

日本海溝より分離した新種の *Flavobacterium* 属 細菌の分類学的研究

能木 裕一^{*1} 中瀬 崇^{*1} 掘越 弘毅^{*1}

深海から分離される菌は陸上や海表面の菌とは異なった性質を持つ物が多い。しかし、その分類学的研究は十分にされていない。深海からよく分離される *Flavobacterium-Cytophaga* complex と呼ばれる一群はグラム陰性の桿菌、DNA の GC 含量が低く、メナキノンを持つ共通性で集められているが、属として明確に分類されていない。海洋由来の株を独立した属として再分類するためには、既知種だけでなく、新種も検討する必要がある。今回、日本海溝よりグラム陰性桿菌で MK-6 を持つ15株を分離した。これらの株の GC 含量、生理試験、資化性試験、脂肪酸分析、DNA の相同性の詳細な分類学的検討を行った。その結果、15株は4種に分類することができた。これらは、既知種との詳細な比較検討の結果、すべて *Flavobacterium* 属に属する新種であることが判明した。

キーワード : *Flavobacterium*, 海洋性細菌

Taxonomic studies about new species of the genus *Flavobacterium* isolated from Japan Trench

Yuichi NOGI^{*2} Takashi NAKASE^{*2}
Koki HORIKOSHI^{*2}

We have isolated and characterized a number of microorganisms from samples of deep-sea mud. The taxonomy of these organisms placed in the genera *Flavobacterium*, *Cytophaga* and related genera. Progress, which results from chemotaxonomic studies, nucleic acid hybridization studies, and 16S rRNA studies, has been made toward an understanding of the taxonomic relationship among these organisms. However, the taxonomic status of these genera is still unsatisfactory. In order to reclassify as the genus *Flavobacterium*, which separated the strain of the marine isolates, it is necessary to examine a comparison between isolated strain and type species.

The 15 strains of orange or yellow-pigmented bacteria were isolated from the Japan Trench. Several strains of these pigmented bacteria have been characterized phenotypically. These strains were gram negative, nonmotile and their DNA GC contents ranged from 30 to 40 mol%. These results suggested that they were considered probable members of the genus *Flavobacterium*. Phospholipid ester-linked fatty acid profiles of the isolate revealed high levels of branched-chain fatty acids and also the presence of branched-chain hydroxy fatty

* 1 深海環境プログラム

* 2 The DEEPSTAR Group

acids. The isolated deep-sea strains were classified into 4 groups of new species of the genus *Flavobacterium*.

Key Words : *Flavobacterium*, Marine bacteria

1 はじめに

深海には、好圧菌、好熱菌、好冷菌など種々の細菌が生育している^{1),2)}。このような深海から分離される菌は陸上や海表面から分離される菌とは異なった性質を持つ物が多く見つけられている。そして、これらの遺伝子や酵素生産などに関して興味深い研究がなされてきた^{3),4)}。しかし、これらの菌に関して分類学的研究は十分にはなされていない。深海から分離された菌の分類に関する研究はまだ多くないため、属として明確に定義されていない属に分類される菌や、今までに報告されていない新種なども多く分離されている。

深海から比較的良く分離される菌として*Flavobacterium*属、*Cytophaga*属に分類される菌がある⁵⁾⁻⁸⁾。しかし、これらの属は陸上から分離された物も含めて、明確な定義がなされておらず、数種類の属に分けられるべき種が混在している。この*Flavobacterium*-*Cytophaga* complexと呼ばれる一群⁹⁾⁻¹²⁾はグラム染色陰性の桿菌、DNAのGC含量が低く、イソプレノイドキノンとしてメナキノンを持つ共通性で集められている。これらをそれぞれ明確に定義された独立した属に再分類する必要がある。

この種の中で海洋由来の物が比較的共通性を持っている。これを独立した属にするためには既知種のこの一群に入る株を比較するだけでは不十分で、新たにこの一群に入る菌を見つけ検討をする必要がある。今回、この特徴を持つ菌を日本海溝より数種分離した。これらの菌に詳細な分類学的検討を行った結果、今までに報告されていない新種であったのでここに報告する。

