

新規の好熱性キチン分解細菌  
*Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株由来  
キチナーゼの性質と構造に関する研究

2015 年 3 月

上田 純子

新規の好熱性キチン分解細菌 *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株由来キチナーゼの性質と構造に関する研究

Studies on properties and structure of a chitinase from a novel thermophilic chitin-degrading bacterium, *Paenibacillus thermoaerophilus* strain TC22-2b

目次

1. 序論.....	1
1-1. キチンおよびキチナーゼ .....	2
1-2. 微生物由来キチナーゼ .....	4
1-3. 細菌の同定と新種細菌の記載 .....	5
1-4. 本研究の目的 .....	6
2. 材料および方法.....	10
2-1. 新規の好熱性キチン分解細菌 TC22-2b 株の分離および多相分類学的解析.....	11
2-1-1. キチン分解細菌 TC22-2b 株の分離.....	11
2-1-1-1. TC22-2b 株の分離 .....	11
2-1-1-2. コロイダルキチンの調製.....	11
2-1-1-3. キチン分解活性試験.....	12
2-1-2. TC22-2b 株の多相分類学的解析.....	12
2-1-2-1. 菌株および培養条件.....	12
2-1-2-2. 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析.....	13
2-1-2-3. ゲノム DNA の G+C 含量の解析 .....	14
2-1-2-4. 形態観察.....	14
2-1-2-5. 生理・生化学的性状の解析.....	15
2-1-2-6. 化学分類学的性状の解析.....	16

2-2. <i>Paenibacillus thermoaerophilus</i> TC22-2b 株由来キチナーゼ ( <i>PthChiA</i> ) の精製と解析	17
2-2-1. キチナーゼ活性測定	17
2-2-2. タンパク質の定量	17
2-2-3. キチナーゼの精製	17
2-2-4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)	18
2-2-5. N 末端アミノ酸配列の解析	18
2-2-6. キチナーゼ活性および安定性に対する温度の影響の解析	19
2-2-7. キチナーゼ活性および安定性に対する pH の影響の解析	19
2-2-8. 反応速度論的解析	19
2-2-9. キチナーゼの加水分解産物の解析	20
2-3. <i>PthChiA</i> 遺伝子の増幅と分子構造の推定	21
2-3-1. <i>PthChiA</i> 遺伝子断片の増幅と塩基配列の解析	21
2-3-2. <i>PthChiA</i> 遺伝子断片の隣接領域の増幅と塩基配列の解析	21
2-3-3. <i>PthChiA</i> のアミノ酸配列およびドメイン構造の推定	22
3. 結果	24
3-1. 多相分類学的解析による TC22-2b 株の同定および記載	25
3-1-1. 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統学的位置付け	25
3-1-2. ゲノム DNA の G+C 含量	26
3-1-3. 形態	26
3-1-4. 生理・生化学的性状	26
3-1-5. 化学分類学的性状	27
3-1-6. TC22-2b 株の命名と記載	28
3-2. <i>Paenibacillus thermoaerophilus</i> TC22-2b 株由来キチナーゼ ( <i>PthChiA</i> ) の精製および	

性質 .....	41
3-2-1. <i>PthChiA</i> の精製 .....	41
3-2-2. <i>PthChiA</i> の性質 .....	41
3-3. <i>PthChiA</i> の分子構造 .....	49
3-3-1. <i>PthChiA</i> 遺伝子と隣接配列の塩基配列および推定アミノ酸配列 .....	49
3-3-2. <i>PthChiA</i> の推定ドメイン構造 .....	50
4. 考察 .....	53
4-1. <i>Paenibacillus</i> 属細菌のキチン分解活性と生育温度 .....	54
4-2. TC22-2b 株由来キチナーゼ ( <i>PthChiA</i> ) の性質 .....	55
4-2-1. <i>PthChiA</i> の基質分解様式 .....	55
4-2-2. <i>PthChiA</i> と既知のキチナーゼの性質の比較 .....	56
4-3. <i>PthChiA</i> の推定分子構造 .....	56
5. 結論 .....	61
謝辞 .....	66
参考文献 .....	67
付録 .....	77

## 略語表

BLAST	basic local alignment search tool
bp	base pair (塩基対)
Da	dalton (ダルトン)
DEAE	diethylaminoethyl (ジエチルアミノエチル)
DNA	deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
GC/MS	gas chromatography mass spectrometry (ガスクロマトグラフィ質量分析)
$k_{\text{cat}}$	turnover number (代謝回転数)
$K_{\text{m}}$	Michaelis constant (ミカエリス定数)
PCR	polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
RNA	ribonucleic acid (リボ核酸)
RNase	ribonuclease (リボヌクレアーゼ)
rRNA	ribosomal RNA (リボソーム RNA)
SDS	sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane (トリスヒドロキシメチルアミノメタン)
TE	Tris-EDTA buffer
$V_{\text{max}}$	maximum velocity (最大反応速度)

# 1. 序論

## 1. 序論

### 1-1. キチンおよびキチナーゼ

キチンは *N*-アセチル-*D*-グルコサミン (GlcNAc) が  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-グリコシド結合で直線状に連なった構造をとる (Fig. 1) 不溶性の多糖であり、自然界で多くの生物によって大量に生産される高分子化合物の一つである (Gooday, 1990)。キチンは真菌の細胞壁や、線形動物の卵殻、エビ、カニ、昆虫を含む節足動物の外骨格などに含まれ、海洋や土壌など環境中に広く分布している (Gooday, 1990; Tharanathan & Kittur, 2003)。これらの生物によるキチンの生産量は年間  $10^{10}$  トン以上とも推測されている (Gooday, 1990; Keyhani & Roseman, 1999; Tharanathan & Kittur, 2003; Yeul & Rayalu, 2013)。これらの生物が生息する環境ではキチンが生産され続けているが、顕著な蓄積が見られないことからキチンは生産されると同時に環境中で分解されていると考えられている (Gooday, 1990)。

一方で、キチンは水産加工の際に生じるエビ殻やカニ殻などの廃棄物に含まれており、様々な産業利用の可能性を持つ生物資源でもある (Dahiya *et al.*, 2006; Kurita, 2006; Wagnare & Ghosh, 2010a)。例えば、キチン分解産物であるキチンオリゴ糖や GlcNAc は医薬品や食品などとしての利用が期待されている。キチンオリゴ糖には抗腫瘍活性や抗酸化作用が知られている (Wang *et al.*, 2011)。また、GlcNAc は変形性関節症の改善効果や美肌効果が確認されており、さらに爽やかな甘味を持つことから機能性甘味料として期待されている (相葉, 2009)。キチンの分解は、キチン含有廃棄物の有効活用のための重要なステップの一つである。

キチナーゼはキチンの  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-グリコシド結合を加水分解する酵素の総称である。キチナーゼの基質分解様式には大きく分けて、基質内部のグリコシド結合をランダムに切断し 2 量体や 3 量体、4 量体のような様々な *N*-アセチルキトオリゴ糖を放出するエンド型と、基質末端から分解していくエキソ型がある (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Dahiya *et al.*, 2006)。キチナーゼは生物界に広く分布しており、細菌、古細菌、真菌、原生生物、動物、植物、

ウイルスから見つかっている (Gooday, 1997)。それぞれの生物におけるキチナーゼの役割は多様である。例えば、細菌や古細菌はキチンを栄養源として利用するためにキチナーゼを利用し、植物は生体構成成分としてキチンを持つ病原性の真菌に対する生体防御の一環としてキチナーゼを利用していると言われている (Dahiya *et al.*, 2006; Flach *et al.*, 1992; Gooday, 1997)。

キチナーゼを含む糖質加水分解酵素は、アミノ酸配列に基づいて 130 以上の糖質加水分解酵素 (Glycoside hydrolases; GH) ファミリーに分類されている (The Carbohydrate-Active Enzymes database, <http://www.cazy.org/>, Lombard *et al.*, 2014) が、これまでに調べられてきたキチナーゼの大部分は GH ファミリー 18 と 19 に分類される (Henrissat, 1991; Henrissat & Bairoch, 1993)。GH18 キチナーゼは細菌、古細菌、真菌、動物、植物、ウイルスで見つかっている (Karlsson *et al.*, 2009)。一方で GH19 キチナーゼは主に植物から見つかっており、他には一部の細菌などが有していることが知られている (Dahiya *et al.*, 2006)。両ファミリーに属するキチナーゼ間のアミノ酸配列には相同性がなく、立体構造も全く異なっており、進化的に起源が全く異なるものと考えられている (Prakash *et al.*, 2010, Suzuki *et al.*, 1999)。また、近年 GH ファミリー 23 や 48 に属するキチナーゼも報告された (Ueda *et al.*, 2009; Fujita *et al.*, 2006)。多くのキチナーゼは活性ドメインに糖質結合モジュール (Carbohydrate-binding module, CBM) などの機能ドメインが連結した複数のドメインから構成されていることが知られている (Adrangi & Faramarzi, 2013; Reguera & Leschine, 2003)。また、細菌由来キチナーゼにおいては活性ドメイン、CBM に加えてフィブロネクチンタイプ III 様ドメイン (Fibronectin III-like domain, FnIII) も含まれていることが多い (Suzuki *et al.*, 1999)。CBM の機能として、CBM が基質に吸着することで活性部位と基質を近づけ、近接した状態を維持することで、活性ドメインによる基質の分解を補助することが知られている (Guillén *et al.*, 2010)。一方で FnIII についてはキチナーゼによって異なる機能を持つことが示唆されている。例えば、基質への吸着へ関与している場合や、基質への吸着には関与していないが酵素全体の構造に影響を与えていることが示唆される場合がある (Vaaje-Kolstad *et al.*,



2013)。

## 1-2. 微生物由来キチナーゼ

キチナーゼは多様な生物から見つかっているが、特に微生物由来キチナーゼは、キチナーゼの環境中での役割と共に産業利用の観点からも注目されている。環境中で生産されたキチンの分解において微生物由来のキチナーゼは重要な役割を果たしていると考えられている (Gooday, 1997)。そして、近年キチン廃棄物からの GlcNAc やキチンオリゴ糖の生産などキチナーゼの産業利用が期待される中で (Dahiya *et al.*, 2006; Patil *et al.*, 2000; Shaikh & Deshpande, 1993)、産業用キチナーゼの供給源として微生物が注目を集めている (Felse & Panda, 2000)。

これまでに海洋や土壌、堆肥、温泉などの環境から分離された多様な微生物の有するキチナーゼが調べられてきた。例えば、古細菌では Crenarchaeota 門の *Sulfolobus tokodaii* str. 7 (Staufenberger *et al.*, 2012) や Euryarchaeota 門の *Thermococcus chitonophagus* DSM10152 (Andronopoulou & Vorgias, 2003)、細菌では Actinobacteria 門の *Streptomyces griseus* HUT 6037 (Tanabe *et al.*, 2000) や Bacteroidetes 門の *Rhodothermus marinus* PRI378 (Hobel *et al.*, 2005)、Firmicutes 門の *Paenibacillus* sp. FPU-7 (Itoh *et al.*, 2013)、Proteobacteria 門の *Serratia marcescens* 2170 (Suzuki *et al.*, 1999)、真菌では Ascomycota 門の *Penicillium* sp. LYG 0704 (Lee *et al.*, 2009) などが挙げられる (Table 1)。

微生物の中でも好熱性微生物は耐熱性キチナーゼの供給源となる。耐熱性酵素は、使用時に常温菌の混入を軽減できるといった産業利用上の利点がある (Haki & Rakshit, 2003)。これまでに好熱性微生物由来キチナーゼもいくつか調べられてきた。例えば、古細菌では *Sulfolobus tokodaii* str. 7 (Staufenberger *et al.*, 2012) や *Thermococcus chitonophagus* DSM10152 (Andronopoulou & Vorgias, 2003)、*Pyrococcus kodakaraensis* KOD1 (Tanaka *et al.*, 1999)、細菌では *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 (Tsujiibo *et al.*, 2000) や *Rhodothermus marinus* PRI378 (Hobel *et al.*, 2005)、*Bacillus licheniformis* JS (Waghmare & Ghosh, 2010a)、*Bacillus* sp.

MH-1 (Sakai *et al.*, 1998)、*Laceyella putida* JAM FM3001 (Shibasaki *et al.*, 2014)、*Ralstonia* sp. A-471 (Ueda *et al.*, 2005)、また真菌では *Chaetomium thermophilum* (Li *et al.*, 2010) や *Paecilomyces thermophila* J18 (Kopparapu *et al.*, 2012)、*Thermomyces lanuginosus* SY2 (Guo *et al.*, 2008) などが知られている (Table 1)。

一方で、環境中にはこれまでに分離、解析されていない微生物が大量に存在していると考えられている。例えば、2013年時点で記載されている細菌は約1万種であるが (Oren *et al.*, 2014)、土壌1gに5万種の細菌が存在しているとも言われている (Roesch *et al.*, 2007)。しかしながら、毎年数百種の新種細菌が記載されている (Oren *et al.*, 2014; List of Prokaryotic names, <http://www.bacterio.net/>) ことから、環境中には従来の方法で分離や培養が可能であるにも関わらず、これまでに分離されていない細菌も数多く存在していると考えられる。新規な細菌を自然界から分離するためには、新たな分離方法を試みることに加えて、従来の分離方法からのアプローチも有効であると思われる。環境中から新たなキチン分解微生物を分離し、そのキチナーゼを解析していくことは、キチン分解微生物やキチナーゼの多様性に関する知見の蓄積や多様な産業用キチナーゼの取得のために意義のあることと考えられる。

### 1-3. 細菌の同定と新種細菌の記載

分離した菌株が新規の菌株であるか知るためには同定作業が必要である。細菌の分類は、主に形態や生理・生化学的性状などの表現性状に基づいて行われてきた。1960年代以降、細胞構成成分を分類指標とする化学分類学や、DNA G+C 含量や DNA-DNA 相同性、16S rRNA 遺伝子塩基配列などの遺伝子情報が細菌の分類手法として取り入れられてきた (鈴木ら、2001)。「種」は細菌の分類においても基本的な単位であり、“DNA-DNA 相同性が70%以上であり、かつ $\Delta T_m$  値 (同一菌株同士のDNAが再会合したDNAと異なる菌株由来のDNAが再会合したDNAの融解温度の差)が5°C以下である菌株の集まり”と定義されている (Wayne *et al.*, 1987)。表現性状はこの遺伝子的な種の定義と一致するべきであ

るとされ、菌株を命名する際には既知種との表現性状の違いを示すことが推奨されている (Wayne *et al.*, 1987)。Stackebrandt と Goebel (1994) により、16S rRNA 遺伝子塩基配列相同性が 97.0% 未満の菌株同士の場合、DNA-DNA 相同性は 70% に満たないとの実験結果が報告された。この報告に基づき、16S rRNA 遺伝子塩基配列相同性が 97.0% 未満の菌株同士は DNA-DNA 相同性試験を行わず、97.0% 以上の相同性を持つ菌株同士の場合に DNA-DNA 相同性試験が行われるようになった。後に、DNA-DNA 相同性は 70% に満たないとされる 16S rRNA 遺伝子塩基配列相同性の値は 97.0% から 98.7% へと更新された (Stackebrandt & Ebers, 2006)。現在細菌の分類学研究では、遺伝子情報や表現性状といった多面的な方向から分類学的考察を行う多相分類学 (polyphasic taxonomy) が基本的な考え方となっている (Vandamme *et al.*, 1996)。未知の細菌を同定するためには、まず 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析により分類学的位置を絞り込む。そして、絞り込まれた分類群において分類指標として用いられている DNA G+C 含量や生理・生化学的性状などの性状を解析し、総合的に分類学的考察を行うことで分類学的位置が決定 (同定) される。

解析した細菌の帰属が既知の分類群に該当するものがなく、新規の分類群を提案することになった場合、国際原核生物分類命名委員会 (International Committee on Systematics of Prokaryotes, ICSP) が定める国際細菌命名規約に沿ってこの分類群の命名を行う。そして命名された新しい分類群は、ICSP の機関誌である *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* にその性状や新規性を記載した論文を掲載することで提案される。このとき、分類群の基準となる菌株を定め、この基準株を二カ国以上の微生物保存機関に寄託し、入手可能とすることが求められている (De Vos & Trüper, 2000)。

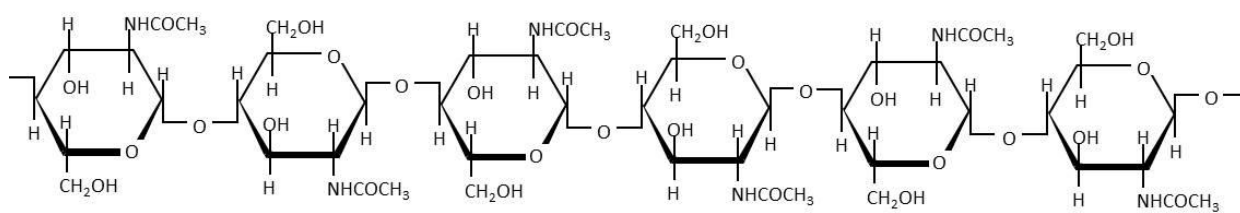
以上のように菌株を記載するにあたって、菌株の詳細な性質の報告と微生物保存機関への寄託が行われる。新たな菌株を記載することは、微生物の多様性に関する知見を広げることにつながる。また、寄託することにより菌株を研究材料や微生物資源としてより広く使用できるようになると思われる。したがって、新たな微生物を分離し記載することは、

微生物の多様性に関する知見の蓄積や、使用にあたって基礎となる重要なことであると考えられる。

#### 1-4. 本研究の目的

これまでに多様なキチン分解微生物が分離され、そのキチナーゼについて解析されてきたが、環境中には未だに分離されていない微生物が数多く存在していると考えられている。また、記載されている菌株のキチナーゼについて調べられた例は少ない。そこで、本研究ではキチン分解微生物とキチナーゼの多様性に関する知見を広げるとともに新たなキチナーゼ供給源を取得することを目指し、新規のキチン分解微生物を分離し、記載すること、そして分離株が有するキチナーゼの性質を明らかにすること、さらに分離株が有するキチナーゼ遺伝子を取得し、キチナーゼの構造を推定することを目的とした。ここでは、特に好熱性微生物に注目した。好熱性微生物由来酵素は高温で使用することができ、使用時に常温菌の混入を軽減できるといった産業利用上の利点があるため (Haki & Rakshit, 2003)、好熱性キチン分解微生物は産業用キチナーゼの供給源として有用なのではないかと思われる。

まず、新規の好熱性キチン分解微生物を取得するために、剪定枝堆肥から微生物の分離を試みた。分離株についてキチナーゼ活性の有無を調べるとともに多相分類学的解析による同定を行った。そして、分離株が有するキチナーゼの性質を調べるために、分離株の細胞外タンパク質からキチナーゼを精製した。精製キチナーゼについて分子量や基質分解様式などを解析した。さらに、精製キチナーゼをコードする遺伝子の取得を試みた。得られた DNA の塩基配列から精製キチナーゼのアミノ酸配列を推定した。そして、推定アミノ酸配列に基づいて既知のアミノ酸配列との比較およびドメイン構造の推定を行った。



**Fig. 1.** Structure of chitin.

**Table 1.** Example of chitinase-producing microbes.

Microbes	Phylum	Domain	Reference
<i>Sulfolobus tokodaii</i> str. 7 *	Crenarchaeota	Archaea	Staufenberger <i>et al.</i> , 2012
<i>Thermococcus chitonophagus</i> DSM10152 *	Euryarchaeota	Archaea	Andronopoulou & Vorgias, 2003
<i>Pyrococcus kodakaraensis</i> KOD1*	Euryarchaeota	Archaea	Tanaka <i>et al.</i> , 1999
<i>Sanguibacter antarcticus</i> KOPRI 21702	Actinobacteria	Bacteria	Park <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces griseus</i> HUT 6037	Actinobacteria	Bacteria	Tanabe <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520 *	Actinobacteria	Bacteria	Tsujibo <i>et al.</i> , 2000
<i>Microbispora</i> sp. V2	Actinobacteria	Bacteria	Nawani <i>et al.</i> , 2002
<i>Oerskovia xanthineolytica</i> NCIM 2839	Actinobacteria	Bacteria	Waghmare & Ghosh, 2010b
<i>Rhodothermus marinus</i> PRI378 *	Bacteroidetes	Bacteria	Hobel <i>et al.</i> , 2005
<i>Bacillus cereus</i> YQ 308	Firmicutes	Bacteria	Chang <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus licheniformis</i> JS *	Firmicutes	Bacteria	Waghmare & Ghosh, 2010a
<i>Bacillus subtilis</i> W-118	Firmicutes	Bacteria	Wang <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus</i> sp. MH-1 *	Firmicutes	Bacteria	Sakai <i>et al.</i> , 1998
<i>Laceyella putida</i> JAM FM3001 *	Firmicutes	Bacteria	Shibasaki <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus</i> sp. D1	Firmicutes	Bacteria	Singh & Chhatpar, 2011
<i>Paenibacillus</i> sp. FPU-7	Firmicutes	Bacteria	Itoh <i>et al.</i> , 2013
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> KJA-424	Firmicutes	Bacteria	Jung <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus pasadenensis</i> NCIM 5434	Firmicutes	Bacteria	Loni <i>et al.</i> , 2014
<i>Aeromonas hydrophila</i> JP101	Proteobacteria	Bacteria	Chen <i>et al.</i> , 1991
<i>Alteromonas</i> sp. strain O-7	Proteobacteria	Bacteria	Orikoshi <i>et al.</i> , 2005
<i>Moritella marina</i> ATCC 15381	Proteobacteria	Bacteria	Stefanidi & Vorgias, 2008
<i>Ralstonia</i> sp. A-471 *	Proteobacteria	Bacteria	Ueda <i>et al.</i> , 2005
<i>Serratia marcescens</i> 2170	Proteobacteria	Bacteria	Suzuki <i>et al.</i> , 1999
<i>Vibrio alginolyticus</i> 283	Proteobacteria	Bacteria	Suginta, 2007
<i>Chaetomium thermophilum</i> *	Ascomycota	Eukaryota	Li <i>et al.</i> , 2010
<i>Paecilomyces thermophila</i> J18 *	Ascomycota	Eukaryota	Kopparapu <i>et al.</i> , 2012
<i>Penicillium</i> sp. LYG 0704	Ascomycota	Eukaryota	Lee <i>et al.</i> , 2009
<i>Trichoderma harzianum</i> T198	Ascomycota	Eukaryota	Deane <i>et al.</i> , 1998
<i>Thermomyces lanuginosus</i> SY2 *	Ascomycota	Eukaryota	Guo <i>et al.</i> , 2008

\* thermophiles

## 2. 材料および方法

## 2. 材料および方法

### 2-1. 新規の好熱性キチン分解細菌 TC22-2b 株の分離および多相分類学的解析

#### 2-1-1. キチン分解細菌 TC22-2b 株の分離

##### 2-1-1-1. TC22-2b 株の分離

本研究に用いた TC22-2b 株は 2008 年に栃木県内の剪定枝処理場（有）野口農産において堆積発酵されていた堆肥から分離された。堆肥は剪定枝の他、葉、樹皮、ソバガラから構成されており、（有）野口農産の許可を得て採取した。採取時の堆肥の温度は 55°C であった。TC22-2b 株は 50°C にて Luria–Bertani (LB) 固体培地 [LB ブロス (Sigma-Aldrich) を 1.5% 寒天で固化した培地] 上で培養され、シングルコロニーアイソレーションを繰り返すことにより純粋培養された。

##### 2-1-1-2. コロイダルキチンの調製

Hirano & Nagao (1988) の方法に一部変更を加えて、キチン粉末 (chitin, practical grade, powder; C7170; Sigma-Aldrich) からコロイダルキチンを作製した。具体的な方法は以下の通りである。まず、氷上にて 80% (w/w) メタンサルホン酸 100 g を攪拌しながらキチン粉末 1.0 g を少量ずつ加えた。約 1.5 時間攪拌した後、混合液をガラス繊維ろ紙 (GF/D; Whatman) を用いて吸引ろ過した。氷上でミリ Q 水約 600 mL を攪拌しながら、ろ液をゆっくりと加えた。懸濁液を 4°C にて一晩静置した後、遠心分離 (4°C、10000 ×g、10 min) によりコロイダルキチンを回収した。回収したコロイダルキチンは pH が中性になるまでミリ Q 水で繰り返し洗浄した。洗浄したコロイダルキチンをミリ Q 水に懸濁させ、4°C にて保存した。また、懸濁液を一部抜き取り、乾燥重量を測定することにより懸濁液のコロイダルキチン濃度を算出した。



### 2-1-1-3. キチン分解活性試験

キチン分解活性の有無を確認するために、TC22-2b 株をコロイダルキチン寒天培地 [pH を 7.8 に調整した modified Brock's basal salts (MBS) (Kurosawa *et al.*, 1998、Appendix 1) に 0.3% コロイダルキチンおよび 0.2% 酵母エキスを加え、1.5% 寒天で固化した培地] に接種し、50°C で 3 日間培養した。培養後にコロニーの周辺のコロイダルキチンが分解され、クリアゾーンの形成が見られた場合にはキチナーゼ活性陽性と判断した。

### 2-1-2. TC22-2b 株の多相分類学的解析

TC22-2b 株について多相分類学的解析を行い、その結果に基づいて本菌株を同定した。同定のための解析項目は、“The minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria” (Logan *et al.*, 2009) を参考にして決定した。

#### 2-1-2-1. 菌株および培養条件

TC22-2b 株は微生物保存機関である German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) および Japan Collection of Microorganisms (JCM) に寄託保存された (寄託番号 DSM 26310 および JCM 18657)。なお、本菌株は、pH を 7.8 に調整した MBS にグルコースおよび酵母エキスを 0.05% ずつ加えた培地 (MBS-GY 培地)、あるいは MBS に酵母エキスを 0.1% 加えた培地 (MBS-0.1Y 培地)、あるいは MBS に酵母エキスを 0.5% 加えた培地 (MBS-0.5Y 培地) を用いて培養した。固体培地を用いる場合には、各培地に寒天を 1.5% 添加した。

各種表現性状の比較実験には、National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center (NBRC) から分譲された *Paenibacillus elgii* SD17<sup>T</sup> 株 (=NBRC 100335<sup>T</sup> 株) および *Paenibacillus validus* JCM 9077<sup>T</sup> 株 (=NBRC 15382<sup>T</sup> 株)、JCM から分譲された *Paenibacillus hodogayensis* SG<sup>T</sup> 株 (=JCM 12520<sup>T</sup> 株)、DSMZ から分譲された *Paenibacillus ginsengarvi* Gsoil 139<sup>T</sup> 株 (=DSM 18677<sup>T</sup> 株) を用いた。これらの比較対照菌

株は TC22-2b 株と同様の培地を用いて培養した。

#### 2-1-2-2. 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析

TC22-2b 株を MBS-GY 培地を用いて 50°C にて対数増殖期後期まで培養した。液体培養液を遠心分離 (25°C、10000 rpm、10 min) することにより菌体を回収し、−25°C にて冷凍保存した。保存した菌体を TE 溶液 (pH 8) に懸濁し、Triton X-100 を 0.1% になるように加えて攪拌した後、70°C で 5 分間インキュベートした。そして、DNA 抽出機 (Magstration System 12GC、Precision System Science Co., LTD.) を用いて DNA の抽出を行った。

