

齧歯類分離CARバチルスの新学名, *Filobacterium rodentium*について

池 郁生

国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンター実験動物開発室

要 約

“CAR (カー) バチルス” は、寒天培地を用いた培養ができず、学名は未定であった。2016年, “CAR バチルス” のラット分離株である SMR-C^T はバクテロイデス門スフィンゴバクテリウム目の新科フィロバクテリウム科 (*Filobacteriaceae*) に、新属・新種として「フィロバクテリウム・ローデンティウム (*Filobacterium rodentium*)」と命名された。基準株は SMR-C^T である。

“CAR (カー) バチルス” はラットやマウスに見られる慢性呼吸器疾患 (chronic respiratory disease) の一因として発見されたグラム陰性のフィラメント状桿菌である [5]。この菌はそれら動物の気道の線毛上皮細胞 (ciliated epithelial cell) に主に感染し、菌の形状が線毛と類似しているため Ganaway らにより CAR バチルス (*Cilia-Associated Respiratory bacillus*) と命名された [5]。“CAR バチルス” はいわゆる培養困難菌であり、1980年の発見 [20] 以来、本菌には学名がつけられていなかった。理化学研究所 (理研) バイオリソースセンター (BRC) 実験動物開発室の池、同微生物材料開発室 (JCM) の坂本、放射線医学総合研究所生物研究推進課の小久保らの共同研究グループは、“CAR バチルス” が分類学の「科」レベルで新しい生物群であることを明らかにし、“CAR バチルス” のラット分離株である SMR-C^T をフィロバクテリウム科 (*Filobacteriaceae*) フィロバクテリウム属のフィロバクテリウム・ローデンティウム (*Filobacterium rodentium*) と命名した [6]。本稿ではこれについて概説する。

“CAR バチルス” は寒天培地で培養できない [5, 7, 9]。この菌の分離には孵化鶏卵漿尿膜腔への注入培養 [5] や、3T3 細胞等に感染させて共培養する方法 [2, 15, 17] が取られ、ラット・マウスからは CAR-NIH [5], SMR [10], CBR [7], CAT-StL および X シリーズ [15], CBM [16] の諸株、そしてウサギ分離株として B シリーズ [3], ブタ分離株として PigCAR-1 など [13] が報告されている。これら分離株は以下の “CAR バチ

ルス” としての特徴を示す。すなわち、感染動物の呼吸器線毛上皮の線毛部で増殖し、感染実験で慢性呼吸器疾患を起こし、菌自体はグラム染色陰性かつ銀染色陽性のフィラメント状桿菌を呈し、電子顕微鏡で3層の外膜が確認され、滑走運動を行う。

細菌に学名を命名するためには、国際原核生物分類命名委員会 (International Committee on Systematics of Prokaryotes, ICSP) による国際細菌命名規約 (International Code of Nomenclature of Bacteria) に沿い、ICSP の公式機関誌である *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* にその性状を記載して提案しなければならない。他誌での学名提案も可能だが、その場合は提案した学名とその性状を記載した論文を *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* に送り、ICSP の審査を受ける必要がある。細菌の学名命名については、森と中川による解説が参考になる [12]。

国際細菌命名規約によると、学名命名には表1の要件が必要である。簡単に述べると、学名は菌株に対して命名されるものであるため、培養可能な基準株 (Type strain) を決め、それを誰もが自由に使えるようにカルチャーコレクションに無条件で寄託し (要件1)、その基準株について必要な記述を行い (要件2-5)、ラテン語文法に適った学名を考案し (要件6)、*Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* に提案する。提案が認められれば、同誌に採択され、LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, www.bacterio.net/index.html) や、NCBI の Taxonomy Browser (www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/) に記載さ

表 1. 細菌とアーキアの学名命名に必要な項目

-
1. 最低 2 カ国のカルチャーコレクションに寄託
培養可能であること, 無条件寄託であること
 2. 菌のコロニー性状, 細胞形態の記述
 3. 生理・生化学的性状試験結果の記述
至適生育温度・pH, 耐塩性, 生化学試験性状など
 4. 化学分類学的性状試験結果の記述
菌体脂肪酸組成分析 (分類群の特徴を表す)
細胞壁アミノ酸組成分析 (グラム陽性菌で重要)
キノン類分析 (呼吸における電子伝達系補酵素)
G+C 含量測定
 5. 16S rDNA 塩基配列に基づく分子系統関係の記述
 6. ラテン語文法に適った学名
-

