



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Phylogenetics of family Enterobacteriaceae and proposal to reclassify *Escherichia hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov.

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2016-10-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 波多, 宏幸 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/55334">http://hdl.handle.net/20.500.12099/55334</a>

氏名（本籍）	波 多 宏 幸（茨城県）		
学位の種類	博 士（再生医科学）		
学位授与番号	乙第 1486 号		
学位授与日付	平成 28 年 6 月 15 日		
学位授与要件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学位論文題目	Phylogenetics of family <i>Enterobacteriaceae</i> and proposal to reclassify <i>Escherichia hermannii</i> and <i>Salmonella subterranea</i> as <i>Atlantibacter hermannii</i> and <i>Atlantibacter subterranea</i> gen. nov., comb. nov.		
審査委員	(主査) 教授 前 川 洋 一 (副査) 教授 清 島 満          教授 出 口 隆		

## 論文内容の要旨

細菌の系統分類はその進化を知る上で極めて重要であるのみならず，臨床医学領域における細菌感染症の制御にも大きく関与する。腸内細菌科には大腸菌，サルモネラ，ペスト菌等の臨床的に重要な菌種が多く，現在 52 属・約 290 種の菌種で構成されている。腸内細菌科の分類は，古くから病原性や生化学性状を基に行われており，さらに 16S rRNA 遺伝子を用いた分類も用いられてきたが，これらの手法では分解能が低く一部の菌種は正しく分類されていないという問題があった。近年，16S rRNA 遺伝子より配列多型が多いハウスキーピング遺伝子を複数用いた Multilocus Sequence Analysis (MLSA) によって，より近縁の菌種を識別することが可能となった。しかし，MLSA では 4 種類程度の少ない遺伝子数で解析を行っており，またその遺伝子を選択した根拠も明確ではないため，妥当性は必ずしも高くない。このことから，妥当性・信頼性のより高い方法を用いて腸内細菌科の分類体系を再構築する必要がある。

本研究では，配列多型が多いことが実証された多数の遺伝子を用いて解析を行うことで腸内細菌科の分類を再検証した。各菌種のドラフトゲノム配列に基づいた新たな遺伝子群による系統解析法を提案し，既法である 16S rRNA 遺伝子による系統解析および MLSA の 2 法と比較することで，その有用性について検証を行った。

### 【対象と方法】

系統解析のための対象遺伝子を選択するに当たり，COG データベースから *Escherichia coli* K-12, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* LT2 及び *Yersinia pestis* CO92 の 3 株に共通して存在するハウスキーピング遺伝子 150 種を選び出し，各菌株間におけるアミノ酸配列の配列置換率を算出した。この結果から，配列多型が多い 10 種の遺伝子を選択した。

腸内細菌科に属する 87 株のドラフトゲノム配列は，公共データベース (NCBI) より入手した。ドラフトゲノム配列が得られていなかった 6 株については，次世代シーケンサーにより配列を決定した後，MiGAP ソフトウェアによりアノテーションを行った。これらのドラフトゲノム配列から，上記で選択した 10 種遺伝子のアミノ酸配列を抽出し，各配列を連結した (C10HKP)。この C10HKP を用いて，各菌株間の配列置換率の算出及び系統解析を MEGA6 ソフトウェアにより実施した。

また，16S rRNA 遺伝子による系統解析，および *atpD*, *gyrB*, *infB*, *rpoB* のハウスキーピング

遺伝子4種を用いた MLSA (4MLSA) による解析を実施した。

上記系統解析で独立したクラスターを形成した *E. hermannii* 及び *S. subterranea* に共通する表現系を確認する目的で、TSI 培地、LIM 培地、シモンズクエン酸培地、VP 培地及び KCN 培地の各種鑑別培地、さらに API 20E、ID32E といったシステムを用いて生化学性状を決定した。

#### 【結果及び考察】

腸内細菌科 93 株間の配列置換率は、16S rRNA 遺伝子では 0.8~6.0%、4MLSA では 0.9~22.1% であったのに対し、C10HKP では 0.9~41.2% と非常に高い置換率であった。加えて、4MLSA と C10HKP の配列置換率間の相関係数は 0.902 であり、高い相関が認められた。系統樹の信頼性を表すブートストラップ値の平均についても、16S rRNA 遺伝子では 49.8%、4MLSA では 77.0% であったのに対し、C10HKP では 89.2% と他法に比べ高い信頼性を持つことが明らかとなった。これらの結果から、C10HKP を用いた腸内細菌科の系統解析は既存の解析方法より有用であることが明らかとなった。

C10HKP による系統解析の結果、*E. hermannii* 及び *S. subterranea* は *Escherichia* 属及び *Salmonella* 属とは異なる、独立したクラスターに属することが判明した。生化学性状を確認した結果、リジン脱炭酸陰性、硫化水素産生陰性、コロニー着色（黄色）及び KCN 試験陽性という点で他の属と識別できる性状を保有していた。これらの結果から、上記 2 菌種は新属に位置付けることが妥当であるとの結論を得た。

#### 【結論】

C10HKP による腸内細菌科の系統解析方法は、既存の方法よりも分解能が高く、各菌種の系統位置も概ね同一であることから、新たな系統解析方法として有用であることが示された。本法による系統解析の結果、*E. hermannii* と *S. subterranea* は *Escherichia* 属及び *Salmonella* 属から独立したクラスターに属し、また生化学性状においてもこれらの属とは異なる特徴を有していることが判明した。この結果から、これら 2 菌種を新属 *Atlantibacter* gen. nov. として独立させることを提案した。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 波多 宏幸 は、腸内細菌科のドラフトゲノム解析に基づいて選択した遺伝子群を用いる新たな系統解析法を考案し、その妥当性と有用性を実証した。また、本法による解析から新属 *Atlantibacter* gen. nov. の設置を含めた腸内細菌科分類体系の見直しを提案した。これらの成果は、細菌学および系統分類学の発展に少なからず寄与するものと認める。

---

#### [主論文公表誌]

Hiroyuki Hata, Tatsuya Natori, Takuya Mizuno, Izumi Kanazawa, Ibrahim Eldesouky, Masahiro Hayashi, Machiko Miyata, Hajime Fukunaga, Shoko Ohji, Akira Hosoyama, Eiji Aono, Atsushi Yamazoe, Keiko Tsuchikane, Nobuyuki Fujita, and Takayuki Ezaki : Phylogenetics of family *Enterobacteriaceae* and proposal to reclassify *Escherichia hermannii* and *Salmonella subterranea* as *Atlantibacter hermannii* and *Atlantibacter subterranea* gen. nov., comb. nov. *Microbiology and Immunology* , doi: 10.1111/1348-0421.12374. (2016).