次に、抽出した DNA を鋳型として PCR 法により 16S rRNA 遺伝子を増幅した。PCR 反応液は、各プライマー 25 pmol、*Taq* DNA ポリメラーゼ 1.25 U (Pre-mix version、TAKARA BIO) および鋳型 DNA を含み、反応液の体積が 50  $\mu$ L になるように滅菌ミリ Q 水を加えた。PCR プライマーには、細菌のユニバーサルプライマーである B27F (forward; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', positions 8–27 based on *Escherichia coli* numbering) および U1492RM (reverse; 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3', positions 1510–1492 based on *E. coli* numbering) を用いた。PCR は以下のサーマルサイクルで行った：熱変性 94°C 3 分；熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 61°C 30 秒、伸長 72°C 2 分を 30 サイクル；最終伸長 72°C 5 分。増幅した DNA の塩基配列決定はユーロフィンジェノミクス株式会社に委託した。決定した TC22-2b 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を国際塩基配列データベース (GenBank/EMBL/DDBJ) に登録した (アクセッション番号 AB738878)。

TC22-2b 株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列 (1474 bp) を BLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>, Altschul *et al.*, 1990) を用いて GenBank データベース内の既知の配列と比較し、本菌株と相同性が高い近縁な細菌群を絞り込んだ。そして、近縁な細菌群の基準株と本菌株とのペアワイズ相同性を FASTA プログラム (Lipman & Pearson, 1985) を用いて算出した。そして、本菌株および近縁な細菌群の基準株の 16S rRNA 遺伝子塩基配列を CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) を用いてアラインメントし、近隣結合

法 (Saitou & Nei, 1987)、最節約法 (Fitch, 1971) および最尤法 (Felsenstein, 1981) により系統樹を作成した。系統樹の作成には総合的遺伝子解析用ソフトウェアである MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011) を用いた。近隣結合法における塩基置換モデルには Kimura's two-parameter model (Kimura, 1980) を用いた。また、系統樹の分岐パターンをブートストラップ法 (Felsenstein, 1985) により評価した。近隣結合法については 1000 回、最節約法については 1000 回、最尤法については 100 回の繰り返しによるブートストラップ解析を行った。

#### 2-1-2-3. ゲノム DNA の G+C 含量の解析

TC22-2b 株の DNA を 2-1-2-2 と同様の方法で抽出した。抽出した DNA 溶液には RNA も含まれていたため、RNase A を 0.02% (w/v) 加え、37°C にて 4 時間インキュベートした。そして、フェノールクロロホルム抽出によりタンパク質を除去し、核酸が含まれる上層を回収した。続いて、エタノール沈殿により DNA を回収し、TE 溶液に溶解した。さらに DNA-TE 溶液を PEG (ポリエチレングリコール) 沈殿により精製し、回収した DNA を滅菌ミリ Q 水に溶解し、DNA 溶液サンプルとした。

精製した DNA 溶液サンプルを用いて、DNA G+C 含量を Noguchi *et al.*, (1988) の方法にしたがって高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により解析した。ヌクレアーゼ P1 および HPLC 用標準デオキシヌクレオチド標準物質には DNA-GC キット (ヤマサ醤油) を用いた。HPLC に使用したカラムは 5C18-PAQ 4.6mmI.D.×150mm (COSMOSIL) であり、移動相としては 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いた。

#### 2-1-2-4. 形態観察

TC22-2b 株を MBS-GY 培地を用いて 50°C で培養し、培養液中の細胞の形態および内生孢子形成を位相差顕微鏡 (Axioskop 40; Carl Zeiss) を用いて観察した。また、TC22-2b 株を MBS-GY 寒天培地に画線し、50°C で培養し肉眼にてコロニー形態を観察した。細胞の運動

性を観察するために、0.4%の寒天を含む半流動 MBS-GY 培地を用いて菌体を穿刺培養した。穿刺部分のみに菌体の増殖が見られた場合は運動性なし、穿刺部分以外にも菌体の広がりが観察された場合は運動性ありと判断した。グラム反応試験は、対数増殖期の細胞を用いてグラム染色および KOH 法により行った。グラム反応試験では、対照菌株としてグラム陽性細菌である *Bacillus subtilis* およびグラム陰性細菌である *Escherichia coli* を用いた。グラム染色は Gram stain kit (Becton Dickinson) を用いて、説明書の通りに行った。KOH 法は Buck (1982) の方法に従って行った。

#### 2-1-2-5. 生理・生化学的性状の解析

嫌気条件下での生育試験を行うために、液体培養液を MBS-GY 寒天培地に接種して、酸素吸収・二酸化炭素発生剤 (アネロパック・ケンキ、三菱ガス化学株式会社) とともに密閉容器 (アネロパック角型ジャー、三菱ガス化学株式会社) に入れ、50°C でインキュベートした。TC22-2b 株の生育に対する温度依存性を調べるために、対数増殖期の培養液を MBS-GY 培地に接種し、20、25、34、40、50、55、58、60°C にて8日間振盪培養した。また、生育に対する pH 依存性を調べるために、pH を 5、6、7、8、9、10 に調整した MBS-GY 培地に培養液を接種し、8日間振盪培した。なお、pH の調整は 50% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> あるいは 1 M NaOH の添加により行った。そして、増殖に対する NaCl 濃度の影響を調べるために、NaCl を 0–4.0% (w/v) 加えた (0.5% 間隔) MBS-GY 培地に培養液を接種し、8日間振盪培した。分光光度計 (SPECTRONIC 20D+, Spectronic Instruments) を用いて各系列の培養液の 600 nm における光学密度 (Optical Density, OD) を測定し、増殖曲線を作成した。

MBS-0.1Y 培地を用いた培養液を遠心分離することにより集めた菌体を用いてカタラーゼ活性およびオキシダーゼ活性試験を行った。カタラーゼ活性の有無を調べるために、菌体に 3% (w/v) 過酸化水素水を滴下し、気泡が発生の有無を観察した。気泡が発生した場合はカタラーゼ活性陽性、発生しなかった場合はカタラーゼ活性陰性である。一方で、オキシダーゼ活性試験は Oxidase Strips (Polysciences) を用いて説明書の通りに行った。デンプ

ンおよびカゼイン分解活性試験は、各基質を 0.1% 含む MBS-0.1YE 寒天培地を用いて Barrow & Feltham (1993) の方法にしたがって行った。Tween 80 分解活性、Voges-Proskauer 試験、メチルレッド試験、H<sub>2</sub>S 生産性は Barrow & Feltham (1993) の方法にしたがって調べた。硝酸還元、インドール生産、アルギニンデヒドロラーゼ活性、ウレアーゼ活性、エスクリン分解活性、ゼラチン分解活性および各種炭水化物資化性について API 20 NE system (bioMérieux) を用いて説明書の通りに試験した。各種炭水化物からの酸産生試験を API 50 CHB system (bioMérieux) を用いて説明書の通りに行った。

#### 2-1-2-6. 化学分類学的性状の解析

化学分類学的性状として、菌体脂肪酸組成、イソプレノイドキノン分子種、細胞壁ジアミノ酸異性体型、リン脂質分子種を調べた。各解析には、MBS-0.5YE 培地を用いた培養液を遠心分離 (25°C, 16000 ×g, 10 min) して回収した菌体を用いた。

脂肪酸組成の解析には、TC22-2b 株は 50°C、比較対照株は 30°C にて対数増殖期まで培養した菌体を用いた。菌体に含まれる脂肪酸を 315°C にて水酸化テトラメチルアンモニウムにより誘導体化した。得られた脂肪酸メチルエステルを GC/MS (6850 Network GC system および 5975CVL-MSD with a Triple-Axis Detector; Agilent) により解析した。イソプレノイドキノンの抽出は鈴木らの方法に従った (鈴木ら、2001)。イソプレノイドキノンの分析は fast atom bombardment MS (EI/FAB mate BU25 ; 日本電子) を用い、ネガティブモードでジエタノールアミンをマトリックスとし、測定を行った。細胞壁のペプチドグリカンに含まれるジアミノ酸の異性体型を Staneck & Roberts (1974) の方法にしたがって、薄層クロマトグラフィー (TLC) により解析した。TLC には、TLC cellulose glass plate (Merck) を用いた。また、菌体中のリン脂質を Minnikin *et al.*, (1984) の方法にしたがって、二次元 TLC により解析した。二次元 TLC には、TLC silica gel 60 F<sub>254</sub> Aluminium sheets (Merck) を用いた。

## 2-2. *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株由来キチナーゼ (*PthChiA*) の精製と解析

### 2-2-1. キチナーゼ活性測定

キチナーゼ活性は、コロイダルキチンを基質として測定した。反応液は 0.5% コロイダルキチン、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) および酵素溶液からなる。反応液を 60°C にて 10 分間インキュベートし、キチナーゼによるコロイダルキチンの分解により放出された還元糖量を Shales' 変法 (Imoto & Yagishita, 1971) にしたがって測定した。キチナーゼ活性 1 unit は、1 分間当たり 1  $\mu\text{mol}$  の *N*-アセチルグルコサミンに相当する還元糖を生成する酵素量と定義した。

### 2-2-2. タンパク質の定量

タンパク質の濃度は BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce) を用いて説明書の通りに測定した。検量線は 0-1.0 mg mL<sup>-1</sup> のウシ血清アルブミンを用いて作成した。

### 2-2-3. キチナーゼの精製

200 mL 三角フラスコに TC22-2b 株および 50 mL の MBS-YC 培地 [MBS (pH 7.8) に 0.2% 酵母エキスおよび 0.3% コロイダルキチンを加えた培地] を加え、50°C にて振盪培養した。5 日間の培養後、細胞を取り除くために、培養液を遠心分離 (4°C、12000  $\times g$ 、15 min) し、さらに上清をフィルターシステム (filter system 0.22  $\mu\text{m}$  PES, Corning) を用いてろ過した。ろ液に 80% 飽和量となる硫酸アンモニウムを加え、タンパク質を 4°C にて一晩沈殿させた。タンパク質の沈殿を遠心分離 (4°C、15000  $\times g$ 、15 min) により回収し、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) に溶解し、同様の緩衝液に対して一晩透析した。コロイダルキチンへの吸着 (Roberts & Cabib, 1982) によるキチナーゼの精製を行うため、透析したタンパク質溶液をコロイダルキチンと混合した [2.5 mg コロイダルキチン (mg タンパク質)<sup>-1</sup>]。氷上で 1 時間おだやかに振盪した後、コロイダルキチンを遠心分離 (4°C、12000  $\times g$ 、10 min) により

回収した。回収したコロイダルキチンを 0.5 M NaCl を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) で 3 回洗浄した後、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) に懸濁した。吸着した酵素によりコロイダルキチンを分解させるために懸濁液を 50°C でインキュベートした。50 時間インキュベート後、コロイダルキチン懸濁液を遠心分離 (4°C、12000 ×g、10 min) し、上清を回収した。回収した上清を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) で平衡化した DEAE Sepharose Fast Flow カラム (1.5 × 9.6 cm; GE Healthcare) にアプライし、同緩衝液で溶出を行った。5 mL のフラクションを回収し、キチナーゼ活性測定を行った。キチナーゼ活性を示したフラクションを一つにまとめ、キチナーゼの性質解析に用いた。

#### 2-2-4. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

キチナーゼの分子量を推定するために SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE に用いた分離ゲルの組成は、375 mM Tris (pH 8.8)、10% ポリアクリルアミド、0.1% SDS であり、濃縮ゲルの組成は 125 mM Tris (pH 6.8)、5% ポリアクリルアミド、0.1% SDS である。タンパク質溶液を gel loading buffer (Sambrook *et al.*, 1989) と混合した後、100°C で 3 分間加熱し、ゲルにアプライした。電気泳動は、Sambrook *et al.*, (1989) の方法にしたがって行った。電気泳動終了後、銀染色 II キットワコー (和光純薬) を用いて銀染色を行いタンパク質のバンドを検出した。

#### 2-2-5. N 末端アミノ酸配列の解析

50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) に溶解してある精製キチナーゼをミリ Q 水で一晩透析し、N 末端アミノ酸配列解析用のサンプルとした。N 末端アミノ酸配列解析については、株式会社ニッピに委託し、Procise 492 HT プロテインシーケンサー (Applied Biosystems) を用いた pulsed liquid エドマン分解法により行われた。

#### 2-2-6. キチナーゼ活性および安定性に対する温度の影響の解析

キチナーゼ活性に対する温度の影響を調べるために、キチナーゼ活性測定を 30–80°C (10°C 毎) で行った。一方、キチナーゼの熱安定性を調べるために、キチナーゼを 30、40、50、60、70 あるいは 80°C で 2 時間インキュベートした後にキチナーゼ活性を測定し、各温度でのインキュベート後の残存活性を算出した。すべての活性測定はトリプリケートで行った。

#### 2-2-7. キチナーゼ活性および安定性に対する pH の影響の解析

キチナーゼ活性に対する pH の影響を調べるために、以下の緩衝液を用いて pH 3–10 でキチナーゼ活性測定を行った：50 mM クエン酸緩衝液 (pH 3、4、5、6)、50 mM リン酸緩衝液 (pH 6、7、8)、50 mM ホウ酸緩衝液 (pH 8、9、10)。また、キチナーゼの安定性に対する pH の影響を調べるために、キチナーゼを 30°C にて上記の緩衝液中で 2 時間インキュベートした後にキチナーゼ活性を測定し、残存活性を算出した。すべての活性測定はトリプリケートで行った。

#### 2-2-8. 反応速度論的解析

反応速度論的解析では *p*-ニトロフェニル *N,N'*-ジアセチル- $\beta$ -D-キトビオシド [*p*NP-(GlcNAc)<sub>2</sub>; Sigma-Aldrich] を基質としてキチナーゼ活性測定を行った。反応液は 0.25–3.0 mM *p*NP-(GlcNAc)<sub>2</sub>、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) および 4.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (0.1  $\mu\text{M}$ ) 精製キチナーゼからなる。反応液を 60°C にて 10 分間インキュベートして酵素反応を行った後、反応液の 1/2 量の 1 M NaOH を加えることにより反応を停止した。405 nm における反応液の吸光度を測定し、遊離した *p*-ニトロフェノールを定量した。 $K_m$  および  $V_{max}$  の値は Lineweaver–Burk プロットから算出した。 $k_{cat}$  は  $V_{max}$  および反応液の酵素濃度から算出した。活性測定はトリプリケートで行った。



#### 2-2-9. キチナーゼの加水分解産物の解析

精製キチナーゼによる *N, N'*-ジアセチルキトビオース (G2)、*N, N', N''*-トリアセチルキトトリオース (G3)、*N, N', N'', N'''*-テトラアセチルキトテトラオース (G4)、*N, N', N'', N''', N''''*-ペンタアセチルキトペンタオース (G5) (生化学バイオビジネス)、*N, N', N'', N''', N''''*, *N'''''*-ヘキサアセチルキトヘキサオース (G6) (Tronto Research chemicals) およびコロイダルキチン分解産物を TLC によって解析した。各分子量の *N*-アセチルキトオリゴ糖の分解産物の解析のため、2 mM 基質、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) およびキチナーゼからなる反応液を 50°C にて 24 時間インキュベートした。そして、各反応液に含まれる糖質を Tanaka *et al.*, (1999) の方法にしたがって TLC により解析した。TLC には TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> Aluminium sheets (Merck) を用いた。一方、コロイダルキチン分解産物を解析するために、0.5% コロイダルキチン、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) およびキチナーゼからなる反応液を 50°C にて 24 時間インキュベートした。そして、反応液を遠心分離 (4°C、15000 ×g、3 min) し、上清を回収し TLC により分解産物を解析した。TLC の方法は上記の通りである。なお、ネガティブコントロールとしてキチナーゼを加えていない反応液も同様の方法により解析した。

## 2-3. *PthChiA* 遺伝子の増幅と分子構造の推定

### 2-3-1. *PthChiA* 遺伝子断片の増幅と塩基配列の解析

*PthChiA* 遺伝子断片を増幅するため、ゲノム DNA を鋳型として縮重プライマーを用いた PCR を行った。フォワードプライマーとして *PthChiA* の N 末端アミノ酸配列に基づいて設計した PtChi48-F5 (5'-GCNGTNTCCACGGGCAA AAA-3') を実験に用いた。また、リバースプライマーとして、GenBank から集めた耐熱性キチナーゼおよび Firmicutes 門細菌由来キチナーゼ (いずれも GH ファミリー18 キチナーゼ) のアミノ酸配列保存領域の塩基配列 (Fig. 2) に基づいて設計した TGH 18-R2 (5'-GGRTAYTCCCAGTCNAKRTCNA-3') を用いた。PCR 反応液は、フォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ 50 pmol、*TaKaRa Ex Taq* DNA ポリメラーゼ 0.625 U (Premix Taq、TAKARA BIO) および鋳型 DNA を含み、反応液の体積が 25  $\mu$ L になるように滅菌ミリ Q 水を加えた。PCR は以下のサーマルサイクルで行った：熱変性 94°C 3 分；熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 53°C 30 秒、伸長 72°C 2 分を 30 サイクル；最終伸長 72°C 5 分。PCR 産物を 2% アガロースゲルを用いて電気泳動した後、約 350 bp のバンドを切り出し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) を用いて精製した。精製した PCR 産物の塩基配列決定はユーロフィンジェノミクス株式会社に委託した。

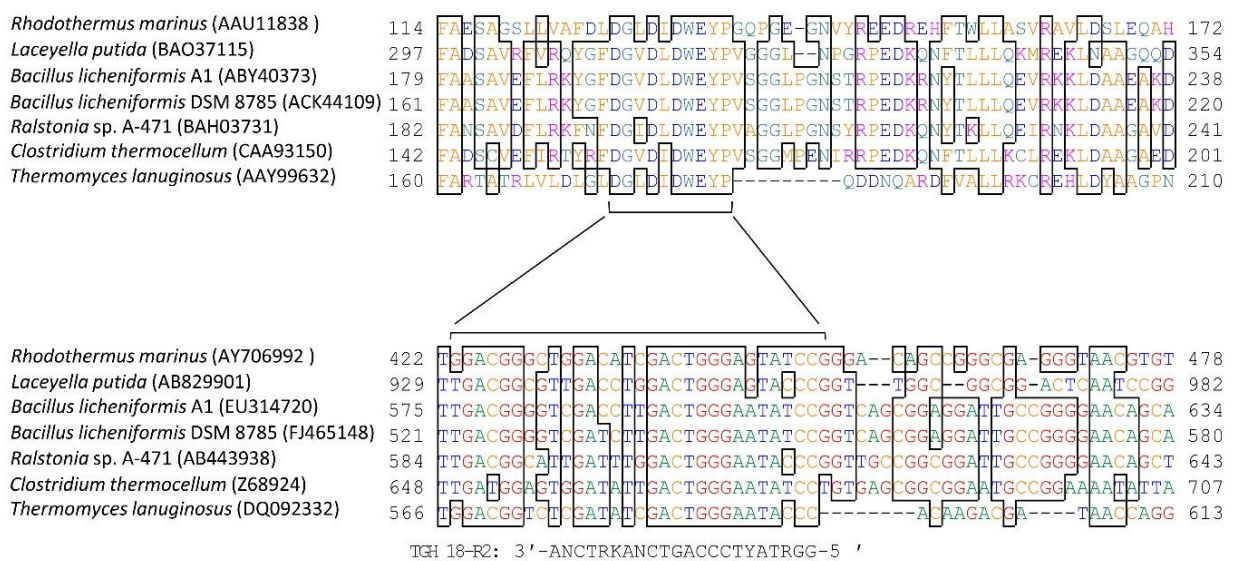
### 2-3-2. *PthChiA* 遺伝子断片の隣接領域の増幅と塩基配列の解析

「2-3-1」で取得した *PthChiA* 遺伝子断片の隣接領域を増幅するために以下の手順によりインバース PCR を行った。まず、ゲノム DNA を断片化するために制限酵素処理を行った。制限酵素反応液は、ゲノム DNA 約 120 ng および制限酵素 1  $\mu$ L、10  $\times$ 制限酵素緩衝液 2  $\mu$ L を含み、体積が 20  $\mu$ L になるように滅菌ミリ Q 水を加えて調製した。制限酵素として *Acc* I、*Apa* I、*Bam*H I、*Bsp*T107 I、*Bss*H II、*Eco*R I、*Hind* III、*Pst* I あるいは *Xho* I を用いた。反応液を各制限酵素の最適温度でインキュベートした後、制限酵素を失活させるために反応液

を 70°C で 15 分間加熱し、GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) を用いて精製した。精製した DNA 断片をセルフライゲーションさせるために、DNA 断片 15 μL (精製した反応液全量) と Ligation high Ver.2 (TOYOBO) 15 μL を混合し、16°C で 12~16 時間インキュベートした。インキュベート後、ライゲーション反応液を GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) を用いて精製し、PCR の鋳型とした。PCR 反応液は、鋳型 6 μL、フォワードプライマーおよびリバースプライマーをそれぞれ 12.5 pmol および *TaKaRa Ex Taq* DNA ポリメラーゼ 0.625 U (Premix Taq、TAKARA BIO) を含み、反応液の体積が 25 μL になるように滅菌ミリ Q 水を加えた。なお、PCR プライマーには *PthChiA* 遺伝子断片の塩基配列に基づいて設計した PtChi48-225F (forward; 5'-GCAGAAGGTGCTCATCTCCGTCGGA-3') および PtChi48-113R (reverse; 5'-AACGACATGTTGCCGCTGGAGGCTC-3') を用いた。PCR は以下のサーマルサイクルで行った: 熱変性 94°C 3 分; 熱変性 94°C 30 秒、アニーリング 60°C 30 秒、伸長 72°C 2.5 分を 30 サイクル; 最終伸長 72°C 10 分。PCR のネガティブコントロールとして制限酵素処理していないゲノム DNA を鋳型として用いた。塩基配列決定はユーロフィンジェノミクス株式会社に委託した。

### 2-3-3. *PthChiA* のアミノ酸配列およびドメイン構造の推定

「2-3-1」および「2-3-2」で取得した塩基配列から Genetyx を用いてアミノ酸配列を推定した。推定アミノ酸配列について Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>; Petersen *et al.*, 2011) を用いてシグナルペプチドの有無を、Pfam (<http://pfam.xfam.org/>; Finn *et al.*, 2014) によりドメイン構造を推定した。そして、BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いてデータベース上のアミノ酸配列と比較し、既知の配列との相同性を算出した。



**Fig. 2.** Design of degenerate primer

### 3. 結果

### 3. 結果

#### 3-1. 多相分類学的解析による TC22-2b 株の同定および記載

TC22-2b 株はコロイダルキチン寒天培地上でクリアゾーンを形成したことからキチン分解活性を有していることが分かった。そこで TC22-2b 株について DNA 解析および表現性状（形態、生理・生化学的性状、化学分類学的性状）の解析を合わせた多相分類学解析により同定し、新種細菌として命名および記載を行った。

##### 3-1-1. 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統学的位置付け

GenBank データベースに登録されている DNA 塩基配列（記載されている基準株、未記載株、未培養株など）に対して相同性検索を行い、ペアワイズ相同性を算出した結果、TC22-2b 株は *Bacillus* sp. YNPRH6P-1 株 (Norris *et al.*, 2002) と最も高い相同性 (99.3%) を示した。*Bacillus* sp. YNPRH6P-1 株は、アメリカ合衆国のイエローストーン国立公園内の Ragged Hills にある土壌から 50°C で分離された菌株である。*Bacillus* sp. YNPRH6P-1 株は、表現性状の報告がされておらず、TC22-2b 株との表現性状の比較を行うことはできなかった。

次に、記載されている細菌基準株との相同性検索を行った結果、TC22-2b 株は *Paenibacillus elgii* SD17<sup>T</sup> 株と最も高い相同性 (93.4%) を示した (Table 2)。原核生物において、16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性が 98.7% 以上の場合に同種である可能性が高いことが報告されており (Stackebrandt & Ebers, 2006)、TC22-2b 株は既知種とは異なる新種の細菌である可能性が高いことが示された。また、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析の結果、TC22-2b 株は *Paenibacillus* 属のクラスター内に位置し (Fig. 3)、*Paenibacillus hodogayensis* および *Paenibacillus ginsengarvi* とクラスターを形成した。なお、最節約法 (Fitch, 1971) および最尤法 (Felsenstein, 1981) により作成した系統樹においても TC22-2b 株は *Paenibacillus* 属のクラスター内に位置し、本菌株が *Paenibacillus* 属に属することが確認さ

れた。

### 3-1-2. ゲノム DNA の G+C 含量

TC22-2b 株の DNA の G+C 含量は 59.1 mol%であった。これまでに記載されている *Paenibacillus* 属細菌の DNA G+C 含量は 39.0-63.4 mol%であり (Appendix 2)、本菌株の値はこの範囲内であった。

### 3-1-3. 形態

対数増殖期の TC22-2b 株は、短径 0.6–0.8  $\mu\text{m}$ 、長径 2.4–5.6  $\mu\text{m}$  の桿菌であった (Fig. 4a)。培養を継続すると偏在性で膨張した孢子嚢内に楕円形の内生孢子の形成が観察された (Fig. 4b)。また、TC22-2b 株を MBS-GY 寒天培地上で 50°C にて 20 時間培養した結果、直径 1–2 mm、白色、不透明、円形、スムーズ、隆起がなく光沢のあるコロニーが形成された (Fig. 5)。グラム染色および KOH 試験のいずれの結果もグラム反応陽性であった。半流動培地において運動性が確認された。いずれの観察結果も *Paenibacillus* 属細菌に一般的に見られる形態であった (Priest, 2009)。

### 3-1-4. 生理・生化学的性状

TC22-2b 株は嫌気条件下では増殖せず、好気条件下でのみ増殖が見られる偏性好気性細菌であった。本菌株は 50°C および 55°C で増殖が速く OD が高かったことから、至適生育温度 50–55°C の好熱菌であることがわかった (Fig. 6a)。また、25–58°C では増殖が見られたが、20°C および 60°C では増殖が確認されなかった (Fig. 6a, 6b)。一方で、本菌株の生育 pH 範囲は pH 6–9 (至適生育 pH 7–8) であり、pH 5 および pH 10 においては増殖が確認されなかった (Fig. 7a, 7b)。また、TC22-2b 株は NaCl を 0-3.5% (w/v) 加えた MBS-GY 培地では増殖したが、NaCl が 4% (w/v) 以上の条件では増殖が見られなかった (Fig. 8)。