れる。

“CAR バチルス”の学名命名の場合も、培養可能な基準株を決めてそれをカルチャーコレクションに寄託する必要があった。共同研究グループは Schoebらの方法を参考に、“CAR バチルス”のラット分離株である SMR [10] が Vero E6 細胞と共培養するとよく増殖することを見いだした。3T3 細胞など他の細胞との共培養でも SMR は増殖したが、SMR の培養初期では増殖可能な状態に至るまで 2-3 週間必要とし、寿命の長い Vero E6 細胞のほうが SMR の増殖支持効果が高いと判断した。SMR は菌端を Vero E6 細胞上に付着させ、もう一端を培地中に伸ばした。位相差顕微鏡を用いて培養中の菌を観察すると、Vero E6 細胞に付着した SMR 菌体は培地中でイソギンチャクの触手のようにゆらゆらと揺れた。

SMR はいったん増殖を始めると、一部は Vero E6 細胞に付着しないで浮遊状態で増殖した。そこで Vero E6 調整培地 (Vero E6 細胞を 37°C, 5%CO₂ インキュベータで 10% ウシ胎児血清添加 IMDM 培地を用いて 3 日間、集密培養し、その培養上清を 0.22 μm フィルターろ過したもの) を使用すると、SMR を 37°C, 5%CO₂ インキュベータで単独培養可能なことが分かった。こうして単独培養できるようになった SMR を改めて SMR-C 株と名付け、学名命名のための基準株とした。SMR-C^T を理研 BRC の微生物材料開発室とドイツの DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) に条件無しで寄託した (JCM 19453^T = DSM 100392^T)。

SMR-C^T の培養条件は、Vero E6 調整培地を用い、SMR-C^T を様々な温度、pH、NaCl 濃度で培養し、増殖するか否かで評価した。SMR-C^T の生化学性状は Rapid ID 32A (bioMérieux) を用い、キットの説明書

にしたがって判定した。菌体脂肪酸組成は、湿菌体をアルカリけん化処理後にメチル化し脂肪酸メチルエステルとして抽出して、菌体脂肪酸組成分析システム (MIDI Inc.) を用いて決定した [8, 11]。SMR-C^T のゲノム DNA はフェノール/クロロホルム法で抽出し、次世代シーケンサーでドラフトゲノムを定め、欠失部分は別途シーケンシングを行って完全な環状ゲノム塩基配列を決定した (東京大学大学院新領域創成科学研究科附属オーミクス情報センター 服部正平元教授らとの共同研究)。MiGAP (www.migap.org) [18] を用いてゲノム DNA 塩基配列から 16S rRNA 遺伝子領域を推定し、また G+C 含量を計算した。SMR-C^T の 16S rRNA 遺伝子はゲノム中に 1 セットのみ存在した。16S rRNA 遺伝子 (LC055729, GenBank/EMBL/DDBJ) を対象に BLASTN 解析 (blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi) [1] を行って近縁の基準株を選び、各遺伝子配列を MUSCLE 法で整列させ、近隣結合法 [14, 19] ならびに最尤法 [4] で系統樹を描いた (ブートストラップ値 1,000)。

SMR-C^T は微好気性で、胞子を形成せず、グラム染色陰性かつ好銀性のフィラメント状桿菌であった。増殖中の菌は位相差検鏡で容易に確認できた。分裂時間は 20-24 時間。4-37°C で増え、最適温度は 37°C だった。pH は 6 から 8 が最適であった。ラット・マウスの生理的な塩濃度以上では成長しなかった。Vero E6 調整培地を用い、超低付着性培養器で培養すると、菌は単独で浮遊状態で増え、大きさは 0.8-0.9 × 8.3-10.0 μm であった。SMR-C^T は鞭毛や線毛といった運動器官を持たないが、滑走運動を行った。SMR-C^T を BALB/c マウスに投与すると慢性呼吸器疾患を発症した。SMR-C^T を透過型電子顕微鏡で観察すると、他の“CAR バチルス”同様に 3 層の外膜を確認

表 2. *Filobacterium rodentium* の学名

学名	<i>Filobacterium rodentium</i>
門	<i>Bacteroidetes</i>
綱	<i>Sphingobacteriia</i>
目	<i>Sphingobacteriales</i>
科	<i>Filobacteriaceae</i> fam. nov.
属	<i>Filobacterium</i> gen. nov.
種	<i>rodentium</i> sp. nov.
基準株	SMR-C ^T = JCM 19453 ^T = DSM 100392 ^T

