

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580126

研究課題名(和文)多遺伝子座位配列解析による嫌気性グラム陰性桿菌の種の定義

研究課題名(英文)Definition of species of Gram-negative anaerobic rods by multilocus sequence analysis

研究代表者

坂本 光央(SAKAMOTO, Mitsuo)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・研究員

研究者番号：50321766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Bacteroides属を含む嫌気性グラム陰性桿菌107種を対象に、16S rRNAおよびhouse keeping genes (dnaJ、gyrB、hsp60、recAおよびrpoB)の配列を決定し、多遺伝子座位配列解析(Multi Locus Sequence Analysis: MLSA)を行った。Bacteroides属における「種」を、6つの遺伝子の塩基配列を結合したMLSAによる類似度が97.5%以上を示す集団として定義した。また、6つの遺伝子の塩基配列を結合したMLSAは、単一遺伝子の塩基配列から作成された系統樹に比べてブートストラップ値が向上し、種間の近縁関係をより明確にした。

研究成果の概要(英文)：Multilocus sequence analysis (MLSA) was performed on 107 species of Gram-negative anaerobic rods including the genus Bacteroides. The genes selected, dnaJ, gyrB, hsp60, recA, rpoB and 16S rRNA were amplified by direct PCR and then sequenced. For the genus Bacteroides, we defined species as a group of strains that share at least 97.5 % gene sequence similarity based on the fragments of five protein-coding housekeeping genes and 16S rRNA gene. Analyses of the concatenated sequences of all six genes revealed robust phylogenetic relationships among the species of Gram-negative anaerobic rods when compared with the single-gene trees.

研究分野：農学

キーワード：Bacteroides MLSA dnaJ gyrB hsp60 recA rpoB 16S rRNA

### 1. 研究開始当初の背景

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。

その後、*Bacteroides* 属の記載が修正され、多くの菌種が本属から *Porphyromonas* 属および *Prevotella* 属へと移籍された。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、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。*Porphyromonas* 属および *Prevotella* 属の創設後も、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* は、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の詳細な比較検討がなされ、*Parabacteroides* 属 (*P. distasonis* および *P. merdae*) および *Tannerella* 属 (*T. forsythia*) へと移籍された。

今日、ヒト常在細菌の研究が盛んに行なわれ、それに伴い、*Bacteroides* 属および *Prevotella* 属などに属する数多くの新菌種が提唱されている。これら新菌種の多くは、形態学的特徴や生理・生化学的性質、さらに化学分類学的性質において際立った鑑別性状がなく、また、非常に高い 16S rRNA 遺伝子配列の類似度を示す。

近年では、全ゲノム情報を使って DNA-DNA hybridization (DDH) 法の評価も行われている。DDH 法が約 1 Kb の断片に切断されてハイブリッドを形成させることから、全ゲノム配列がわかっている菌種の配列を 1,020 bp の断片に切断し、BLAST で類似度を計測した値 average nucleotide identity (ANI) を比較すると、DDH の 70%類似度は ANI では 95%に相当すると報告されている。我々のこれまでの研究から、*Bacteroides* 属を含む嫌気性グラム陰性桿菌の分類において *hsp60* 遺伝子の有用性が明らかとなっている。

### 2. 研究の目的

今日の細菌の分類に必須である 16S rRNA 遺伝子は、その配列情報からは系統情報は得られるが菌種を特定できないことが多いこと

もわかってきた。そこで本研究では嫌気性グラム陰性桿菌を対象に、

(1) 16S rRNA 遺伝子より多型のある遺伝子 (house keeping genes) を多数解析し、菌群ごとに菌種識別に有効な遺伝子を選択する。

(2) 解析された細菌の全ゲノム情報と比較し、菌種の再定義を行なう。

(3) カルチャーコレクションとしてオンラインカタログへ情報を追加し、保有菌株の付加価値を高めることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) *Bacteroides* 属を含む嫌気性グラム陰性桿菌 (*Barnesiella* 属、*Butyricimonas* 属、*Dysgonomonas* 属、*Odoribacter* 属、*Parabacteroides* 属、*Paraprevotella* 属、*Porphyromonas* 属、*Prevotella* 属および *Tannerella* 属など) 107 種を対象に、16S rRNA および *hsp60* 遺伝子以外の house keeping genes (*dnaJ*、*gyrB*、*recA* および *rpoB*) の配列を決定し、多遺伝子座位配列解析 (Multi Locus Sequence Analysis: MLSA) を行った。

