Fluviicola taffensis* gen. nov., sp. nov., a novel freshwater bacterium of the family *Cryomorphaceae* in the phylum 'Bacteroidetes'. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2189-2194.
- Otsuka, Y., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., Matsuda, M., Nakamura, M. & Murata, H. 2011. *Burkholderia oxyphila* sp. nov., a bacterium isolated from acidic forest soil that catabolizes (+)-catechin and its putative aromatic derivatives. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 249-254.
- Park, S., Yoshizawa, S., Chiura, H.X., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., Kogure, K. & Yokota, A. 2012. *Nonlabens marinus* [corrected] sp. nov., a novel member of the *Flavobacteriaceae* isolated from the Pacific Ocean. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **102**: 669-676. Erratum in: *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2012. **102**: 753.
- Park, S., Yoshizawa, S., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., Yokota, A. & Kogure, K. 2013. *Aureicoccus marinus* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Flavobacteriaceae*, isolated from seawater. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**: 1885-1890.
- Sievers, M. & Swings, J. 2005. Family II. *Acetobacteraceae*, In Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. & Garrity, G.M. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, second edition. vol. 2, p. 41-50, Springer, New York.
- Suzuki, R., Zhang, Y., Iino, T., Kosako, Y., Komagata, K. & Uchimura, T. 2010. *Asaia astilbes* sp. nov., *Asaia platycodi* sp. nov., and *Asaia prunellae* sp. nov., novel acetic acid bacteria isolated from flowers in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **56**: 339-346.
- Takahashi, M., Suzuki, K. & Nakagawa, Y. 2006a. Emendation of the genus *Flammeovirga* and *Flammeovirga aprica* with the proposal of *Flammeovirga arenaria* nom. rev., comb. nov. and *Flammeovirga yaeyamensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2095-2100.
- Takahashi, M., Yukphan, P., Yamada, Y., Suzuki, K.I., Sakane, T. & Nakagawa, Y. 2006b. Intrageneric structure of the genus *Gluconobacter* analyzed by the 16S rRNA gene and 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **52**: 187-193.
- Tanasupawat, S., Kommanee, J., Yukphan, P., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. & Yamada, Y. 2011a. *Acetobacter farinalis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **57**: 159-167.
- Tanasupawat, S., Kommanee, J., Yukphan, P., Moonmangmee, D., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y. & Yamada, Y. 2011b. *Gluconobacter uchimurae* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **57**: 293-301.
- Thi Lan Vu, H., Malimas, T., Yukphan, P., Potacharoen,

- W., Tanasupawat, S., Loan, L.T.T., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2007. Identification of Thai isolates assigned to the genus *Gluconobacter* based on 16S-23S rRNA ITS restriction analysis. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **53**: 133-142.
- Thi Lan Vu, H., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarn, W., Malimas, T., Muramatsu, Y., Uyen, T.T.B., Tanasupawat, S., Kien, C.D., Nakagawa, Y., Thanh Pham, H. & Yamada, Y. 2013. *Nguyenibacter vanlangensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **59**: 153-166.
- 内村 泰 2007. 日本・東南アジア産酢酸菌の分離・分類に関する研究. *IFO Res. Commun.* **21** : 7-17.
- Yamada, Y., Okada, Y. & Kondo, K. 1976. Isolation and characterization of "polarly flagellated intermediate strains" in acetic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **22**: 237-245.
- Yamada, Y., Hosono, R., Lisdiyanti, P., Widyastuti, Y., Saono, S., Uchimura, T. & Komagata, K. 1999. Identification of acetic acid bacteria isolated from Indonesian sources, especially of isolates classified in the genus *Gluconobacter*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **45**: 23-28.
- Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., Uchimura, T. & Komagata, K. 2000. *Asaia bogorensis* gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 823-829.
- Yamada, Y. & Yukphan, P. 2008. Genera and species in acetic acid bacteria. *Int. J. Food. Microbiol.* **125**: 15-24.
- Yamada, Y., Yukphan, P., Lan Vu, H.T., Muramatsu, Y., Ochaikul, D., Tanasupawat, S. & Nakagawa, Y. 2012. Description of *Komagataeibacter* gen. nov., with proposals of new combinations (*Acetobacteraceae*). *J. Gen. Appl. Microbiol.* **58**: 397-404.
- Yamada, Y. 2014. Transfer of *Gluconacetobacter kakiaceti*, *Gluconacetobacter medellinensis* and *Gluconacetobacter maltaceti* to the genus *Komagataeibacter* as *Komagataeibacter kakiaceti* comb. nov., *Komagataeibacter medellinensis* comb. nov. and *Komagataeibacter maltaceti* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **64**: 1670-1672.
- Yukphan, P., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2004a. Identification of strains assigned to the genus *Gluconobacter* Asai 1935 based on the sequence and the restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **50**: 9-15.
- Yukphan, P., Malimas, T., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2004b. Re-identification of *Gluconobacter* strains based on restriction analysis of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **50**: 189-195.
- Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2004c. *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 313-316.
- Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2005. *Neoasaia Chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **51**: 301-311.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Potacharoen, W. & Yamada, Y. 2008. *Tanticharoenia sakaeratensis* gen. nov., sp. nov., a new osmotolerant acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 672-676.
- Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Hamana, K., Tahara, Y., Suzuki, K., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2009. *Ameyamaea Chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -*Proteobacteria*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**: 2156-2162.
- Yukphan, P., Malimas, T., Lundaa, T., Muramatsu, Y., Takahashi, M., Kaneyasu, M., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2010. *Gluconobacter wancherniae* sp. nov., an acetic acid bacterium from Thai isolates

in the α -*Proteobacteria*. J. Gen. Appl. Microbiol. **56**: 67-73.
Yukphan, P., Malimas, T., Muramatsu, Y., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. & Yamada, Y. 2011.

Neokomagataea gen. nov., with descriptions of *Neokomagataea thailandica* sp. nov. and *Neokomagataea tanensis* sp. nov., osmotolerant acetic acid bacteria of the α -*Proteobacteria*. Biosci. Biotechnol. Biochem. **75**: 419-426.