することができた。

SMR-C^T のゲノム塩基配列から推定した 1,491 塩基の 16S rRNA 遺伝子配列を用いて BLASTN 解析を行うと、ラットやマウスから分離報告のある“CAR バチルス”の株と 99-100% 一致した。“CAR バチルス”ブタ分離株との相同性は 87-88% であった。“CAR バチルス”以外の基準株との比較では、一番近縁だったのが *Chitinophaga pinensis* DSM 2588^T, *Terrimonas ferruginea* DSM 30193^T, *Chitinophaga ginsengisoli* Gsoil 052^T, *Chitinophaga filiformis* NBRC 15056^T, *Chitinophaga cymbidii* R156-2^T および *Chitinophaga skermanii* CC-SG1B^T であり、すべてキティノファーガ科 (*Chitinophagaceae*) に属し、SMR-C^T との相同性はいずれも 86% であった。

SMR-C^T の脂肪酸組成は、iso-C_{15:0} (41.0%), anteiso-C_{15:0} (25.8%), C_{16:0} (17.0%), C_{14:0} (10.3%), iso-C_{16:0} (4.4%), そして anteiso-C_{17:0} (1.7%) であった。不飽和脂肪酸やヒドロキシ脂肪酸は認められなかった。SMR-C^T の最優勢脂肪酸は iso-C_{15:0} であり、キティノファーガ科に属する他の基準株と同様であったが、anteiso-C_{15:0}, C_{16:0} および C_{14:0} の構成比はいずれの基準株とも異なっていた。

ゲノム塩基配列から計算した G+C 含量は、47.7 mol% であった。文献から調べたキティノファーガ科に属する他の基準株の G+C 含量は 40.7-51.9% だった。

SMR-C^T の生化学性状で特徴的であったことは、ウレアーゼ陽性、ならびに α ガラクトシダーゼ、β ガラクトシダーゼ、α グルコシダーゼ、α フコシダーゼがそれぞれ陰性だったことである。文献から調べたキティノファーガ科に属する他の基準株では *Chitinophaga ginsengisoli* Gsoil 052^T と *Chitinophaga pinensis* DSM 2588^T のほかはウレアーゼ陰性（一部の株では未検査）であり、α ガラクトシダーゼ、β ガラクトシダーゼ、α グルコシダーゼ、α フコシダーゼについては、キティノファーガ科に属する他の基準株

表 3. *Filobacterium rodentium* SMR-C^T の主要性状

分離源	ラット呼吸器疾患肺
グラム染色	陰性
銀染色	陽性
細胞長	8-10 μm
形状	フィラメント状桿菌
胞子形成	なし
鞭毛・線毛	なし
滑走運動	あり
DNA G+C 含量	47.7 mol%
ウレアーゼ活性	あり
α-ガラクトシダーゼ活性	なし
β-ガラクトシダーゼ活性	なし
α-グルコシダーゼ活性	なし
α-フコシダーゼ活性	なし
主要脂肪酸	iso-C _{15:0} , anteiso-C _{15:0} , C _{16:0} , C _{14:0}

ですべて陰性を示したものはなかった。

16S rRNA 遺伝子配列を対象とした系統樹解析では、SMR-C^T は“CAR バチルス”の他の齧歯類由来株とクレイドを形成したが、近隣結合法と最尤法の双方ともに SMR-C^T はキティノファーガ科のいずれの属ともクラスターを形成せず、SMR-C^T が細菌の新たな系列を代表することが示唆された。

以上から、共同研究グループは、SMR-C^T などラットやマウスから分離された“CAR バチルス”は「科」レベルで新しい生物群であると考えた。そしてこの SMR-C^T を、バクテロイデス門スフィンゴバクテリウム目の新しい科であるフィロバクテリウム科 (*Filobacteriaceae*)、その中の新しい属であるフィロバクテリウム属の新種「フィロバクテリウム・ローデンティウム (*Filobacterium rodentium*)」と命名した [6]。 *Filobacterium* は、新ラテン語でフィラメント状細菌の意味、*rodentium* は、マウスやラットが属する齧歯類由来であることを意味する。基準株は SMR-C^T である (表 2)。表 3 に *Filobacterium rodentium* SMR-C^T の主要性状を記載した。