TC22-2b 株のカタラーゼおよびオキシダーゼ活性は陽性であった。また、加水分解能に

については、デンプン分解は陽性であったが、カゼイン分解は陰性であった。また、Tween 80 寒天培地上では増殖しなかった。Voges-Proskauer 試験は、弱陽性であった。メチルレッド試験は陰性であった。H<sub>2</sub>S 生産性は陰性であった。API 20 NE を用いた各種生化学的性状試験の結果、硝酸還元、インドール生産、アルギニンデヒドロラーゼ活性、ウレアーゼ活性、エスクリン分解活性、ゼラチン分解活性は陰性であった。また、D-マンニトールおよびマルトースの資化性は陽性であり、D-グルコースおよび D-マンノース、GlcNAc の資化性は弱陽性であったが、以下の基質の資化性は陰性であった：L-アラビノース、グルコン酸、カプロン酸、アジピン酸、リンゴ酸、クエン酸、酢酸フェニル。API 50 CHB による酸産生試験の結果、D-マンニトール、メチル  $\alpha$ -D-グルコピラノシド、GlcNAc、アミグダリン、D-セロビオース、D-マルトース、D-メリビオース、D-スクロース、D-トレハロース、D-ラフィノース、デンプン、グリコーゲン、ゲンチビオース、D-ツラノースからの酸産生は陽性であり、メチル  $\beta$ -D-キシロピラノシド、D-グルコース、D-フルクトース、D-マンノース、L-ラムノース、サリシン、5-ケトグルコン酸では弱陽性であり、グリセロール、エリスリトール、アラビノース、D-リボース、キシロース、アドニトール、D-ガラクロース、L-ソルボース、ズルシトール、イノシトール、D-ソルビトール、メチル  $\alpha$ -D-マンノピラノシド、アルブチン、D-ラクトース、イヌリン、D-メレジトース、キシリトール、D-リキソース、D-タガトース、フコース、アラビトール、グルコン酸、2-ケトグルコン酸では陰性であった (Table 3)。

TC22-2b 株と近縁種で比較した生理・生化学的性状を Table 4 に示した。すべての性状が一致する菌株はなかった。特に顕著な違いが見られた性状は生育温度であった。TC22-2b 株が 55°C で増殖するのに対し、いずれの近縁種も同温度での増殖が確認されなかった。以上の結果から TC22-2b 株の生理生化学的性状は近縁種と異なることが示された。

### 3-1-5. 化学分類学的性状

TC22-2b 株の細胞に含まれる主要な脂肪酸は n-C<sub>16:0</sub> (25.5%)、iso-C<sub>16:0</sub> (23.6%)、



anteiso-C<sub>15:0</sub> (21.5%) であった (Table 5)。TC22-2b 株と近縁種の主要脂肪酸を比較すると、脂肪酸の種類は類似していたが、それらの存在比は異なっていた (Table 5)。すなわち、TC22-2b 株では iso-C<sub>16:0</sub> の存在比が近縁種と比較して高く、反対に anteiso-C<sub>15:0</sub> の存在比が相対的に低かった。脂肪酸組成の違いからも、TC22-2b 株は、近縁種とは異なることが示された。

TC22-2b 株の細胞に含まれる主要なイソプレノイドキノンは 7 イソプレン単位の側鎖を持つメナキノン (MK-7) であった。また、細胞壁ペプチドグリカン中のジアミノ酸は meso-ジアミノピメリン酸 (meso-DAP) であった。これまでに報告されている *Paenibacillus* 属細菌に含まれるジアミノ酸のほとんどは meso-ジアミノピメリン酸である (Appendix 2)。そして、主要なリン脂質はジホスファチジルグリセロール (DPG)、ホスファチジルグリセロール (PG)、ホスファチジルエタノールアミン (PE) であった (Fig. 9)。これらのリン脂質は他の多くの *Paenibacillus* 属細菌においても主要リン脂質として報告されている (Appendix 2)。以上の化学分類学的性状からも、TC22-2b 株の *Paenibacillus* 属への帰属が示唆された。

### 3-1-6. TC22-2b 株の命名と記載

TC22-2b 株は分子系統解析および表現性状の比較から既知種とは異なり、*Paenibacillus* 属に帰属することが示された。以上の解析結果に基づき、本菌株を新種細菌 *Paenibacillus thermoaerophilus* (ther.mo.aer.ó.phi.lus. Gr. adj. *thermos*, hot; Gr. masc. n. *aer*, air; Gr. adj. *philos*, loving; M. L. adj. *thermoaerophilus*, loving heat and air) と命名し、記載した (Ueda *et al.*, 2013)。

**Table 2.** 16S rRNA gene sequence similarities between strain TC22-2b and type strains of related species in the genus *Paenibacillus*

Related species	Accession number	Similarity (%)
<i>Paenibacillus elgii</i> SD17 <sup>T</sup>	AY090110	93.4
<i>Paenibacillus validus</i> JCM 9077 <sup>T</sup>	AB073203	93.1
<i>Paenibacillus barengoltzii</i> SAFN-016 <sup>T</sup>	AY167814	93.0
<i>Paenibacillus ehimensis</i> KCTC 3748 <sup>T</sup>	AY116665	93.0
<i>Paenibacillus aestuarii</i> CJ25 <sup>T</sup>	EU570250	93.0
<i>Paenibacillus rigui</i> WPCB173 <sup>T</sup>	EU939688	92.9
<i>Paenibacillus chinjuensis</i> WN9 <sup>T</sup>	AF164345	92.8
<i>Paenibacillus hodogayensis</i> SG <sup>T</sup>	AB179866	92.8
<i>Paenibacillus ginsengarvi</i> Gsoil 139 <sup>T</sup>	AB271057	92.7
<i>Paenibacillus ginsengihumi</i> DCY16 <sup>T</sup>	EF452662	92.7
<i>Paenibacillus larvae</i> subsp. <i>larvae</i> DSM7030 <sup>T</sup>	AY530294	92.6
<i>Paenibacillus naphthalenovorans</i> PR-N1 <sup>T</sup>	AF353681	92.6
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i> XIL14 <sup>T</sup>	AY427832	92.5
<i>Paenibacillus koreensis</i> YC300 <sup>T</sup>	AF130254	92.5
<i>Paenibacillus urinalis</i> 5402403 <sup>T</sup>	EF212892	92.4
<i>Paenibacillus edaphicus</i> VKPM B-7517 <sup>T</sup>	AB045093	92.4
<i>Paenibacillus chungangensis</i> CAU 9038 <sup>T</sup>	GU187432	92.4
<i>Paenibacillus puldeungensis</i> CAU 9324 <sup>T</sup>	GU187433	92.4
<i>Paenibacillus tianmuensis</i> B27 <sup>T</sup>	FJ719490	92.2
<i>Paenibacillus thermophilus</i> WP-1 <sup>T</sup>	JQ824133	92.0

**Table 3.** Acid production from various carbohydrates by strain TC22-2b

Acid production	Substrate
Positive	D-Mannitol
	Methyl $\alpha$ -D-glucopyranoside
	<i>N</i> -Acetylglucosamine
	Amygdalin
	D-Cellobiose
	D-Maltose
	D-Melibiose
	D-Sucrose
	D-Trehalose
	D-Raffinose
	Starch
	Glycogen
	Gentiobiose
	D-Turanose
Weakly positive	Methyl $\beta$ -D-xylopyranoside
	D-Glucose
	D-Fructose
	D-Mannose
	L-Rhamnose
	Salicin
Negative	5-ketogluconate
	Glycerol

**Table 3.** (continued)

Acid production	Substrate
Negative	Erythritol
	Arabinose
	D-Ribose
	Xylose
	Adonitol
	D-Galactose
	L-Sorbose
	Dulcitol
	Inositol
	D-Sorbitol
	Methyl $\alpha$ -D-mannopyranoside
	Arbutin
	D-Lactose
	Inulin
	D-Melezitose
	Xylitol
	D-Lyxose
	D-Tagatose
	Fucose
Arabitol	
Gluconate	
2-ketogluconate	

**Table 4.** Phenotypic characteristics of strain TC22-2b and type strains of related species in the genus *Paenibacillus*

Strains: 1, strain TC22-2b; 2, *P. elgii* NBRC 100335<sup>T</sup>; 3, *P. validus* NBRC 15382<sup>T</sup>; 4, *P. hodogayensis* JCM 12520<sup>T</sup>; and 5, *P. ginsengarvi* DSM 18677<sup>T</sup>. All data are from this study. +, positive; –, negative; w, weakly positive; and NG, no growth. All strains were positive for catalase and assimilation of maltose. All were negative for arginine dihydrolase, the methyl red test, H<sub>2</sub>S production, and assimilation of caprate, adipate, citrate, and phenylacetate.

Characteristic	1	2	3	4	5
Growth at 55°C	+	–	–	–	–
Oxidase	+	–	+	+	+
Urease	–	+	–	–	–
Voges-Proskauer test	w	+	w	–	–
Nitrate reduction	–	+	w	–	–
Hydrolysis of					
Casein	–	+	–	–	–
Gelatin	–	+	–	–	–
Starch	+	+	+	–	–
Aesculin	–	+	+	–	–
Tween 80	NG	+	w	–	–
Assimilation of					
D-Glucose	w	+	+	w	+
L-Arabinose	–	w	–	–	–
D-Mannose	w	+	+	–	–
D-Mannitol	+	+	+	+	–
<i>N</i> -Acetylglucosamine	w	+	–	–	w
Gluconate	–	+	+	+	+
Malate	–	+	+	–	–

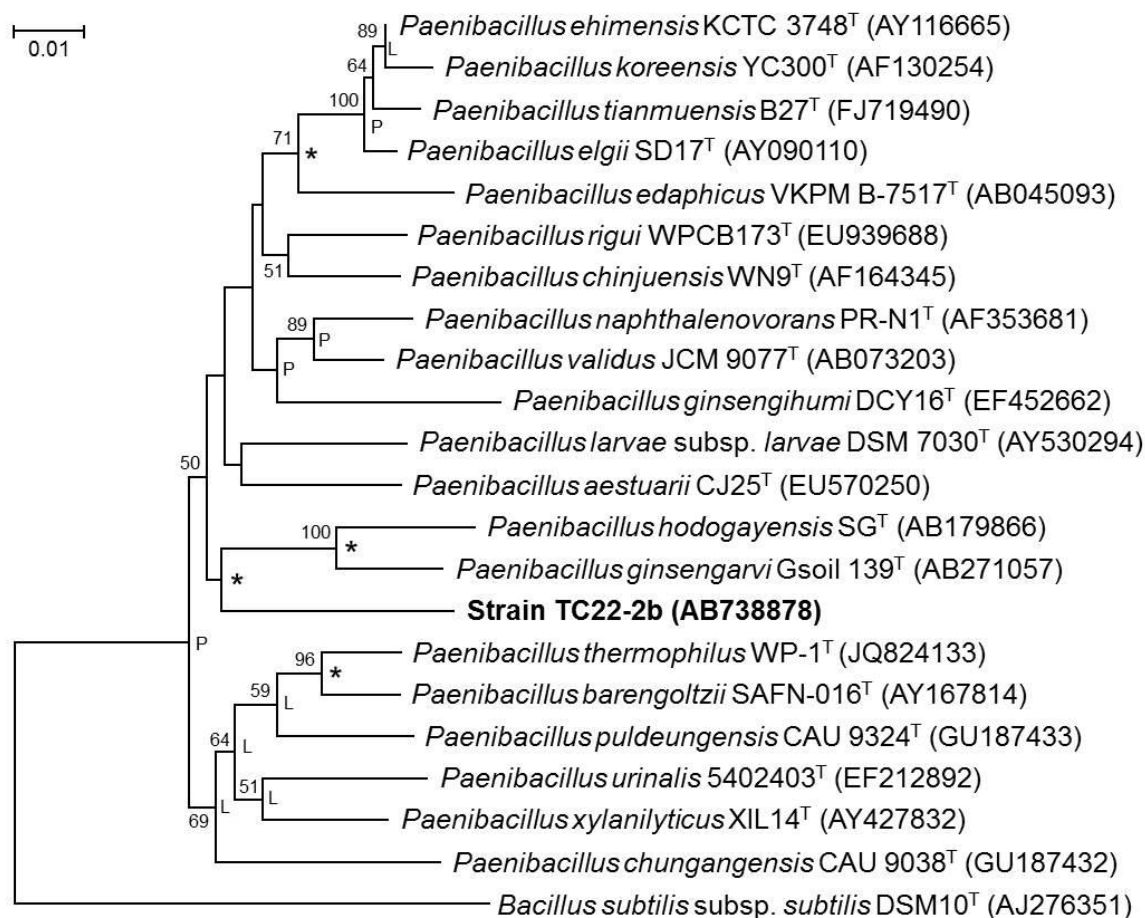
**Table 4.** (continued)

Characteristic	1	2	3	4	5
Acid production from					
Glycerol	–	w	+	w	w
D-Ribose	–	+	+	–	w
D-Xylose	–	+	+	–	–
Methyl $\beta$ -D-xylopyranoside	w	–	–	w	w
D-Galactose	–	+	+	–	–
D-Fructose	w	w	+	–	–
D-Mannose	w	+	+	–	–
L-Rhamnose	w	–	–	–	–
Inositol	–	+	+	–	–
D-Mannitol	+	+	+	+	–
<i>N</i> -Acetylglucosamine	+	+	–	–	–
Amygdalin	+	–	–	w	w
Salicin	w	–	–	–	–
D-Cellobiose	+	+	–	+	–
D-Lactose	–	+	–	+	–
Glycogen	+	w	+	–	–
Gentiobiose	+	w	–	–	–

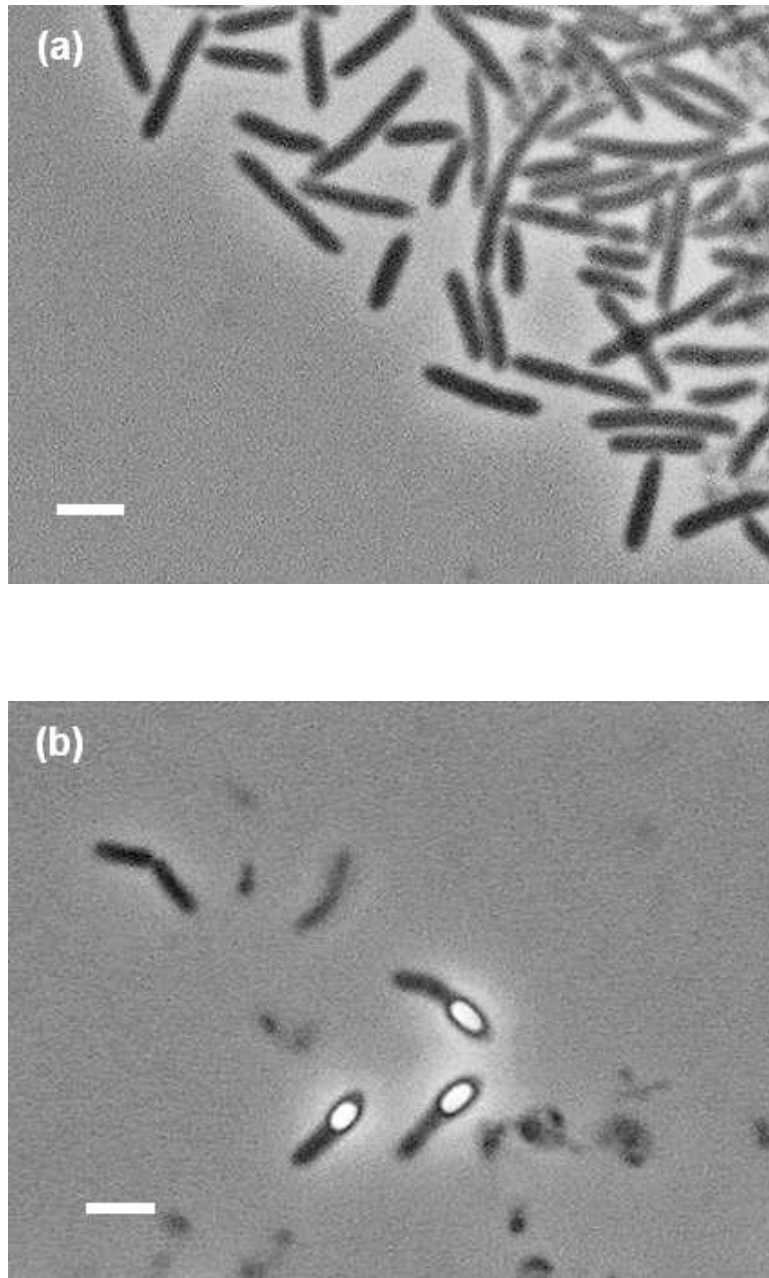
**Table 5.** Cellular fatty acid profiles of strain TC22-2b and type strains of related species in the genus *Paenibacillus*

Strains: 1, strain TC22-2b; 2, *P. elgii* NBRC 100335<sup>T</sup>; 3, *P. validus* NBRC 15382<sup>T</sup>; 4, *P. hodogayensis* JCM 12520<sup>T</sup>; and 5, *P. ginsengarvi* DSM 18677<sup>T</sup>. The values shown are the percentages of total fatty acids. All data were obtained in this study. ND, Not detected.

Fatty acid	1	2	3	4	5
Straight-chain saturated					
n-C <sub>10:0</sub>	ND	ND	1.4	ND	ND
n-C <sub>12:0</sub>	1.6	2.2	4.4	1.4	4.0
n-C <sub>14:0</sub>	3.2	7.1	8.0	3.3	3.2
n-C <sub>15:0</sub>	3.2	1.6	4.9	8.2	8.4
n-C <sub>16:0</sub>	25.5	26.4	19.1	16.2	11.4
n-C <sub>17:0</sub>	0.9	ND	0.4	1.0	0.8
n-C <sub>18:0</sub>	1.7	1.4	1.1	1.2	1.7
Branched saturated					
iso-C <sub>14:0</sub>	1.4	2.0	5.7	4.3	2.7
iso-C <sub>15:0</sub>	3.0	2.5	2.6	2.5	0.9
iso-C <sub>16:0</sub>	23.6	5.3	9.8	16.2	17.3
iso-C <sub>17:0</sub>	2.3	0.8	0.4	0.9	ND
iso-C <sub>18:0</sub>	0.3	ND	ND	ND	ND
anteiso-C <sub>15:0</sub>	21.5	42.3	37.1	38.4	39.6
anteiso-C <sub>17:0</sub>	11.2	7.6	4.1	5.4	8.8
Unsaturated					
C <sub>16:1<math>\omega</math>7c</sub>	0.7	0.9	1.0	1.0	1.0

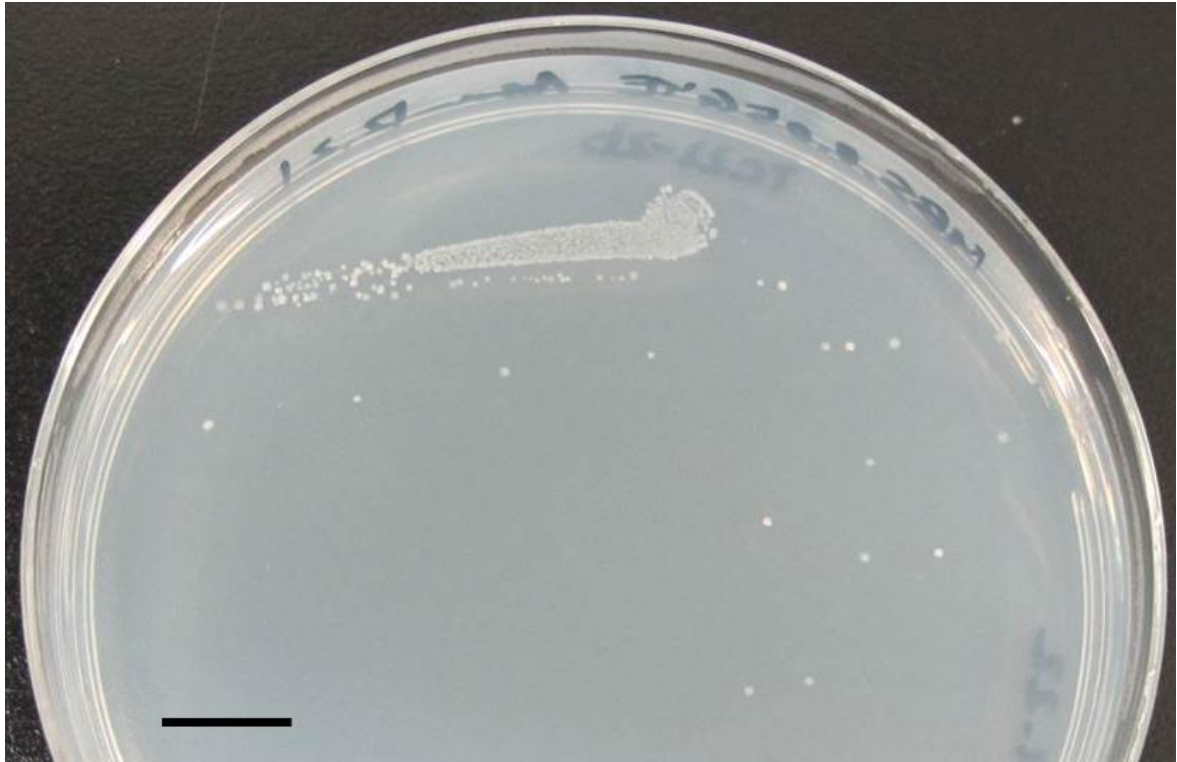


**Fig. 3.** Neighbour-joining phylogenetic tree based on nearly complete 16S rRNA gene sequences showing the relationship between strain TC22-2b and the type strains of closely related members of the genus *Paenibacillus*. Asterisks at nodes indicate branches recovered with all three methods; L and P indicate branches which are also recovered by using the maximum-likelihood and maximum-parsimony algorithms, respectively. The numbers at each node are bootstrap values performed with 1000 replicates. Bootstrap values less than 50% are not shown. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position.

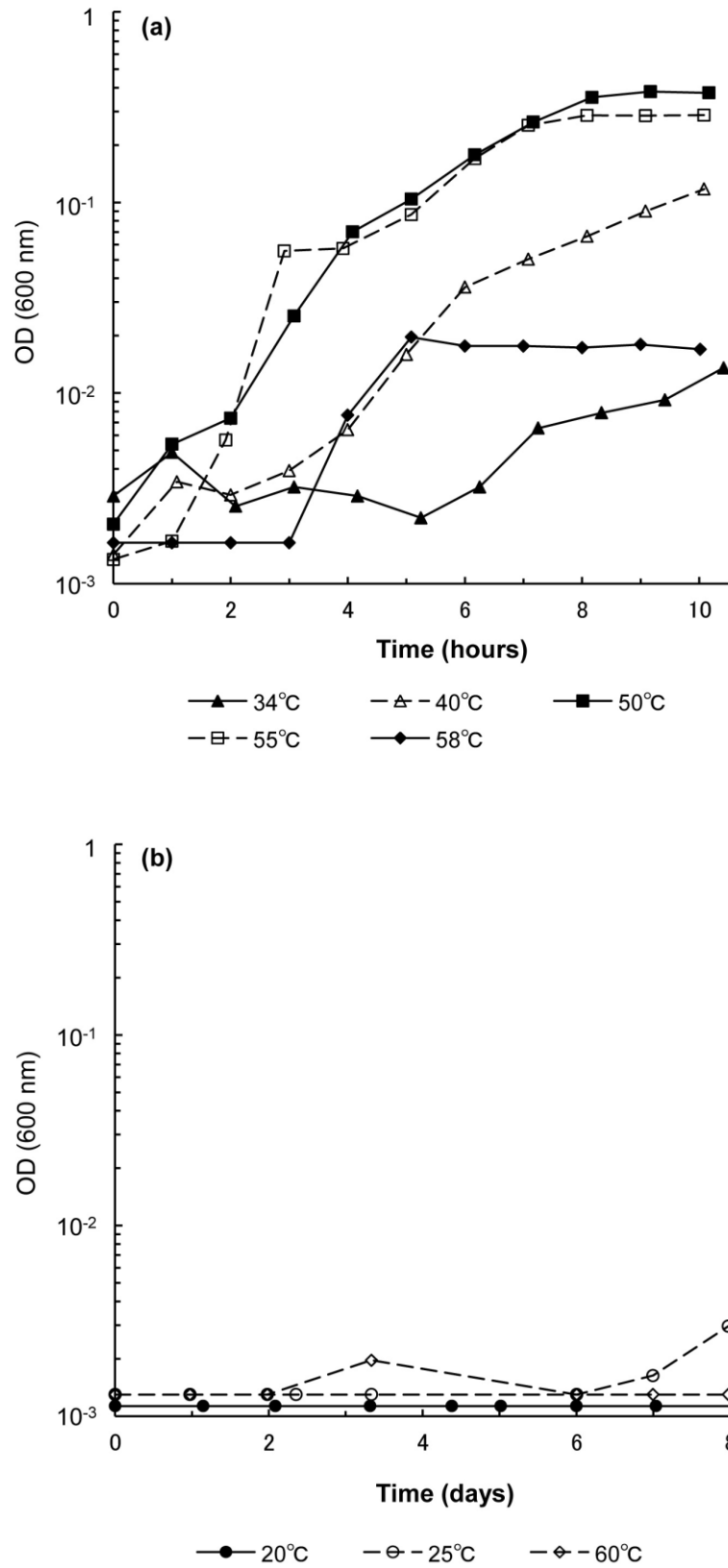


**Fig. 4.** Phase-contrast micrographs of vegetative cells and the sporangia of strain TC22-2b. Strain TC22-2b was cultured in MBS-GY for 6 h (a) or 42 h (b). Bars, 2  $\mu\text{m}$ .