2 実験方法

2.1 試料

「しんかい6500」でのDive272~277の岩手県宮古沖の日本海溝、深度4,500mの3地点と、6,000~6,500mの6地点から採取した深海底泥。

基準株(Type strain)はJapan Collection of Microorganism(JCM)(理化学研究所), American Type Culture Collection(ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSM), Institute of Applied Microbiology(IAM)(東京大学)から取

り寄せた以下の株を比較検討に用いた。*Cytophaga latercula*(JCM 8515), *Cytophaga lytica*(JCM 8516), *Cytophaga marina*(JCM 8137), *Cytophaga marinoflava*(JCM 8517), *Cytophaga uliginosa*(ATCC 14397), *Flavobacterium aquatile*(IAM 12316), *Flavobacterium johnsonae*(JCM 8514), *Flavobacterium pectinovorum*(JCM 8518), *Flavobacterium psychrophilum*(JCM 8519), *Flavobacterium gondwanense*(DSM 5423), *Flavobacterium salegens*(DSM 5424)

2.2 培地・培養条件

分離用培地としては、Difco社のMarin agar 2216を用いた寒天プレートに、滅菌人工海水で2倍に希釈した泥を100ml塗布し、20℃で3日間培養を行った。比較するための基準株の培養もMarin agar 2216培地を用いて各至適温度で培養を行った。糖の資化性に用いる培地や生理試験に用いる培地などは総て人工海水により調製したが、それ以外の点に関しては常法¹²⁾⁻¹⁵⁾に従って行った。

2.3 キノン分析

凍結乾燥した菌体300mgからクロロホルム-メタノールで菌体成分を抽出し、薄層クロマトグラフィー(TLC)で展開し、メナキノン、ユビキノンの画分を分離した。メナキノン部分を分離後抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で定性的に分析^{14),16)}を行った。

2.4 DNAのGC含量とハイブリダイゼーション

DNAの精製はSaito & Miura¹⁷⁾の方法で調製を行った。DNAのGC含量はP1ヌクレアーゼとアルカリフォスファターゼを使ってヌクレオシドにしてからHPLCで定量分析¹⁴⁾を行った。分離株間のDNA-DNAハイブリダイゼーション、分離株とType strainのDNA-DNAハイブリダイゼーションはホトビオチン標識DNAを使った、蛍光マイクロプレート法¹⁸⁾で行った。

2.5 菌体脂肪酸の分析

凍結乾燥した菌体20mgを無水塩酸・メタノールで100℃、3時間処理を行い、脂肪酸メチルエステルとした。

これをヘキサンに抽出後蒸留水で洗浄，脱水，濃縮した¹⁶⁾。サンプルの分析はガスクロマトグラフィー・マススペクトロメトリー(GC/MS)で成分組成比と構造の解析¹⁹⁾を行った。

3 結果及び考察

3.1 菌株の分離

プレート上に生育したコロニーから異なると思われる物を拾い，44菌株を分離した。これらをグラム染色を行い，顕微鏡観察を行った。その結果，すべて桿菌でグラム染色陰性は31株，グラム染色陽性の菌は13株であった。次に，グラム染色陰性桿菌に付いてキノン分析を行った。TLC分析の結果，メナキノンを持つ株15株，ユビキノンを持つ株16株，両方を持つ株は分離株の内には無かった。メナキノンをHPLCで定性分析を行った結果，すべてMK-6であった。これらメナキノンを持つ株はすべての株が運動性が無く，すべて黄色からオレンジ色のコロニーを作った。このグラム陰性桿菌でMK-6を持ち，運動性が無く，後で述べるDNAのGC含量が低いことなどから15菌株はすべて，*Flavobacterium-Cytophaga* complexに含まれると考えられた。これらについて詳細な検討を行った。(表1参照)

