

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06086

研究課題名(和文) 超希少な運動性放線菌の選択分離方法の確立と遺伝資源としての保全

研究課題名(英文) Development of a method for selective isolation of extremely rare motile actinomycetes and their conservation as a genetic resource.

研究代表者

山村 英樹 (Yamamura, Hideki)

山梨大学・大学院総合研究部・准教授

研究者番号：70516939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌は土壌などの環境試料中に多く存在しており、その多くはStreptomyces属が占めている。一方で、分布数の少ない放線菌を希少放線菌と呼び、さらに分布数の少ない運動性放線菌は新規天然物の探索源として需要が高くなってきている。本件研究では従来法とは異なる器材や誘引剤を利用する事でより簡便な運動性放線菌の選択分離法を提案する事を目的とした。様々な検討を行った結果、簡便な器材のみで実施が可能なバルク土壌集積培養法とその改良法を開発することに成功した。この方法によって得られる運動性放線菌は新種推定株が多いことが分かった。うち1株について詳細な分類学的研究を行ったところ、新種であると同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創薬資源として活躍が期待されている希少放線菌、中でも運動性放線菌の分離方法を新たに構築する手法を考案、さらに新規遺伝資源の取得が可能になった。この方法は、ろ紙などを用いる事で、研究設備が乏しい途上国においても希少放線菌探索の実施を可能にするものである。希少放線菌は創薬資源としても価値があるため、本法を用いて途上国自身でコレクションを保有すれば、製薬企業との共同研究費獲得が可能になり、その資金を元手に更なる研究のレベルアップと教育を施すことが可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Actinomycetes are abundant in soil, and most of them occupy the genus Streptomyces. On the other hand, actinomycetes with low abundance are called rare actinomycetes, and motile actinomycetes with even lower abundance have been in high request as a novel natural product source to be explored. The purpose of this study was to propose a simpler method for selective isolation of motile actinomycetes using different equipment and attractants from conventional methods. After various studies, we succeeded in developing a soil-deposited bulk culture method and an improved method that can be implemented using only simple equipment. A number of new species estimated strains of motile actinomycetes were obtained by this method. One of these strains was identified as a new species after a detailed taxonomic study.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放線菌 選択分離法 運動性 ろ紙

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放線菌は土壌などの環境試料中に多く存在しており、その多くは *Streptomyces* 属が占めている。一方で、分布数の少ない放線菌を希少放線菌と呼び、近年、新規天然物の探索源として需要が多い。例えば、Mycetoindole (Saito et al., 2021, J. Antibiotics)は *Actinomycetospora* 属から生産され、Rausuquinone (Harunari et al., 2022, J. Antibiotics)は *Rhodococcus* 属から生産される事が報告されている。更に希少放線菌の中でも運動性を示す放線菌は特殊な分離方法を用いなければ分離が困難であり、新種と推定される菌株はごく稀にしか取得することができない。運動性放線菌として知られる *Actinoplanes* 属からは Teichomycin が発見されているものの、その希少性から十分に天然物創薬の探索研究に供されているとは言い難い状況である。

これまでに、運動性放線菌の選択分離法としては、キャピラリー法(Hayakawa et al., 1992, J. Ferment. Bioeng.)や RC(Rehydration and Centrifugation)法(Hayakawa et al., 2000, Antonie van Leeuwenhoek)などが知られており、特に RC 法は運動性放線菌である *Actinoplanes* 属が多く分離することができる事が知られている(早川ら, 2016, IFO research comm.)。しかしながら、これら分離方法は特殊な器具が必要であり、専門の研究室でなければ実施できない事がデメリットとして挙げられる。そこで、本研究では放線菌分離の専門研究室以外でも実施可能な希少放線菌選択分離法を構築し、新種レベルの希少放線菌の遺伝子資源を保全することを目的とした。本研究で開発した選択分離方法は簡便であるため波及しやすく、日本および世界の創薬研究にリソースを提供する源泉としての機能を担うことが期待される。

### 2. 研究の目的

希少放線菌の中でも運動性放線菌は創薬資源として十分に供されていない。また、特殊な器材を使わない分離方法も知られていない。そこで、一般的な研究室にありふれた器材を利用した運動性放線菌の選択分離法を構築する事を第一の目的とした。運動性放線菌の選択分離方法として知られるキャピラリー法は極小のガラス管に運動性放線菌を誘引させることを特徴として知られる。RC 法も同様に誘引を特徴としている。本研究においても誘引を選択要因として用い、器材としてはろ紙やメンブランフィルターの口径を運動性・非運動性を選別要因とした。

本研究で得られた分離株から新規な遺伝子資源である新種が取得できるのかを第二の目的とした。得られた分離株は常法にもとづいて 16S rDNA 配列から一次的な同定を行い、さらに化学分類学的試験や生理性状試験を行う事で新種としての評価を行った。

