

氏名(本国籍)	Pattaraporn Yukphan (タイ王国)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博乙第113号
学位授与年月日	平成18年9月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題目	Systematic Study of Acetic Acid Bacteria Isolated in Thailand (タイランドで分離された酢酸菌の系統分類学的研究)
審査委員会	主査 静岡大学 教授 田原 康 孝 副査 岐阜大学 教授 高見澤 一 裕 副査 信州大学 教授 千 菊 夫 副査 静岡大学 助教授 徳 山 真 治

論文の内容の要旨

近年、酢酸菌の多様性に関する研究が、とくに、熱帯地方の分離源を対象に行われる様になった。本研究は2部より構成されている。その第1部は、*Gluconobacter* 属細菌の16S-23S rDNA internal transcribed spacer (ITS) の制限酵素の切断パターンによる同定に関するもので、本法により、*Gluconobacter* 属酢酸菌、第4の新種 *Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) Yukphan et al. 2005 が報告された。第2部は、タイランドにて分離された酢酸菌の分類同定に関するもので、*Asaia* 属酢酸菌、第3の新種 *Asaia krungthepensis* Yukphan et al. 2004、および、*Acetobacteraceae* 科酢酸菌、第9の新属 *Neoasaia* Yukphan et al. 2006、新種 *Neoasaia Chiangmaiensis* Yukphan et al. 2006 が報告された。

第1章 16S-23S rDNA ITS 塩基配列に基づく系統樹は、*Gluconobacter* 属酢酸菌13株につき、3個のクラスターを与え、それぞれ、*G. oxydans*、*G. cerimus*、*G. frateurii* に相当した。総ての供試菌株の16S-23S rDNA ITS 領域の *Bsp*1286I、および、*Mvo*II による切断パターンは、1株を除き、基準株のそれと一致した。しかし、この例外的な菌株は、系統樹において、*G. frateurii* の基準株と同一のクラスターを与えた。これらの結果は、本法が *Gluconobacter* 属酢酸菌の分類同定に使用されうることを示した。

第2章 16S-23S rDNA ITS の *Mbo*II、および、*Bsp*1286I による切断パターンは、供試の *Gluconobacter* 属酢酸菌30株のうち、27株が、Group I、Group III、Group IV、Group VI に分割され、それぞれ、*G. oxydans*、*G. frateurii*、*G. cerimus*、*G. frateurii* と、再同定された。本研究で、Group II、すなわち、*G. cerimus* に再同定されるべき菌株は、見出せなかった。残る Group VII の2株、Group VIII の1株は、それぞれ、独特の切断パターンを与えたことより、新しいタクソンに属すると示唆された。

第3章 先の Group VII に属する2株、NBRC 3250^T、および、NBRC 3273 は、表現型にお

いて、*G. oxydans*、*G. cerinus*、*G. frateurii* の基準株と区別された。本菌株は、DNA-DNA hybridization にて、8-43% なる低い値を、16S rDNA、および、16S-23S rDNA ITS 塩基配列に基づく系統樹では、独立したクラスターを、また、*MboII*、*BsoBI*、*Tsp509I* では、独特の切断パターンを、それぞれ、与えた。これらの結果より、*Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) sp. nov., nom. rev. が提案され、本新種の基準株は NBRC 3250^T とされた。

第4章 バンコクで採取されたヘリコニアの花より、3株の酢酸菌が分離された。16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹では、本菌株は *Asaia* 属に属するが、なお、独立したクラスターを与えた。DNA 塩基組成は 60.2-60.5 mol% G+C、DNA-DNA hybridization では、本菌株が、独立したタクソンを与えることを示した。本菌株の表現型は、*A. bogorensis*、*A. siamensis* の基準株とは、共通していたが、マルトースに生育した。これらの結果より、*Asaia krungthepensis* sp. nov. が提案され、本新種の基準株は、AA08^T (= BCC 12978^T) とされた。

第5章 16S-23S rDNA ITS 塩基配列に基づく系統樹では、3種の *Asaia* 属酢酸菌の基準株は、3個のクラスターを形成した。しかし、タイで分離され、表現型より *Asaia* 属酢酸菌と同定された13株の representative strain は、複雑な clustering を示し、その数は8個であった。16S-23S rDNA ITS 領域の *TaqI*、および、*MvaI* による切断パターンでは、Group I、Group IV、Group VI に属する9株は、*A. bogorensis* に、Group V に属する2株、および、Group III に属する残りの2株は、それぞれ、*A. siamensis*、*A. krungthepensis* と同定された。なお、本研究では、Group II に属する菌株は見出せなかった。

