Mini Review

グラム陽性細菌の系統関係からみた形態および化学分類学的 性状の分類指標としての意義

Taxonomic significance of morphological and chemotaxonomic characteristics and phylogeny in Gram-positive bacteria

横 田 明

AKIRA YOKOTA

東京大学分子細胞生物学研究所

〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

*Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo,
1-1-1, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan*

(受付 1998 年 6 月 29 日—受理 1998 年 8 月 7 日)

1. はじめに

グラム陽性細菌は球菌から桿菌、分岐状、菌糸状、内性孢子形成を示す菌種、さらには形態的に高度に分化した放線菌まで、グラム陰性細菌に比べ比較的多様な形態を示す。グラム陽性細菌は一般的に多層のペプチドグリカンとテイコ酸その他の糖質より構成される分厚い細胞壁の構造を有し、内性孢子を形成しない菌種でも乾燥その他の環境変化に対して耐久性を示す。グラム陽性細菌の各属の定義は主に形態、化学分類学的性状（主にメナキノン組成と細胞壁アミノ酸組成など）と系統分類の組み合わせにより行われており、16S rRNA 塩基配列の類似度からみたとき、グラム陰性細菌に比べて、属のレベルで互に接近していて、かなり細分化されている場合が多い。本シンポジウムではグラム陽性菌における形態と化学分類学的性状の意義について述べてい

菌の系統はおおよそ30億年前に約12の系統に分かれたものと考えられている。その中で、*Aquifax* 群、*Thermotoga* 群が最初に別れ、続いて緑色非硫黄細菌 (*Chloroflexus* 群) と *Thermus-Deinococcus* 群、シアノバクテリアが別れたものと考えられている。シアノバクテリアの出現によって原始地球には存在しなかった酸素が作られ、この酸素ガスの出現によって真性細菌の進化が爆発的に促進されたものと言われている。その結果、グラム陽性細菌が現れ、さらにグラム陰性細菌は *Flavobacterium-Cytophaga* 群、*Spirohaeta* 群、*Clamydia* 群、緑色硫黄細菌群、*Proteobacteria* 群に分岐する。グラム陽性菌のなかで放線菌はさらに形態的に進化を遂げたグループの細菌であるが、グラム陽性真正細菌とはっきり隔絶された分類群ではなく、連続したものでその境界はあいまいである。

グラム陽性菌は DNA の G+C 含量が55%を境に系統が隔たっており、55%以上のものを放線菌を含んで高 G+C グラム陽性細菌（またはアクチノバクテリア)¹⁴⁾、55%以下のものは低 G+C グラム陽性細菌と呼ばれている。

2. グラム陽性細菌の系統・進化と形態

16S rRNA 塩基配列に基づいて推定された真正細菌

3. グラム陽性、高 G+C 球菌の系統上の位置

グラム陽性高 G+C の球菌は近年多くの新しい属が報告^{7,10,13,17,18,20,21)}されて現在15属にもほびっているが、これらは系統研究の結果、多くの場合、球菌どうしよりも桿菌の属により近縁であることが明らかになってきている。球菌は桿菌の系統のなかに混在しており、球菌どうしが近縁なものとしてまとまっているわけではない。球菌のうち、*Micrococcus* 属と *Arthrobacter* 属は以前から近縁であることが指摘されていたが、最近、Koch *et al.*⁹⁾ は *Micrococcus* 属のうち運動性球菌 *M. agilis* を *Arthrobacter* 属に移して *A. agilis* の新組み合わせを提唱した。この例にみられるように、球菌と桿菌との隔たりは明確ではなくなっている。

a) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2 (1986) でのグラム陽性球菌の分類上の取り扱い

かつて好気性のグラム陽性球菌は1つの Family *Micrococcaceae* 科としてまとめられていた。1986年の Bergey's Manual では、Family *Micrococcaceae* には *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Planococcus*, *Staphylococcus* が、Family *Deinococcaceae* には *Deinococcus* が含まれていたが、*Planococcus*, *Staphylococcus* は低 G+C グラム陽性細菌で、高 G+C グラム陽性細菌とは系統的に異なる位置にあることから、現在ではこの分類体系は用いられてはいない。

b) 近年報告された新しい球菌とそれらの分類学的性状

グラム陽性、高 G+C 球菌として従来からの *Micrococcus*, *Blastococcus*, *Stomatococcus* 属に加えて、近年急激に新属の報告がなされた。ここ4年の間に10属の報告があり、現在この仲間は合わせて13属となっている。*Blastococcus*, *Kineococcus* 属菌種は運動性を示すが、それ以外の球菌は非運動性である。

c) グラム陽性、高 G+C 球菌の系統

これらの新属の系統上の位置についてはそれぞれの報告の中で明らかにされているが、これまで 16S rRNA 塩基配列が未知であった *Pelczaria* 属については我々が調べたので、これを含めてデータベース