3.2 分離株の生理・生化学試験

分離株を形態，コロニーの色，DNAのGC含量と以下の試験によりグループ分けした。カタラーゼ，オキシダーゼ，インドール生産，硝酸塩の還元，亜硝酸の還元，ONPG生産，メチルレッド(MR)試験，アセチルメチルカルビノールの生産(VP)試験，H₂S生産，ウレアーゼ生産，各温度における生育の試験を行った。

これらの試験からグループ分けすると，グループ1と4はコロニーの色が黄橙，グループ2はオレンジ，グループ3は黄色。グループ1，2はカタラーゼ陽性だが，グループ3，4は陰性。オキシダーゼはすべての株が生産する。硝酸塩の還元はグループ1の272-25だけが行い，亜硝酸塩の還元はグループ1の272-11とグループ4の272-17だけが行う。ONPGは，グループ1，2が陽性で，グループ3，4が陰性であった。MR反応はグループ2だけが陽性であった。(表2参照)

これらの試験結果などから各グループと近縁と思われるMK-6で海洋から分離された*Flavobacterium-Cytophaga* complexの代表的なType strainと比較した。

*Flavobacterium aquatile*は海洋由来ではないがMK-6で*Flavobacterium*の基準株なので，ここでは比較の

ために入れた。*Cytophaga*の基準株である*C. hutchinsonii*はMK-7なので検討に加えなかった。これらの種のType strainでは，グループ1の株以外では特に近縁と思われる種は無かった。以下に各グループの大まかな特徴を述べる。

(1) 各グループの特徴と既知種との比較

- ① グループ1：黄橙のコロニーでGC含量約32%，カタラーゼ陽性，硝酸塩と亜硝酸塩の還元についてはそれぞれ異なるが，ONPG陽性，42℃では生育できない，4℃で1週間以内に生育する2株。DNAのGC含量，カタラーゼ，H₂S生産しないことなどからType strainの*C. marina*，*C. marinoflava*，*F. aquatile*の3種に比較的近い性質を示した。
- ② グループ2：オレンジのコロニーでGC含量約42%，カタラーゼ陽性，ONPG陽性，MR反応陽性，42℃で生育でき，4℃での生育に1週間以上かかる2株。DNAのGC含量，MR反応陽性，42℃で生育できることなどからType strainで近縁と思われる株は無かった。
- ③ グループ3：黄色のコロニーでGC含量約41～42%，カタラーゼ陰性，42℃での生育では3株が生育し，4℃で1週間以内に生育する2株など計9株。DNAのGC含量，カタラーゼ陰性などからType strainで近縁と思われる株は無かった。
- ④ グループ4：黄橙色のコロニーでGC含量約42%，カタラーゼ陰性，亜硝酸の還元では異なる，42℃では生育せず，4℃での生育に1週間以上かかる2株。DNAのGC含量，カタラーゼ陰性などからType strainで近縁と思われる株は無かった。

各グループ内の相同性と他のグループとの明確な違いは次に示す，DNA-DNAハイブリダイゼーションで四つのグループに分けることが出来た。

表1 菌株の分離源

Table 1 Source of isolate.

岩手県宮古沖日本海溝 (40° 06' N, 144° 11' E)				
サンプル No.	深度 m	分離菌株数	MK-6株	菌株名
1	6370	9	4	272-11, 272-14 272-15, 272-16
2	6367	8	3	272-17, 272-18, 272-19
3	6455	8	3	272-22, 272-23, 272-25
4	6379	5	1	273-13
5	6372	6	2	273-21, 273-22
6	6048	2	0	
7	4505	2	0	
8	4418	3	2	274-31, 274-32
9	4485	1	0	
総数		44	15	

表2 分離株と基準株の基本性状

Table 2 Phenotypic characteristics and conventional biochemical reactions for isolates, *Cytophaga* and *Flavobacterium*.