### 3. 研究の方法

#### 1) バルク土壌集積培養法

2点の畑などの土壌約 300 g をそれぞれ風乾せずにタッパーに入れ、滅菌水で浸潤させ、ろ紙を2つ折りにした状態で 0.1% スキムミルクを含む 5 mM CHES buffer (pH 9.0) を入れ、そのまま湿潤土壌に差し入れた。その後、約 90 分間静置し、ろ紙内の液を分取し、適宜希釈した後に放線菌の選択分離培地 HV 寒天培地に接種し、約 2 週間 30°C で培養した(Fig.1)。その後、出現したコロニー数を計測した。得られたコロニーについては、純粋分離後に DNA 抽出し、PCR にて 16S rDNA を増幅、ダイレクトシーケンスにて塩基配列を決定した。得られた配列は EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>) にて既知種との相動性検索を行った。また、分離株はすべて研究室のマイナス 80 度のディープフリーザーにて凍結保存を行った。なお、既知種との相動性が 98.7% 以上を当該種として計上し、それ未満を未知種として計上した。

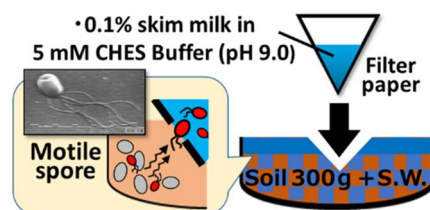


Fig. 1 Simple scheme for bulk soil accumulation technique

#### 2) バルク土壌集積培養法の改良

バクテリアの出現率減少を目的とした改良として、土壌の風乾を行った。また、複数種類の抗生物質を HV 寒天培地に加えることで、出現する運動性放線菌の種類を多様化させる検討を行った。具体的には、アミカシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、スペクチノマイシン、トブラマイシン、ネオマイシン、パロモマイシンについて抗生物質耐性試験を行った。得られた分離株については 16S rDNA の塩基配列を決定し、近縁種との相動性値を算出し、98.7% 以下を新種推定株とした。

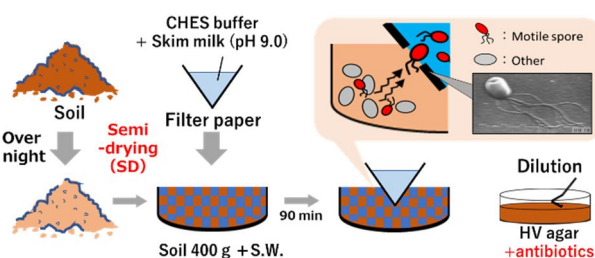


Fig. 2 Scheme for bulk soil accumulation technique using semi-drying soil

### 3) 新種推定株の分類学的試験

日本産 *Actinoplanes* 属 E110-4 株とミャンマー産 *Actinoplanes* 属 MM16-A0105 株についてメナキノンや脂肪酸、DAP 異性体、リン脂質などの化学分析を行い、糖の資化性や生育至適温度や生育至適 pH、耐塩性、酵素反応などの生理性状試験を行った。また、ゲノム DNA をそれぞれから抽出・精製し、ゲノム配列の決定を受託解析にて行った。ゲノム配列情報から GC 含量を決定し、近縁種との比較として ANI および dDDH の算出を行った。

## 4. 研究成果

### 1) バルク土壌集積培養法

バルク土壌集積培養法を用いて得られた放線菌の 16S rDNA の塩基配列から相同性検索を行い、希少放線菌とされる放線菌の結果を Table 1 に示した。分離された放線菌のうち、主要な運動性放線菌は *Actinoplanes* 属であった。この他に、*Cryptosporangium* 属や *Pseudosporangium* 属、*Virgisporangium* 属、*Couchioplanes* 属が分離されていた。このうち、新種と推定される *Actinoplanes* 属は 13 株中 7 株であり約半数が新種推定株であることが分かった。この他にも、*Cryptosporangium* 属と *Pseudosporangium* 属にも新種推定株が見出された。全体では 23 株中 10 株 (43%) が新種推定株であった。この高い新種推定株の割合は既存のキャピラリー法や RC 法では得られない傾向であることが分かった。しかしながら、分離プレート上における放線菌の割合は、土壌サンプルの種類にもよるが、放線菌以外の多数のバクテリアの出現により少なくなっており、これは放線菌の分離効率を下げるデメリットになっている。

Table 1 Identification of actinomycetes obtained from a field soils using by filter paper with CHES buffer + Skim milk.