から得たグラム陽性、高 G+C 球菌の全属、および関連の桿菌、放線菌の属の 16S rRNA 塩基配列(計73属)に基づいて、系統樹を作成した(図1)。これによると、球菌は系統樹上、グラム陽性桿菌ないしは菌糸状の生育を示す放線菌と呼ばれる菌群の中に散在しており、球菌どうしが近縁な関係としてまとまっているわけではない。

Micrococcus 属は Stackebrandt *et al.*¹³⁾ により5つの属に分けられたが、このうち新属 *Kocuria* 属は我々のシーケンスデータから *Pelczaria* 属にごく近縁であることが判明(未発表)し、命名の優先権から *Kocuria* 属は *Pelczaria* 属に含められるべきものと考えられた。また、前述のように、運動性球菌 *M. agilis* は Koch *et al.*⁹⁾ により *Arthrobacter* 属に移されたが、*Arthrobacter* 属はもともと *Rod-Coccus* のライフサイクルを示すことが知られており、*A. agilis* はそのライフサイクルの球菌のステージで固定されたものとの考えに立っている。これは桿菌の属に球菌の種が含まれた例である。

d) 近縁な球菌と桿菌との組み合わせ —化学分類学的性状

形態的および化学分類学的特徴から *Blastococcus* 属および *Microsphaera* 属は放線菌として取り扱われている *Geodermatophilus* 属に類似しているが、系統解析からも近縁である(図1)ことが明らかである。*Blastococcus* 属は *Geodermatophilus* 属と同一属である可能性があり、さらに今後の詳細な分類学的検討が必要である。また、球菌の *Stomatococcus* 属は桿菌の *Rothia* 属に近縁であり(図1)、これらも同一属とすべき可能性がある。

e) ペプチドグリカンタイプ B グループの菌種

最近、B タイプのペプチドグリカン構造を持ち、ジアミノ酸としてジアミノ酪酸(2,4-diaminobutyric acid, Dab)を持つ新属の桿菌 *Agrococcus* 属⁴⁾ と *Cryobacterium* 属¹⁵⁾, *Leucobacter* 属¹⁶⁾ が報告された。*Agrococcus* 属は球から極く短い桿状の形態を示し、化学分類学的性状として MK-12, 11 を含み、系統的には *Cryobacterium* 属に近縁である。このグループの属はペプチドグリカン・アミノ酸とメナキノン組成に基づきかなり細分化されている一群である。

Fig. 1. Phylogenetic relationships of Gram-positive cocci and related genera, and the distribution of diagnostic diamino acid and principal menaquinones. The tree was constructed by neighbor-joining method.

4. グラム陽性, 低 G+C, 好気性球菌の分類学的性状の比較

グラム陽性, 低 G+C, 好気性球菌としては現在, *Planococcus*, *Marinococcus*, *Salinicoccus*, *Sporosarcina*, *Saccharococcus* の 5 属が知られている。これらの属の系統的關係も既に調べられているが, これらは高 G+C 細菌の場合と同様, 球菌どうしが近縁であるというよりも, *Bacillus*, *Lactobacillus* などの桿菌の属とより近縁であることが明らかにされている³⁾。最近, 有孢子球菌 *Marinococcus halophilus* は桿菌の仲間と共に新属 *Halobacillus* に移された¹²⁾。これは, 桿菌の属に球菌の種を含められたことになる。また, Nakagawa et al.⁶⁾ は最近, 好気性運動性球菌である *Planococcus* 属に桿菌である *Flavobacterium okeanokoites* を移行 (新組み合わせ *P. okeanokoites* の提唱) して *Planococcus* 属の定義の修正を行っている。すなわちこれは, 前述の例とは逆に, 従来球菌の属であったところに桿菌の種が含まれたこととなる。

低 G+C グループでも, 嫌気性有孢子球菌である *Sarcina* 属の菌種が嫌気性有孢子桿菌 *Clostridium* 属の系統に入り込んでいることが判明し, *Clostridium* 属は *Sarcina* 属に含められる可能性が指摘された¹⁹⁾が, 現在のところは *Clostridium* の学名を保存する方向で動いており, その後, *Clostridium* 属は 6 つの属に分割された²⁾。このように, グラム陽性細菌に於いては, 球-桿の形態的特徴が属を仕分ける指標とは成り得ない状況となりつつある。

