

秋田の温泉で抗生物質を生産している好熱菌を探索しよう

生物資源科学部 応用生物科学科

2年 佐々木 梓

2年 原田 華

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

助教 牟田口 祐太

背景・目的

抗生物質は微生物が生産する他の微生物の生育を阻害する物質であり、微生物が病原体となる様々な感染症の治療に利用されている。しかし、従来の抗生物質が効かない薬剤耐性菌の出現が世界的な問題となっており、新規の抗生物質の探索または開発は重要な研究課題の1つとなっている。

これまで、抗生物質を生産する微生物は土壌や淡水、海水など様々な自然環境から見出されてきた。一方で、通常の生物が生息できない極限環境に生息する極限環境微生物は、抗生物質の生物資源としての探索が殆ど進んでおらず、新たな抗生物質生産菌を見出せる可能性がある。本研究の対象としている好熱菌も、温泉等の高温環境に生息する極限環境微生物の一種である。秋田県には多くの温泉源があり、特に地表に源泉が噴き出して周囲に高温な環境を形成している場所が多数ある。このような場所には、多種多様な好熱菌が存在していると考えられる。

以上のことから私たちは、温泉源の豊かな秋田県で抗生物質を生産する好熱菌を見出すことができれば、新たな抗生物質の発見に繋がる可能性が高いと考えた。本研究では、秋田県の温泉地から土壌を採取し、抗生物質を生産する好熱菌を探索することを目的とする。

実験内容と結果

○実験 I 温泉土壌からの好熱菌の培養

1) 温泉土壌の採取

秋田県の温泉である小安峡温泉 (6月、12月)、黒湯温泉 (7月)、奥奥八九郎温泉 (11月) を訪れ、各温泉の3、4ヶ所で土壌サンプルを保温容器に採取した。各温泉土壌サンプルのpHおよび採取場所の温度を表1に示す。サンプルを研究室に持ち帰った後、温泉土壌の一部の砂泥を濾紙で除去した。その濾液と残りの温泉土壌を50℃で保存した。

表1. 採取した温泉土壌サンプル

小安峡温泉 (6月)			小安峡温泉 (12月)			黒湯温泉			奥奥八九郎温泉		
試料 番号	温度 (°C)	pH	試料 番号	温度 (°C)	pH	試料 番号	温度 (°C)	pH	試料 番号	温度 (°C)	pH
①	56.5	7.9	④	56.5	7.9	⑧	51.5	4.5	⑪	40.6	6.7
②	56.6	7.8	⑤	56.6	7.8	⑨	36.7	4.5	⑫	43.5	6.9
③	57.2	7.8	⑥	57.2	7.8	⑩	64.5	4.5	⑬	43.5	6.7
			⑦	58.0	7.8				⑭	43.2	6.7

2) 好熱菌の培養

本研究では、土壤細菌の培養に広く利用されている LG 培地を用いて、採取した温泉土壌から好熱菌の培養を試みた。加えて、11 月と 12 月にそれぞれ採取した奥奥八九郎温泉、小安峡温泉のサンプルについては、代表的な抗生物質生産細菌群である放線菌の効率的分離法を参考にして、好熱性の放線菌の培養も試みた。

a) LG 培地を用いた好熱菌の分離培養

LG 培地の組成を表 2 に示す。LG 培地を 2%寒天で固めた LG 寒天培地に温泉土壌サンプルの濾液 100 μ L を塗布し、微生物の増殖によってコロニーが形成されるまで培養した。また、環境微生物の中には栄養が豊富な条件下では増殖しないものもあるため²⁾、LG 培地を蒸留水で 10 倍希釈した培地 (1/10×LG 培地)の寒天培地でも培養を試みた。培地の pH 及び培養温度は表 3 に示す通り、土壌サンプルを採取した環境に合わせて設定した。

10.0 g/L トリプトン
5.0 g/L 酵母エキス
5.0 g/L NaCl
2.5 g/L グルコース
(20.0 g/L 寒天)