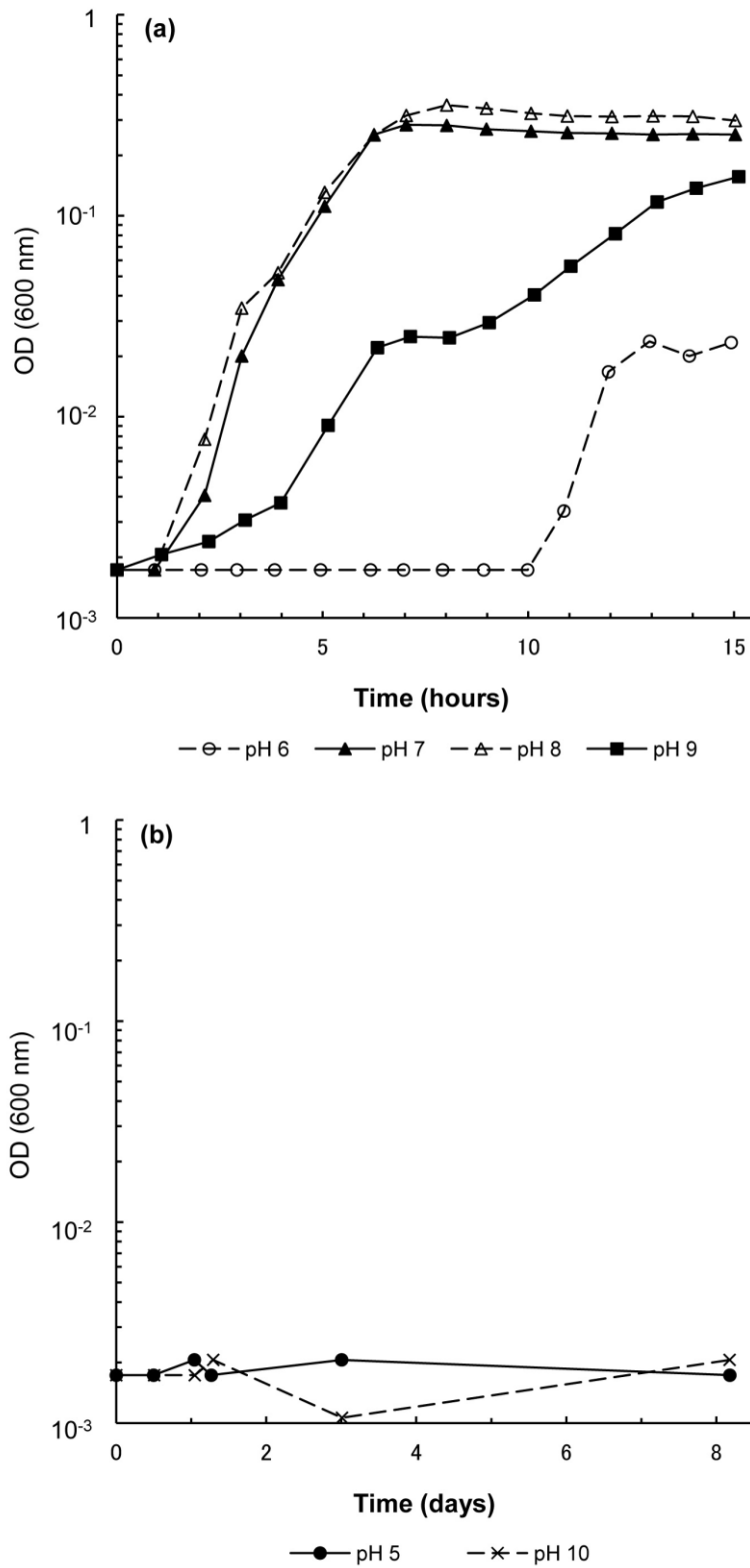




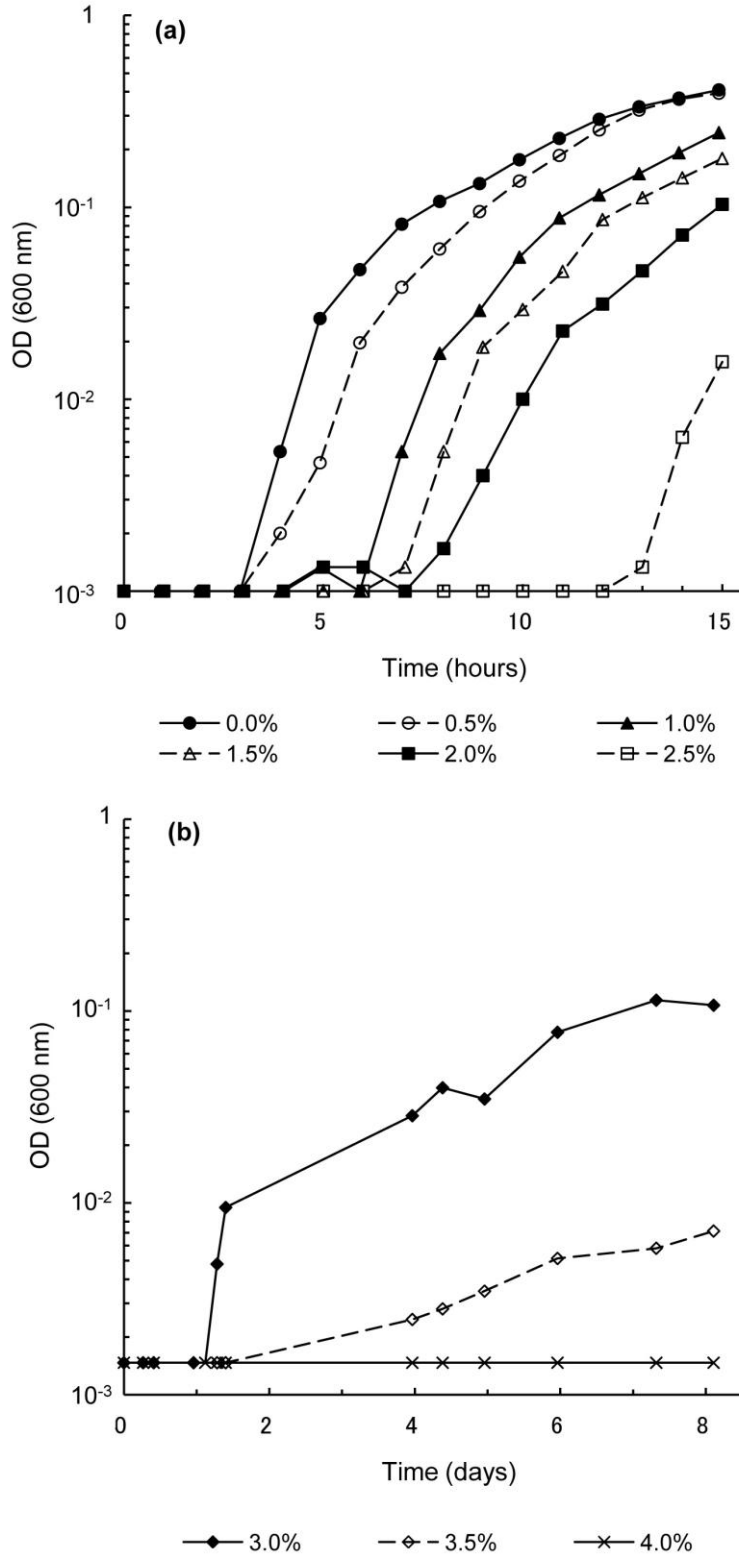
**Fig. 5.** Colonies of strain TC22-2b grown on MBS-GYE plates at 50°C over night. Bar = 1 cm.



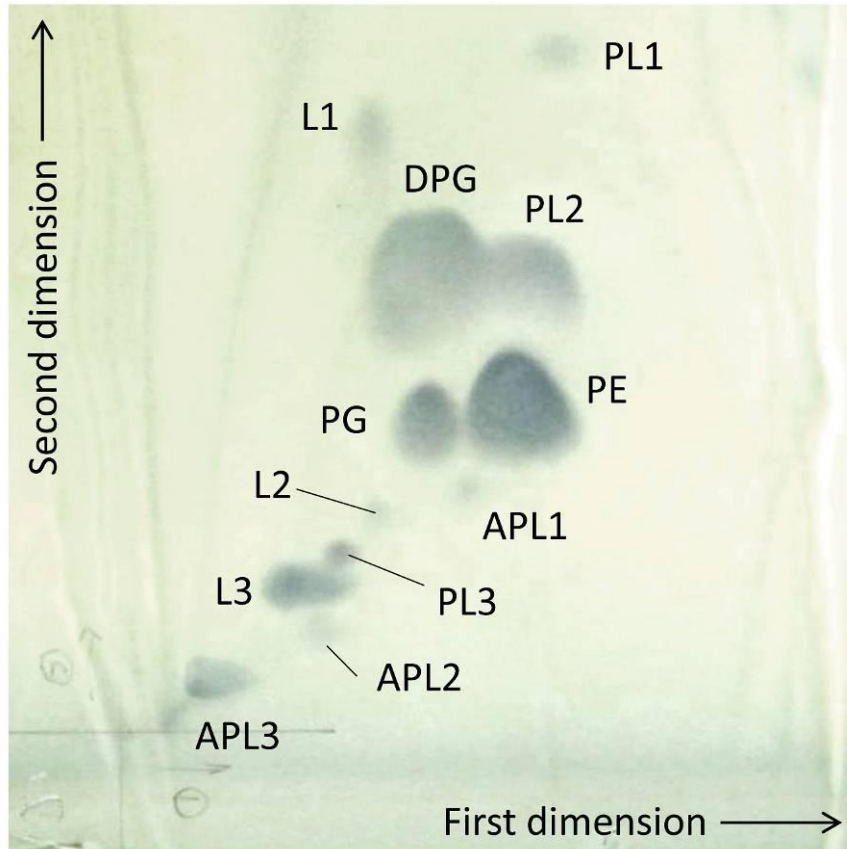
**Fig. 6.** Effect of temperature on growth of strain TC22-2b. **a** incubation was performed at 34°C, 40°C, 50°C, 55°C and 58°C. **b** incubation was performed at 20°C, 25°C and 60°C.



**Fig. 7.** Effect of pH on growth of strain TC22-2b. **a** incubation was performed using MBS-GY media at pH 6, 7, 8 and 9. **b** incubation was performed using MBS-GY media at pH 5 and 10.



**Fig. 8.** Effect of NaCl concentration on growth of strain TC22-2b. **a** incubation was performed using MBS-GY media supplemented with 0% (w/v), 0.5% (w/v) , 1.0% (w/v) , 1.5% (w/v) , 2.0% (w/v) and 2.5% (w/v) of NaCl. **b** incubation was performed using MBS-GY media supplemented with 3.0% (w/v), 3.5% (w/v) and 4.0% (w/v) of NaCl.



**Fig. 9.** Two-dimensional thin-layer chromatography of polar lipids of strain TC22-2b. The spray reagent 5% ethanolic molybdotophosphoric acid was used for detection of total lipids. DPG, diphosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PG, phosphatidylglycerol; APL, unidentified aminophospholipid; PL, unidentified phospholipid; L, unidentified lipid.

### 3-2. *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株由来キチナーゼ (*PthChiA*) の精製および性質

剪定枝堆肥から分離された好熱性細菌 *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株が培養上清中に分泌したタンパク質からキチナーゼ (*PthChiA*) を精製し、性質解析を行った。

#### 3-2-1. *PthChiA* の精製

*P. thermoaerophilus* TC22-2b 株が分泌するキチナーゼを精製するために、菌株を MBS-YC 培地で培養した。予備実験において、コロイダルキチンが目視で確認出来る程度培養液中に残存している段階で培養上清を回収してもキチナーゼ活性が検出されなかったため、コロイダルキチンが分解されて見えなくなるまで培養した。その後、遠心分離により回収した培養上清について硫酸沈殿、コロイダルキチンへの吸着、陰イオン交換クロマトグラフィーを順に行うことにより SDS-PAGE 上で単一のバンドを示す精製キチナーゼ (*PthChiA*) が得られた (Fig. 10)。本方法による収率は 26% で、精製倍率は 4.5 倍だった (Table 6)。なお、SDS-PAGE の結果からコロイダルキチンへの吸着によりキチナーゼ以外のタンパク質の多くが取り除かれたことがわかった。

#### 3-2-2. *PthChiA* の性質

SDS-PAGE の結果から、*PthChiA* の分子量は約 48 kDa と推定された (Fig. 10)。また、*PthChiA* の N 末端アミノ酸配列は AVSTGKK であった。

*PthChiA* の温度依存性を調べるために 30–80°C (10°C 間隔) でキチナーゼ活性測定を行った結果、反応温度が 30°C から 60°C へと上昇するのに伴い活性も上昇し、60°C にて最大活性を示し、反応温度が 80°C にまで上昇すると活性が急激に減少した (Fig. 11a)。50–70°C の範囲で最大活性の 69% 以上の活性を示した (Fig. 11a)。また、熱安定性を調べるために同様の温度で *PthChiA* を 2 時間インキュベートした後にキチナーゼ活性測定を行ったとこ

ろ、80°C で 2 時間インキュベート後には失活していたが、30-50°C で 2 時間インキュベート後では 68% 以上の活性が維持されていた (Fig. 11b)。

クエン酸緩衝液およびリン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液を用いて pH 3-10 の範囲で pH 依存性を調べた結果、*PthChiA* は pH 4 で最大活性を示し、pH 4-7 の間で最大活性の 50% 以上の活性を示した (Fig. 12a)。また、pH 安定性を調べたところ、本酵素は pH 4-10 間で 2 時間のインキュベート後においても 80% 以上の活性が維持された (Fig. 12b)。酸性側では比較的安全性が低く、pH 3 では 2 時間のインキュベート後に維持された活性は 40% 程度だった (Fig. 12b)。

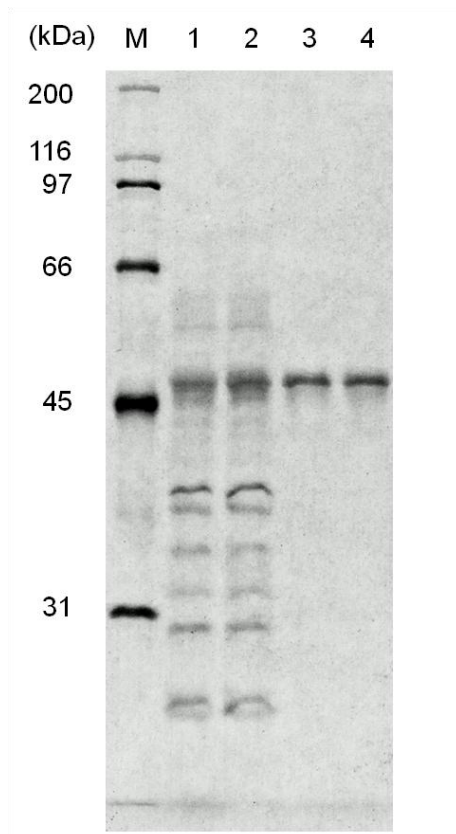
$p\text{NP}-(\text{GlcNAc})_2$  を基質として反応速度論的解析を行ったところ、Lineweaver-Burk プロットより *PthChiA* の  $K_m$  および  $V_{\max}$  の値は各々 1.4 mM、0.058 mM min<sup>-1</sup> と算出された (Fig. 13)。  $V_{\max}$  および反応液の酵素濃度から  $k_{\text{cat}}$  は 9.6 s<sup>-1</sup> と算出された。触媒効率の指標である  $k_{\text{cat}}/K_m$  は 6.8 mM<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> であった。

基質分解様式を調べるために、*PthChiA* と *N*-アセチルキトオリゴ糖の 2 量体 (G2) ~6 量体 (G6) あるいはコロイダルキチンを 50°C で 24 時間インキュベートした後、反応液中に含まれる糖質を TLC により解析した。*PthChiA* と G2 を 50°C で 24 時間インキュベート後に検出されたのは G2 のみであり、分解産物は確認されなかった (Fig. 14a)。一方で、G3、G5、G6 と *PthChiA* をインキュベート後には G1 と G2 が検出されたことから、これらの基質は単量体と 2 量体にまで分解されたことが分かった。また、G4 は G2 に分解された (Fig. 14a)。そしてコロイダルキチンを基質とした場合には G2、G3 および G4 が反応液中に検出された (Fig. 14a)。なお、キチナーゼ不在下ではいずれの基質からも分解産物が検出されなかった (Fig. 14b)。

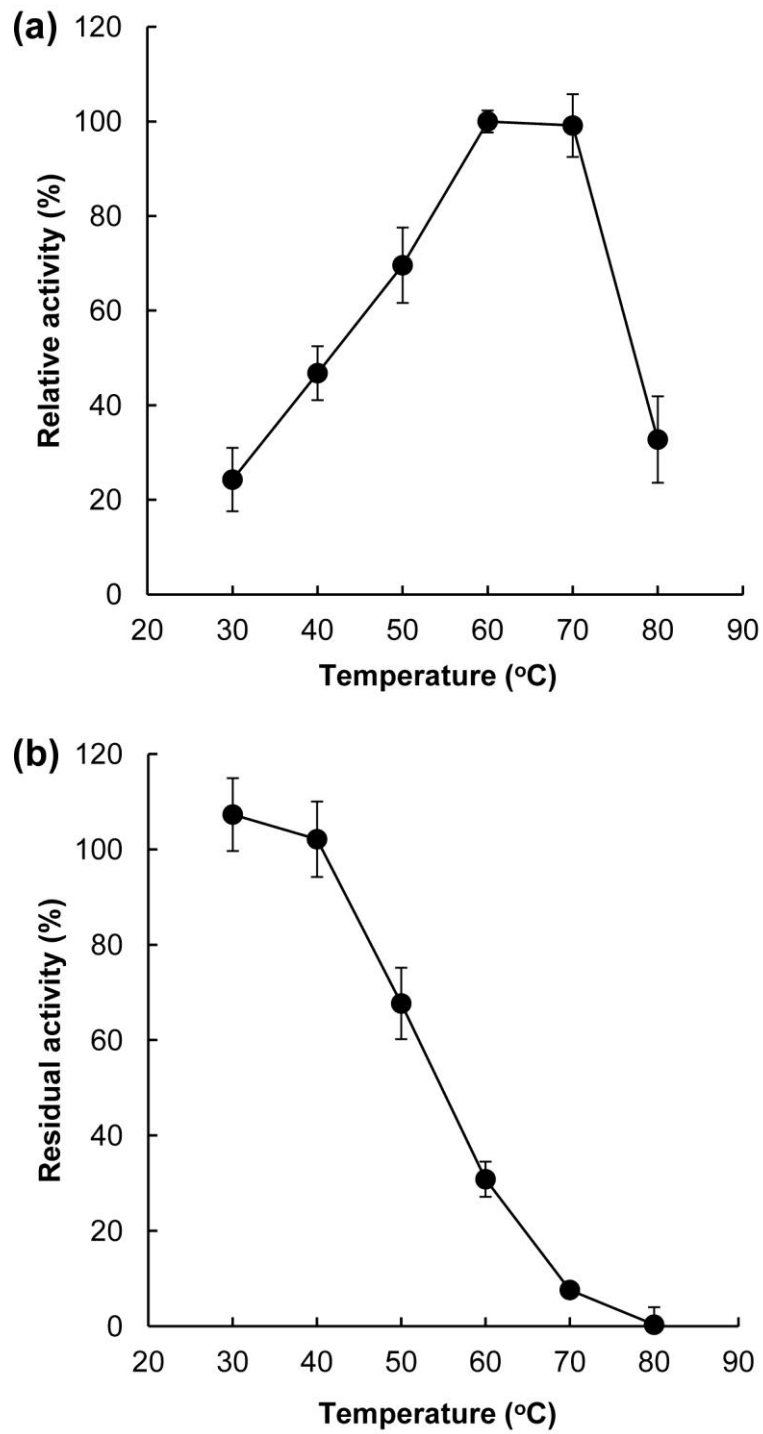
**Table 6.** Purification of chitinase produced by *P. thermoaerophilus* strain TC22-2b

Purification step	Activity (U)	Protein (mg)	Specific activity [U (mg protein) <sup>-1</sup> ]	Yield (%)	Purification fold
Culture filtrate	21.5	73.5	0.29	100	1.0
Ammonium sulphate precipitation	17.1	26.4	0.65	80	2.2
Colloidal chitin adsorption	5.9	4.5	1.31	27	4.5
DEAE Sepharose	5.6	4.2	1.32	26	4.5

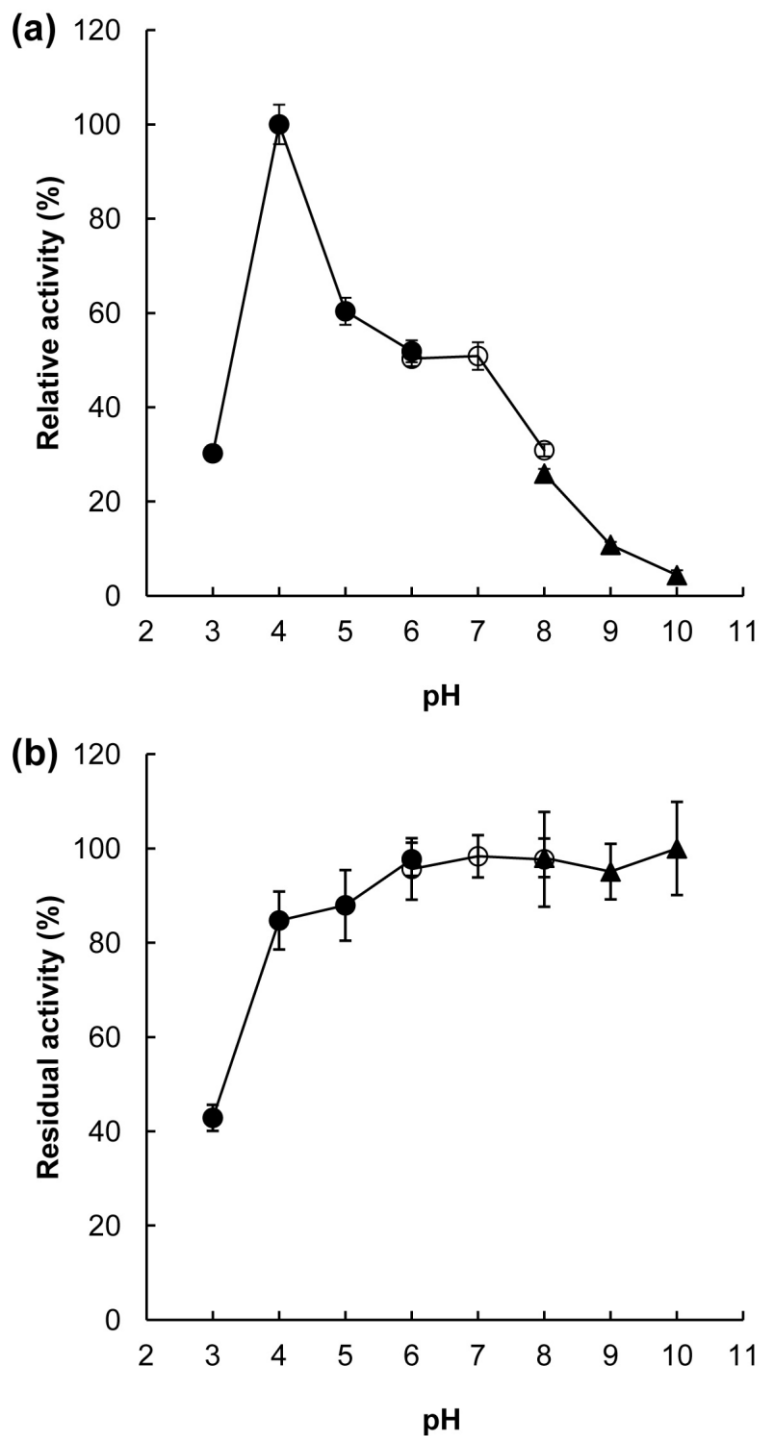




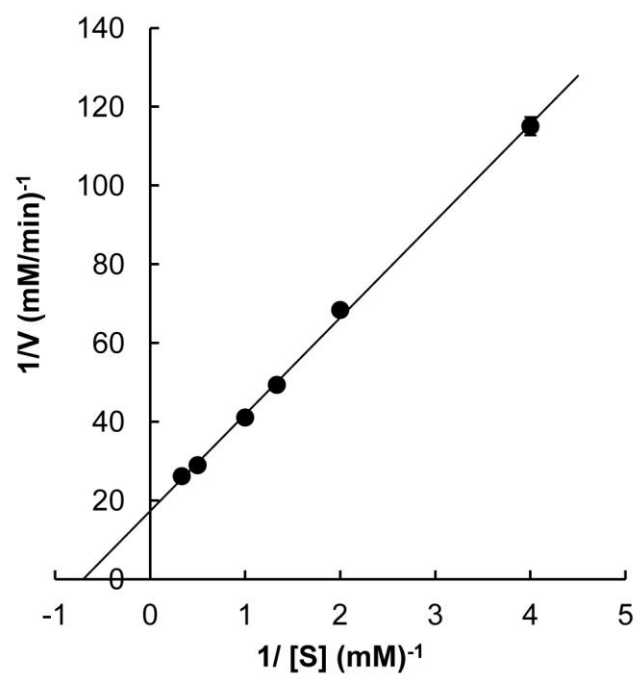
**Fig. 10.** SDS-PAGE analysis results for chitinase at different purification steps. *Lane M* molecular weight markers (SDS-PAGE molecular weight standards, broad range, BioRad), *lane 1* culture filtrate, *lane 2* fraction from ammonium sulfate precipitation, *lane 3* fraction adsorbed to colloidal chitin, *lane 4* chitinase fractions eluted from a DEAE Sepharose fast flow column. Numbers on the left indicate the molecular masses of marker proteins.



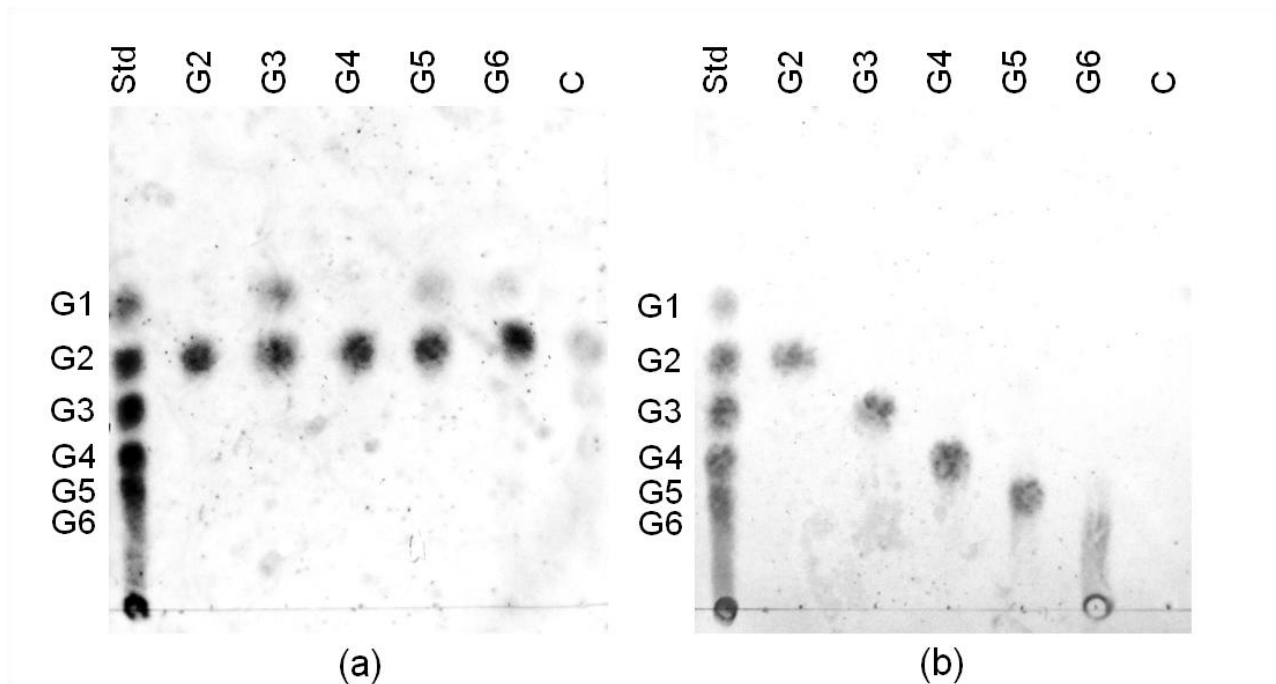
**Fig. 11.** Effect of temperature on the activity (a) and stability (b) of *PthChiA*. **a** Chitinase activity was measured at temperatures ranging from 30 to 80°C for 10 min. **b** Enzyme samples were incubated at different temperatures for 2 h, after which residual activity was measured.



**Fig. 12.** Effect of pH on the activity (a) and stability (b) of *PthChiA*. **a** Chitinase activity was measured at different pH values at 60°C for 10 min. **b** Enzyme samples were incubated at different pH values at 30°C for 2 h, after which residual activity was measured. pH was adjusted using the following buffers: citrate buffer (filled circle), phosphate buffer (open circle), and borate buffer (filled triangle).