Strain	Length x Width (μm)	Color	Catalase	Oxidase	Indole	硝酸塩還元	亜硝酸塩還元	ONPG	MR	VP	H ₂ S	Urease	42°C	37°C	4°C (1 week)	4°C (3 week)
1 272-11	3-4 x 0.4	yellow-orange	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
272-25	2-4 x 0.4	yellow-orange	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+
2 272-14	2-4 x 0.5	orange	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
272-18	1.5-3 x 0.5	orange	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
3 272-15	3-5 x 0.5	yellow	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
272-19	2-4 x 0.5	yellow	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
272-22	2-4 x 0.5	yellow	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
272-23	2-4 x 0.5	yellow	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
273-13	1.5-2.5 x 0.6	yellow	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
273-21	2-4 x 0.6	yellow	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
273-22	2-3 x 0.6	yellow	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
274-31	2-3 x 0.6	yellow	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
274-32	2-4 x 0.6	yellow	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
4 272-16	2-3 x 0.4	yellow-orange	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
272-17	2-3 x 0.5	yellow-orange	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>C. alutera</i> JCM8515 ^T	1-5 x 0.4	orange-red	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>C. lytica</i> JCM8516 ^T	1.5-3.5 x 0.4	bright-yellow	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>C. marina</i> JCM8137 ^T	2-5 x 0.4	yellow-orange	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>C. marinoflava</i> JCM8517 ^T	1-3 x 0.5	yellow	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>C. uliginosa</i> ATCC14397 ^T	1-4 x 0.4	Golden-yellow	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>F. aquatile</i> IAM12316 ^T	2-6 x 0.6	yellow	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>F. gondwanense</i> DSM5423 ^T	2-4 x 0.5	orange	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>F. salegens</i> DSM5424 ^T	2-4 x 0.6	yellow	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

a) *C* : *Cytophaga*, b) *F* : *Flavobacterium*, * T : Type strain
 + : Positive, - : Negative

3.3 DNA-DNAハイブリダイゼーション

この分離株のグルーピングを確認するために、まず分離株間のDNA-DNAハイブリダイゼーションをフォトビオチンを使った蛍光マイクロプレート法で行った。ハイブリダイゼーションは反応液中のホルムアミドの濃度を40%にし、反応温度を40℃で3時間行った。その結果、分離株のグループ内では80%以上の高い相同性を示し、他のグループとは40%以下の低い相同性しか示さないことから、このグルーピングが正しいことがDNAホモロジーでも確認された。そして各グループの代表株は、グループ1は272-11、グループ2は272-18、グループ3は273-22、グループ4は272-17として、Type strainとのハイブリダイゼーションを行った。その結果、グループ3と*C. uliginosa*が比較的高い値を示したが、60%以下なので同一種と考えるには相同値が低すぎることから別種とした。(表3参照)

3.4 糖など基質の資化性

すべての株が、糖から酸を生成したのはセロビオース、グルコース、マルトースで、基質ではゼラチンとデンプンを資化した。グループ3の1株を除いてラクトースと

トレハロースから酸を生成した。グループ4の2株では糖から酸の生成に関してかなり異なった結果になった。アラビノースとラフィノース、サリシンではグループ1と2は酸の生成をするがグループ3はしない。グループ1と2はシュウクロースとキシロースから酸を生成するが、グループ3ではどちらか片方から酸を生成する株か両方とも酸を生成しない株の三つに分かれた。

グループ1と2はエスクリンを加水分解するが、海洋由来の*Flavobacterium*属、*Cytophaga*属に多く見られる寒天やCMCの加水分解能はなかった。(表4参照)

3.5 分離株の菌体脂肪酸

分離株の菌体脂肪酸を定法により抽出し、ガスマス分析を行いその組成比を比べた。すべての株で*i*-15:0 (13-メチルテトラデカン酸)と3 OH (3 ハイドロキシ) 脂肪酸を多量に含むという*Flavobacterium-Cytophaga* complexの特徴を良く表している。グループ1, 2, 4ではグループ内でよくまとまっているが、グループ3では、274-31, 274-32の2株がグループ内の他の株とかなり異なっている。他の7株が、*i*-15:0が全体の30%をしめるのに対し、2株は15%を占めるにとどまっている。

表3 GC含量とDNA-DNAハイブリダイゼーション

Table 3 G+C contents of DNAs and levels of DNA-DNA hybridization among isolate, *Cytophaga* and *Flavobacterium*.

