

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710234

研究課題名（和文） 亜熱帯域のミコール酸含有放線菌群の多様性解明とその保全

研究課題名（英文） Diversity of mycolic acid containing actinomycetes isolated from subtropical region in Japan and its conservation.

## 研究代表者

山村 英樹 (YAMAMURA HIDEKI)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：70516939

## 研究成果の概要（和文）：

本研究は、生物多様性が豊かな亜熱帯域から天然のミコール酸含有放線菌群を選択分離することで生物多様性を解明し、菌株の保全を行う事を目的とした。亜熱帯域として沖縄県石垣島および西表島において森林とサトウキビ畑から各々20試料の採取を行い、*Nocardia* 属 12 種、*Mycobacterium* 属 2 種を確認した。*Rhodococcus* 属の選択分離法としてノボビオシン(10 mg/L)とフラジオマイシン(20 mg/L)を併用し、さらにアルカリ-SDS 溶液による土壌前処理法を組み合わせること事が有効であることが分かった。本研究で得られた分離株は新種と推定される菌株が得られたので微生物保存機関における寄託保全を行った。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to reveal the diversity and conservation of mycolic acid containing actinomycete such as *Nocardia* and *Mycobacterium* from subtropical area in Japan. Forest and cultivated field soil samples were collected from Iriomote island, Okinawa, Japan. The isolates belonging to the genus *Nocardia* and *Mycobacterium* were selectively isolated using sucrose-gradient centrifugation method and Oil-SDS emulsification method. Twelve species of *Nocardia* and two species of *Mycobacterium* was detected. Selective isolation method for the genus *Rhodococcus* was developed as combined use of antibiotics (fradiomycine; 20 mg/L and novobiocin; 10 mg/L) and pretreatment of soil with alkaline-SDS solution. Some of isolates were suspected as new species and were deposited in NITE-Biological Resource Center for microbial conservation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：資源保全学・資源保全学

キーワード：微生物、保全、放線菌、分類学、生態学、多様性

## 1. 研究開始当初の背景

放線菌はグラム陽性高 GC 含量細菌であり、これまでに数多くの抗生物質（例えば、ストレプトマイシンなど）や生理活性物質（例えば、ストレプトタビジンなど）が発見され、医薬品や研究試薬として産業界に大きく寄与している。そのため、多くの製薬企業等が土壌から放線菌をスクリーニングしてきた経緯がある。しかしながら、分離された放線菌のほとんどは *Streptomyces* 属と呼ばれる土壌中の主要放線菌属であり、それ以外の放線菌は分布密度が低いことから「希少放線菌」と呼ばれて、創薬ターゲットとしてはあまり活用されてこなかった。その原因として、この希少放線菌は選択分離法と呼ばれる特殊な分離方法でなければ分離が困難である事が挙げられる。そのため、希少放線菌は生態学的な特徴は未解明な点が多い。これまでに申請者らは、ミコール酸含有希少放線菌 *Nocardia* 属および *Mycobacterium* 属の選択分離法を構築し、山梨県周辺の土壌から分離・同定を行ってきた。一方で、日本で最も生物多様性が豊かな亜熱帯地域での希少放線菌の分布は未解明であり、微生物資源としての評価および保全は行われていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究は生物多様性が豊かな亜熱帯域から天然のミコール酸含有放線菌群を選択分離することで *Nocardia* 属や *Mycobacterium* 属の多様性を解明し、保全することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) サンプリング

亜熱帯域として沖縄県石垣島および西表島において森林とサトウキビ畑から各々20試料の採取を行った。

### (2) *Nocardia* 属および *Mycobacterium* 属の分離および同定

ミコール酸含有放線菌である *Nocardia* 属や *Mycobacterium* 属については申請者らが開発したシヨ糖密度勾配遠心法とオリーブ油-SDS 法を用いて分離を行った。なお、分離株の同定には 16S rDNA の塩基配列(>1300 bp)を用いて相同性検索を行い、近隣接合法による系統解析により同定を行った。

### (3) *Rhodococcus* 属の選択分離法の構築 抗生物質による選択生育性向上を目指し

て *Rhodococcus* 属の既知種 12 種を用いた抗生物質耐性試験を行った。さらに土壌主要属である *Streptomyces* 属の抑制方法としてアルカリ-SDS 溶液による土壌前処理法を検討した。

