

# 思い出の土地から放線菌を見つけよう

生物資源科学部 応用生物科学科

1年 一箭 華倫

1年 宗像 萌

1年 渡邊 葵依

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

准教授 春日 和

## 1. 研究の目的

土壌中には数多くの微生物が存在しており、その中には「放線菌」と呼ばれる一群の細菌がいる。放線菌は、菌糸状に生育するグラム陽性細菌であり、抗生物質、抗真菌物質や抗癌物質など多種多様な薬剤の生産能が知られている。薬として利用されているこれら物質の多くは放線菌が作り出す物質をもとに製造されており、そのような放線菌は、土壌や水系、植物体などから分離されてきたものである。

私たちは微生物や抗生物質に興味があり、どちらにも関係している研究を行っている春日先生のもとで研究したいと考え、また自主研究を通して、自分たちが興味のある研究の知識を得たいと考えたため、今回の自主研究を計画した。

今回の自主研究では、自分たちの思い出の場所の土壌から放線菌を分離し、抗菌活性物質を生産する菌株を見出すことを目的とする。

## 2. 実験

### 1) 土壌試料の採集と処理

放線菌を分離するために、種々の土壌試料を採集した(表1)。まず、放線菌を単離する練習用に、秋田県内の身近な場所で土壌試料を採取し、ついで、夏休みの帰省期間に、各自が独立して以下のように、実家周辺の「思い出の場所」で土壌試料を採取した(表1)。採取した土壌試料は、一週間以上、室温で暗所にて乾燥させて放線菌の孢子形成を促し、放線菌以外の細菌やカビなどの真菌類を減らした。その後、乳鉢で粉碎し、100℃で1～2時間、加熱することによって、放線菌以外の細菌類や真菌類を死滅させ、放線菌の孢子のみが残るようにした。

表1. 土壌試料の採取と採れた菌株数

採取者 宗像				採取者 渡邊				採取者 一箭			
場所	土壌試料	HA	CS	場所	土壌試料	HA	CS	場所	土壌試料	HA	CS
秋田県立大学	ヘリポート横	6	6	秋田県立大学	畑	3	5	秋田県立大学	圃場横	4	4
大潟村	南の池公園	7	5	秋田市	空地	4	7	大潟村	大潟キャンパス桜道	8	8
	アスパラ畑	5	0		家近くの畑	8	7		寮の駐車場	5	8
	サツマイモ畑	4	7		C公園	8	3		寮の横	6	7
福島県田村市	実家の横	6	10	福島県本宮市	畑	12	0		新潟市	実家	6
	公民館花壇①	3	2		消火栓	12	1	ゲートボール場		3	5
	公民館花壇②	1	1		ビワの木の下の木	13	5	公園		1	4
	公民館遊具付近	2	3		クリの木	6	3	祖母の家		2	1
	A小学校	15	2		桑畑	2	3	畑		5	5
福島県三春町	B駅	12	3	ガードレールの下	2	3	川	0	4		
	滝桜	0	4	ビニールハウス	4	1	合計	46	56		
	合計	61	43	小屋の前	3	2					
				合計	74	35					

### 2) 放線菌の分離

1) の乾熱土壌試料を、放線菌の単離に利用されるHA寒天培地(表2)2枚、およびCS寒天培地(表3)2枚に少量散布し、30℃で1週間静置培養して、放線菌コロニーを出現させた。これらの培地には、放線菌以外の菌類や細菌が増殖しないように、シクロヘキシミド(60 µg/mL)、ナイスタチン(60 µg/mL)、ト

リメトプリム(20 µg/mL)、およびナリジクス酸(20 µg/mL)を添加した。

出現したコロニーをできるだけ多く、新しい同じ寒天培地に植え継いで30°Cで1週間培養し、放線菌株を分離した。次に、分離した放線菌株を栄養源が豊富なISP2寒天培地(表4、4種の抗菌物質を同様に添加してある)に植え継ぎ、30°Cで1週間培養した。これにより、得られた放線菌株のコロニーの形状や孢子形成、色素生産などの特徴が明らかになり、他の雑菌が混在していないか確認できた。最後に、重複させないように菌株を選抜して、菌株保存用のISP2培地バイアルに植え継ぎ株名をつけて保存した。

以上により、宗像はHA培地で61、CS培地で43、渡邊はHA培地で74、CS培地で35、一箭はHA培地で46、CS培地で56の菌株を分離した(表1)。

腐植酸	1.0 g/L
酵母エキス	1.0 g/L
KCl	1.7 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	1.25 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g/L
CaCO <sub>3</sub>	0.02 g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g/L
普通寒天	15 g/L
pH7.0-7.2	