**Fig. 13.** Lineweaver–Burk plot of chitinase activity with  $p\text{NP}-(\text{Glc-NAc})_2$  used as the substrate



**Fig. 14.** TLC analysis of chitinase hydrolysis products for different *N*-acetyl-chitooligosaccharides and colloidal chitin. Substrates were incubated at 50°C for 24 h with (a) or without chitinase (b). *Lane Std* standard *N*-acetyl-chitooligosaccharides ranging from monomers (G1) to hexamers (G6). *Lanes G2–G6* reaction products from *N*-acetyl-chitooligosaccharides ranging from dimers to hexamers incubated with (a) or without chitinase (b). *Lane C* reaction products from colloidal chitin incubated with (a) or without chitinase (b).

### 3-3. *PthChiA* の分子構造

#### 3-3-1. *PthChiA* 遺伝子と隣接配列の塩基配列および推定アミノ酸配列

*PthChiA* の N 末端アミノ酸配列あるいは既知の GH18 キチナーゼの配列に基づいて設計した縮重プライマーを用いて *PthChiA* 遺伝子断片を増幅し、322 bp の *PthChiA* 遺伝子部分塩基配列を取得した。また、インバース PCR では、*BspT107 I* あるいは *BssH II* により分解したゲノム DNA を用いた場合のみ十分量の DNA が増幅され、部分塩基配列の上流および下流の塩基配列を取得することができた。以上の実験により 1776 bp の塩基配列が得られた (Fig. 15)。

取得した塩基配列中には *PthChiA* のオープンリーディングフレーム (ORF) と思われる推定開始コドン ATG および推定終止コドン TAG を含む 1548 bp の領域があった (Fig. 15)。この ORF は 515 アミノ酸をコードしており、その中には *PthChiA* の N 末端アミノ酸配列 ( $A^{39}VSTGKK^{45}$ ) が見られた (Fig. 15)。推定開始コドンの上流にはリボソームの結合に関与する Shine-Dalgarno 配列 (Shine & Dalgarno, 1975) と一致する配列 5'-AGGA-3'が見られた (Fig. 15)。ただし、推定開始コドン  $M^1$  と N 末端アミノ酸配列の間には開始コドンとなり得る配列 ATG が他にも 3 か所存在しており、実際にどのコドンが開始コドンとして機能しているか現段階では不明である。BLASTP を用いて *PthChiA* の ORF の推定アミノ酸配列と GenBank 中のアミノ酸配列と比較したところ、*PthChiA* は *Paenibacillus* sp. J14 株由来キチナーゼ (WP\_028537743) と最も高い相同性 68.0% を示した。このキチナーゼについてはアミノ酸配列の情報がデータベース上にあるのみで、どのような性質を持っているかは分からない。

Signal P による *PthChiA* 推定アミノ酸配列の解析の結果、N 末端側の 38 残基の推定アミノ酸 ( $M^1 \sim A^{38}$ ) はシグナルペプチドであり、 $A^{38}$  と  $A^{39}$  の間の結合が切断されると予測された。シグナルペプチドが切断された後の *PthChiA* は残りの 477 アミノ酸 ( $A^{39} \sim A^{515}$ ) から構成されると推定される。シグナルペプチドが切断された後の *PthChiA* の推定アミノ酸

配列から算出される分子量は約 50 kDa であった。

### 3-3-2. *PthChiA* の推定ドメイン構造

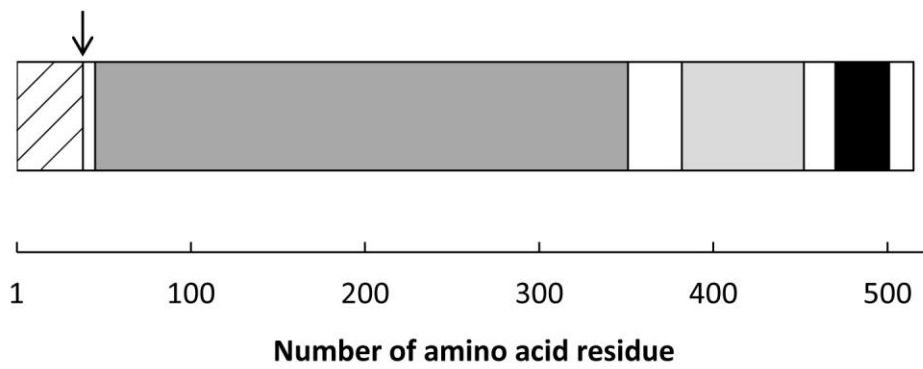
Pfam による *PthChiA* 推定アミノ酸配列の解析の結果、*PthChiA* は GH18 ドメイン (I<sup>46</sup>~D<sup>351</sup>)、フィブロネクチンタイプ III 様ドメイン (FnIII; A<sup>383</sup>~N<sup>452</sup>)、糖質結合モジュール (CBM; A<sup>471</sup>~P<sup>501</sup>) からなるマルチドメイン構造 (Fig. 16) を持つと推定された。なお、GH18 ドメイン中には GH 18 キチナーゼに保存された共通配列 DXXDXDXE (van Aalten *et al.*, 2000) が存在していた (D<sup>151</sup>GFDIDLE<sup>158</sup>)。

*PthChiA* の各ドメインの推定アミノ酸配列とデータベース上のアミノ酸配列を BLASTP を用いて比較した。*PthChiA* の GH 18 ドメインのアミノ酸配列は既知の配列との相同性が 77.8% 以下であり、最も高い相同性を示したのは *Stigmatella aurantiaca* 由来キチナーゼ (WP\_013376730、77.8%) などであった。また、*PthChiA* の FnIII と高い相同性を示したのは *Cohnella laeviribosi* 由来キチナーゼ (WP\_033396084、77.1%) であった。CBM では *Paenibacillus curdlanolyticus* 由来糖質結合タンパク質 (WP\_006036861、76.7%) と最も高い相同性を示した。いずれのタンパク質もアミノ酸配列の情報がデータベース上にあるのみで、どのような性質を持っているかは分からない。

TGACGAATCCCTTTCCGTCAAAATAGAGATACGCCACGTATTTTCCCGCCGCTTGTTCCTCCGCGCAGCATCCGAACCAGCAGTCGAACTCT  
 ATTCGTGCCTCTCATGGCCGACCCGGTCCCGACGTCCGGATCCGATTGCGAAAGGAGGTGTTGAATCAAAGGATTTGCAGCCCTTTGAAA  
 1 M M R A L P S M G L A V M R 14  
 1 TCGCTTTCAACCCCTCGAAAATCCGAGAGACTGAAAGGAGACATGAGATGATGAGAGCGCTGCCGAGTATGGGATTGGCGTTATGCGC 42  
 15 A C R A V L A L L L V V A G L Q F G V S K A E A A V S T G K 44  
 43 GCGTGCAGGGCGTTTTGGCCTTGCTGCTGGTGTGCGCCGATTCGAGTTCGGCGTCTCGAAGGCCGAGGCGGCTGTCTCAACCGCAA 132  
 45 K I I V G Y W H N F D N G S T N I R L R D I S P D F D V I Q 74  
 133 AAAATCATCGTGGTTATTGGCATAATTTCGATAACGGTTCACCAATATTCGTCTGCGGACATTTCCGCCGATTTTGACGTGATTGAC 222  
 75 V A F A E P V G G A S S G N M S F T P Y N A T V S E F Q S D 104  
 223 GTCGCCTTCGCCGAGCCGGTTCGGAGGAGCCTCCAGCGGCAACATGTGTTACGCGCTACAACGCGACGGTTCAGCGAATTTCAATCCGAT 312  
 105 I A F L K S R G Q K V L I S V G G A N G T V E L T T S Q A R 134  
 313 ATCGCGTTTTCGAAGAGCCGGGGCAGAAGGTGCTCATCTCCGTCGGAGGAGCCAACGGCACGGTGAAGTACGACGAGCCAAGCCAGG 402  
 135 Q T F V N T M K S I I N T Y G F D G F D I D L E G S S L S L 164  
 403 CAAACGTTCGTCAACACAATGAAATCGATCATCAACACGTACGGTTCGACGGCTTCGACATCGATCTGGAAGGCGATTCCCTGTCTTA 492  
 165 N P G D A D F K N P T S P K I V N L I S A T R E I L N S Y G 194  
 493 AATCTGGAGATGCCGATTTCAAAAATCCGACCTCGCCAAAATTGCAACCTCATCTCCGCGACTCGGGAAATTTTGAACAGCTACGGC 582  
 195 P D F L L T M A P E T A Y V Q G G A S T Y G G I W G A Y L P 224  
 583 CCGGACTTTCTGCTCACCATGGCGCGGAGACGGCCTACGTGCAAGCGGGGCAAGCACGTACGGCGGGATCTGGGGCGGTATCTCCCC 672  
 225 L I H N L R N E L D Y L H V Q H Y N S G S M I G L D G R S Y 254  
 673 TTGATCCACAACCTGCGCAACGAGCTTGATTACCTGCATGTTACGATACAACTCCGGCAGCATGATAGGGCTCGACGGCAGATCCTAC 762  
 255 S Q G T P D F H V A M A E M L L A G F P V A N N P N N M F P 284  
 763 TCGCAGGGTACGCCGATTTCCATGTGCCATGGCCGAGATGCTGCTGGCCGGTTCGCCGTCGCGAACAAATCCGAATAACATGTTCCCG 852  
 285 A L R P E Q I L I G L P A S P Q A A G G G Y T T P E N V Q K 314  
 853 GCCTTGCCTCCGGAACAATCCGTAGGTCTGCCCGCATCGCCTCAAGCGGCCGGCGGGCTATACGACTCCGGAGAACGTGCAGAAG 942  
 315 A L D Y L I K G Q S F G G S Y V L R N G A G Y P G L K G L M 344  
 943 GCGCTGGATTATCTCATCAAAGGCCAGTCCTTCGGCGGCGAGCTACGTGCTTCGCAACGGCGCCGGTTATCCCGGCTGAAAGGGCTTATG 1032  
 345 T W S I N W D K Y N N Y Q F S T S H R A Y L N Q F G S G G G 374  
 1033 ACATGGTTCGATCAACTGGGACAATAACAACACTACCAATTTTCGACCAGCCATCGGGCGTATTTGAACAGTTCCGGATCGGGAGGAGGC 1122  
 375 G G D T T P P T A P T N L R V T A V T A N S V S L A W N A S 404  
 1123 GGAGGCGACACGACGCCGCCGACGGCCCGACGAATTTGCGCGTGACCGCCGTACCGCAAACAGCGTATCGCTGGCGTGGAACGCCTCC 1212  
 405 S D N V G V T G Y T V S Y G A S S V N M T G T T A V I G G L 434  
 1213 AGCGACAATGTCGGCGTGACGGGTACACGGTGTCTTACGGCGCATCGAGCGTAAACATGACGGGAACGACGGCCGTCATCGGGCGCCTG 1302  
 435 S A G T T Y T F T V K A R D A A G N V S A G T S I Q A T T T 464  
 1303 AGCGCGGGCACGACCTACCGTTTACGGTGAAGGCCAGAGATGCCGAGGCAACGTCTCGCGGGGACGTCGATCCAGGCGACGACGACC 1392  
 465 G S G G P S A W A P Y V S Y A V G D L V V Y N G Q T Y R C I 494  
 1393 GGCTCCGGCGGTCTTCGGCGTGGGCGCCCTACGTCAGCTACGCGGTTGGAGATCTGGTCTGCTACAACGGCCAGCGTACCGCTGCATC 1482  
 495 Q S H T S L P G W E P P V V P A L W S L A \* 515  
 1483 CAGTCCCATACGTCGCTGCCCGGCTGGGAGCCGCCGTTGTCCCGGCTCTGTGGAGCCTGGCGTAG 1548

**Fig. 15.** Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *PthChiA* and flanking region. The putative Shine-Dalgarno sequence is indicated by dashed underline. The deduced amino acid sequence is shown in the single letter above the nucleotide sequence. The N-terminal amino acid sequence of the purified *PthChiA* is underlined. Asterisk indicates the stop codon.





**Fig. 16.** Domain structure of *PthChiA*. *Hatched*, signal peptide; *dark gray*, GH family 18; *light gray*, fibronectin type III like domain; *black*, carbohydrate-binding domain; *arrow*, cleavage site.

## 4. 考察

## 4. 考察

### 4-1. *Paenibacillus* 属細菌のキチン分解活性と生育温度

本研究では剪定枝堆肥から好熱性キチン分解細菌 TC22-2b 株を分離した。本菌株について多相分類学的解析を行った結果、新種の *Paenibacillus* 属細菌と同定された。そして *Paenibacillus thermoaerophilus* と命名され、記載された (Ueda *et al.*, 2013)。*Paenibacillus* 属は分類学的には、Firmicutes 門、Bacilli 綱、Bacillales 目、Paenibacillaceae 科に属する細菌群であり、1993 年に group 3 bacilli 綱細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づいて提唱された属である (Ash *et al.*, 1993)。提唱された当時は、11 種で構成されていたが、その後も新たな分離報告例が続き現在では 150 種以上が記載され、Firmicutes 門の中でも特に種多様性の高い属の一つとなっている。*Paenibacillus* 属細菌は土壌に広く分布している従属栄養細菌であり、中には糖質分解酵素やタンパク質分解酵素などを分泌する種が多く知られており、土壌中の有機物の分解に関与しているのではないかと考えられている (Priest, 2009)。

*Paenibacillus* 属細菌の中にはキチン分解活性を有することが報告されている菌株も知られている。分類学的位置づけが必ずしも明確ではない未記載の株も含めると TC22-2b 株以外に 20 種でキチン分解活性を有することが知られている (Table 7)。この中でキチナーゼが精製され、性質が報告されたのは *P. illinoisensis* KJA-424 (Jung *et al.*, 2005)、*P. pasadenensis* NCIM5434 (Loni *et al.*, 2014)、*Paenibacillus* sp. D1 (Singh & Chhatpar, 2011)、*Paenibacillus* sp. FPU-7 (Itoh *et al.*, 2014) である。また、キチナーゼ遺伝子の解析が行われたのは *Paenibacillus* sp. FPU-7 (Itoh *et al.*, 2013; Itoh *et al.*, 2014) のみである。本研究において *P. thermoaerophilus* TC22-2b 株からキチナーゼ (*PthChiA*) を精製しその性質を調べたことや、*PthChiA* 遺伝子を増幅し構造の推定を行ったことにより *Paenibacillus* 属細菌が有するキチナーゼの多様性に関する知見をさらに広げることができたと考えられる。

*Paenibacillus* 属細菌は Firmicutes 門の中でも特に種多様性の高い属の一つとなっているが、それらの生育温度に着目すると、比較的限られた条件で生育するものが多い。温度は 28-40°C と常温で良好に生育する種がほとんどである (Priest, 2009; Appendix 2)。一方で、

本研究により分離、記載された *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株は細胞形態や主要イソプレノイドキノン分子種、細胞壁ジアミノ酸分子種などは *Paenibacillus* 属細菌に一般的に見られるものであった (Priest, 2009; Shida *et al.*, 1997; Appendix 2) が、生育温度範囲が 25-58°C、至適生育温度が 50-55°C と *Paenibacillus* 属細菌としては高温であった。これまでに 45°C 以上の高温域で良好に生育する好熱性 *Paenibacillus* 属細菌として記載されているのは本菌株と温泉堆積物から分離された *P. thermophilus* (生育温度範囲 37-60°C、至適生育温度 42-45°C) (Zhou *et al.*, 2012a; Validation List no. 149, 2013) の 2 菌株のみである (Appendix 2)。 *P. thermophilus* についてはキチン分解活性に関する報告が無く (Zhou *et al.*, 2012a)、 *P. thermoaerophilus* TC22-2b 株はキチン分解活性を有する好熱性 *Paenibacillus* 属細菌の初めての報告となった。

#### 4-2. TC22-2b 株由来キチナーゼ (*PthChiA*) の性質

##### 4-2-1. *PthChiA* の基質分解様式

*P. thermoaerophilus* TC22-2b 株から精製したキチナーゼ (*PthChiA*) の基質分解様式を調べるために、*PthChiA* による基質分解産物を TLC により調べた。キチナーゼの基質分解様式には大きく分けて、基質内部の  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-グリコシド結合をランダムに切断し G2 や G3、G4 のような様々な *N*-アセチルキトオリゴ糖を放出するエンド型と、基質末端から分解していくエクソ型が知られているが (Cohen-Kupiec & Chet, 1998; Dahiya *et al.*, 2006)、*PthChiA* の場合は次の 2 点からエンド型であると考えた：(1) G3 や G5、G6 からは G1 および G2 が加水分解産物として検出されたが、G4 からは G2 のみが検出された (Fig. 14) ことから、末端の結合を切断することは可能であるが内部の結合を優先的に切断することが示唆される；(2) コロイダルキチンから数種類の分解産物 (G2、G3、G4) が検出された (Fig. 14)。また、G2 からは分解産物が検出されなかった (Fig. 14) ことから、G2 は *PthChiA* の基質にはならないことが示唆された。

#### 4-2-2. *PthChiA* と既知のキチナーゼの性質の比較

*PthChiA* とこれまでに報告されているキチナーゼの分子量、最適反応温度、最適反応 pH、反応速度パラメータ、基質分解様式を Table 8 に示した。これらの性質は必ずしもこれまでに知られている *Paenibacillus* 属細菌由来キチナーゼ (Jung *et al.*, 2005; Singh & Chhatpar, 2011; Loni *et al.*, 2014; Itoh *et al.*, 2014) と類似してはならず、系統的に近縁ではない多様な微生物由来キチナーゼと類似している場合もあった。例えば、分子量に関しては *PthChiA* の 48 kDa であり、*Bacillus cereus* YQ308 や *Streptomyces griseus* HUT 6037、*Thermomyces lanuginosus* SY2 由来キチナーゼなどと類似していたが、これまでに報告されている他の *Paenibacillus* 属細菌由来キチナーゼとは異なっていた。また、好熱好酸性キチナーゼは本菌株を含め、*Laceyella putida* JAM FM3001、*Microbispora* sp. V2、*Rhodothermus marinus* PRI378、*Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 など系統的に多様な微生物から見つかった。同様にエンド型の分解様式を持つキチナーゼも系統的に多様な微生物から見つかった。pNP-(GlcNAc)<sub>2</sub> を基質とした場合の  $K_m$  および  $k_{cat}$  に関しては、*Paenibacillus* 属細菌ではこれまでに本菌株と *Paenibacillus* sp. FPU-7 が分泌するキチナーゼ ChiW (Itoh *et al.*, 2014) で報告されている。*PthChiA* の  $K_m$  と  $k_{cat}$  はともに ChiW より高い値であり、 $k_{cat}/K_m$  は ChiW より低かった。また、他の系統の微生物由来キチナーゼと比較すると、本キチナーゼの  $K_m$  と  $k_{cat}$  は比較的高い値であったが、 $k_{cat}/K_m$  に関しては本キチナーゼより高い値や同程度の値を示すキチナーゼが多く、本キチナーゼの触媒効率は既知のキチナーゼに比べて特にも高くも低くもないレベルであった。以上のように、今回調べた性質の中では、*PthChiA* のみに見られる独特な性質は特に見られなかったが、これまでに知られているキチナーゼの性質が好熱性 *Paenibacillus* 属細菌由来キチナーゼにも見られたという知見が得られた。

#### 4-3. *PthChiA* の推定分子構造

*PthChiA* の推定アミノ酸配列中には N 末端側からシグナルペプチド、GH18、FnIII、CBM と思われる配列が存在し、細胞外に分泌されたのちにシグナルペプチドが切断されると推

定された。この *PthChiA* の推定アミノ酸配列の解析から予想される *PthChiA* の性質と、実際に *P. thermoaerophilus* TC22-2b 株の液体培養液の上清から精製した *PthChiA* の性質が以下の 5 点で一致した。1 点目として、GH18 キチナーゼと思われるドメインが存在したことは精製 *PthChiA* がキチナーゼ活性を示すことと一致した。次に、推定アミノ酸配列中に見られた CBM は基質へ吸着する性質を持つと言われており (Guillén *et al.*, 2010)、*PthChiA* がコロイダルキチンへの吸着により精製されたことと一致した。3 点目として、シグナルペプチドはタンパク質の細胞外への輸送に関与するタンパク質の領域であることから、*PthChiA* は細胞外タンパク質であることが示唆された。このことは *PthChiA* が TC22-2b 株の液体培養液の上清中から精製されたタンパク質 (細胞外タンパク質) であったことと一致した。4 点目として、N 末端アミノ酸配列である。推定アミノ酸配列からシグナルペプチドは A<sup>38</sup> と A<sup>39</sup> の間の結合が切断されると予測され、細胞外に輸送されシグナルペプチドが切除された *PthChiA* は残りの 477 アミノ酸 (A<sup>39</sup>~A<sup>515</sup>) から構成されると推定される。精製した *PthChiA* の N 末端アミノ酸配列は AVSTGKK であり (3-2-2 章)、このシグナルペプチドが切除された *PthChiA* の推定アミノ酸配列の N 末端の配列 (A<sup>39</sup>VSTGKK<sup>45</sup>) と一致する。また、5 点目として、細胞外に輸送されシグナルペプチドが切除された *PthChiA* の推定アミノ酸配列から算出される分子量は約 50 kDa であり、SDS-PAGE (Fig. 10) の結果から算出された精製 *PthChiA* の分子量 (約 48 kDa) とほぼ一致した。

シグナルペプチドや FnIII、CBM はこれまでに知られている細菌由来キチナーゼの多くでも見つかっており (Suzuki *et al.*, 1999)、マルチドメイン構造はキチナーゼに一般的に見られる構造である (Adrangi & Faramarzi, 2013; Reguera & Leschine, 2003)。また、*PthChiA* の配列中には GH 18 キチナーゼの共通配列 DXXDXDXE (van Aalten *et al.*, 2000) も存在していた。*PthChiA* は上記のような典型的なキチナーゼの構造を有している一方で、既知配列との推定アミノ酸配列相同性が 78% 未満であり、高い相同性を示す既知のキチナーゼはなかった。したがって、本研究で分離された TC22-2b 株は既知のキチナーゼとアミノ酸配列が異なる新たなキチナーゼの供給源であると言える。

**Table 7.** List of chitinolytic bacteria in the genus *Paenibacillus*

Species or strain	Isolation source	Reference
<i>Paenibacillus azotofixans</i>	rhizosphere	Zhou <i>et al.</i> , 2012b
<i>Paenibacillus borealis</i>	humus	Elo <i>et al.</i> , 2001
<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	soil, cast-off shells of icadas	Kuroshima <i>et al.</i> , 1996; Ahmadi <i>et al.</i> , 2008; Song <i>et al.</i> , 2012
<i>Paenibacillus ehimensis</i>	soil	Kuroshima <i>et al.</i> , 1996; Aktuganov <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus elgii</i>	soil	Das <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	soil	Jung <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus koreensis</i>	compost	Chung <i>et al.</i> , 2000
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	milk	DasGupta <i>et al.</i> , 2006
<i>Paenibacillus pabuli</i>	crab shell	Juarez-Jimenez <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus pasadenensis</i>	soil	Loni <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus peoriae</i>	soil	von der Weid <i>et al.</i> , 2003
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	soil	Beatty & Jensen, 2002
<i>Paenibacillus sabina</i>	sea dump	Patel <i>et al.</i> , 2007
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	soil	Chen <i>et al.</i> , 2010
" <i>Paenibacillus tylopili</i> "	mycorrhizosphere	Kuisiene <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus</i> sp. 300	terrestrial environment	Singh <i>et al.</i> , 1999
<i>Paenibacillus</i> sp. B2	mycorrhizosphere	Budi <i>et al.</i> , 2000
<i>Paenibacillus</i> sp. D1	common effluent treatment plant	Singh & Chhatpar, 2011
<i>Paenibacillus</i> sp. FPU-7	soil	Itoh <i>et al.</i> , 2013; Itoh <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus</i> sp. BISR-047	desert soil	Meena <i>et al.</i> , 2014

**Table 8.** Characteristics of chitinases from different sources

Source of chitinase	Molecular mass (kDa)	Optimum temp. (°C)	Optimum pH	Kinetic parameter <sup>a</sup>			Endo/Exo	Reference
				$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		
<i>Paenibacillus thermoaerophilus</i> TC22-2b	48	60	4	1.4	9.6	6.8	Endo	This study
<i>Paenibacillus</i> sp. D1	56.56	50	5.0	NR	NR	NR	NR	Singh & Chhatpar, 2011
<i>Paenibacillus</i> sp. FPU 7	150	50	4.5-5.5	0.14	0.99	7.1	NR	Itoh <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> KJA-424	54	60	5.0	NR	NR	NR	Endo	Jung <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus pasadenensis</i> NCIM 5434	35	37	10	NR	NR	NR	NR	Loni <i>et al.</i> , 2014
<i>Bacillus cereus</i> YQ 308	48	50	7	NR	NR	NR	NR	Chang <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus licheniformis</i> DSM8785	66	60	6.0	0.03	0.31	10.30	Endo	Songsiriritthigul <i>et al.</i> , 2010
<i>Bacillus</i> sp. MH-1	71	75	6.5	NR	NR	NR	Endo	Sakai <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus</i> sp. MH-1	62	65	5.0	NR	NR	NR	Endo	Sakai <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus</i> sp. MH-1	53	75	5.5	NR	NR	NR	Endo	Sakai <i>et al.</i> , 1998
<i>Laceyella putida</i> JAM FM3001	38	75	4	NR	NR	NR	NR	Shibasaki <i>et al.</i> , 2014
<i>Microbispora</i> sp. V2	35	60	3.0	NR	NR	NR	NR	Nawani <i>et al.</i> , 2002
<i>Oerskovia xanthineolytica</i> NCIM 2839	66	55	8.0	NR	NR	NR	Endo	Waghmare & Ghosh, 2010b
<i>Sanguibacter antarcticus</i> KOPRI 21702	55	37	7.6	0.16	0.31	1.96	Endo	Park <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces griseus</i> HUT 6037	49	60	5.5-7.0	NR	NR	NR	Endo	Tanabe <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces thermoviolaceus</i> OPC-520	30	60	4.0	NR	NR	NR	Endo	Tsujibo <i>et al.</i> , 2000