Strain	GC%	% Reassociation with labeled DNA from:			
		272-11	272-18	273-22	272-17
272-11	32.3	100	7	3	4
272-25	32.1	80	5	3	4
272-14	42.1	3	97	6	7
272-18	41.9	4	100	6	11
272-15	41.9	3	6	96	30
272-19	41.4	4	12	97	39
272-22	41.5	4	11	92	34
272-23	41.5	4	13	102	37
273-13	41.4	4	12	96	36
273-21	41.3	4	11	97	35
273-22	41.2	4	13	100	35
274-31	41.1	3	10	92	30
274-32	41.1	4	14	90	33
272-16	41.5	2	11	32	83
272-17	42.5	2	12	28	100
<i>C. latercula</i> JCM 8515 ^T	32.2	3	3	2	6
<i>C. lytica</i> JCM 8516 ^T	32.8	5	5	3	4
<i>C. marina</i> JCM 8137 ^T	32.4	4	3	4	7
<i>C. marinoflava</i> JCM 8517 ^T	32.3	5	6	3	3
<i>C. uliginosa</i> ATCC14397 ^T	42.2	2	5	45	3
<i>F. aquatile</i> IAM 12316 ^T	32.9	4	4	4	4
<i>F. gondwanense</i> DSM5423 ^T	38.5	4	5	6	5
<i>F. salegens</i> DSM5424 ^T	40.2	4	16	10	10

a) *C* : *Cytophaga* , b) *F* : *Flavobacterium* , * T : Type strain

表4 糖及び基質の資化性

Table 4 Differential characteristics of isolate, *Cytophaga* and *Flavobacterium*.

Strain	Acid production from:												Decomposition of:					
	L-Arabinose	Cellobiose	D-Glucose	Lactose	Maltose	Mannitol	Raffinose	Salicin	Sucrose	Sorbitol	Trehalose	D-Xylose	Agar	Chitin	CMC	Esculin	Gelatin	Starch
272-11	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
272-25	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+
272-14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
272-18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
272-15	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
272-19	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
273-21	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
273-22	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
274-32	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+
272-22	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
272-23	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
273-13	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
274-31	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
272-16	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
272-17	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. ʎ. latercula</i> JCM8515 ^T	-	-	-	-	+	-	-	-	w	-	-	+	w	-	+	-	+	+
<i>C. lytica</i> JCM8516 ^T	-	-	+	+	+	-	w	-	w	w	+	+	+	-	+	-	+	+
<i>C. marina</i> JCM8137 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>C. marinoflava</i> JCM8517 ^T	-	-	+	+	+	-	w	-	w	w	+	+	w	-	+	+	+	w
<i>C. uliginosa</i> ATCC14397 ^T	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	w	-	-	+	+
<i>F. ʎ. aquatile</i> IAM12316 ^T	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. gondwanense</i> DSM5423 ^T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>F. salegens</i> DSM5424 ^T	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+

a) *C* : *Cytophaga* , b) *F* : *Flavobacterium* , * T : Type strain

+ : Positive, - : Negative, w : weak

表5 脂肪酸組成

Table 5 Fatty acid compositions of isolate, *Cytophaga* and *Flavobacterium*.