(2) 対象菌群において既に全ゲノム情報が解析された菌種を対象に ANI 値を計測し、DDH 法および MLSA 法との関連性を検討した。また、対象菌群において分類学的に問題とされている菌種で未だ全ゲノム配列が解析されていない菌種の全ゲノム配列を決定した。

### 4. 研究成果

MLSAは、まず初めに *Bacteroides* 属を対象とした。各遺伝子の種間類似度を比較したところ、*gyrB* 遺伝子が 64.4-100% と最も低い種間類似度を示し、*rpoB* 遺伝子が 74.0-100% と最も高かった。*gyrB* 遺伝子に次いで、*dnaJ* 遺伝子 (67.9-100%)、*recA* 遺伝子 (72.1-100%) そして *hsp60* 遺伝子 (72.9-100%) の順に類似度は低かった。また、6つの遺伝子を用い、スプリット分解解析法で *Bacteroides* 属の系統を再構成した結果、明確な網状根が観察された10のクレードが見いだされた。各クレードに属する種は遺伝学的や生態学的な性質が類似していた。特に *Pyogenes* クレードに属する3種は、同一種と考えられた。これらの結果を基に *Bacteroides* 属における「種」とは、6つの遺伝子の塩基配列を結合した MLSA による類似度が 97.5% 以上を示す集団として定義することができた。

対象菌群において分類学的に問題とされている菌種 *Porphyromonas crevioricanis* と *Porphyromonas cansulci* についてまず全ゲノム配列を決定 (ドラフト) した。DNA-DNA 相同性試験などの結果から、*P. cansulci* は発表の優先権のある *P. crevioricanis* の異タイプ異名 (heterotypic synonym) であることが明らかとなっており、この結果を支持するように両菌種のゲノム構造は非常に類似していた。

*P. crevioricanis* JCM 15906<sup>T</sup>とJCM 13913 (旧 *P. cansulci*の基準株) 2株間におけるANI値が99.5%、また、in silicoによるDDH値が96.5%と、既報の従来法によるDDHの結果を支持する結果が得られた。さらに未だ全ゲノム配列が解析されていない菌種(*Bacteroides*属16種19株、*Porphyromonas*属5種6株、*Prevotella*属26種26株からなる合計47種51株)を中心に全ゲノム配列を決定(ドラフト)した。*Bacteroides pyogenes* JCM 6294<sup>T</sup>、JCM 6292 (旧*Bacteroides suis*の基準株) および JCM 10003 (旧*Bacteroides tectus*の基準株) についても同様な解析を行ってみると、JCM 6294<sup>T</sup>とJCM 6292の2株間では99.9% (ANI) と100% (in silico) と高値を示し、従来法の結果とよく一致していたが、前述の2株のどちらか1株とJCM 10003株の2株間ではANI値が94.5%と従来法のDDH値70%に相当するANIの閾値95%に近接した数値を示し、また、in silicoによる解析結果では64.7%と亜種レベルと考えられる数値を示した。従来法のDDH値とANI値の関係を論じるには更なるデータの解析が必要であると思われる。

さらに対象とする菌種の範囲を広げ、*Bacteroides* 属およびその類縁細菌群の分類においてMLSAによる分子系統解析を行った。各遺伝子の種間類似度を比較したところ、*dnaJ* 遺伝子が51.7-98.5% (平均65.6%) と最も低い種間類似度を示し、*rpoB* 遺伝子が62.2-99.4% (平均77.9%) と最も高かった。*dnaJ* 遺伝子に次いで、*gyrB* 遺伝子(55.4-99.9% : 平均67.7%)、*hsp60* 遺伝子(56.6-99.6% : 平均72.6%)そして*recA* 遺伝子(60.5-98.2% : 平均72.9%)の順に類似度は低かった。以上の結果より、*Bacteroides* 属およびその類縁細菌群の分類においてもハウスキーピング遺伝子の利用は16S rRNA 遺伝子(77.1-99.2% : 平均85.6%)と比較して有用であることが示された。また、6つの遺伝子を連結した塩基配列を用いてMLSAを行った結果、単一遺伝子の塩基配列から作成された系統樹に比べてブートストラップ値が向上し、種間の近縁関係をより明確にすることができた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Sakamoto, M., Oshima, K., Suda, W., Kitamura, K., Iida, T., Hattori, M. and Ohkuma, M. Draft genome sequences of three strains of *Bacteroides pyogenes* isolated from feline and swine. Genome Announc. 2: e01242-13 (2014) 査読あり  
DOI: 10.1128/genomeA.01242-13  
Kitahara, M., Sakamoto, M., Tsuchida, S., Kawasumi, K., Amao, H., Benno, Y. and