**Table 8.** (continued)

Source of chitinase	Molecular mass (kDa)	Optimum temp. (°C)	Optimum pH	Kinetic parameter <sup>a</sup>			Endo/Exo	Reference
				$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		
<i>Ralstonia</i> sp. A-471	45	60	5.0	NR	NR	NR	NR	Ueda <i>et al.</i> , 2005
<i>Moritella marina</i> ATCC 15381	60	28	5.0	0.555	19.54	35.2	Endo	Stefanidi & Vorgias, 2008
<i>Vibrio alginolyticus</i> 283	65	NR	6.5	0.67	7.41	11.1	Endo	Suginta, 2007
<i>Rhodothermus marinus</i> PRI378	39	70	4.5-5	3.01	2.4	0.8	Endo	Hobel <i>et al.</i> , 2005
<i>Pyrococcus kodakaraensis</i> KOD1	130	85	5.0	NR	NR	NR	Endo	Tanaka <i>et al.</i> , 1999
<i>Sulfolobus tokodaii</i> str. 7	77	70	2.5	NR	NR	NR	NR	Staufenberger <i>et al.</i> , 2012
<i>Thermococcus chitonophagus</i> DSM10152	70	70	7.0	0.14	0.38	2.7	Endo	Andronopoulou & Vorgias, 2003
<i>Chaetomium thermophilum</i>	47.3	60	5.5	NR	NR	NR	Endo	Li <i>et al.</i> , 2010
<i>Paecilomyces thermophila</i> J18	43.7	50	4.5	NR	NR	NR	NR	Kopparapu <i>et al.</i> , 2012
<i>Penicillium</i> sp. LYG 0704	47	40	5.0	NR	NR	NR	NR	Lee <i>et al.</i> , 2009
<i>Trichoderma harzianum</i> T198	27.5	50	3.5	NR	NR	NR	Exo	Deane <i>et al.</i> , 1998
<i>Thermomyces lanuginosus</i> SY2	48	55	4.5	NR	NR	NR	NR	Guo <i>et al.</i> , 2008

NR, not reported

<sup>a</sup> kinetic parameters were determined using *p*NP-(GlcNAc)<sub>2</sub> as a substrate

## 5. 結論

## 5. 結論

本研究において、新種の好熱性キチン分解細菌である TC22-2b 株を分離することに成功した。TC22-2b 株について多相分類学的解析を行うことにより同定し、新種細菌 *Paenibacillus thermoaerophilus* として命名および記載することができた (Ueda *et al.*, 2013)。さらに、TC22-2b 株が分泌する新規のキチナーゼの精製と、精製キチナーゼをコードする遺伝子の取得に成功した。そして、精製キチナーゼの性質および推定分子構造を明らかにした。これらの成果により、高温環境でキチンを分解する好熱性 *Paenibacillus* 属細菌の存在が初めて示されたことから、キチン分解微生物の多様性に関する知見を広げることができたと思われる。また、TC22-2b 株は新種であり、本菌株から分泌されたキチナーゼ *PthChiA* は既知のキチナーゼと高い相同性を示さなかったことから、新たなキチナーゼの供給源を取得することができたと考えられる。

以下に本研究で分離、記載された *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株、本菌株由来キチナーゼ (*PthChiA*) の性質、推定構造の概要を記す。

### *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株

*P. thermoaerophilus* TC22-2b 株は、剪定枝堆肥から分離された菌株であり、コロイダルキチンを含む寒天培地上でクリアゾーンを形成したことからキチン分解活性を有することが確認された。16S rRNA 遺伝子塩基配列解析により本菌株は *Paenibacillus* 属細菌と近縁であることが示された。本菌株の細胞形態や内生孢子形成能、イソプレノイドキノン分子種、細胞壁ジアミノ酸分子種、主要リン脂質分子種、DNA G+C 含量などは既知の *Paenibacillus* 属細菌の特徴 (Priest, 2009; Shida *et al.*, 1997; Appendix 2) と一致した。本菌株の性状で特徴的だったのは生育温度である。本菌株は生育温度範囲 25-58°C、至適生育温度 50-55°C の好熱性細菌であった。これまでに、150 種以上の *Paenibacillus* 属細菌が記

載されているが、45°C 以上の高温域で良好に生育する好熱性細菌として記載されているのは本菌株と *P. thermophilus* (Zhou *et al.*, 2012a; Validation List no. 149, 2013) の 2 種のみである。*P. thermophilus* はキチン分解に関する報告はされておらず、*P. thermoaerophilus* TC22-2b 株はキチン分解活性を有する好熱性 *Paenibacillus* 属細菌の初めての報告となった。

#### *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株由来キチナーゼ (*PthChiA*) の性質

*P. thermoaerophilus* TC22-2b 株が有するキチナーゼの性質を調べるために、コロイダルキチンを含む液体培地中で本菌株を培養した後、培養上清を回収し、上清中に含まれるキチナーゼを硫酸沈殿、コロイダルキチンへの吸着、陰イオンクロマトグラフィーにより精製し、分子量が約 48 kDa の精製キチナーゼを取得し、*PthChiA* と名付けた。*PthChiA* は 60°C および pH 4 で最大活性を示し、30-50°C で 2 時間インキュベート後においても 68%以上の活性維持し、pH 4-10 で 2 時間インキュベート後においても 80%以上の活性を維持した。*pNP*-(GlcNAc)<sub>2</sub> を基質とした場合の  $K_m$  は 1.4 mM であり、 $k_{cat}$  は 9.6 s<sup>-1</sup>であった。そして、エンド様式で基質を分解した。これらの性質は既知のキチナーゼにも見られる性質であったが、必ずしもこれまでに知られている *Paenibacillus* 属細菌由来キチナーゼと類似しているのではなく、系統的に近縁ではない多様な微生物由来キチナーゼと類似している場合もあった。

#### *Paenibacillus thermoaerophilus* TC22-2b 株由来キチナーゼ (*PthChiA*) の推定構造

精製した *PthChiA* の N 末端アミノ酸配列あるいは既知のキチナーゼのアミノ酸配列に基づいて縮重プライマーを設計し PCR を行い、*PthChiA* 部分塩基配列を取得した。さらにインバース PCR により部分塩基配列の隣接領域を増幅し、*PthChiA* の ORF と思われる塩基配列を取得することに成功し、この塩基配列から推定アミノ酸配列を得た。推定アミノ酸配列について、Signal P および Pfam を用いてドメインを検索した結果、*PthChiA*

は N 末端側からシグナルペプチド、GH 18、FnIII、CBM と複数のドメインから構成されると推定された。シグナルペプチドの直後には精製 *PthChiA* の N 末端アミノ酸配列と一致するアミノ酸配列が確認された。今回推定されたドメインはこれまでに知られている多くの細菌由来キチナーゼでも見つかっている (Suzuki *et al.*, 1999)。また、推定 GH 18 ドメイン中には GH18 キチナーゼの共通配列 DXXDXDXE (van Aalten *et al.*, 2000) が存在していた (D<sup>151</sup>GFDIDLE<sup>158</sup>)。 *PthChiA* のドメイン構造は細菌キチナーゼでよく見られるものであったが、推定アミノ酸配列全体および各ドメインのアミノ酸配列は既知アミノ酸配列との相同性が 78% 未満であり、高い相同性を示す既知のキチナーゼはなかった。

今後の展望として、*PthChiA* の基礎研究および産業への応用の可能性を考えた。基礎研究への応用としては、*PthChiA* は好熱性のキチナーゼであったため、タンパク質の高温適応に関する研究材料として利用できる。また、*PthChiA* 遺伝子の塩基配列を取得することができたので、機能遺伝子の環境メタゲノムの解析の際に照合データの一つとして役立つ。産業面については、*PthChiA* の熱安定性および pH 安定性はキチンからのキチンオリゴ糖生産などへの応用において利点になる。また、本キチナーゼは 60°C に最大活性を持つ好熱性酵素であり、50°C や 60°C といった高温で使用するにより常温菌の混入を軽減できると思われる。キチンの分解において複数種類のキチナーゼを組み合わせることで相乗効果がもたらされることが報告されており (Orikoshi *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2002)、今回得られたキチナーゼ *PthChiA* についても同程度の最適温度や最適 pH を持つ他のキチナーゼと混合して用いることでより高い効率でキチンを分解できる可能性がある。*PthChiA* を研究材料や産業用酵素として利用する場合には、*P. thermoaerophilus* TC22-2b 株を培養することで *PthChiA* を取得する方法に加えて、*PthChiA* 遺伝子を取得することもできたので、大腸菌などを用いて組換えタンパク質として *PthChiA* を大量に取得することも可能であると思われる。組換えタンパク質として取得できれば、TC22-2b 株を培養して *PthChiA* を精製する方法に比べて、より簡便に大量の *PthChiA* を取得する

ことが可能になると考えられる。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導・ご鞭撻を賜りました、創価大学大学院工学研究科環境共生工学専攻の黒沢則夫教授に心から感謝申し上げます。また、本博士論文を作成するにあたって貴重な御指導と御助言を頂きました、山本修一教授、田口哲教授に深く感謝申し上げます。

脂肪酸組成およびイソプレノイドキノン、DNA G+C 含量の解析を行うにあたり、多大なるご協力を頂きました山本修一教授、園田和彦氏を始めとする有機地球化学研究室の皆様心より御礼申し上げます。イソプレノイドキノンの解析では新津隆士准教授にも多大なるご協力を頂き、深く感謝申し上げます。また、堆肥の採取にあたってご協力頂きましたマレーシアプトラ大学バイオサイエンスセンター 長尾宣夫研究員、有限会社野口農産に心より感謝申し上げます。

文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「低炭素社会形成のための生物・熱化学プロセスによるバイオマス資源循環利活用技術の研究開発」においてリサーチアシスタントとして一年間雇用して頂き、感謝申し上げます。

研究を進めるにあたり、細やかな実験指導を頂き、様々な面でも励まし支えて頂きました渡邊啓子研究員、佐藤智子助教、郭秀萍博士に深く感謝いたします。キチナーゼに関する実験についてご指導を頂きました分子微生物学研究室卒業生の木戸舞氏に感謝申し上げます。また、研究室生活でお世話になりました分子微生物学研究室の卒業生の方々、後輩に感謝申し上げます。

最後に、これまで支えて頂いた家族、友人に心から感謝申し上げます。

## 参考文献

- 相葉誠一 (2009) 酵素分解によるキチンからの *N*-アセチル *D*-グルコサミンの生産、キチン・キトサン開発技術、pp.70-76、平野茂博 監修、シーエムシー出版。
- 鈴木健一郎、平石明、横田明 (2001) 微生物の分類・同定実験法、シュプリンガー・フェアラーク東京。
- Validation List no. 149. (2013). *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1-5.
- Adrangi, S. & Faramarzi, M. A. (2013). From bacteria to human: A journey into the world of chitinases. *Biotechnol Adv* 31, 1786-1795.
- Ahmadi, J. K., Yazdi, M. T., Najafi, M. F., Shahverdi, A. R., Faramarzi, M. A., Zarrini, G. & Behravan, J. (2008). Isolation and Characterization of a Chitinolytic Enzyme Producing Microorganism, *Paenibacillus chitinolyticus* JK2 from Iran. *Research Journal of Microbiology* 3, 395-404.
- Aktuganov, G., Melentjev, A., Galimzianova, N., Khalikova, E., Korpela, T. & Susi, P. (2008). Wide-range antifungal antagonism of *Paenibacillus ehimensis* IB-Xb and its dependence on chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase production. *Can J Microbiol* 54, 577-587.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.
- Andronopoulou, E. & Vorgias, C. E. (2003). Purification and characterization of a new hyperthermostable, allosamidin-insensitive and denaturation-resistant chitinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus chitonophagus*. *Extremophiles* 7, 43-53.
- Ash, C., Priest, F. G. & Collins, M. D. (1993). Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 64, 253-260.
- Barrow, G. I. & Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd edn. Cambridge: Cambridge University Press.
- Beatty, P. H. & Jensen, S. E. (2002). *Paenibacillus polymyxa* produces fusaricidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. *Can J Microbiol* 48, 159-169.
- Buck, J. D. (1982). Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 44, 992-993.



- Budi, S., Van Tuinen, D., Arnould, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. (2000). Hydrolytic enzyme activity of *Paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Applied Soil Ecology* 15, 191-199.
- Chang, W. T., Chen, C. S. & Wang, S. L. (2003). An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Curr Microbiol* 47, 102-108.
- Chen, H., Kao, P., Huang, H., Shieh, C., Chen, C. & Liu, Y. (2010). Effects of using various bioreactors on chitinolytic enzymes production by *Paenibacillus taichungensis*. *Biochem Eng J* 49, 337-342.
- Chen, J. P., Nagayama, F. & Chang, M. C. (1991). Cloning and expression of a chitinase gene from *Aeromonas hydrophila* in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 57, 2426-2428.
- Chung, Y. R., Kim, C. H., Hwang, I. & Chun, J. (2000). *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 1495-1500.
- Cohen-Kupiec, R. & Chet, I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol* 9, 270-277.
- Dahiya, N., Tewari, R. & Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 773-782.
- Das, S. N., Dutta, S., Kondreddy, A., Chilukoti, N., Pullabhotla, S. V., Vadlamudi, S. & Podile, A. R. (2010). Plant growth-promoting chitinolytic *Paenibacillus elgii* responds positively to tobacco root exudates. *J Plant Growth Regul* 29, 409-418.
- DasGupta, S., Khan, N. & Nautiyal, C. (2006). Biologic Control Ability of Plant Growth-Promoting *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488 Isolated from Milk. *Curr Microbiol* 53, 502-505.
- De Vos, P. & Trüper, H. G. (2000). Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 2239-2244.
- Deane, E. E., Whipps, J. M., Lynch, J. M. & Peberdy, J. F. (1998). The purification and characterization of a *Trichoderma harzianum* exochitinase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1383, 101-110.
- Elo, S., Suominen, I., Kämpfer, P., Juhanoja, J., Salkinoja-Salonen, M. & Haahtela, K. (2001). *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 535-545.

- Felse, P. A. & Panda, T. (2000). Production of microbial chitinases—A revisit. *Bioprocess Eng* 23, 127-134.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17, 368-376.
- Finn, R. D., Bateman, A., Clements, J. & other authors (2014). Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res* 42, D222-D230.
- Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Syst Biol* 20, 406-416.
- Flach, J., Pilet, P. E. & Jolles, P. (1992). What's new in chitinase research? *Experientia* 48, 701-716.
- Fujita, K., Shimomura, K., Yamamoto, K., Yamashita, T. & Suzuki, K. (2006). A chitinase structurally related to the glycoside hydrolase family 48 is indispensable for the hormonally induced diapause termination in a beetle. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 502-507.
- Gooday, G. W. (1997). The many uses of chitinases in nature. *Chitin and Chitosan Research* 3, 233-243.
- Gooday, G. W. (1990). The Ecology of Chitin Degradation. In *Advances in Microbial Ecology*, vol. II, pp. 387-430. Edited by K. C. Marshall. New York: Plenum Press.
- Guillén, D., Sánchez, S. & Rodríguez-Sanoja, R. (2010). Carbohydrate-binding domains: multiplicity of biological roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 85, 1241-1249.
- Guo, R. F., Shi, B. S., Li, D. C., Ma, W. & Wei, Q. (2008). Purification and characterization of a novel thermostable chitinase from *Thermomyces lanuginosus* SY2 and cloning of its encoding gene. *Agricultural Sciences in China* 7, 1458-1465.
- Haki, G. D. & Rakshit, S. K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol* 89, 17-34.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280, 309-316.
- Henrissat, B. & Bairoch, A. (1993). New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 293, 781-788.
- Hirano, S. & Nagao, N. (1988). An improved method for the preparation of colloidal chitin by

- using methanesulfonic acid. *Agric Biol Chem* 52, 2111-2112.
- Hobel, C. F. V., Hreggvidsson, G. O., Marteinson, V. T., Bahrani-Mougeot, F., Einarsson, J. M. & Kristjánsson, J. K. (2005). Cloning, expression, and characterization of a highly thermostable family 18 chitinase from *Rhodothermus marinus*. *Extremophiles* 9, 53-64.
- Imoto, T. & Yagishita, K. (1971). A simple activity measurement of lysozyme. *Agric Biol Chem* 35, 1154-1156.
- Itoh, T., Hibi, T., Fujii, Y. & other authors (2013). Cooperative degradation of chitin by extracellular and cell surface-expressed chitinases from *Paenibacillus* sp. FPU-7. *Appl Environ Microbiol* 79, 7482-7490.
- Itoh, T., Sugimoto, I., Hibi, T., Suzuki, F., Matsuo, K., Fujii, Y., Taketo, A. & Kimoto, H. (2014). Overexpression, purification, and characterization of *Paenibacillus* cell surface-expressed chitinase ChiW with two catalytic domains. *Biosci Biotechnol Biochem* 78, 624-634.
- Juarez-Jimenez, B., Rodelas, B., Martinez-Toledo, M., Gonzalez-Lopez, J., Crognale, S., Gallo, A. M., Pesciaroli, C. & Fenice, M. (2008). Production of chitinolytic enzymes by a strain (BM17) of *Paenibacillus pabuli* isolated from crab shells samples collected in the east sector of central Tyrrhenian Sea. *Int J Biol Macromol* 43, 27-31.
- Jung, W. J., Kuk, J. H., Kim, K. Y., Kim, T. H. & Park, R. D. (2005). Purification and characterization of chitinase from *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424. *J Microbiol Biotechnol* 15, 274-280.
- Karlsson, M. & Stenlid, J. (2009). Evolution of family 18 glycoside hydrolases: diversity, domain structures and phylogenetic relationships. *J Mol Microbiol Biotechnol* 16, 208-223.
- Keyhani, N. O. & Roseman, S. (1999). Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1473, 108-122.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 16, 111-120.
- Kopparapu, N. K., Zhou, P., Zhang, S., Yan, Q., Liu, Z. & Jiang, Z. (2012). Purification and characterization of a novel chitinase gene from *Paecilomyces thermophila* expressed in *Escherichia coli*. *Carbohydr Res* 347, 155-160.
- Kuisiene, N., Raugalas, J., Spröer, C., Kroppenstedt, R., Stuknyte, M. & Chitavichius, D. (2008). *Paenibacillus tylopili* sp. nov., a chitinolytic bacterium isolated from the mycorrhizosphere of *Tylopilus felleus*. *Folia Microbiol* 53, 433-437.
- Kurita, K. (2006). Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans.

*Marine Biotechnol* 8, 203-226.

- Kurosawa, N., Itoh, Y. H., Iwai, T., Sugai, A., Uda, I., Kimura, N., Horiuchi, T. & Itoh, T. (1998). *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order *Sulfolobales*. *Int J Syst Evol Microbiol* 48, 451-456.
- Kuroshima, K., Sakane, T., Takata, R. & Yokota, A. (1996). *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolyticus* sp. nov., new chitinolytic members of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Bacteriol* 46, 76-80.
- Lee, Y. G., Chung, K. C., Wi, S. G., Lee, J. C. & Bae, H. J. (2009). Purification and properties of a chitinase from *Penicillium* sp. LYG 0704. *Protein Expr Purif* 65, 244-250.
- Li, A. N., Yu, K., Liu, H. Q., Zhang, J., Li, H. & Li, D. C. (2010). Two novel thermostable chitinase genes from thermophilic fungi: cloning, expression and characterization. *Bioresour Technol* 101, 5546-5551.
- Lipman, D. J. & Pearson, W. R. (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science* 227, 1435-1441.
- Logan, N. A., Berge, O., Bishop, A. H. & other authors (2009). Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2114-2121.
- Lombard, V., Golaconda Ramulu, H., Drula, E., Coutinho, P. M. & Henrissat, B. (2014). The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res* 42, D490-D495.
- Loni, P. P., Patil, J. U., Phugare, S. S. & Bajekal, S. S. (2014). Purification and characterization of alkaline chitinase from *Paenibacillus pasadenensis* NCIM 5434. *J Basic Microbiol* 53, 1-10.
- Meena, S., Gothwal, R. K., Saxena, J., Mohan, M. K. & Ghosh, P. (2014). Chitinase production by a newly isolated thermotolerant *Paenibacillus* sp. BISR-047. *Ann Microbiol* 64, 787-797.
- Minnikin, D. E., O'donnell, A. G., Goodfellow, M., Alderson, G., Athalye, M., Schaal, A. & Parlett, J. H. (1984). An integrated procedure for the extraction of bacterial isoprenoid quinones and polar lipids. *J Microbiol Methods* 2, 233-241.
- Nawani, N. N., Kapadnis, B. P., Das, A. D., Rao, A. S. & Mahajan, S. K. (2002). Purification and characterization of a thermophilic and acidophilic chitinase from *Microbispora* sp. V2. *J Appl Microbiol* 93, 965-975.
- Noguchi, T., Kumagai, M. & Kuninaka, A. (1988). Analysis of base composition of sequenced DNA's by high performance liquid chromatography of their nuclease P1 hydrolysate. *Agric Biol Chem* 52, 2355-2356.

- Norris, T. B., Wraith, J. M., Castenholz, R. W. & McDermott, T. R. (2002). Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. *Appl Environ Microbiol* 68, 6300-6309.
- Oren, A. & Garrity, G. M. (2014). Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years. *Antonie Van Leeuwenhoek* 106, 43-56.
- Orikoshi, H., Nakayama, S., Miyamoto, K., Hanato, C., Yasuda, M., Inamori, Y. & Tsujibo, H. (2005). Roles of four chitinases (chiA, chiB, chiC, and chiD) in the chitin degradation system of marine bacterium *Alteromonas* sp. strain O-7. *Appl Environ Microbiol* 71, 1811-1815.
- Park, H. J., Kim, D., Kim, I. H., Lee, C., Kim, I., Kim, J. Y., Kim, S. J., Lee, H. K. & Yim, J. H. (2009). Characteristics of cold-adaptive endochitinase from Antarctic bacterium *Sanguibacter antarcticus* KOPRI 21702. *Enzyme Microb Technol* 45, 391-396.
- Patel, B., Gohel, V. & Raol, B. (2007). Statistical optimisation of medium components for chitinase production by *Paenibacillus sabina* strain JD2. *Annals of Microbiology* 57, 589-597.
- Patil, R. S., Ghormade, V. & Deshpande, M. V. (2000). Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microb Technol* 26, 473-483.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G. & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods* 8, 785-786.
- Prakash, N. A. U., Jayanthi, M., Sabarinathan, R., Kanguane, P., Mathew, L. & Sekar, K. (2010). Evolution, homology conservation, and identification of unique sequence signatures in GH19 family chitinases. *J Mol Evol* 70, 466-478.
- Priest, G. P. (2009). *Paenibacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, pp. 269-295. Edited by A. C. Parte. Dordrecht: Springer.
- Reguera, G. & Leschine, S. B. (2003). Biochemical and genetic characterization of ChiA, the major enzyme component for the solubilization of chitin by *Cellulomonas uda*. *Arch Microbiol* 180, 434-443.
- Roberts, R. L. & Cabib, E. (1982). *Serratia marcescens* chitinase: One-step purification and use for the determination of chitin. *Anal Biochem* 127, 402-412.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A. & other authors (2007). Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J* 1, 283-290.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Sakai, K., Yokota, A., Kurokawa, H., Wakayama, M. & Moriguchi, M. (1998). Purification and

- characterization of three thermostable endochitinases of a noble *Bacillus* strain, MH-1, isolated from chitin-containing compost. *Appl Environ Microbiol* 64, 3397-3402.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shaikh, S. A. & Deshpande, M. V. (1993). Chitinolytic enzymes: their contribution to basic and applied research. *World J Microbiol Biotechnol* 9, 468-475.
- Shibasaki, H., Uchimura, K., Miura, T., Kobayashi, T., Usami, R. & Horikoshi, K. (2014). Highly thermostable and surfactant-activated chitinase from a subseafloor bacterium, *Laceyella putida*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 7845-7853.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. (1997). Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 47, 289-298.
- Shine, J. & Dalgarno, L. (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. *Nature* 254, 34-38.
- Singh, A. K. & Chhatpar, H. S. (2011). Purification and Characterization of Chitinase from *Paenibacillus* sp. D1. *Appl Biochem Biotechnol* 164, 77-88.
- Singh, P. P., Shin, Y. C., Park, C. S. & Chung, Y. R. (1999). Biological control of Fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89, 92-99.
- Song, Y., Seo, D., Kim, K., Park, R. & Jung, W. (2012). Expression patterns of chitinase produced from *Paenibacillus chitinolyticus* with different two culture media. *Carbohydr Polym* 90, 1187-1192.
- Songsiriritthigul, C., Lapboonrueng, S., Pechsrichuang, P., Pesatcha, P. & Yamabhai, M. (2010). Expression and characterization of *Bacillus licheniformis* chitinase (ChiA), suitable for bioconversion of chitin waste. *Bioresour Technol* 101, 4096-4103.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology today* 33, 152-155.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44, 846-849.
- Staneck, J. L. & Roberts, G. D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol* 28, 226-231.

- Staufenberger, T., Imhoff, J. F. & Labes, A. (2012). First crenarchaeal chitinase found in *Sulfolobus tokodaii*. *Microbiol Res* 167, 262-269.
- Stefanidi, E. & Vorgias, C. E. (2008). Molecular analysis of the gene encoding a new chitinase from the marine psychrophilic bacterium *Moritella marina* and biochemical characterization of the recombinant enzyme. *Extremophiles* 12, 541-552.
- Suginta, W. (2007). Identification of chitin binding proteins and characterization of two chitinase isoforms from *Vibrio alginolyticus* 283. *Enzyme Microb Technol* 41, 212-220.
- Suzuki, K., Taiyoji, M., Sugawara, N., Nikaidou, N., Henrissat, B. & Watanabe, T. (1999). The third chitinase gene (*chiC*) of *Serratia marcescens* 2170 and the relationship of its product to other bacterial chitinases. *Biochem J* 343, 587-596.
- Suzuki, K., Sugawara, N., Suzuki, M., Uchiyama, T., Katouno, F., Nikaidou, N. & Watanabe, T. (2002). Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 produced by recombinant *Escherichia coli*: enzymatic properties and synergism on chitin degradation. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 1075-1083.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28, 2731-2739.
- Tanabe, T., Kawase, T., Watanabe, T., Uchida, Y. & Mitsutomi, M. (2000). Purification and characterization of a 49-kDa chitinase from *Streptomyces griseus* HUT 6037. *J Biosci Bioeng* 89, 27-32.
- Tanaka, T., Fujiwara, S., Nishikori, S., Fukui, T., Takagi, M. & Imanaka, T. (1999). A unique chitinase with dual active sites and triple substrate binding sites from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus kodakaraensis* KOD1. *Appl Environ Microbiol* 65, 5338-5344.
- Tharanathan, R. N. & Kittur, F. S. (2003). Chitin—the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 61-87.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL 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.
- Tsujibo, H., Hatano, N., Endo, H., Miyamoto, K. & Inamori, Y. (2000). Purification and characterization of a thermostable chitinase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and cloning of the encoding gene. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 96-102.
- Ueda, J., Yamamoto, S. & Kurosawa, N. (2013). *Paenibacillus thermoaerophilus* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from compost. *Int J Syst Evol Microbiol* 63,

3330-3335.