	% of total fatty acids in:																					
	n-15:0	n-15:1	n-16:0	n-16:1	n-17:1	i-14:0	i-15:0	i-15:1	i-16:0	i-16:1	i-17:1	a-15:0	a-17:1	2OH-i-15:0	3OH-i-14:0	3OH-i-15:0	3OH-i-16:1	3OH-15:0	3OH-15:1	3OH-16:0	3OH-16:1	other
272-11	5	1	7				11	11	2		12	3		5		5	17		1	3	1	15
272-25	5	1	6				16	12	2		16	4		5		5	18			2		8
272-14	4		6	2		27		8	1	14	7	1		5		3	13	1			2	6
272-18	4		5	2		28		6	1	13	9	1		8		3	11	1			2	5
272-15	3	6	7	1		31	9	8	1	12	8						2					12
272-19			2	5		31	8	1		17	15	2				2	7	1			4	5
272-22	2	3	6	2		31	9	2		19	9	1				3	9				1	4
272-23	1		3	5		30	7	3		17	16	2				2	7	1			3	3
273-13	2		4	3		33	10	1		16	13	1				2	8				2	4
273-21	2		4	3		35	10	2		22	9	1				2	8					2
273-22	2		3	5		28	9	5	1	18	11	1				2	9	1			2	4
274-31	5	1	15	1	1	16	7	22	6	6	6					1	3		4		1	4
274-32	4		11	1	2	14	5	28	7	6	7					1	5		7		1	2
272-16	7		3	3		23	12	5		18	8					3	8				1	9
272-17	2		3	5		20	9	4		18	16	1				2	8	2			5	6
<i>C. latercula</i> ^T	5	2	5	2		19	12	3		8		2			3	6	21			2		9
<i>C. lytica</i> ^T	9	2	9	8	1	20	13	2		2	3				1	10	11			2		7
<i>C. marina</i> ^T	2	3	17	2	1	22	19			1	4	1			2	9	4			2		10
<i>C. marinoflava</i> ^T	9	4	8	10	1	14	15			3	2				1	13	7			1		12
<i>F. aquatile</i> ^T	14	4	2	7		23	7	2		2	7	2				12	7			3		8
<i>F. johnsonae</i> ^T	5	2	14	3	1	29	9	2		3	1	3			2	10	10			4		2
<i>F. pectinovora</i> ^T	4	6	6	3		26	12	1		8	1	6				11	11					6
<i>F. psychrophila</i> ^T	3	4	1			23	24			17	2	1				9	8					6

a) *C* : *Cytophaga* , b) *F* : *Flavobacterium* , * T : Type strain

逆にこの2株はi-16:0を多く含む特徴があり、組成比が大きく異なり、しかも糖から酸を生成するパターンも若干異なっているが、DNAハイブリダイゼーションでは90%以上の相同性を示しているので同一グループとした。今回、日本海溝から分離した株は、全体的に、i-17:1 (16メチルヘキサデセンサン) を多く含んでいる傾向がある。全体の脂肪酸組成比をType strainと比べてみても似通った株はない。強いてあげれば、*F. psychrophilum* と似た傾向はあるがこの菌は淡水から分離された株で塩濃度の高い培地では生育できないのでまるっきり違った種である。(表5参照)

以上の結果をまとめると、DNAのGC含量、形態、コロニーの色、生理試験、糖などの資化性、DNA-DNAハイブリダイゼーション、脂肪酸組成、といったデータすべてを比べた。今回、日本海溝より分離したMK-6を持つグラム陰性桿菌は*Flavobacterium-Cytophaga* complexと呼ばれる一群の属に属する菌であることが確認された。しかし、種々の実験結果を比べると既知種のType strainと今回分離した株の中に一致する種は無かった。これらのことから、この分離株は少なくとも4グループに分けられ、それぞれが新種と考えられた。

4 おわりに

現在のデータから予想される属は*Flavobacterium*属に属する可能性が一番大きい、最終的な新種としての確認は、16S rRNAシーケンスのデータから系統学的位置を確認し、それにより入る属を決め、新種で有れば新種として命名する予定である。また今回、日本海溝から分離した株以外にも日本近海の深海から分離した*Flavobacterium*属に属する新種を数株分離しているので、それらとの比較を行う予定である。そして、これらの株とすでに報告されている海洋由来の*Flavobacterium*属のType strainを含め、独立した新属と成る可能性を検討する予定です。

最後に本研究を行うに当たり、日本海溝での底泥の採取などを行っていただいた、「しんかい6500」潜航チーム及び「よこすか」乗船員の各位に感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) Hamamoto, T. and K. Horikoshi : Deep-sea microbiology research within the Deepstar program. J. of Marine Biotechnology, **1**, 119-124. (1993)