Genus	Species	Number of strains	
		Field soil (Yamanashi, 2 samples)	CHES buffer +Skim milk (pH 9.0)
<i>Actinoplanes</i>	<i>brasiliensis</i>	1	
	<i>nipponensis</i>	2	
	<i>rectilineatus</i>	1	
	<i>sichuanensis</i>	2	
	sp.	7	
<i>Cryptosporangium</i>	<i>aurantiacum</i>	1	
	sp.	1	
<i>Pseudosporangium</i>	<i>ferrugineum</i>	2	
	sp.	2	
<i>Virgisporangium</i>	<i>aurantiacum</i>	2	
<i>Couchioplanes</i>	<i>caeruleus</i>	2	
<b>Total new species</b>		<b>10 (43%)</b>	
<b>Total</b>		<b>23</b>	

### 2) バルク土壌集積培養法の改良

前出のバルク土壌集積培養法はバクテリアコロニーの出現により相対的な放線菌の出現割合が減少してしまっていた。そこで、土壌を風乾させる事でバクテリアの出現抑制を試みた。当初、サンプリングからプレティングまでの時間を短縮する意図として風乾は行わずにいたが、一晚程度の風乾 (semi-drying) を行った。その結果を Fig. 3 と Fig. 4 に示した。一晚程度の風乾処理を行う事でバクテリアの減少を測ることができた。一方、放線菌の出現割合はバクテリアの減少率を遥かに上回る結果となった。これは、バクテリアの減少による放線菌が出現できる面積が上昇したため、あるいは風乾中に放線菌の増殖が促進された事が考えられる。

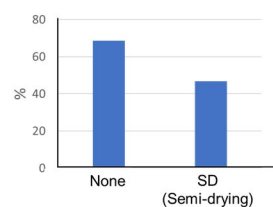


Fig. 3 Percentage of bacteria in total colonies that appeared on the plate after air-drying treatment.

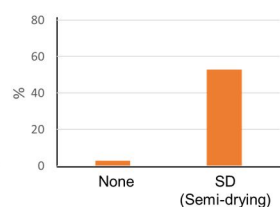


Fig. 4 Percentage of actinomycetes in total colonies that appeared on the plate after air-drying treatment.

抗生物質を加えた HV 寒天培地を用いることで、優占種の出現が抑制され、複数系統の運動性放線菌が得られるのではと考え、抗生物質耐性試験を既知の *Actinoplanes* 属種を用いて行った。その結果、スペクチノマイシン、トブラマイシン、ネオマイシンの 3 種類が有望であったため、実際の分離プレートに添加し、分離される放線菌の種類に変化があるかを調べた結果を Table 2 に示した。その結果、主要な運動性放線菌である *Actinoplanes* 属であることに変化はなく、若干の取得される属に変化が見られた。全体的に新種が取れる割合は高かった。そこで、*Actinoplanes* 属の新種推定株の系統解析を行い、各抗生物質添加区の間で重複がどの位の割合かを調べたところ、トブラマイシン添加区において重複が少ないことが分かった。

Table 2 Effect of antibiotic addition on the diversity of isolates in the modified bulk soil dipping method

Genus	Number of isolate			
	SD*	SD + Spec.	SD + Tobra.	SD + Neomy.
<i>Actinoplanes</i>	8 (8)**	6 (5)	11 (5)	9 (7)
<i>Streptosporangium</i>	1 (0)	2 (0)		
<i>Cryptosporangium</i>	1 (1)			
<i>Couchioplanes</i>			1 (0)	1 (0)
<i>Nonomuraea</i>		1 (0)		1 (0)
<i>Streptomyces</i>			1 (0)	
<i>Micromonospora</i>				1 (1)
Total	10 (9)	9 (5)	13 (5)	12 (8)

\*SD : Semi-drying

\*\* No. of isolates belong to novel species

### 3) 新種推定株の分類

バルク土壌集積培養法およびその改良法によって多数の新種推定株が分離された。このうち、E110-4 株について詳細な分類学的研究を行った。

E110-4 株は山梨県すもも畑の土壌から分離され、ISP2 培地でオレンジ色のコロニーを形成した。16S rDNA の塩基配列の相同性検索を行ったところ、*Actinoplanes rectilineatus* NRRL B-16090<sup>T</sup> と 98.33% であり、*Actinoplanes couchii* GW8-1761<sup>T</sup> とは 98.10%、*Actinoplanes derwentensis* DSM 43941<sup>T</sup> とは 98.05% であった。生理性状試験を行った結果、*Actinoplanes rectilineatus* とは、硝酸塩

の還元、ウレアーゼ、ゼラチンの分解、APIZYM 試験における Leucine allyl amidase、-galactosidase、 $\beta$ -galactosidase、*N*-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase の酵素活性において種を区別可能な性状を見出した。すべての *Actinoplanes* 属における E110-4 株の系統的位置を確認するため近隣接合法による系統解析を行った結果、比較的高い位置で分岐がみられ、新規性の高い系統であることが分かった。