サンプル採取場所	試料番号	培地 pH	培養温度
小安峡温泉	①～⑦	7.5	55°C
黒湯温泉	⑧～⑩	4.5	55°C
奥奥八九郎温泉	⑪～⑭	6.5	45°C

b) 好熱性放線菌の分離培養

温泉土壌サンプル中の砂泥を湿重量で約 0.5 g 計りとり、同重量の孢子抽出液(表 4)を加えてよく混合した。この混合液を 10 分間静置した後、その上清 100 μ L を HA 寒天培地 (表 5) に塗布し、微生物の増殖によってコロニーが形成されるまで培養した。培地の pH 及び培養温度は a)と同様に設定した。

0.1 % Sodium dodecyl sulfate (SDS)
50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0)
12% 酵母エキス

0.1% 腐植酸	0.02 g/L CaCO ₃
1.0 g/L 酵母エキス	0.01 g/L FeSO ₄ •7H ₂ O
1.7 g/L KCl	50 μ g/mL サイクロヘキシミド
1.25 g/L Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	20 μ g/mL ナジリクス酸
0.5 g/L MgSO ₄ •7H ₂ O	20 g/L 寒天

○結果 I

各培養シャーレには様々な形状、色、大きさのコロニーが多数生育した。そのうち、外見の特徴が異なるコロニー309 株を任意に選択し (表 6)、抗生物質生産菌をバイオアッセイにて探索することとした。

表 6. 各温泉土壌から得たコロニー数

小安峽温泉			黒湯温泉			奥奥八九郎温泉		
番号	培地	コロニー数	番号	培地	コロニー数	番号	培地	コロニー数
①	LG	13	⑧	LG	0	⑪	LG	5
	1/10×LG	19		1/10×LG	32		1/10×LG	21
②	LG	11	⑨	LG	0	⑫	HA	4
	1/10×LG	21		1/10×LG	4		LG	1
③	LG	12	⑩	LG	0	⑬	1/10×LG	6
	1/10×LG	20		1/10×LG	32		HA	0
④	HA	5				LG	3	
⑤	HA	11				⑭	1/10×LG	20
⑥	HA	8					HA	0
⑦	HA	22				LG	8	
						⑭	1/10×LG	18
							HA	13

○実験 II 抗生物質生産菌のスクリーニング

実験 I で選択した 309 株を液体培地で培養した後、培養上清を検体としてバイオアッセイを実施し、抗生物質を生産している可能性があるコロニーを探索した。

1) 液体培地での培養

LG 寒天培地および 10×LG 寒天培地に形成されたコロニーを、5 mL の LG 液体培地、10×LG 液体培地にそれぞれ植菌した。一方、HA 寒天培地に形成されたコロニーは、放線菌の抗生物質生産に用いられる GPY 培地 (5 mL、表 7) に植菌した。培地の pH 及び培養温度は表 3 に示す通りに設定し、7 日間振盪培養した。

表 7. GPY 培地

10.0 g/L	グルコース
4.0 g/L	ポリペプトン
4.0 g/L	酵母エキス
0.5 g/L	MgSO ₄ •7H ₂ O
1.0 g/L	K ₂ HPO ₄

2) 検体の調製

培養液 500 μL を回収し、エタノール 500 μL を加え、ボルテックスで十分に攪拌した。遠心分離 (10,000×g, 2 min) 後、上清を検体として回収し、-20°C で保存した。

3) バイオアッセイ

本研究では検定菌として、*Escherichia coli* (グラム陰性細菌)、*Bacillus subtilis* (グラム陽性細菌)、*Candida albicans* (真核微生物)、*Kocuria rhizophila* (抗生物質高感受性細菌) を用いてバイオアッセイを行った。バイオアッセイ用培地 (表 8) に各検定菌の菌体懸濁液をそれぞれ 1% ずつ添加し、0.8%