- Ueda, M., Kotani, Y., Sutrisno, A., Nakazawa, M. & Miyatake, K. (2005). Purification and characterization of chitinase B from moderately thermophilic bacterium *Ralstonia* sp. A-471. *Biosci Biotechnol Biochem* 69, 842-844.
- Ueda, M., Ohata, K., Konishi, T., Sutrisno, A., Okada, H., Nakazawa, M. & Miyatake, K. (2009). A novel goose-type lysozyme gene with chitinolytic activity from the moderately thermophilic bacterium *Ralstonia* sp. A-471: cloning, sequencing, and expression. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, 1077-1085.
- Vaae - Kolstad, G., Horn, S. J., Sørli, M. & Eijsink, V. G. (2013). The chitinolytic machinery of *Serratia marcescens*—a model system for enzymatic degradation of recalcitrant polysaccharides. *FEBS Journal* 280, 3028-3049.
- van Aalten, D. M., Synstad, B., Brurberg, M. B., Hough, E., Riise, B. W., Eijsink, V. G. & Wierenga, R. K. (2000). Structure of a two-domain chitotriosidase from *Serratia marcescens* at 1.9-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5842-5847.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 60, 407-438.
- von der Weid, I., Alviano, D. S., Santos, A. L., Soares, R. M., Alviano, C. S. & Seldin, L. (2003). Antimicrobial activity of *Paenibacillus peoriae* strain NRRL BD - 62 against a broad spectrum of phytopathogenic bacteria and fungi. *J Appl Microbiol* 95, 1143-1151.
- Waghmare, S. R. & Ghosh, J. S. (2010a). Chitobiose production by using a novel thermostable chitinase from *Bacillus licheniformis* strain JS isolated from a mushroom bed. *Carbohydr Res* 345, 2630-2635.
- Waghmare, S. R. & Ghosh, J. S. (2010b). Study of thermostable chitinases from *Oerskovia xanthineolytica* NCIM 2839. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, 1849-1856.
- Wang, S. L., Liang, T. W. & Yen, Y. H. (2011). Bioconversion of chitin-containing wastes for the production of enzymes and bioactive materials. *Carbohydr Polym* 84, 732-742.
- Wang, S., Lin, T., Yen, Y., Liao, H. & Chen, Y. (2006). Bioconversion of shellfish chitin wastes for the production of *Bacillus subtilis* W-118 chitinase. *Carbohydr Res* 341, 2507-2515.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R. & other authors (1987). International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37, 463-464.
- Yeul, V. S. & Rayalu, S. S. (2013). Unprecedented chitin and chitosan: a chemical overview. *J*



*Polym Environ* 21, 606-614.

Zhou, Y., Gao, S., Wei, D. Q., Yang, L. L., Huang, X., He, J., Zhang, Y. J., Tang, S. K. & Li, W. J. (2012a). *Paenibacillus thermophilus* sp. nov., a novel bacterium isolated from a sediment of hot spring in Fujian province, China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102, 601-609.

Zhou, Y., Lee, Y. S., Park, I. H., Sun, Z., Yang, T., Yang, P., Choi, Y. L. & Sun, M. (2012b). Cyclodextrin glycosyltransferase encoded by a gene of *Paenibacillus azotofixans* YUPP-5 exhibited a new function to hydrolyze polysaccharides with  $\beta$ -1, 4 linkage. *Enzyme Microb Technol* 50, 151-157.

**Appendix 1. Composition of MBS**

Compound	Concentration (L <sup>-1</sup> )
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.30 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.20 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.25 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.07 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.00 mg
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.80 mg
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O	4.50 mg
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.22 mg
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.05 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.03 mg
VO <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.03 mg
CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01 mg

**Appendix 2.** Growth temperature, DNA G+C content, diamino acid in the cell wall peptidoglycan and major polar lipids of described *Paenibacillus* species.

Species	Growth temperature (°C)		G+C content (mol%)	Diamino acid	Major polar lipids	Reference*
	Optimum	Maximum				
<i>Paenibacillus aestuarii</i>	30-37	37	50	NR	NR	Bae <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus agarexedens</i>	NR	35	47-49	NR	NR	Uetanabaro <i>et al.</i> , 2003
<i>Paenibacillus agaridevorans</i>	NR	35	50-52	NR	NR	Uetanabaro <i>et al.</i> , 2003
<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	28-30	35-40	47-49	NR	NR	Nakamura, 1987
<i>Paenibacillus algorifonticola</i>	20-30	37	47	<i>meso</i> -DAP	DPG, PE	Tang <i>et al.</i> , 2011
<i>Paenibacillus alkaliterrae</i>	30	37	49.4	<i>meso</i> -DAP	NR	Yoon <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus alvei</i>	28	<50	45-47	NR	NR	Shida <i>et al.</i> , 1997a
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	37	40	46.3-46.6	NR	NR	Shida <i>et al.</i> , 1997b
<i>Paenibacillus anaericanus</i>	30-35	40	42.6	NR	NR	Horn <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus antarcticus</i>	10-15	31	40.7	NR	NR	Montes <i>et al.</i> , 2004
<i>Paenibacillus apiarius</i>	28	40	52-54	NR	NR	Nakamura, 1996
<i>Paenibacillus assamensis</i>	NR	37	41.2	<i>meso</i> -DAP	NR	Saha <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus azoreducens</i>	37	50	46.8	NR	NR	Meehan <i>et al.</i> , 2001
<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	NR	40	45	NR	DPG, PE	Sanchez <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus barengoltzii</i>	37	50	NR	NR	NR	Osman <i>et al.</i> , 2006
<i>Paenibacillus borealis</i>	28	37	53.6	NR	NR	Elo <i>et al.</i> , 2001
<i>Paenibacillus brasiliensis</i>	30-32	42	NR	NR	NR	von der Weid <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus camelliae</i>	30	42	48.3	ND	DPG, PG, PE	Oh <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus campinasensis</i>	40	45	50.9	<i>meso</i> -DAP	NR	Yoon <i>et al.</i> , 1998
<i>Paenibacillus castaneae</i>	30	<40	46	NR	NR	Valverde <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus catalpae</i>	25-28	40	51.0	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Zhang <i>et al.</i> , 2013
<i>Paenibacillus cellulosityticus</i>	28	37	51	NR	NR	Rivas <i>et al.</i> , 2006
<i>Paenibacillus cellulositrophicus</i>	30-37	55	52.7	<i>meso</i> -DAP	NR	Akaracharanya <i>et al.</i> , 2009

**Appendix 2.** (continued)

Species	Growth temperature (°C)		G+C content (mol%)	Diamino acid	Major polar lipids	Reference*
	Optimum	Maximum				
<i>Paenibacillus chartarius</i>	30	45	53.9	meso-DAP	DPG, PG, PE	Kampfer <i>et al.</i> , 2012
<i>Paenibacillus chibensis</i>	37	50	52.5-53.2	NR	NR	Shida <i>et al.</i> , 1997b
<i>Paenibacillus chinjuensis</i>	30-37	45	53	meso-DAP	NR	Yoon <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	25-37	42-45	51.3-52.8	NR	NR	Kuroshima <i>et al.</i> , 1996
<i>Paenibacillus chondroitinus</i>	28-30	35-40	47-48	NR	NR	Nakamura, 1987
<i>Paenibacillus chungangensis</i>	30	45	51.6	meso-DAP	DPG, PG	Parket <i>et al.</i> , 2011
<i>Paenibacillus cineris</i>	NR	50	51.5	NR	NR	Logan <i>et al.</i> , 2004
<i>Paenibacillus contaminans</i>	30	37	51.2	meso-DAP	DPG, PG, PE	Chou <i>et al.</i> , 2009
<i>Paenibacillus cookie</i>	NR	50	51.6	NR	NR	Logan <i>et al.</i> , 2004
<i>Paenibacillus curdlanolyticus</i>	30	<50	50-52	NR	NR	Shida <i>et al.</i> , 1997a
<i>Paenibacillus daejeonensis</i>	30	NR	53	meso-DAP	NR	Lee <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus darwinianus</i>	18-28	37	55.6	NR	DPG, PG, PE	Dsouza <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	37	45	55	NR	NR	Tcherpakov <i>et al.</i> , 1999
<i>Paenibacillus dongdonensis</i>	37	40	44.3	meso-DAP	DPG, PE	Son <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus doosanensis</i>	30	45	48.3	meso-DAP	DPG, PG, PE	Kim <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus durus</i>	30	NR	50.3	NR	NR	Jin <i>et al.</i> , 2011a
<i>Paenibacillus edaphicus</i>	NR	<50	54.7	meso-DAP	DPG, PG	Hu <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus ehimensis</i>	28-40	50-53	52.9-54.9	NR	NR	Kuroshima <i>et al.</i> , 1996
<i>Paenibacillus elgii</i>	NR	45	51.7	meso-DAP	NR	Kim <i>et al.</i> , 2004
<i>Paenibacillus endophyticus</i>	30	40	52.9	no meso-DAP	DPG, PG, PE	Carro <i>et al.</i> , 2013
<i>Paenibacillus favisporus</i>	37	<50	53	NR	NR	Velazquez <i>et al.</i> , 2004
<i>Paenibacillus filicis</i>	25-30	37	53.2	meso-DAP	NR	Kim <i>et al.</i> , 2009a
<i>Paenibacillus fonticola</i>	35-42	45	49.2	meso-DAP	DPG, PG, PE	Chou <i>et al.</i> , 2007
<i>Paenibacillus forsythia</i>	30	40	50.4	NR	NR	Ma & Chen, 2008
<i>Paenibacillus frigoriresistens</i>	15	37	51.7	meso-DAP	DPG, PG, PE	Ming <i>et al.</i> , 2012

**Appendix 2.** (continued)

Species	Growth temperature (°C)		G+C content (mol%)	Diamino acid	Major polar lipids	Reference*
	Optimum	Maximum				
<i>Paenibacillus gansuensis</i>	35-40	45	50	NR	NR	Lim <i>et al.</i> , 2006a
<i>Paenibacillus ginsengarvi</i>	37	45	48.1	NR	NR	Yoon <i>et al.</i> , 2007
<i>Paenibacillus ginsengihumi</i>	37	42	50.9	NR	NR	Kim <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus glacialis</i>	22	30	42	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Kishore <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	30	<50	48	NR	NR	Shida <i>et al.</i> , 1997a
<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>	28-37	<50	50.5	NR	NR	Dasman <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus graminis</i>	NR	35-40	52.1	NR	NR	Berge <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus granivorans</i>	37	45	47.8	NR	NR	van der Maarel <i>et al.</i> , 2000
<i>Paenibacillus guangzhouensis</i>	35	40	53.4	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Li <i>et al.</i> , 2014a
<i>Paenibacillus harenae</i>	32-35	40	49.9	<i>meso</i> -DAP	NR	Jeon <i>et al.</i> , 2009
<i>Paenibacillus hodogayensis</i>	30	40	55	NR	NR	Takeda <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus hordei</i>	35-37	40	53.5	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Kim <i>et al.</i> , 2013
<i>Paenibacillus humicus</i>	NR	40	58.3	<i>meso</i> -DAP	NR	Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2007
<i>Paenibacillus hunanensis</i>	30	44	53.3	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Liu <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	37	50	48.1	NR	NR	Shida <i>et al.</i> , 1997b
<i>Paenibacillus jambilae</i>	30	40	40.6-40.8	<i>meso</i> -DAP	NR	Aguilera <i>et al.</i> , 2001
<i>Paenibacillus jilunlii</i>	30	50	52.9	<i>meso</i> -DAP	DPG	Jin <i>et al.</i> , 2011b
<i>Paenibacillus kobensis</i>	30	<50	50-52	NR	NR	Shida <i>et al.</i> , 1997a
<i>Paenibacillus koleovorans</i>	30	<50	54.0-55.8	NR	NR	Takeda <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus konsidensis</i>	37	42	51.3	NR	NR	Ko <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus koreensis</i>	38-40	50	54	NR	NR	Chung <i>et al.</i> , 2000
<i>Paenibacillus kribbensis</i>	30-37	44	48	<i>meso</i> -DAP	NR	Yoon <i>et al.</i> , 2003
<i>Paenibacillus lactis</i>	30-40	50-55	51.6	NR	NR	Scheldeman <i>et al.</i> , 2004
<i>Paenibacillus larvae</i>	35-37	40	42.3	NR	NR	Heyndrickx <i>et al.</i> , 1996a
<i>Paenibacillus lautus</i>	28-30	45-50	51	NR	NR	Heyndrickx <i>et al.</i> , 1996b

**Appendix 2.** (continued)

Species	Growth temperature (°C)		G+C content (mol%)	Diamino acid	Major polar lipids	Reference*
	Optimum	Maximum				
<i>Paenibacillus lentimorbus</i>	NR	35	NR	NR	NR	Pettersson <i>et al.</i> , 1999
<i>Paenibacillus lentus</i>	35-41	50	46.1	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Li <i>et al.</i> , 2014b
<i>Paenibacillus lupini</i>	30	40	54.4	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Carro <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus macerans</i>	30	≥50	52-53	NR	NR	Shida <i>et al.</i> , 1997a
<i>Paenibacillus macquariensis</i>	15-20	25	39.0	NR	NR	Priest, 2009
<i>Paenibacillus marinisediminis</i>	37	45	45.0	<i>meso</i> -DAP	PG, PE	Lee <i>et al.</i> , 2013a
<i>Paenibacillus massiliensis</i>	30-37	<50	NR	NR	NR	Roux & Raoult, 2004
<i>Paenibacillus mendelii</i>	25-30	<50	50.8	NR	NR	Smerda <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus montaniterrae</i>	NR	50	48.8	<i>meso</i> -DAP	NR	Khianggam <i>et al.</i> , 2009a
<i>Paenibacillus motobuensis</i>	37	55	47	NR	NR	Iida <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus mucilaginosus</i>	NR	<50	55.7	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG	Hu <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus nanensis</i>	37	45	52.9	<i>meso</i> -DAP	NR	Khianggam <i>et al.</i> , 2009b
<i>Paenibacillus naphthalenovorans</i>	30-37	<55	49	NR	NR	Daane <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus nematophilus</i>	30	37	44	NR	NR	Enright <i>et al.</i> , 2003
<i>Paenibacillus oceanisediminis</i>	30	45	44	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Lee <i>et al.</i> , 2013b
<i>Paenibacillus odorifer</i>	NR	35	44	NR	NR	Berge <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus pabuli</i>	28-30	35-40	49	NR	NR	Nakamura, 1984
<i>Paenibacillus panacisoli</i>	37	42-45	53.9	NR	NR	Ten <i>et al.</i> , 2006
<i>Paenibacillus pasadenensis</i>	NR	NR	63.4	NR	NR	Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2007
<i>Paenibacillus pectinilyticus</i>	30	30	51.5	ND	DPG, PG, PE, PME	Park <i>et al.</i> , 2009
<i>Paenibacillus peoriae</i>	28-30	35-45	45-47	NR	NR	Heyndrickx <i>et al.</i> , 1996b
<i>Paenibacillus phoenicis</i>	37	50	52.5	<i>meso</i> -DAP	NR	Benardini <i>et al.</i> , 2011
<i>Paenibacillus phyllosphaerae</i>	28	37	50.7	NR	NR	Rivas <i>et al.</i> , 2005a
<i>Paenibacillus pini</i>	20-30	37	43.3	<i>meso</i> -DAP	NR	Kim <i>et al.</i> , 2009b
<i>Paenibacillus pinihumi</i>	25-30	37	49.5	<i>meso</i> -DAP	NR	Kim <i>et al.</i> , 2009c

**Appendix 2.** (continued)

Species	Growth temperature (°C)		G+C content (mol%)	Diamino acid	Major polar lipids	Reference*
	Optimum	Maximum				
<i>Paenibacillus pinisoli</i>	25-40	45	54.5	NR	DPG, PG, PE	Moon & Kim, 2014
<i>Paenibacillus pocheonensis</i>	NR	30	52.1	NR	NR	Baek <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus polymyxa</i>	30	<50	43-46	NR	NR	Shida <i>et al.</i> , 1997a
<i>Paenibacillus popilliae</i>	NR	31	NR	NR	NR	Pettersson <i>et al.</i> , 1999
<i>Paenibacillus profundus</i>	30-35	42	NR	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Romanenko <i>et al.</i> , 2013
<i>Paenibacillus prosopidis</i>	30	40	52.9	ND	DPG, PG, PE	Valverde <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus provencensis</i>	30-37	44	NR	NR	NR	Roux <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus pueri</i>	37	42	56.6	ND	DPG, PG, PE, PME	Kim <i>et al.</i> , 2009d
<i>Paenibacillus puldeungensis</i>	30	45	48.8	<i>meso</i> -DAP	DPG	Traiwai <i>et al.</i> , 2011
<i>Paenibacillus purispatii</i>	32	39	NR	L-Lys-D-Asp	DPG, PG, PE	Behrendt <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus quercus</i>	28	35	41.6	<i>meso</i> -DAP	NR	Wang <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus relictisesami</i>	37	45	51.9	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, OH-PE, NPG	Shimoyama <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus residui</i>	37	50	49.3	<i>meso</i> -DAP	NR	Vaz-Moreira <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus rhizosphaerae</i>	28	37	50.9	NR	NR	Rivaset <i>et al.</i> , 2005b
<i>Paenibacillus rigui</i>	30	37	48.3	<i>meso</i> -DAP	PE	Baik <i>et al.</i> , 2011a
<i>Paenibacillus riograndensis</i>	28	<40	55.1	L-Lys-L-Ala-L-Ala	DPG, PG	Beneduzi <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus sabinae</i>	30	37	51.9	NR	NR	Ma <i>et al.</i> , 2007a
<i>Paenibacillus sacheonensis</i>	30	40	56.1	NR	DPG, PG, PE	Moon <i>et al.</i> , 2011
<i>Paenibacillus sanguinis</i>	30-37	<50	NR	NR	NR	Roux & Raoult, 2004
<i>Paenibacillus sediminis</i>	NR	55	45.9	NR	DPG, PG, PE	Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>Paenibacillus selenii</i>	28	37	42.3	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Xiang <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus selenitireducens</i>	28	37	49.6	<i>meso</i> -DAP	DPG, PE	Yao <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus septentrionalis</i>	NR	45	47.3	<i>meso</i> -DAP	NR	Khianggam <i>et al.</i> , 2009a
<i>Paenibacillus sepulcri</i>	25	30	50	<i>meso</i> -DAP	NR	Smerda <i>et al.</i> , 2006
<i>Paenibacillus shirakamiensis</i>	25	35	43.9	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE	Tonouch <i>et al.</i> , 2014

**Appendix 2.** (continued)

Species	Growth temperature (°C)		G+C content (mol%)	Diamino acid	Major polar lipids	Reference*
	Optimum	Maximum				
<i>Paenibacillus siamensis</i>	NR	50	45.8	meso-DAP	NR	Khianggam <i>et al.</i> , 2009a
<i>Paenibacillus soli</i>	NR	42	56.6-57.0	meso-DAP	NR	Park <i>et al.</i> , 2007
<i>Paenibacillus sonchi</i>	30	40	46.8	NR	NR	Hong <i>et al.</i> , 2009
<i>Paenibacillus sophorae</i>	30	50	46	meso-DAP	DPG, PG, lyso-PG	Jin <i>et al.</i> , 2011a
<i>Paenibacillus sputi</i>	30-37	42	48.1	meso-DAP	DPG, PG, PE	Kim <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus stellifer</i>	NR	40	55.6	NR	NR	Suominen <i>et al.</i> , 2003
<i>Paenibacillus susongensis</i>	30	40	48.6	meso-DAP	DPG, PG, PE	Guo <i>et al.</i> , 2014
<i>Paenibacillus taichungensis</i>	30	40	46.7	meso-DAP	NR	Lee <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus taihuensis</i>	30-37	40	55.2	meso-DAP	DPG, PG, PE	Wu <i>et al.</i> , 2013
<i>Paenibacillus taiwanensis</i>	30	45	44.6	NR	NR	Lee <i>et al.</i> , 2007
<i>Paenibacillus tarimensis</i>	37	45	53.7	meso-DAP	NR	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Paenibacillus telluris</i>	37	45	49.5	NR	NR	Lee <i>et al.</i> , 2011
<i>Paenibacillus terrae</i>	30	40	47	meso-DAP	NR	Yoon <i>et al.</i> , 2003
<i>Paenibacillus terrigena</i>	NR	32	48.1	NR	NR	Xie & Yokota, 2007
<i>Paenibacillus thailandensis</i>	37	55	52.7	meso-DAP	NR	Khianggam <i>et al.</i> , 2009b
<i>Paenibacillus thermoaerophilus</i>	50-55	58	59.1	meso-DAP	DPG, PG, PE	Ueda <i>et al.</i> , 2013
<i>Paenibacillus thermophilus</i>	42-45	60	52.5	meso-DAP	DPG, PG	Zhou <i>et al.</i> , 2012
<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i>	28	45	52-54	NR	NR	Nakamura, 1990
<i>Paenibacillus tianmuensis</i>	30	37	55.4-55.5	meso-DAP	NR	Wu <i>et al.</i> , 2011
<i>Paenibacillus timonensis</i>	30-37	≥ 50	NR	NR	NR	Roux & Raoult, 2004
<i>Paenibacillus tundrae</i>	27	37	50.3	NR	NR	Nelson <i>et al.</i> , 2009
<i>Paenibacillus turicensis</i>	37-42	48	NR	NR	NR	Bosshard <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus typhae</i>	28-30	40	47.9	meso-DAP	DPG, PG, PE	Kong <i>et al.</i> , 2013
<i>Paenibacillus uliginis</i>	30	<41	45.2	L-Lys-D-Asp	DPG, PG, PE	Behrendt <i>et al.</i> , 2010
<i>Paenibacillus urinalis</i>	30-37	44	NR	NR	NR	Roux <i>et al.</i> , 2008



**Appendix 2.** (continued)

Species	Growth temperature (°C)		G+C content (mol%)	Diamino acid	Major polar lipids	Reference*
	Optimum	Maximum				
<i>Paenibacillus validus</i>	28-35	42-50	51-52	NR	NR	Heyndrickx <i>et al.</i> , 1995
<i>Paenibacillus vulneris</i>	30	50	NR	NR	DPG, PG, PE, PME	Glaeser <i>et al.</i> , 2013
<i>Paenibacillus wooponensis</i>	30-35	37	56	<i>meso</i> -DAP	DPG, PE	Baik <i>et al.</i> , 2011b
<i>Paenibacillus woosongensis</i>	37	47	51.7	<i>meso</i> -DAP	NR	Lee & Yoon, 2008
<i>Paenibacillus wynnii</i>	20	<40	44.6	NR	NR	Rodriguez-Dí'az <i>et al.</i> , 2005
<i>Paenibacillus xinjiangensis</i>	30-35	40	47	<i>meso</i> -DAP	NR	Lim <i>et al.</i> , 2006b
<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	23	32	46.4	NR	NR	Nelson <i>et al.</i> , 2009
<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	37	<50	50.5	NR	NR	Rivas <i>et al.</i> , 2005c
<i>Paenibacillus xylanisolvens</i>	30-37	50	51.6	<i>meso</i> -DAP	DPG, PG, PE, PME	Khianggam <i>et al.</i> , 2011
<i>Paenibacillus zanthoxyli</i>	30	37	53.2	NR	NR	Ma <i>et al.</i> , 2007b

DAP, diaminopimelic acid; DPG, diphosphatidylglycero; PG, phosphatidylglycerol; PE, phosphatidylethanolamine; PME, phosphatidylmonomethylethanolamine; OH-PE, hydroxyl-phosphatidylethanolamine; NPG, ninhydrin-positive glycolipids. NR, not reported. ND, *meso*-DAP was not detected.

\*Reference

- Aguilera, M., Monteoliva-Sanchez, M., Suarez, A., Guerra, V., Lizama, C., Bennasar, A. & Ramos-Cormenzana, A. (2001). *Paenibacillus jamilae* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium able to grow in olive-mill wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1687-1692.
- Akaracharanya, A., Lorliam, W., Tanasupawat, S., Lee, K. C. & Lee, J. S. (2009). *Paenibacillus cellulositrophicus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from Thai soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2680-2684.

- Bae, J. Y., Kim, K. Y., Kim, J. H., Lee, K., Cho, J. C. & Cha, C. J. (2010). *Paenibacillus aestuarii* sp. nov., isolated from an estuarine wetland. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 644-647.
- Baek, S. H., Yi, T. H., Lee, S. T. & Im, W. T. (2010). *Paenibacillus pocheonensis* sp. nov., a facultative anaerobe isolated from soil of a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 1163-1167.
- Baik, K. S., Lim, C. H., Choe, H. N., Kim, E. M. & Seong, C. N. (2011a). *Paenibacillus rigui* sp. nov., isolated from a freshwater wetland. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 529-534.
- Baik, K. S., Choe, H. N., Park, S. C., Kim, E. M. & Seong, C. N. (2011b). *Paenibacillus wooponensis* sp. nov., isolated from wetland freshwater. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 2763-2768.
- Behrendt, U., Schumann, P., Stieglmeier, M., Pukall, R., Augustin, J., Spröer, C., Schwendner, P., Moissl-Eichinger, C. & Ulrich, A. (2010). Characterization of heterotrophic nitrifying bacteria with respiratory ammonification and denitrification activity—Description of *Paenibacillus uliginis* sp. nov., an inhabitant of fen peat soil and *Paenibacillus purispatii* sp. nov., isolated from a spacecraft assembly clean room. *Syst Appl Microbiol* 33, 328-336.
- Benardini, J. N., Vaishampayan, P. A., Schwendner, P., Swanner, E., Fukui, Y., Osman, S., Satomi, M. & Venkateswaran, K. (2011). *Paenibacillus phoenicis* sp. nov., isolated from the Phoenix Lander assembly facility and a subsurface molybdenum mine. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 1338-1343.
- Beneduzi, A., Costa, P. B., Parma, M., Melo, I. S., Bodanese-Zanettini, M. H. & Passaglia, L. M. (2010). *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 128-133.
- Berge, O., Guinebrete`re, M. H., Achouak, W., Normand, P. & Heulin, T. (2002). *Paenibacillus graminis* sp. nov. and *Paenibacillus odorifer* sp. nov., isolated from plant roots, soil and food. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 607-616.
- Bosshard, P. P., Zbinden, R. & Altwegg, M. (2002). *Paenibacillus turicensis* sp. nov., a novel bacterium harbouring heterogeneities between 16S rRNA genes. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 2241-2249.
- Carro, L., Flores-Felix, J. D., Cerda-Castillo, E., Ramirez-Bahena, M. H., Igual, J. M., Tejedor, C., Velazquez, E. & Peix, A. (2013). *Paenibacillus endophyticus* sp. nov., isolated from nodules of *Cicer arietinum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 4433-4438.
- Carro, L., Flores-Felix, J. D., Ramirez-Bahena, M. H., Garcia-Fraile, P., Martinez-Hidalgo, P., Igual, J. M., Tejedor, C., Peix, A. & Velazquez, E. (2014). *Paenibacillus lupini* sp. nov., isolated from nodules of *Lupinus albus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 3028-3033.