微結晶セルロース	5.0 g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5 g/L
酵母エキス	0.5 g/L
KCl	1.7 g/L
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	0.5 g/L
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5 g/L
CaCO <sub>3</sub>	0.02 g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g/L
普通寒天	15 g/L
pH7.0-7.2	

グルコース	4.0 g/L
酵母エキス	4.0 g/L
麦芽エキス	10 g/L
普通寒天	18 g/L
pH 7.0-7.2	

### 3) 液体培養とバイオアッセイ

放線菌の物質生産能力を調べるため、OAT液体培地(表5)とGSSY液体培地(表6)で放線菌単離株を培養し、その培養液に抗菌活性物質が含まれるかバイオアッセイによって検定した。放線菌株は、それぞれの液体培地2 mLをガラス玉1個とともに入れた短試験管に1菌株ずつ植菌し、30°C 1で1週間、120 rpmの往復振盪培養を行った。培養後、等量のエタノールで抽出して遠心分離後に上清を回収した。

最初にすべての抽出液について、*Pseudomonas fluorescens*に対してバイオアッセイを行った(一次検定)。これは抽出液を30 µLずつ8 mmペーパーディスクに染み込ませ、*P. fluorescens*を混ぜたKSMアッセイ培地に乗せて、30°Cで1-2日間培養し、抗菌活性を示す生育阻止円の出現を観察した(表8)。生育阻止円が観察された抽出液について、さらに*E. coli*(大腸菌)、*Bacillus subtilis*(枯草菌)と*Staphylococcus aureus*(黄色ブドウ球菌)、及び*Candida albicans*を用いて二次検定を行った。その結果、表9で示した10株の培養液で抗菌活性物質が検出された。*P. fluorescens*に対しては抗菌活性が明確でない場合も多かったが、*B. subtilis*や*S. aureus*などのグラム陽性細菌に対しては明瞭な抗菌活性を示すものが数多く見いだされた。

日食オーツ	20 g/L
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0 mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0 mg/L

グリセロール	20 g/L
可溶性デンプン	20 g/L
酵母エキス	5 g/L
CaCO <sub>3</sub>	3 g/L
1 N NaOH	1.5 mL/L
pH7.0	

グルコース	1 g/L
酵母エキス	2 g/L
ポリペプトン	5 g/L
普通寒天	8 g/L
1 N NaOH	1 mL/L
pH7.0	

表 8. *P. fluorescens* を用いた一次選抜で抗菌活性を示した菌株

実験者	土壌試料	菌株
宗像	ヘリポート横	MM10
	A 小学校	MM60, MM70, MM71, MM72, MM75, MM78
渡邊	畑	AW38, AW42
	消火栓	AW46
	ビワの木	AW72, AW77
	桑畑	AW77, AW78, AW79
	ガードレールの下	AW85, AW86, AW92
一箭	実家	KI38, KI40, KI41, KI43, KI45
	ゲートボール場	KI52
	畑	KI68
	川	KI69
	公園	KI76, KI77

表9. バイオアッセイの二次選抜の結果

実験者	菌株	生育阻止円 (mm)				
		<i>P. fluorescens</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
宗像	MM10	(13.5)	-	-	-	-
	MM60	(12.9)	-	11.3	-	-
渡邊	AW69	(33.5)	-	20.8	15.7	(11.4)
	AW77	(29.1)	-	23.9	15.3	(23.7)
	AW79	(25.3)	-	23.2	16.5	(20.9)
	AW92	(24.9)	-	17.2	16.2	-
一箭	KI41	(21.0)	-	15.0	11.1	-
	KI45	17.3	-	(12.7)	8.9	-
	KI76	14.0	-	10.3	9.6	-
	KI77	(13.5)	-	14.2	9.5	-

( )付きの数値は目視できたが不明確な阻止円であることを示す。-, 阻止円なし。

#### 4) DNAの抽出とPCR、塩基配列の決定

抗菌活性の生産が認められた放線菌株を、放線菌用のGPY液体培地に植菌し、30°Cで3日間、120rpmの往復振盪培養を行った。培養液から遠心分離(10,000rpm, 2 min)により菌体を回収し、この菌体をSETS緩衝液300 µLに懸濁して20 mg/mLリゾチーム 30 µLを加えて37°Cで30分間反応させ、ついで5 mg/mLアクチナーゼE 34 µLおよび10% SDS 36 µLを加えて溶菌させた。溶菌液に5 M NaClを120 µLとクロロホルム 200 µLを十分に混合し、遠心分離(10,000rpm, 5 min)によってDNAを含む水溶液を得た。この水溶液300 µLにイソプロピルアルコール200 µLを加えて、DNAを沈殿させ、沈殿を500 µLの70%エタノール液で洗浄してから、10 µg/mL RNaseを含むTE緩衝液に溶解した。