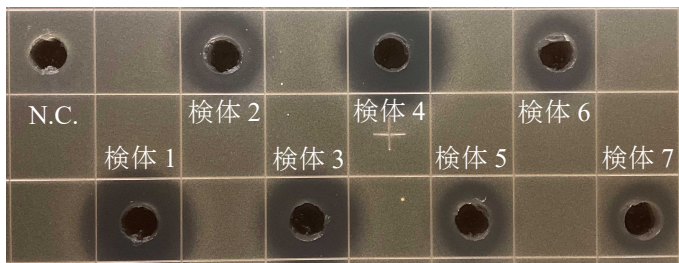
表 8. バイオアッセイ用培地

1.0 g/L	グルコース
2.0 g/L	酵母エキス
1.0 g/L	ポリペプトン
8.0 g/L	寒天

寒天で固めたものを検定シャーレとして使用した。検定シャーレの複数箇所を直径約 1 cm の円形にくり抜き、各穴に 30 μL の検体を注入した。これを各検定菌の至適生育温度で 1~2 日間インキュベートし、検体の注入箇所周辺における生育阻止円の有無を観察した。

○結果 II

309 検体のうち 7 検体 (検体 1~7 とする)について、*K. rhizophila* の検定シャーレで生育阻止円が観察された (図 1)。7 検体はいずれも奥奥八九郎温泉の土壌から得られた菌株の培養上清だった (表 9)。これら 7 検体を他の検定菌で検定した場合には生育阻止円は観察されず、また、残りの 302 検体はいずれの検定菌に対しても生育阻止円を形成しなかった。



検体番号	試料番号	使用培地
1~3	⑪	1/10×LG
4	⑬	LG
5~7	⑭	1/10×LG

図 1. 検体 1~7 の *K. rhizophila* に対するバイオアッセイの結果
N.C.: ネガティブコントロール (50%エタノール)

考察

本研究では秋田県内 3 ヶ所の温泉から土壌を採取し、異なる培養条件から多種多様なコロニーを得た。その中から、分離土壌・外観がそれぞれ異なる 309 株について、液体培養後の上清を検体としてバイオアッセイを実施し、抗菌活性を示すものをスクリーニングした。結果として、奥奥八九郎温泉の土壌から得た 7 株の培養上清で *K. rhizophila* に対する生育阻害が観察された。以上より、抗生物質を生産する可能性が高い微生物を温泉土壌から見出すことに成功した。

好熱菌由来の抗生物質として、好熱性 *Streptomyces* 属放線菌が生産する XK-46³⁾や好熱性 *Micromonospora* 属放線菌が生産する T-12⁴⁾が報告されている。しかし、いずれの報告例もかなり古く、好熱菌由来の抗生物質に関する知見は現在も少ないと考えられる。この点に着目し、本研究では温泉土壌から抗生物質を生産する「好熱菌」を探索した。好熱菌は「至適生育温度が 45°C 以上、あるいは生育限界温度が 55°C 以上の微生物」と定義されているので、本研究では基本的に 55°C で菌の培養を試みた。一方、奥奥八九郎温泉の源泉とその付近の温度は 45°C 程度であり、その土壌から 55°C で培養を試みた場合にはコロニーは殆ど得られず、45°C の培養によって多様なコロニーを得ることに成功した。本研究で抗生物質を生産している可能性を見出した 7 株も 45°C 培養で得られた菌株であり、学術的には「好熱菌」ではない可能性がある。しかし、調べた限りにおいて温泉土壌から抗生物質を生産する菌を見出した例は無いことから、これらの菌株が「好熱菌」に該当しない場合でも、新規の抗生物質生産菌および抗生物質を見出せる可能性がある。

抗生物質は医薬、農薬、保存料、家畜飼料添加剤に加え、生化学試薬として生体反応の解析等にも広く活用されている。よって、多様な微生物から新規抗生物質を見出すことの社会的貢献度は高い。今後、本研究で見出した 7 株の分類学的同定、抗菌活性物質の精製・構造決定、抗菌スペクトルの解析等を進めることで、本研究成果が社会的貢献度および学術的価値の高い研究に発展することが大いに期待できる。

参考文献

- 1) 乙黒美彩, 中島琢自, 宮道慎二. 生物工学会誌 90, 493 (2012)
- 2) 田中靖浩, 玉木秀幸. The Chemical Times 2016, 26 (2016)
- 3) S. Takasawa et al., *J. Antibiot.* 27, 503 (1974)
- 4) A.E. Kosmachev, *Microbiologia (Moskow)* 31, 66 (1962)