- Chou, J. H., Chou, Y. J., Lin, K. Y., Sheu, S. Y., Sheu, D. S., Arun, A. B., Young, C. C. & Chen, W. M. (2007). *Paenibacillus fonticola* sp. nov., isolated from a warm spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1346-1350.
- Chou, J. H., Lee, J. H., Lin, M. C., Chang, P. S., Arun, A. B., Young, C. C. & Chen, W. M. (2009). *Paenibacillus contaminans* sp. nov., isolated from a contaminated laboratory plate. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 125-129.
- Chung, Y. R., Kim, C. H., Hwang, I. & Chun, J. (2000). *Paenibacillus koreensis* sp. nov., a new species that produces an iturin-like antifungal compound. *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 1495-1500.
- Daane, L. L., Harjono, I., Barns, S. M., Launen, L. A., Palleron, N. J. & Haggblom, M. M. (2002). PAH-degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 131-139.
- Dasman, Kajiyama, S., Kawasaki, H., Yagi, M., Seki, T., Fukusaki, E. & Kobayashi, A. (2002). *Paenibacillus glycanilyticus* sp. nov., a novel species that degrades heteropolysaccharide produced by the cyanobacterium *Nostoc commune*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1669-1674.
- Dsouza, M., Taylor, M. W., Ryan, J., MacKenzie, A., Lagutin, K., Anderson, R. F., Turner, S. J. & Aislabie, J. (2014). *Paenibacillus darwinianus* sp. nov., isolated from gamma-irradiated Antarctic soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1406-1411.
- Elo, S., Suominen, I., Kämpfer, P., Juhanoja, J., Salkinoja-Salonen, M. & Haahtela, K. (2001). *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 535-545.
- Enright, M. R., McInerney, J. O. & Griffin, C. T. (2003). Characterization of endospore-forming bacteria associated with entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis* spp., and description of *Paenibacillus nematophilus* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 435-441.
- Glaeser, S. P., Falsen, E., Busse, H. J. & Kämpfer, P. (2013). *Paenibacillus vulneris* sp. nov., isolated from a necrotic wound. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 777-782.
- Guo, X. Q., Gu, J. Y., Yu, Y. J., Zhang, W. B., He, L. Y. & Sheng, X. F. (2014). *Paenibacillus susongensis* sp. nov., a mineral-weathering bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 3958-3963.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Scheldeman, P. & other authors (1995). *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *gordonae* (Pichinoty et al. 1986) Ash et al. 1994 is a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *validus* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994: emended description of *P. validus*. *Int J Syst Bacteriol* 45, 661-669.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Hoste, B., Janssen, P., Kersters, K., De Vos, P., Logan, N.

- A., Ali, N. & Berkeley, R. C. W. (1996a). Reclassification of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *pulvifaciens* (Nakamura 1984) Ash et al. 1994, a later subjective synonym of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) *larvae* (White 1906) Ash et al. 1994, as a subspecies of *P. larvae*, with emended descriptions of *P. larvae* as *P. larvae* subsp. *larvae* and *P. larvae* subsp. *pulvifaciens*. *Int J Syst Evol Microbiol* 46, 270-279.
- Heyndrickx, M., Vandemeulebroecke, K., Scheldeman, P., Kersters, K., de Vos, P., Logan, N. A., Aziz, A. M., Ali, N. & Berkeley, R. C. W. (1996b). A polyphasic reassessment of the genus *Paenibacillus*, reclassification of *Bacillus lautus* (Nakamura 1984) as *Paenibacillus lautus* comb. nov. and of *Bacillus peoriae* (Montefusco et al. 1993) as *Paenibacillus peoriae* comb. nov., and emended descriptions of *P. lautus* and of *P. peoriae*. *Int J Syst Bacteriol* 46, 988-1003.
- Hong, Y. Y., Ma, Y. C., Zhou, Y. G., Gao, F., Liu, H. C. & Chen, S. F. (2009). *Paenibacillus sonchi* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sonchus oleraceus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 2656-2661.
- Horn, M. A., Ihssen, J., Matthies, C., Schramm, A., Acker, G. & Drake, H. L. (2005). *Dechloromonas denitrificans* sp. nov., *Flavobacterium denitrificans* sp. nov., *Paenibacillus anaericus* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* strain MH72, N<sub>2</sub>O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1255-1265.
- Hu, X. F., Li, S. X., Wu, J. G., Wang, J. F., Fang, Q. L. & Chen, J. S. (2010). Transfer of *Bacillus mucilaginosus* and *Bacillus edaphicus* to the genus *Paenibacillus* as *Paenibacillus mucilaginosus* comb. nov. and *Paenibacillus edaphicus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 8-14.
- Iida, K., Ueda, Y., Kawamura, Y., Ezaki, T., Takade, A., Yoshida, S. & Amako, K. (2005). *Paenibacillus motobuensis* sp. nov., isolated from a composting machine utilizing soil from Motobu-town, Okinawa, Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1811-1816.
- Jeon, C. O., Lim, J. M., Lee, S. S., Chung, B. S., Park, D. J., Xu, L. H., Jiang, C. L. & Kim, C. J. (2009). *Paenibacillus harenae* sp. nov., isolated from desert sand in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 13-17.
- Jin, H. J., Lv, J. & Chen, S. F. (2011a). *Paenibacillus sophorae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Sophora japonica*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 767-771.
- Jin, H. J., Zhou, Y. G., Liu, H. C. & Chen, S. F. (2011b). *Paenibacillus jilunlii* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Begonia semperflorens*. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 1350-1355.
- Kampfer, P., Falsen, E., Lodders, N., Martin, K., Kassmannhuber, J. & Busse, H. J. (2012).

- Paenibacillus chartarius* sp. nov., isolated from a paper mill. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1342-1347.
- Khianggam, S., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Kim, K. K., Lee, K. C. & Lee, J. S. (2011). *Paenibacillus xylanisolvans* sp. nov., a xylan-degrading bacterium from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 160-164.
- Khianggam, S., Tanasupawat, S., Lee, J. S., Lee, K. C. & Akaracharanya, A. (2009a). *Paenibacillus siamensis* sp. nov., *Paenibacillus septentrionalis* sp. nov. and *Paenibacillus montaniterrae* sp. nov., xylanase-producing bacteria from Thai soils. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 130-134.
- Khianggam, S., Akaracharanya, A., Tanasupawat, S., Lee, K. C. & Lee, J. S. (2009b). *Paenibacillus thailandensis* sp. nov. and *Paenibacillus nanensis* sp. nov., xylanase-producing bacteria isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 564-568.
- Kim, B., Kim, M. N., Lee, K. H., Kwon, S. B., Bae, K. S. & Shin, K. (2009a). *Paenibacillus filicis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of the fern. *The Journal of Microbiology* 47, 524-529.
- Kim, B., Lee, K. H., Kim, M. N., Kim, E., Min, S. R., Kim, H. S. & Shin, K. (2009b). *Paenibacillus pini* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from the rhizosphere of pine tree. *The Journal of Microbiology* 47, 699-704.
- Kim, B., Lee, K. H., Kim, M. N., Kim, E., Rhee, M., Kwon, O. & Shin, K. (2009c). *Paenibacillus pinihumi* sp. nov., a cellulolytic bacterium isolated from the rhizosphere of *Pinus densiflora*. *The Journal of Microbiology* 47, 530-535.
- Kim, B. C., Jeong, W. J., Kim do, Y., Oh, H. W., Kim, H., Park, D. S., Park, H. M. & Bae, K. S. (2009d). *Paenibacillus pueri* sp. nov., isolated from Pu'er tea. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1002-1006.
- Kim, D. S., Bae, C. Y., Jeon, J. J., Chun, S. J., Oh, H. W., Hong, S. G., Baek, K. S., Moon, E. Y. & Bae, K. S. (2004). *Paenibacillus elgii* sp. nov., with broad antimicrobial activity. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 2031-2035.
- Kim, J. M., Lee, S. H., Lee, S. H., Choi, E. J. & Jeon, C. O. (2013). *Paenibacillus hordei* sp. nov., isolated from naked barley in Korea. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103, 3-9.
- Kim, J. H., Kang, H. & Kim, W. (2014). *Paenibacillus doosanensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1271-1277.
- Kim, K. K., Lee, K. C., Yu, H., Ryoo, S., Park, Y. & Lee, J. S. (2010). *Paenibacillus sputi* sp. nov., isolated from the sputum of a patient with pulmonary disease. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2371-2376.
- Kim, M. K., Kim, Y. A., Park, M. J. & Yang, D. C. (2008). *Paenibacillus ginsengihumi* sp. nov., a

- bacterium isolated from soil in a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 1164-1168.
- Kishore, K. H., Begum, Z., Pathan, A. A. & Shivaji, S. (2010). *Paenibacillus glacialis* sp. nov., isolated from the Kafni glacier of the Himalayas, India. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 909-1913.
- Ko, K. S., Kim, Y. S., Lee, M. Y., Shin, S. Y., Jung, D. S., Peck, K. R. & Song, J. H. (2008). *Paenibacillus konsidensis* sp. nov., isolated from a patient. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2164-2168.
- Kong, B. H., Liu, Q. F., Liu, M., Liu, Y., Liu, L., Li, C. L., Yu, R. & Li, Y. H. (2013). *Paenibacillus typhae* sp. nov., isolated from roots of *Typha angustifolia* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1037-1044.
- Kuroshima, K., Sakane, T., Takata, R. & Yokota, A. (1996). *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolyticus* sp. nov., new chitinolytic members of the genus *Bacillus*. *Int J Syst Bacteriol* 46, 76-80.
- Lee, H., Roh, S. W., Yim, K. J. & other authors (2013a). *Paenibacillus marinisediminis* sp. nov., a bacterium isolated from marine sediment. *Journal of Microbiology* 51, 312-317.
- Lee, J. S., Lee, K. C., Chang, Y. H., Hong, S. G., Oh, H. W., Pyun, Y. R. & Bae, K. S. (2002). *Paenibacillus daejeonensis* sp. nov., a novel alkaliphilic bacterium from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 2107-2111.
- Lee, J., Kim, C. & Yoon, K. (2011). *Paenibacillus telluris* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from soil. *The Journal of Microbiology* 49, 617-621.
- Lee, F. L., Kuo, H. P., Tai, C. J., Yokota, A. & Lo, C. C. (2007). *Paenibacillus taiwanensis* sp. nov., isolated from soil in Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1351-1354.
- Lee, F. L., Tien, C. J., Tai, C. J., Wang, L. T., Liu, Y. C. & Chern, L. L. (2008). *Paenibacillus taichungensis* sp. nov., from soil in Taiwan. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2640-2645.
- Lee, J., Shin, N. R., Jung, M. J., Roh, S. W., Kim, M. S., Lee, J. S., Lee, K. C., Kim, Y. O. & Bae, J. W. (2013b). *Paenibacillus oceanisediminis* sp. nov. isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 428-434.
- Lee, J. C. & Yoon, K. H. (2008). *Paenibacillus woosongensis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 612-616.
- Li, J., Lu, Q., Liu, T., Zhou, S., Yang, G. & Zhao, Y. (2014a). *Paenibacillus guangzhouensis* sp. nov., an Fe(III)- and humus-reducing bacterium from a forest soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 3891-3896.
- Li, Y. F., Calley, J. N., Ebert, P. J. & Helmes, E. B. (2014b). *Paenibacillus lentus* sp. nov., a beta-mannanolytic bacterium isolated from mixed soil samples in a selective enrichment using guar gum as the sole carbon source. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1166-1172.

- Lim, J. M., Jeon, C. O., Lee, J. C., Xu, L. H., Jiang, C. L. & Kim, C. J. (2006a). *Paenibacillus gansuensis* sp. nov., isolated from desert soil of Gansu Province in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2131-2134.
- Lim, J. M., Jeon, C. O., Park, D. J., Xu, L. H., Jiang, C. L. & Kim, C. J. (2006b). *Paenibacillus xinjiangensis* sp. nov., isolated from Xinjiang province in China. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2579-2582.
- Liu, Y., Liu, L., Qiu, F., Schumann, P., Shi, Y., Zou, Y., Zhang, X. & Song, W. (2010). *Paenibacillus hunanensis* sp. nov., isolated from rice seeds. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 1266-1270.
- Logan, N. A., De Clerck, E., Lebbe, L., Verhelst, A., Goris, J., Forsyth, G., Rodriguez-Diaz, M., Heyndrickx, M. & De Vos, P. (2004). *Paenibacillus cineris* sp. nov. and *Paenibacillus cookii* sp. nov., from Antarctic volcanic soils and a gelatin-processing plant. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1071-1076.
- Ma, Y., Xia, Z., Liu, X. & Chen, S. (2007a). *Paenibacillus sabiniae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere soils of shrubs. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 6-11.
- Ma, Y., Zhang, J. & Chen, S. (2007b). *Paenibacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Zanthoxylum simulans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 873-877.
- Ma, Y. C. & Chen, S. F. (2008). *Paenibacillus forsythiae* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 319-323.
- Meehan, C., Bjourson, A. J. & McMullan, G. (2001). *Paenibacillus azoreducens* sp. nov., a synthetic azo dye decolorizing bacterium from industrial wastewater. *Int J Syst Evol Microbiol* 51, 1681-1685.
- Ming, H., Nie, G., Jiang, H., Yu, T., Zhou, E., Feng, H., Tang, S. & Li, W. (2012). *Paenibacillus frigoriessistens* sp. nov., a novel psychrotroph isolated from a peat bog in Heilongjiang, Northern China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102, 297-305.
- Montes, M. J., Mercadé, E., Bozal, N. & Guinea, J. (2004). *Paenibacillus antarcticus* sp. nov., a novel psychrotolerant organism from the Antarctic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1521-1526.
- Moon, J. C., Jung, Y. J., Jung, J. H., Jung, H. S., Cheong, Y. R., Jeon, C. O., Lee, K. O. & Lee, S. Y. (2011). *Paenibacillus sacheonensis* sp. nov., a xylanolytic and cellulolytic bacterium isolated from tidal flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 2753-2757.
- Moon, J. & Kim, J. (2014). Isolation of *Paenibacillus pinesoli* sp. nov. from forest soil in Gyeonggi-Do, Korea. *Journal of Microbiology* 52, 273-277.
- Nakamura, L. K. (1984). *Bacillus amylolyticus* sp. nov., nom. rev., *Bacillus lautus* sp. nov., nom.

- rev., *Bacillus pabuli* sp. nov., nom. rev., and *Bacillus validus* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 34, 224-226.
- Nakamura, L. K. (1987). *Bacillus alginolyticus* sp. nov. and *Bacillus chondroitinus* sp. nov., two alginate-degrading species. *Int J Syst Bacteriol* 37, 284-286.
- Nakamura, L. K. (1990). *Bacillus thiaminolyticus* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 40, 242-246.
- Nakamura, L. K. (1996). *Paenibacillus apiarius* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 46, 688-693.
- Nelson, D. M., Glawe, A. J., Labeda, D. P., Cann, I. K. & Mackie, R. I. (2009). *Paenibacillus tundrae* sp. nov. and *Paenibacillus xylanexedens* sp. nov., psychrotolerant, xylan-degrading bacteria from Alaskan tundra. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1708-1714.
- Oh, H., Kim, B., Lee, K. H., Park, D., Park, H. & Bae, K. S. (2008). *Paenibacillus camelliae* sp. nov., isolated from fermented leaves of *Camellia sinensis*. *The Journal of Microbiology* 46, 530-534.
- Osman, S., Satomi, M. & Venkateswaran, K. (2006). *Paenibacillus pasadenensis* sp. nov. and *Paenibacillus barengoltzii* sp. nov., isolated from a spacecraft assembly facility. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 1509-1514.
- Park, D. S., Jeong, W. J., Lee, K. H., Oh, H. W., Kim, B. C., Bae, K. S. & Park, H. Y. (2009). *Paenibacillus pectinilyticus* sp. nov., isolated from the gut of *Diestrammena apicalis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 59, 1342-1347.
- Park, M. H., Traiwan, J., Jung, M. Y., Nam, Y. S., Jeong, J. H. & Kim, W. (2011). *Paenibacillus chungangensis* sp. nov., isolated from a tidal-flat sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 281-285.
- Park, M. J., Kim, H. B., An, D. S., Yang, H. C., Oh, S. T., Chung, H. J. & Yang, D. C. (2007). *Paenibacillus soli* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 146-150.
- Pettersson, B., Rippere, K. E., Yousten, A. A. & Priest, F. G. (1999). Transfer of *Bacillus lentimorbus* and *Bacillus popilliae* to the genus *Paenibacillus* with emended descriptions of *Paenibacillus lentimorbus* comb. nov. and *Paenibacillus popilliae* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 49, 531-540.
- Priest, G. P. (2009). *Paenibacillus*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 3, pp. 269-295. Edited by A. C. Parte. Dordrecht: Springer.
- Rivas, R., Garcia-Fraile, P., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E. & Velazquez, E. (2006). *Paenibacillus cellulolyticus* sp. nov., a cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from the bract phyllosphere of *Phoenix dactylifera*. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2777-2781.



- Rivas, R., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E. & Velazquez, E. (2005a). *Paenibacillus phyllosphaerae* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from the phyllosphere of *Phoenix dactylifera*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 743-746.
- Rivas, R., Gutierrez, C., Abril, A., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E., Ventosa, A. & Velazquez, E. (2005b). *Paenibacillus rhizosphaerae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Cicer arietinum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 1305-1309.
- Rivas, R., Mateos, P. F., Martinez-Molina, E. & Velazquez, E. (2005c). *Paenibacillus xylanilyticus* sp. nov., an airborne xylanolytic bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 405-408.
- Rodriguez-Diaz, M., Lebbe, L., Rodelas, B., Heyrman, J., De Vos, P. & Logan, N. A. (2005). *Paenibacillus wynnii* sp. nov., a novel species harbouring the *nifH* gene, isolated from Alexander Island, Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2093-2099.
- Romanenko, L. A., Tanaka, N., Svetashev, V. I. & Kalinovskaya, N. I. (2013). *Paenibacillus profundus* sp. nov., a deep sediment bacterium that produces isocoumarin and peptide antibiotics. *Arch Microbiol* 195, 247-254.
- Roux, V., Fenner, L. & Raoult, D. (2008). *Paenibacillus provencensis* sp. nov., isolated from human cerebrospinal fluid, and *Paenibacillus urinalis* sp. nov., isolated from human urine. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 682-687.
- Roux, V. & Raoult, D. (2004). *Paenibacillus massiliensis* sp. nov., *Paenibacillus sanguinis* sp. nov. and *Paenibacillus timonensis* sp. nov., isolated from blood cultures. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 1049-1054.
- Saha, P., Mondal, A. K., Mayilraj, S., Krishnamurthi, S., Bhattacharya, A. & Chakrabarti, T. (2005). *Paenibacillus assamensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from a warm spring in Assam, India. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2577-2581.
- Sanchez, M. M., Fritze, D., Blanco, A., Sproer, C., Tindall, B. J., Schumann, P., Kroppenstedt, R. M., Diaz, P. & Pastor, F. I. (2005). *Paenibacillus barcinonensis* sp. nov., a xylanase-producing bacterium isolated from a rice field in the Ebro River delta. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 935-939.
- Scheldeman, P., Goossens, K., Rodriguez-Diaz, M., Pil, A., Goris, J., Herman, L., De Vos, P., Logan, N. A. & Heyndrickx, M. (2004). *Paenibacillus lactis* sp. nov., isolated from raw and heat-treated milk. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 885-891.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. (1997a). Emended description of *Paenibacillus amylolyticus* and description of *Paenibacillus illinoisensis* sp. nov. and *Paenibacillus chibensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 47, 299-306.
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. (1997b). Transfer of

- Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 47, 289-298.
- Shimoyama, T., Johari, N. B., Tsuruya, A., Nair, A. & Nakayama, T. (2014). *Paenibacillus relictisesami* sp. nov., isolated from sesame oil cake. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1534-1539.
- Smerda, J., Sedlacek, I., Pacova, Z., Durnova, E., Smiskova, A. & Havel, L. (2005). *Paenibacillus mendelii* sp. nov., from surface-sterilized seeds of *Pisum sativum* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2351-2354.
- Smerda, J., Sedlacek, I., Pacova, Z., Krejci, E. & Havel, L. (2006). *Paenibacillus sepulcri* sp. nov., isolated from biodeteriorated mural paintings in the Servilia tomb. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2341-2344.
- Son, J. S., Kang, H. U. & Ghim, S. Y. (2014). *Paenibacillus dongdonensis* sp. nov., isolated from rhizospheric soil of *Elymus tsukushiensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 2865-2870.
- Suominen, I., Sproer, C., Kampfer, P., Rainey, F. A., Lounatmaa, K. & Salkinoja-Salonen, M. (2003). *Paenibacillus stellifer* sp. nov., a cyclodextrin-producing species isolated from paperboard. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1369-1374.
- Takeda, M., Suzuki, I. & Koizumi, J. (2005). *Paenibacillus hodogayensis* sp. nov., capable of degrading the polysaccharide produced by *Sphaerotilus natans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 737-741.
- Takeda, M., Kamagata, Y., Shinmaru, S., Nishiyama, T. & Koizumi, J. (2002). *Paenibacillus koleovorans* sp. nov., able to grow on the sheath of *Sphaerotilus natans*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 1597-1601.
- Tang, Q. Y., Yang, N., Wang, J. & other authors (2011). *Paenibacillus algorifonticola* sp. nov., isolated from a cold spring. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 2167-2172.
- Tcherpakov, M., Ben-Jacob, E. & Gutnick, D. L. (1999). *Paenibacillus dendritiformis* sp. nov., proposal for a new pattern-forming species and its localization within a phylogenetic cluster. *Int J Syst Bacteriol* 49 Pt 1, 239-246.
- Ten, L. N., Baek, S. H., Im, W. T., Lee, M., Oh, H. W. & Lee, S. T. (2006). *Paenibacillus panacisoli* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from soil in a ginseng field in South Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56, 2677-2681.
- Tonouchi, A., Tazawa, D. & Fujita, T. (2014). *Paenibacillus shirakamiensis* sp. nov., isolated from the trunk surface of a Japanese oak (*Quercus crispula*). *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 1763-1769.
- Traiwai, J., Park, M. H. & Kim, W. (2011). *Paenibacillus puldeungensis* sp. nov., isolated from a grassy sandbank. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 670-673.

- Ueda, J., Yamamoto, S. & Kurosawa, N. (2013). *Paenibacillus thermoaerophilus* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from compost. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 3330-3335.
- Uetanabaro, A. P., Wahrenburg, C., Hunger, W., Pukall, R., Sproer, C., Stackebrandt, E., de Canhos, V. P., Claus, D. & Fritze, D. (2003). *Paenibacillus agarexedens* sp. nov., nom. rev., and *Paenibacillus agaridevorans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 1051-1057.
- Valverde, A., Fterich, A., Mahdhi, M., Ramirez-Bahena, M. H., Caviedes, M. A., Mars, M., Velazquez, E. & Rodriguez-Llorente, I. D. (2010). *Paenibacillus prosopidis* sp. nov., isolated from the nodules of *Prosopis farcta*. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2182-2186.
- Valverde, A., Peix, A., Rivas, R., Velazquez, E., Salazar, S., Santa-Regina, I., Rodriguez-Barrueco, C. & Igual, J. M. (2008). *Paenibacillus castaneae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of *Castanea sativa* Miller. *Int J Syst Evol Microbiol* 58, 2560-2564.
- Van der Maarel, M., Veen, A. & Wijbenga, D. (2000). *Paenibacillus granivorans* sp. nov., a new *Paenibacillus* species which degrades native potato starch granules. *Syst Appl Microbiol* 23, 344-348.
- Vaz-Moreira, I., Faria, C., Nobre, M. F., Schumann, P., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2007). *Paenibacillus humicus* sp. nov., isolated from poultry litter compost. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2267-2271.
- Vaz-Moreira, I., Figueira, V., Lopes, A. R., Pukall, R., Sproer, C., Schumann, P., Nunes, O. C. & Manaia, C. M. (2010). *Paenibacillus residui* sp. nov., isolated from urban waste compost. *Int J Syst Evol Microbiol* 60, 2415-2419.
- Velázquez, E., de Miguel, T., Poza, M., Rivas, R., Rosselló-Mora, R. & Villa, T. G. (2004). *Paenibacillus favisporus* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from cow faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 54, 59-64.
- von der Weid, I., Duarte, G. F., van Elsas, J. D. & Seldin, L. (2002). *Paenibacillus brasilensis* sp. nov., a novel nitrogen-fixing species isolated from the maize rhizosphere in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 2147-2153.
- Wang, D., Jiang, Y., Wei, X., Lai, H. & Xue, Q. (2014). *Paenibacillus quercus* sp. nov., isolated from rhizosphere of *Quercus aliena* var. *acuteserrata*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105, 1173-1178.
- Wang, L., Baek, S. H., Cui, Y., Lee, H. G. & Lee, S. T. (2012). *Paenibacillus sediminis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from a tidal flat. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 1284-1288.
- Wang, M., Yang, M., Zhou, G., Luo, X., Zhang, L., Tang, Y. & Fang, C. (2008). *Paenibacillus tarimensis* sp. nov., isolated from sand in Xinjiang, China. *Int J Syst Evol Microbiol* 58,

2081-2085.

- Wu, X., Fang, H., Qian, C., Wen, Y., Shen, X., Li, O. & Gao, H. (2011). *Paenibacillus tianmuensis* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 61, 1133-1137.
- Wu, Y. F., Wu, Q. L. & Liu, S. J. (2013). *Paenibacillus taihuensis* sp. nov., isolated from an eutrophic lake. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 3652-3658.
- Xiang, W., Wang, G., Wang, Y., Yao, R., Zhang, F., Wang, R., Wang, D. & Zheng, S. (2014). *Paenibacillus selenii* sp. nov., isolated from selenium mineral soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 2662-2667.
- Xie, C. H. & Yokota, A. (2007). *Paenibacillus terrigena* sp. nov., isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 70-72.
- Yao, R., Wang, R., Wang, D., Su, J., Zheng, S. & Wang, G. (2014). *Paenibacillus selenitireducens* sp. nov., a selenite-reducing bacterium isolated from a selenium mineral soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 64, 805-811.
- Yoon, M. H., Ten, L. N. & Im, W. T. (2007). *Paenibacillus ginsengarvi* sp. nov., isolated from soil from ginseng cultivation. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 1810-1814.
- Yoon, J. H., Kang, S. J., Yeo, S. H. & Oh, T. K. (2005). *Paenibacillus alkaliterrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* 55, 2339-2344.
- Yoon, J. H., Oh, H. M., Yoon, B. D., Kang, K. H. & Park, Y. H. (2003). *Paenibacillus kribbensis* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* sp. nov., biofloculants for efficient harvesting of algal cells. *Int J Syst Evol Microbiol* 53, 295-301.
- Yoon, J. H., Seo, W. T., Shin, Y. K., Kho, Y. H., Kang, K. H. & Park, Y. H. (2002). *Paenibacillus chinjuensis* sp. nov., a novel exopolysaccharide-producing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 52, 415-421.
- Yoon, J. H., Yim, D. K., Lee, J. S., Shin, K. S., Sato, H. H., Lee, S. T., Park, Y. K. & Park, Y. H. (1998). *Paenibacillus campinasensis* sp. nov., a cyclodextrin-producing bacterium isolated in Brazil. *Int J Syst Bacteriol* 48, 833-837.
- Zhang, J., Wang, Z. T., Yu, H. M. & Ma, Y. (2013). *Paenibacillus catalpae* sp. nov., isolated from the rhizosphere soil of *Catalpa speciosa*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63, 1776-1781.
- Zhou, Y., Gao, S., Wei, D. Q., Yang, L. L., Huang, X., He, J., Zhang, Y. J., Tang, S. K. & Li, W. J. (2012). *Paenibacillus thermophilus* sp. nov., a novel bacterium isolated from a sediment of hot spring in Fujian province, China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 102, 601-609.