このDNAをTE緩衝液でさらに500倍に希釈したものを鋳型(表10)とし、タカラバイオ社のLA Taq with GC buffer、16S rRNA遺伝子の特異的に増幅するプライマーセット(rrn8F, rrn1530R)を使用してPCR反応を行った(表10)。PCR産物は、0.9%アガロースゲル電気泳動により約1.5kbpのDNAが増幅されていることを確認した後に、本学のバイオテクノロジーセンターに塩基配列の解析を依頼した。得られた900塩基以上の配列をBLASTNにかけ、最も近縁な微生物株を明らかにした(表11)。

表10. PCR反応

1. 初期変性	94°C, 1 min
2. 増幅 (30 サイクル)	94°C, 30 sec
	55°C, 30 sec
	72°C, 1 min 30sec
3. 追加伸長反応	72°C, 4 min 30 sec
4. 保存	15°C

表11. 抗菌活性を示した菌株の同定

菌株	配列 (bp)	もっとも近縁である3種		
		1位 (一致度%)	2位	3位
MM10	1068	<i>Streptomyces capoamus</i> (99.8)	<i>S. rameus</i>	<i>S. regensis</i>
MM60	969	<i>Streptomyces bungoensis</i> (100)	<i>S. rameus</i>	<i>S. longwoodensis</i>
AW69	957	<i>Streptomyces viridiformis</i> (99.9)	<i>S. melanosporofaciens</i>	<i>S. antimycoticus</i>
AW77	971	<i>Streptomyces galbus</i> (99.9)	<i>S. bungoensis</i>	<i>S. rameus</i>
AW79	968	<i>Streptomyces galbus</i> (99.9)	<i>S. bungoensis</i>	<i>S. rameus</i>
AW92	950	<i>Streptomyces cacaoi</i> subsp. <i>asoensis</i> (99.9)	<i>S. humidus</i>	<i>S. caniferus</i>
KI41	1048	<i>Streptomyces griseosporus</i> (99.3)	<i>S. somaliensis</i>	<i>S. glomeratus</i>
KI45	1013	<i>Streptomyces bungoensis</i> (99.9)	<i>S. rameus</i>	<i>S. capoamus</i>
KI76	927	<i>Streptomyces toxytricini</i> (100)	<i>S. globosus</i>	<i>S. yangpuensis</i>
KI77	1018	<i>Streptomyces levis</i> (100)	<i>S. tuirus</i>	<i>S. enissocaesilis</i>

AW79はAW77と完全に一致したため、同種と考えられる。また、黄色で示した菌株は互いに近縁種であることがわかった。赤字で示した菌株は抗菌物質の生産が報告されている。

表11に示したように、土壌試料から多種多様な*Streptomyces*属の放線菌を分離できた。一部の菌株では、赤字で示した近縁種で種々の抗菌物質の生産が報告されている。そのため、私たちが

分離した菌株が生産した物質も構造的に関連のある物質である可能性があるが、これに関しては今後の検討が必要である。

### 3. まとめ

私たちは今回の自主研究を通じて、

1. 「自分の思い出の地」から抗菌活性物質を生産する菌株を計10株見出すことができた。これにより、身近な場所に薬となりえる物質を作る微生物が存在していることを実感できた。
2. 基本的な研究で使う技術として、無菌操作やPCR法、電気泳動などを実践した。

また、以上の研究では、以下の結論が導かれた。

1. 表9より、菌株によって抗菌活性の有無に差があったことから、単離できたそれぞれの放線菌が作る抗菌物質は被検菌に対して異なる抗菌活性を示すということがわかった。
2. 表11より、MM60とKI45は最も近縁である種が一致したことから、採取場所が福島県と新潟県で異なるが、別の場所でも近縁の菌が生息していることがわかった。

今後、この研究では、

1. 菌の種類を完全に同定することにより、単離した菌についてもっと多くのことが分かる可能性がある。そして、採取した土壌の環境と放線菌との関係についても考察できるかもしれない。
2. 最初の抗菌物質の探索では、*P. fluorescens*ではなく、*B. subtilis*や*S. aureus*を用いることにより、より多くの抗菌活性物質を検出できる可能性がある。
3. さらに、異なる被検菌を用いてどの菌に対して抗菌活性を示すかを調べれば、それぞれの生産物質の特徴を明らかにできると考えられる。そしてその特徴をもとに生物の病気に役立つ薬や食品などを抗菌するための薬などの応用法を考えていきたい。