第6章 16S rDNA の *StyI*、*BsaII*、*SnaBI* による切断パターンでは、*Asaia* 属13株の representative strain は、3個のグループを与えた。Group A は、8株を数え、Group B、Group C は、ともに、2株を数えて、*A. bogorensis*、*A. siamensis*、*A. krungthepensis* に、それぞれ、同定された。残る1株は、Group D に属し、*A. bogorensis* に同定された。本研究において、16S rDNA の *StyI*、*BsaII*、*SnaBI* による切断実験は、同様に、*Asaia* 属酢酸菌の分類同定に利用されうことを示した。

第7章 分離株 AC28^T とされる菌株を、チェンマイで採取した red ginger の花より分離した。16S rDNA 塩基配列に基づく系統樹では、本分離株は、*Kozakia baliensis* の基準株とクラスターを形成した。しかし、16S-23S rDNA ITS 塩基配列に基づく系統樹では、独立したクラスターを与えた。16S rDNA の制限酵素による切断実験では、本分離株が、*K. baliensis*、および、3種の *Asaia* 属酢酸菌の基準株とは、別個の切断パターンを与えた。とくに、本分離株は、*Kozakia* 属、および、*Asaia* 属酢酸菌とは、表現型で、分別された。これらの結果より、*Neosasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov. が提案された。基準株は、分離株 AC28^T (= BCC 15763^T) とされた。

第8章 16S rDNA、16S-23S rDNA、23S rDNA、16S rDNA/16S-23S rDNA ITS/23S rDNA、23S rDNA D1/D2、23S rDNA down-stream sequences に基づく6種の系統樹では、*Asaia* 属酢酸菌の基準株は、常に、1つのクラスターを形成したが、*Swaminathania* 属酢酸菌の唯一の種である *Swaminathania salitolerans* の基準株は、その *Asaia* 属クラスターの外にあった。しかし、23S rDNA、および、23S rDNA down-stream 塩基配列では、本基準株は、*Asaia* 属クラスターの内に取り込まれた。一方、*K. baliensis*、および、*N. chiangmaiensis* の基準株は、*Asaia* 属酢酸菌の基準株とは、常に、遠い存在であった。これらの結果は、*Swaminathania* 属と *Asaia* 属とが、系統的に congeneric であることを示すものである。

審 査 結 果 の 要 旨

近年、酢酸菌の多様性に関する研究が、とくに、熱帯地方の分離源を対象にして行われる様になった。本研究は、タイランドにて分離された酢酸菌を扱ったものであり、2部より構成され、得られた結果は次の様である。

1) 16S-23S rDNA ITS 塩基配列に基づく系統樹は、*Gluconobacter* 属酢酸菌13株につき、3個のクラスターを与え、それぞれ、*G. oxydans*、*G. cerinus*、*G. frateurii*に相当した。総ての供試菌株の16S-23S rDNA ITS領域の *Bsp1286I*、および、*Mvll*による切断パターンは、1株を除き、基準株のそれと一致した。しかし、この例外的な菌株は、系統樹において、*G. frateurii*の基準株と同一のクラスターを与えた。これらの結果は、本法が*Gluconobacter*属酢酸菌の分類同定に使用されうることを示した。

2) 16S-23S rDNA ITSの *MbolI*と *Bsp1286I*による切断パターンは、供試の *Gluconobacter* 属酢酸菌30株のうち、27株が、Group I、Group III、Group IV、Group VIに分割され、それぞれ、*G. oxydans*、*G. frateurii*、*G. cerinus*、*G. frateurii*と、再同定された。本研究で、Group II、すなわち、*G. cerinus*に再同定されるべき菌株は、見出せなかった。残るGroup VIIの2株、Group VIIIの1株は、それぞれ、独特の切断パターンを与えたことより、新しいタクソンに属すると示唆された。

3) Group VIIに属する2株、NBRC 3250T、および、NBRC 3273は、表現型において、*G. oxydans*、*G. cerinus*、*G. frateurii*の基準株と区別された。本菌株は、DNA-DNA hybridizationにて、8-43%なる低い値を、16SrDNA、および、16S-23S rDNA ITS塩基配列に基づく系統樹では、独立したクラスターを、また、*MbolI*、*BsoBI*、*Tsp509I*では、独特の切断パターンを、それぞれ、与えた。これらの結果より、*Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) sp. nov., nom. rev. が提案され、本新種の基準株はNBRC 3250Tとされた。

4) バンコクで採取されたヘリコニアの花より、3株の酢酸菌が分離された。16SrDNA塩基配列に基づく系統樹では、本菌株は *Asaia* 属に属するが、なお、独立したクラスターを与えた。DNA塩基組成は60.2-60.5 mol% G+C、DNA-DNA hybridizationでは、本菌株が、独立したタクソンを与えることを示した。本菌株の表現型は、*A. bogoensis*、*A. siamensis*の基準株とは、共通していたが、マルトースに生育した。これらの結果より、*Asaia krungthepensis* sp. nov. が提案され、本新種の基準株は、AA08T (= BCC 12978T)とされた。