“CAR バチルス”は 1980 年の最初の報告 [27] から 35 年を経て、SMR-C^T を基準株として学名を得ることとなった。しかし、SMR-C^T の病原性発揮機構については未解明のままである。上記のように SMR-C^T のゲノム塩基配列は既に決定しているが、類縁菌を含め未知の遺伝子が多く、SMR-C^T の病原性関連遺伝子候補は不明である。今後、病原性発揮機構の研究が必要である。

謝 辞

Filobacterium rodentium SMR-C^T 学名命名に関わったすべての方々、すべての機関に感謝申し上げます。

文 献

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–33402.
- Cundiff, D. D., Besch-Williford, C., Hook, R. R. Jr, Franklin, C. L. and Riley, L. K. 1994. Detection of cilia-associated respiratory bacillus by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 1930–1934.
- Cundiff, D. D., Besch-Williford, C. L., Hook, R. R. Jr, Franklin, C. L. and Riley, L. K. 1995. Characterization of cilia-associated respiratory bacillus in rabbits and analysis of the 16S rRNA gene sequence. *Lab. Anim. Sci.* 45: 22–26.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164–166.
- Ganaway, J. R., Spencer, T. H., Moore, T. D. and Allen, A. M. 1985. Isolation, propagation, and characterization of a newly recognized pathogen, cilia-associated respiratory bacillus of rats, an etiological agent of chronic respiratory disease. *Infect. Immun.* 47: 472–479.
- Ike, F., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Kajita, A., Matsushita, S. and Kokubo, T. 2016. *Filobacterium rodentium* gen. nov., sp. nov., a member of *Filobacteriaceae* fam. nov. within the phylum *Bacteroidetes*; includes a microaerobic filamentous bacterium isolated from specimens from diseased rodent respiratory tracts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 150–157.
- Itoh, T., Kohyama, K., Takakura, A., Takenouchi, T. and Kagiya, N. 1987. Naturally occurring CAR bacillus infection in a laboratory rat colony and epidemiological observations. *Exp. Anim.* 36: 387–393.
- Kuykendall, L. D., Roy, M. A., O'Neill, J. J. and Devine, T. E. 1988. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38: 358–361.
- MacKenzie, W. F., Magill, L. S. and Hulse, M. 1981. A filamentous bacterium associated with respiratory disease in wild rats. *Vet. Pathol.* 18: 836–839.
- Matsushita, S. 1986. Spontaneous respiratory disease associated with cilia-associated respiratory (CAR) bacillus in a rat. *Jap. J. Vet. Sci.* 48: 437–440.
- Miller, L. T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *J. Clin. Microbiol.* 16: 584–586.
- 森 浩二, 中川恭好. 2011. 微生物名ってどうやって決まるの? 生物工学 89(6): 336–339.
- Nietfeld, J. C., Fickbohm, B. L., Rogers, D. G., Franklin, C. L. and Riley, L. K. 1999. Isolation of cilia-associated respiratory (CAR) bacillus from pigs and calves and experimental infection of gnotobiotic pigs and rodents. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 252–258.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406–425.
- Schoeb, T. R., Dybvig, K., Davidson, M. K. and Davis, J. K. 1993. Cultivation of cilia-associated respiratory bacillus in artificial medium and determination of the 16S rRNA gene sequence. *J. Clin. Microbiol.* 31: 2751–2757.
- Shoji, Y., Nozu, R., Takakura, A., Matsushita, S. and Itoh, T. 1988. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of serum antibody to CAR bacillus. *Exp. Anim.* 37: 67–72.
- Shoji, Y., Itoh, T. and Kagiya, N. 1992. Propagation of CAR bacillus in artificial media. *Exp. Anim.* 41: 231–234.
- Sugawara, H., Ohyama, A., Mori, H. and Kurokawa, K. 2009. Microbial genome annotation pipeline (MiGAP) for diverse users. In the 20th International Conference on Genome Informatics. (Kanagawa, Japan), p. S001-1-S001-2 vol. 20.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTER W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673–4680.
- Van Zwieten, M. J., Solleveld, H. A., Lindsey, J. R., de Groot, F. G., Zurcher, C. and Hollander, C. F. 1980. Respiratory disease in rats associated with a filamentous bacterium: a preliminary report. *Lab. Anim. Sci.* 30: 215–221.