Ohkuma, M. *Parabacteroides chinchillae* sp. nov., isolated from chinchilla (*Chinchilla lanigera*) faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 3470-3474 (2013) 査読あり

DOI: 10.1099/ijs.0.050146-0

Sakamoto, M., Tanaka, N., Shiwa, Y., Yoshikawa, H. and Ohkuma, M. Draft genome sequences of *Porphyromonas crevioricanis* JCM 15906<sup>T</sup> and *Porphyromonas cansulci* JCM 13913<sup>T</sup> isolated from canine oral cavity. Genome Announc. 1: e00483-13 (2013) 査読あり

DOI: 10.1128/genomeA.00483-13

Sakamoto, M. and Ohkuma, M. *Bacteroides reticulotermitis* sp. nov., isolated from the gut of the subterranean termite (*Reticulitermes speratus*). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 691-695 (2013) 査読あり

DOI: 10.1099/ijs.0.040931-0

Sakamoto, M. and Ohkuma, M. *Porphyromonas crevioricanis* is an earlier heterotypic synonym of *Porphyromonas cansulci* and has priority. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 454-457 (2013) 査読あり

DOI: 10.1099/ijs.0.042531-0

Sakamoto, M. and Ohkuma, M. Reclassification of *Xylanibacter oryzae* Ueki *et al.* 2006 as *Prevotella oryzae* comb. nov., with an emended description of the genus *Prevotella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 2637-2643 (2012) 査読あり

DOI: 10.1099/ijs.0.038638-0

Sakamoto, M. and Ohkuma, M. *Bacteroides sartorii* is an earlier heterotypic synonym of *Bacteroides chinchillae* and has priority. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62: 1241-1244 (2012) 査読あり

DOI: 10.1099/ijs.0.035659-0

Sakamoto, M. and Ohkuma, M. Identification and classification of the genus *Bacteroides* by multilocus sequence analysis. Microbiology 157: 3388-3397 (2011) 査読あり

DOI: 10.1099/mic.0.052332-0

[学会発表](計9件)

坂本光央、大熊盛也、多遺伝子座配列解析による嫌気性グラム陰性桿菌の分子系統、日本微生物資源学会第21回大会、2014年9月3日、東京農業大学世田谷キャンパス(東京)

Sakamoto, M. and Ohkuma, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of the genus *Bacteroides* and related taxa by using the *dnaJ*, *gyrB*, *hsp60*, *recA*, *rpoB*, and

16S rRNA genes.14th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2014年7月30日、Montreal (Canada)

Sakamoto, M. and Ohkuma, M. *Porphyromonas crevioricanis* is an earlier heterotypic synonym of *Porphyromonas cansulci* and has priority. The 5th ANRRC International Meeting, 2013年10月31日、湘南国際村センター(葉山)

坂本光央、大熊盛也、*Porphyromonas cansulci* は *Porphyromonas crevioricanis* のシノニムである、日本微生物資源学会第20回大会、2013年6月27日、つくば国際会議場(つくば)

北原真樹、坂本光央、土田さやか、川角浩、天尾弘実、辨野義己、大熊盛也、チンチラの糞便から分離された *Parabacteroides* 属の新種提唱、日本微生物資源学会第19回大会、2012年6月28日、かずさアカデミアホール(木更津)

坂本光央、大熊盛也、キシラン分解性細菌 *Xylanibacter oryzae* の再分類、日本微生物資源学会第19回大会、2012年6月28日、かずさアカデミアホール(木更津)

坂本光央、嫌気性グラム陰性桿菌の系統分類学的研究、公益財団法人発酵研究所第6回助成研究報告会、2012年6月7日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)(招待講演)

Sakamoto, M. Identification and classification of the genus *Bacteroides* by multilocus sequence analysis. 第85回日本細菌学会総会、2012年3月29日、長崎ブリックホールおよび長崎新聞文化ホール(長崎)

Sakamoto, M. and Ohkuma, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of the genus *Bacteroides* by using the *dnaJ*, *gyrB*, *hsp60*, *recA*, *rpoB*, and 16S rRNA genes. 13th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011年9月7日、札幌コンベンションセンター(札幌)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂本 光央 (SAKAMOTO, Mitsuo)  
独立行政法人理化学研究所・バイオリソ  
スセンター・研究員  
研究者番号：50321766

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

大熊 盛也 (OHKUMA, Moriya)  
独立行政法人理化学研究所・バイオリソ  
スセンター・室長  
研究者番号：10270597