

秋田県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

1年 小野 莉奈

1年 宮世古 望夏

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だされてきた。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、抗生物質としての探索が殆ど進んでおらず、新たな抗生物質産生菌を見いだせる可能性がある。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。秋田県とその周辺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おり、抗生物質を生産する好熱菌も存在する可能性がある。

実際に、令和3年度に実施された学生自主研究では、抗生物質を産生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ている。本研究では、秋田県内外の温泉源から抗生物質を生産する好熱菌をさらに探索することを目的とした。

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

秋田県の小安峡温泉(6月)、蒸ノ湯(7月)、大深温泉(7月)と宮城県の鬼首温泉(9月)を訪れ、各温泉の複数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。

表1. 採取した温泉土壌サンプル

採取場所	温度範囲(℃)	pH範囲	試料番号
小安峡温泉	59.8～74.4	6.96～8.37	1～9
蒸ノ湯温泉	42.6～65.6	2.3～4.2	10～12
大深温泉	59.8～74.1	2.2～4.0	13～15
鬼首温泉	52.8～70.6	7.0～8.1	16～25

2) 好熱菌の培養

サンプルを研究室に持ち帰り、直ちに砂泥を取り除いた後に、試料をシャーレ中の固形培地に塗布して、恒温槽にて好熱菌の培養を試みた。土壌細菌の培養に広く用いられるLG培地(表2)を寒天で固化した培地に、温泉試料200 µLを塗布し、60°Cにて2日間または7日間培養した。培地のpHは表3に示す通り、土壌サンプルのpHに合わせて設定した。さらに、鬼首温泉から採取した試料については、寒天培地での60°C培養に加え、ゲランガムで固化した培地を用いて70°Cで培養する条件も検討した。

表2. LG培地

1.0 g/L トリプトン
0.5 g/L 酵母エキス
0.5 g/L 塩化ナトリウム
0.25 g/L グルコース
1.02 g/L 塩化マグネシウム・六水和物
(20.0 g/L 寒天 又は 5.0 g/L ゲランガム)

表3. 好熱菌培養条件

試料番号	培地pH	培地固型化剤	培養温度	培養日数
1, 2, 7	7.0	寒天	60°C	2日間、7日間
3, 4, 5, 6, 8, 9	8.0	寒天	60°C	2日間、7日間
10, 11, 12, 13, 14, 15	4.0	寒天	60°C	2日間、7日間
16, 17, 18, 19, 20	8.0	寒天	60°C	2日間、7日間
21, 22, 23, 24, 25		ゲランガム	70°C	2日間、7日間

○結果 I

結果として、50枚のシャーレに合計17047個のコロニーを得ることに成功した。

○実験 II 抗生物質生産菌のスクリーニング

実験 I で得られた固形培地上のコロニーを対象にバイオアッセイを実施し、抗菌活性物質を生産している可能性があるコロニーを探索した。

バイオアッセイ用軟寒天培地(表4)を加熱溶解し、固化する前(48°C付近)に検定菌 *Kocuria rhizophila*(抗生物質高感受性菌)の菌体を添加・懸濁後、この溶液を好熱菌コロニーが形成された固形培地の上に重層した。軟寒天が固まった後、*K. rhizophila*の最適生育温度でシャーレを2~3日間インキュベートし、好熱菌コロニーの周辺における生育阻止円の有無を観察した(一次スクリーニング)。

続いて、*K. rhizophila*の生育阻止円が観察された好熱菌コロニー(菌株)を、白金耳で新しい固形培地にそれぞれ塗抹してコロニーを形成させ(分離)、新たに得られたコロニーに対して上記と同様の方法でバイオアッセイを行った。一次スクリーニングで選別された好熱菌1株から得られた複数のコロニーの中で、最も半径の大きい阻止円が観察されたものから更に分離・バイオアッセイを行い、この操作を3回繰り返すことで、再現性高く検定菌の生育を阻害する好熱菌株を選抜した(二次スクリーニング)。

表4. バイオアッセイ用軟寒天培地

1.0 g/L	ポリペプトン
2.0 g/L	酵母エキス
1.0 g/L	グルコース
50 mM	リン酸緩衝液 (pH 7.0)
8.0 g/L	寒天

○結果Ⅱ

実験Ⅰで得られた好熱菌コロニー(17047個)のうち、一次スクリーニングで選抜されたものは44株であった。さらに、二次スクリーニングでは9株が選抜された(図1)。これらの9株はいずれも鬼首温泉から分離された菌株であった(表5)。本実験で得られた9株をON1~9とした。