5. Phylum *Deinococcus-Thermus* の球菌と桿菌

Deinococcus 属は高 G+C でグラム陽性タイプの細胞壁を持つが系統的にはグラム陽性, 高 G+C 細菌とは異なり, Phylum *Deinococcus-Thermus* に属する。桿菌である *Deinobacter* 属はこの *Deinococcus* 属と近縁であり, 従ってこの Phylum に属するものとされていた。しかし最近, *Deinococcus* 属全菌種 (5 種) と *Deinobacter* 属の系統解析がなされ, 桿菌の *Deinobacter* 属は球菌の属 *Deinococcus* 属に含まれることとなった¹¹⁾。これも球菌の属に桿菌の種が含まれた例である。

6. キノン分子種の化学分類学的指標としての意義

イソプレノイド・キノンは電子伝達に関わる補酵素コエンザイム Q (CoQ) のアナログとして特に好気性の細菌, 古細菌, 放線菌, 酵母, かびなどの微生物に広く存在し, 菌種によってキノンの種類, イソプレノイド鎖のイソプレン単位数, イソプレノイド鎖中の水素飽和度に違いがみられることから, キノン分子種の違いは化学分類の重要な指標として用いられており, 特にグラム陽性細菌ではペプチドグリカン組成とメナキノン組成の組み合わせが属を規定する形質として重要なものとなっている。しかし, その多様な分子種がいかにして生合成されるのか, これまで不明であったが, ごく最近になって Okada et al.^{8,9)} によりかなりのところまで解明され, ユビキノンのメナキノンの側鎖の長さは大腸菌では *ispB*, 酵母 *S. cerevisiae* では *COQ1* 遺伝子の産物, すなわち Polyprenyl pyrophosphate (PPP) synthase により決定されることが判明した。イソプレノイド鎖長を決定する反応として *p*-Hydroxybenzoic acid との縮合反応を触媒する *p*-Hydroxybenzoate-polyprenyl pyrophosphate (PHB-PPP) transferase と, ポリプレノイド側鎖のアセンブリーを触媒する Polyprenyl pyrophosphate (PPP) synthase の 2 つが考えられる。彼らは *S. cerevisiae* 内で *E. coli* の *ispB* を組み込んだプラスミドを発現させたところ, 本来 *S. cerevisiae* が持つ ユビキノンの Q-6 ではなく, *E. coli* 型の Q-8 を生成させることに成功した。すなわちこの結果はユビキノン分子種の特異性は, 側鎖に特異的な PPP synthase により規定されることを示している。グラム陽性細菌のメナキノンも同様の酵素が関与してことが *Bacillus subtilis* により確認されている。この結果はキノンの, メナキノン分子種の分類学的意義付けの解明に有用な情報と思われる。

7. 桿菌, 分枝型, 糸状細胞の進化と分類

放線菌との境界領域の属では菌糸状の菌種と桿菌の菌種が同居し, 球菌の属がこれらの属に近縁な場合もみられる^{7,17,18)}。グラム陽性細菌での形態的形質, すなわち球菌であるか, 桿菌であるか, あるいは菌糸を形成するかないか, などの形質は本質的なものなのであろうか。多くのグラム陽性細菌が球状と桿状の形態を取り得ることから, 球状に固定さ

れた形質をもって即、属レベルの識別の指標に用いることは受け入れられなくなっている。グラム陰性細菌である *Escherichia coli*, *Agrobacterium* では1つの変異で分岐型の細胞形態を示す形態変化の例が知られている⁹⁾。*Escherichia coli* では *minB* (クロモソームの分配に関与する遺伝子) の変異により分岐型細胞を形成する。このようなグラム陰性細菌での例がそのままグラム陽性細菌にあてはまるとは言えないかも知れないが、球-桿の形態形成が系統的に新しいできごとであるなら、それは本質的な違いとみることはできないであろう。