化学分類試験を行ったところ、菌体加水分解産物からメソ型ジアミノピメリン酸が検出され、主要メナキノンには MK-9(H<sub>4</sub>) であり、主要脂肪酸は C<sub>17:1</sub>( $\omega$ 8c)、iso-C<sub>15:0</sub>、iso-C<sub>16:0</sub>、anteiso-C<sub>17:0</sub> であった。これら脂肪酸組成は近縁種 *Actinoplanes rectilineatus* との区別をする性状として利用可能である。リン脂質は phosphatidylethanolamine、Phosphatidylglycerol を持つことが分かった。

E110-4 株のゲノム解析については、DNBSEQ-G400 を用いたショートリード、GridION を用いたロングリードを取得し、両者を合わせたハイブリッドアセンブルを行った。その結果、最終コンティグは環状の 1 本鎖となり、ゲノムサイズは約 9.6Mb であった。GC 含量は 70.4% であった。これを用いて ANI (Average Nucleotide identity) および dDDH (digital DNA-DNA hybridization) の算出を行ったところ、すべての近縁種と ANI 値が 95% 未満であり、dDDH の値も 70% 未満であることが分かった。以上の事から、E110-4 株は *Actinoplanes* 属の新種であることが確定し、NBRC 114217 として寄託を行った。

本研究では、創薬資源として活躍が期待されている希少放線菌、中でも運動性放線菌の分離方法を新たに構築する手法を考案、さらに新規遺伝資源が取得できることを明らかとする事を目的とした。様々な検討を行った結果、簡便な器材のみで実施が可能なバルク土壌集積培養法とその改良法を開発することに成功した。この方法は、ろ紙などを用いる事で、研究設備が乏しい途上国においても希少放線菌探索の実施を可能にするものである。希少放線菌は創薬資源としても価値があるため、途上国自身でコレクションを保有すれば、製薬企業との共同研究費獲得が可能になり、その資金を元手に更なる研究のレベルアップと教育を施すことが可能であると考えられる。また、本研究で開発された方法で得られた新種推定株は新種として確定する事ができた。これは、バルク土壌集積培養法とその改良法が新規な放線菌リソース取得に有益であり、効率的な遺伝子資源の保全に役立つものである。今後は、残りの新種推定株について詳細な分類学的研究を行い、種の提案と更なる保全へとつなげていく予定である。

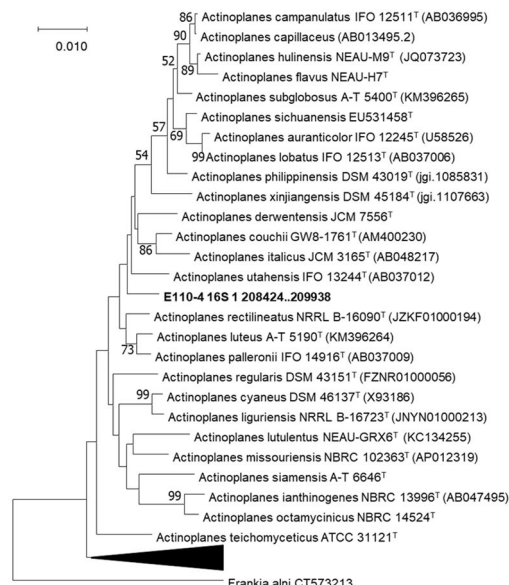


Fig. 5 Neighbor-joining phylogenetic tree of strain E110-4 based on almost complete 16S rRNA gene sequences.

Table 3 Genomic comparison of strain E110-4 and related species of the genus *Actinoplanes*.

Related taxon	16S similarity	ANI value	dDDH value
<i>Actinoplanes rectilineatus</i>	98.33	80.8	24.2
<i>Actinoplanes couchii</i>	98.10	79.7	23.6
<i>Actinoplanes derwentensis</i>	98.05	80.1	23.5
<i>Actinoplanes italicus</i>	98.05	80.7	24.1
<i>Actinoplanes palleronii</i>	98.05	80.3	23.4
<i>Actinoplanes liguriensis</i>	98.05	79.7	24.1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩淵 智宏, 山村 英樹, 中川 洋史, 小久保 晋, 早川 正幸
2. 発表標題 新規運動性放線菌の選択的分離を可能にするバルク土壌浸漬法の開発
3. 学会等名 第34回日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井 智大, 岩淵 智宏, 田村 朋彦, 小久保 晋, 中川 洋史, 早川 正幸, 山村 英樹
2. 発表標題 運動性放線菌を選択的に分離するバルク土壌浸漬法の改良および分類に関する研究
3. 学会等名 第35回日本放線菌学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------