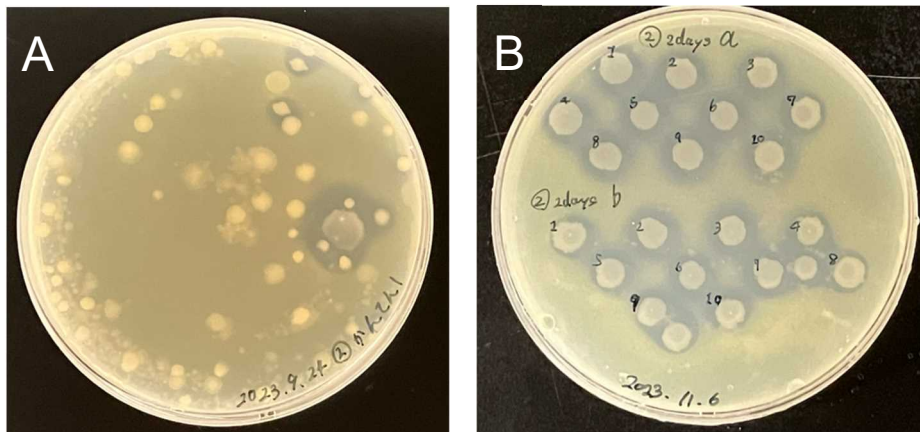


図1. バイオアッセイ結果の様子
 A. 一次スクリーニング時の例
 B. 二次スクリーニング時の例 (N01, N02)

表5. 本研究で選抜された9株の情報

菌株	試料番号	培地固型化剤	培養温度	培養日数
N01~3	17	寒天	60℃	2日間
N04~9	17	ゲランガム	70℃	2日間

○実験Ⅲ 分離菌株のsmall subunit ribosome RNA遺伝子解析

実験Ⅱで得たON1~9を分類学的に同定するために、それぞれのsmall subunit ribosome RNA遺伝子の塩基配列を解析した。細菌16S rRNA遺伝子、古細菌16S rRNA遺伝子、真核生物18S rRNA遺伝子をPCR増幅するための各プライマーセットを用いて、固形培地上のコロニーに対してColony direct PCRを実施し、約1,500 bpのDNA断片が増幅するプライマーセットを検討した。さらに、増幅されたDNA断片の塩基配列解析を本学バイオテクノロジーセンターに依頼した。

○結果Ⅲ

ON1～9の全ての株において、細菌の16S rRNA遺伝子の共通配列から設計されたプライマーである27fと1492r[1]を使用した場合に、約1,500 bpのDNA断片をPCR増幅することに成功した(図2)。各PCR産物の塩基配列解析の結果、ON1～9由来のPCR産物から645～661 bpの塩基配列情報をそれぞれ得た。これらの配列情報を基にBLASTによる相同性検索を行った結果、ON1～9の全ての場合において、好熱性細菌*Geobacillus thermoleovorans* SGAir0734の16S rRNA遺伝子と高い相同性(99%以上)を示した。加えて、ON1～9由来の塩基配列はいずれの組合せでも99.0%以上の相同性を示した。

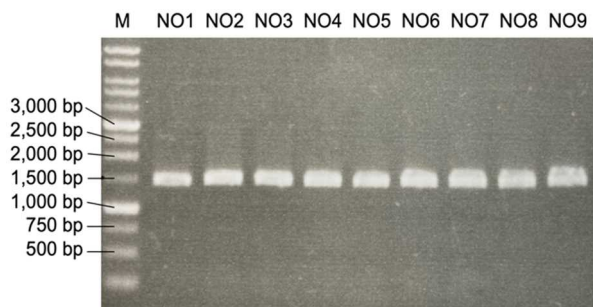


図 2. 16S rRNA 遺伝子の PCR

考察

本研究では秋田県内3ヶ所の温泉、宮城県内1ヶ所の温泉から土壌を採取し、異なる培養条件から多数の好熱菌コロニーを得た。固形培地上のコロニーに検定菌*K. rhizophila*を懸濁した軟寒天を重層し、検定菌の生育阻止円が形成されるコロニーをスクリーニングした。結果として、鬼首温泉の土壌から、検定菌の生育を阻害する抗菌活性物質を生産している可能性が高い好熱菌9株(NO1～9)を分離することに成功した。さらに、16S rRNA遺伝子解析により、これら9株が好熱性細菌である*Geobacillus*属細菌であることが示唆された。

これまでに*Geobacillus*属細菌において、バクテリオシンや抗菌色素などの抗菌活性物質を生産する種が報告されている。しかしながら、多種に渡る*Geobacillus*属細菌に対して抗菌活性物質の報告例は未だ少なく、*Geobacillus*属好熱性細菌は抗菌活性物質の新たな生物資源として注目されている[2]。本研究で見出した好熱菌9株も*Geobacillus*属細菌であったことから、バクテリオシンなどの抗菌活性物質を生産している可能性は非常に高い。さらに、独自に自然環境から分離した菌株であることから、今後、新規構造を有した抗菌活性物質をこれらの菌株から見出すことも期待できる。

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9株が生産する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] 鈴木健一郎、平石明、横田明 編、“微生物の分類・同定実験法”、p50、丸善出版(2012)
- [2] Joanna Zebrowska *et al.* (2022) *Antibiotics*, **11**: 242.