- 2) Kato, C., A. Inoue and K. Horikoshi: Isolating and characterizing deep-sea marine microorganisms. Elsevier Trends J., **14**, 6-12. (1996)
- 3) Kato, C., T. Sato and K. Horikoshi : Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples. Biodiversity and Conservation, **4**, 1-9. (1995)
- 4) Kato, C., M. Smorawska, T. Sato and K. Horikoshi : Analysis of a Pressure-regulated Operon from the Barophilic Bacterium Strain DB6705. Biosci. Biotech. Biochem., **60**(1), 166-168. (1996)
- 5) Wakabayashi, H., M. Hikida and K. Masumura : *Flexibacter maritimus* sp. nov., a Pathogen of Marine Fishes. Int. J. Syst. Bacteriology, **36**(3), 396-398. (1986)
- 6) Dobson, S. J., R. R. Colwell, T. A. McMeekin and P. D. Franzmann : Direct Sequencing of the Polymerase Chain Reaction-Amplified 16S rRNA Gene of *Flavobacterium gondwanense* sp. nov. and *Flavobacterium salegens* sp. nov., Two New Species from a Hypersaline Antarctic Lake. Int. J. Syst. Bacteriology, **43**(1), 77-83. (1993)
- 7) Nakagawa, Y. and K. Yamasato : Phylogenetic diversity of the genus *Cytophaga* revealed by 16S rRNA sequencing and menaquinone analysis. J. General Microbiology, **139**, 1155-1161. (1993)
- 8) Hanzawa, N., S. Kanai, A. Katsuta, Y. Nakagawa and K. Yamasato : 16S rDNA-based phylogenetic analysis of marine flavobacteria. J. Mar. Biotechnol., **3**, 111-114. (1995)
- 9) Paster, B. J., W. Ludwig, W. G. Weisburg, E. Stackebrandt, R. B. Hespell, C. M. Hahn, H. Reichenbach, K. O. Stetter and C. R. Woese : A Phylogenetic Grouping of the *Bacteroides*, *Cytophagas*, and Certain *Flavobacteria*. Syst. Appl. Microbiology, **6**, 34-42. (1985)
- 10) Nakagawa, Y. and K. Yamasato : Emendation of the Genus *Cytophaga* and Transfer of *Cytophaga agarovorans* and *Cytophaga salmonicolor* to *Marinilabilia* gen. nov. : Phylogenetic Analysis of the *Flavobacterium-Cytophaga* Complex. Int. J. Syst. Bacteriology, **46**(2), 599-603. (1996)

- 11) Bernardet, J. F., P. Segers, M. Vancanneyt, F. Berthe, K. Kersters and P. Vandamme : Cutting a Gordian Knot: Emended Classification and Description of the Genus *Flavobacterium*, Emended Description of the Family *Flavobacteriaceae*, and Proposal of *Flavobacterium hydatis* nom. nov. (Basonym, *Cytophaga aquatilis* Strohl and Tait 1978). *Int. J. Syst. Bacteriol*, **46**(1), 128-148. (1996)
- 12) Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Ninth Edition. Williams & Wilkins, Maryland, 787pp. (1994)
- 13) 門田 元・多賀信夫 : 海洋微生物研究法. 学会出版センター, 東京, 307pp. (1985)
- 14) 日本細菌学会教育委員会編 : 細菌学技術叢書 8 . 新しい分類学に伴走する細菌同定法. 菜根出版, 東京, 144pp. (1987)
- 15) 坂崎利一 : Cowan and Steel's 医学細菌の同定の手びき 第3版. 近代出版, 東京, 386pp. (1993)
- 16) Komagata, K. and K. Suzuki : Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology*, **19**, 161-207. (1987)
- 17) Saito, H. and K. Miura : Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta*, **72**, 619-629. (1963)
- 18) 日本放線菌学会編 : 放線菌学技術叢書2 . DNA 相同性試験 マイクロプレートハイブリダイゼーション法. 日本放線菌学会, 東京, 24pp. (1992)
- 19) Goodfellow, M. and A. G. O'donnell : *Handbook of New Bacterial Systematics*. Academic press, London, 560pp. (1993)

(原稿受理 : 1996年12月20日)