文 献

- 1) Akerlund, T., K. Nordström and R. Bernander. 1993. Branched *Escherichia coli* cells. *Mol. Microbiol.* **10**: 849–858.
- 2) Collins, M.D., P.A. Lawson, A. Williams, J.J. Cordoba, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe and J.A.E. Farrow. 1996. The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combination. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 812–826.
- 3) Farrow, J.A., S. Wallbanks and M.D. Collins. 1994. Phylogenetic interrelationships of round-spore-forming bacilli containing cell walls based on lysine and the non-spore-forming genera *Caryophanon*, *Exiguobacterium*, *Kurthia*, and *Planococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 74–82.
- 4) Groth, I., P. Schumann, N. Weiss, K. Martin and F.A. Rainey. 1996. *Agrococcus jenensis* gen. nov., sp. nov., a new genus of actinomycetes with diaminobutyric acid in the cell wall. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 234–239.
- 5) Koch, C., P. Schumann and E. Stackebrandt. 1995. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 837–839.
- 6) Nakagawa, Y., T. Salkane and A. Yokota. 1996. Emendation of the genus *Planococcus* and transfer of *Flavobacterium okeanokoites* Zobell and Upham 1944 to the genus *Planococcus* as *Planococcus okeanokoites* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 866–870.
- 7) Nakamura, K., A. Hiraishi, Y. Yoshimi, M. Kawarasaki, K. Masuda and Y. Kamagata. 1995. *Micrococcus phosphovorius* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive polyphosphate-accumulating bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 17–22.
- 8) Okada, K., Y. Kamiya, X.F. Zhu, K. Suzuki, K. Tanaka, T. Nakagawa, H. Matsuda and M. Kawamukai. 1997. Cloning of the *sdsA* gene encoding solanesyl diphosphate synthase from *Rhodobacter capsulatus* and its functional expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 5992–5998.
- 9) Okada, K., K. Suzuki, Y. Kamiya, X. Zhu, S. Fujisaki, Y. Nishimura, T. Nishino, T. Nakagawa, M. Kawasumi and H. Matsuda. 1996. Polyprenyl diphosphate synthase essentially defines the length of the side chain of ubiquinone. *Biochim. Biophys. Acta.* **1302**: 217–223.
- 10) Prauser, H., P. Schumann, F.A. Rainey, R.M. Kroppenstedt and E. Stackebrandt. 1997. *Teracoccus luteus* gen. nov., sp. nov., an LL-diaminopimelic acid-containing coccoid actinomycete from soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 1218–1224.
- 11) Rainey, F.A., M.F. Nobre, P. Schumann, E. Stackebrandt and M.S. da Costa. 1997. Phylogenetic diversity of the deinococci as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 510–514.
- 12) Spring, S., W. Ludwig, M.C. Marquez, A. Ventosa, and K.-H. Schleifer. 1996. *Halobacillus* gen. nov., with description of *Halobacillus litoralis* sp. nov. and *Halobacillus trueperi* sp. nov., and transfer of *Sporosarcina halophila* to *Halobacillus halophilus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 492–496.
- 13) Stackebrandt, E., C. Koch, O. Gvozdiak and P. Schumann. 1995. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohen 1872 gen. emend. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 682–692.
- 14) Stackebrandt, E., F.A. Rainey and N.L. Ward-Rainey. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 479–491.
- 15) Suzuki, K., J. Sasaki, M. Uramoto, T. Nakase and K. Komagata. 1997. *Cryobacterium psychrophilum* gen. nov., sp. nov., nom. rev., comb. nov., an obligately psychrophilic actinomycete to accommodate “*Curtobacterium psychrophilum*” Inoue and Komagata 1976. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 474–478.
- 16) Takeuchi, M., P. Schumann, N. Weiss and A. Yokota. 1996. *Leucobacter komagatae* gen. nov., sp. nov., a new aerobic gram-positive, nonsporing rod with 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 967–971.
- 17) Takeuchi, M. and A. Yokota. 1994. Phylogenetic analysis of *Kineococcus aurantiacus* based on 16S rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol. Letters* **116**: 7–12.
- 18) Tamura, T., M. Takeuchi and A. Yokota. 1994. *Luteococcus japonicus* gen. nov., sp. nov., a new gram-positive, aerobic cocci with LL-diaminopimelic acid in the cell wall. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:

- 348–356.
- 19) Willems, A. and M.D. Collins. 1996. Phylogenetic replacement of *Sarcina ventriculi* and *Sarcina maxima* within group I *Clostridium*, a possible problem for future revision of the genus *Clostridium*. Request for an opinion. Int. J. Syst. Bacteriol. **44**: 591–593.
- 20) Yokota, A., T. Tamura, T. Nishii and T. Hasegawa. 1993. *Kineococcus aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic Gram-positive, motile coccus with meso-diaminopimelic acid and arabinogalactan in the cell wall. Int. J. Syst. Bacteriol. **43**: 52–57.
- 21) Yoshimi, Y., A. Hiraishi and K. Nakamura. 1996. Isolation and characterization of *Microsphaera multipartita* gen. nov., sp. nov., a polysaccharide-accumulating gram-positive bacterium from activated sludge. Int. J. Syst. Bacteriol. **46**: 519–525.