5) 6S-23S rDNA ITS塩基配列に基づく系統樹では、3種の *Asaia* 属酢酸菌の基準株は、3個のクラスターを形成した。しかし、タイで分離され、表現型より *Asaia* 属酢酸菌と同定された13株の representative strainは、複雑なclusteringを示し、その数は8個であった。16S-23S rDNA ITS領域の *TaqI*、および、*Mval*による切断パターンでは、Group I、Group IV、Group VIに属する9株は、*A. bogorensis*に、Group Vに属する2株、および、Group IIIに属する残りの2株は、それぞれ、*A. siamensis*、*A. krungthepensis*と同定された。なお、本研究では、Group IIに属する菌株は見出せなかった。

6) 16S rDNA の *StyI*、*BsaII*、*SnaBI*による切断パターンでは、*Asaia*属13株の representative strainは、3個のグループを与えた。Group Aは、8株を数え、Group B、Group Cは、ともに、2株を数えて、*A. bogorensis*、*A. siamensis*、*A. krungthepensis*に、それぞれ、同定された。残る1株は、Group Dに属し、*A. bogorensis*に同定された。本研究において、16S rDNA の *StyI*、*BsaII*、*SnaBI*による切断実験は、同様に、*Asaia*属酢酸菌の分類同定に利用されうることを示した。

7) 分離株AC28Tとされる菌株を、チェンマイで採取した red ginger の花より分離した。16S rDNA塩基配列に基づく系統樹では、本分離株は、*Kozakia baliensis*の基準株とクラスターを形成した。しかし、16S-23S rDNA ITS塩基配列に基づく系統樹では、独立したクラスターを与えた。16S rDNA の制限酵素による切断実験

では、本分離株が、*K. baliensis*、および、3種の*Asaia*属酢酸菌の基準株とは、別個の切断パターンを与えた。とくに、本分離株は、*Kozakia*属、および、*Asaia*属酢酸菌とは、表現型で、分別された。これらの結果より、*Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov. が提案された。基準株は、分離株 AC28T (= BCC 15763T)とされた。

8) 16S rDNA、16S-23S rDNA、23S rDNA、16S rDNA/16S-23SrDNA ITS/23S rDNA、23S rDNA D1/D2、23S rDNA down-stream sequencesに基づく6種の系統樹では、*Asaia*属酢酸菌の基準株は、常に、1つのクラスターを形成したが、*Swaminathania*属酢酸菌の唯一の種である*Swaminathania salitolerans*の基準株は、その*Asaia*属クラスターの外にあった。しかし、23S rDNA、および、23S rDNA down-stream塩基配列では、本基準株は、*Asaia*属クラスターの内に取り込まれた。一方、*K. baliensis*、および、*N. chiangmaiensis*の基準株は、*Asaia*属酢酸菌の基準株とは、常に、遠い存在であった。これらの結果は、*Swaminathania*属と*Asaia*属とが、系統的にcongenericであることを示すものである。

このように本論文の内容は、酢酸菌分類学の研究に新しい知見を与えるものであり、酢酸菌の基礎研究の発展に貢献するものと評価された。本審査委員会は、論文の構成、内容ならびに下記に示す学位論文の基礎となる学術論文および既発表学術論文等について慎重に審議し、審査委員の全員一致をもって本論文が博士の学位を授与されるに値すると判定した。

<学位論文の基礎となる学術論文>

1) Yukphan, P., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. and Yamada, Y.: *Asaia krungthepensis* sp. nov., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 313-316 (2004).

2) Yukphan, P., Potacharoen, W., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y.: Identification of strains assigned to the genus *Gluconobacter* Asai 1935 based on the sequence and the restriction analyses of the 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50, 9-15 (2004).

3) Yukphan, P., Malimas, T., Takahashi, M., Potacharoen, W., Busabun, T., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y.: Re-identification of *Gluconobacter* strains based on restriction analysis of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50, 189-195 (2004).

<既発表学術論文>

4) Yukphan, P., Takahashi, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y.: *Gluconobacter albidus* (ex Kondo and Ameyama 1958) sp. nov., nom rev., an acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50, 235-242 (2004).

5) Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. and Yamada, Y.: *Neoasaia chiangmaiensis* gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant acetic acid bacterium in the α -Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 51, 301-311 (2005).

6) Yukphan, P., Malimas, T., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Tanticharoen, M. and Yamada, Y.: Identification of strains assigned to the genus *Asaia* Yamada et al. 2000 based on restriction analysis of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 52, 55-62 (2006).

7) Malimas, T., Yukphan, P., Takahashi, M., Potacharoen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Tanticharoen, M. and Yamada, Y.: Heterogeneity of strains assigned to *Gluconobacter frateurii* Mason and Claus 1989 based on restriction analysis of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 684-690 (2006).