### (4) 新種推定株の分類学的特徴

*Nocardia* 属および *Rhodococcus* 分離株のなかで既知種との相同性および系統解析の結果から新種と推定された菌株がいくつかあったので、菌体脂肪酸、メナキノン種、全菌体糖、ジアミノピメリン酸、リン脂質の特徴を調べた。また、糖の資化性などの生理性状試験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *Nocardia* 属および *Mycobacterium* 属の多様性

西表島および石垣島の畑および森林土壌からシヨ糖密度勾配遠心法を用いて *Nocardia* 属を選択的に分離を行ったところ、*Nocardia aobensis*、*Nocardia araoensis*、*Nocardia asteroides*、*Nocardia cyriacigeorgica*、*Nocardia rhamnosiphila* など計 12 種を見出すことができた。特に *Nocardia rhamnosiphila* についてはサトウキビ畑から多く分離された事が特徴的であった。この *Nocardia rhamnosiphila* はラムノースを好んで資化することから名づけられており、サトウキビ畑という生息環境が *Nocardia rhamnosiphila* にとって好適な環境であったと推測される。既報の *Nocardia* 属の多様性と比較してみると、温帯域に属する山梨県では 3~4 種の *Nocardia* 属種が検出されるのみであるのに対して、亜熱帯地域の西表島・石垣島では種数が 4 倍程度増加していることが分かった。

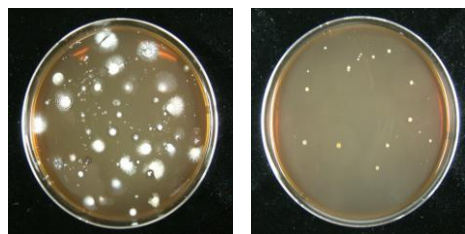
また、*Mycobacterium* 属については *Mycobacterium neworleansense* と *Mycobacterium peregrinum* の 2 種のみが検出された。いずれの種も温帯域の土壌からも高い頻度で分離される傾向にある。しかし、温帯域の方が *Mycobacterium septicum* や *Mycobacterium phocaicum* が多く分離される傾向が強いため、*Nocardia* の種数と反比例するかのようになり *Mycobacterium* 属の種数は減少していた。

### (2) *Rhodococcus* 属の選択分離法

*Rhodococcus* 属は難分解性物質を分解する能力を有している種が多く、バイオレメディエーションに利用可能な菌群である。本研究

では *Rhodococcus* 属の選択分離法構築にあたり *Streptomyces* 属などの土壌優先種をできるだけ排除できる抗生物質の検討を行った。即ち、ノボビオシン(10 mg/L)とフラジオマイシン(20 mg/L)を併用した場合、全ての既知種が耐性を示した。一方、土壌中の主要放線菌である *Streptomyces* 属の既知種 21 種では僅か 5%しか耐性を示さなかったため、選択剤としての有効性を検証する事が出来た。

次いで、アルカリ-界面活性剤耐性との組み合わせることで、土壌試料から *Rhodococcus* 属を含むミコール酸含有菌の出現割合を 3 割程度まで上昇させることができた。具体的には、土壌 1 g を 10 ml の 1% NaOH-1% SDS に加え、25℃のウォーターバス内で 30 分間前処理を行った。それを適宜希釈し、フラジオマイシン、ノボビオシン、ナリジクス酸 (20 mg/l) を添加した HV 寒天培地に塗布し、28℃で 2 週間培養を行った。なお、ナリジクス酸はグラム陰性細菌の抑制剤として添加している。その後、培地上に生育した放線菌のコロニー数を計測し、対照とした希釈平板法との比較を行った。その結果、アルカリ SDS 処理と抗生物質の併用により、*Streptomyces* 属とその他の細菌が大幅に減少した (図 1)。



a) 希釈平板法 (Control)      b) アルカリ SDS + 抗生物質

図 1 アルカリ SDS 処理と抗生物質の併用による *Rhodococcus* 属の選択分離

また、*Rhodococcus* 属分離株の選択分離培地上における一般細菌との区別は、顕微鏡観察によって行う。例えば、*Rhodococcus* 属のコロニーは図 2 のような偽菌糸状の形態を示す。

得られた *Rhodococcus* 属分離株を純粋分離し、16S rRNA 遺伝子を用いた系統解析の結

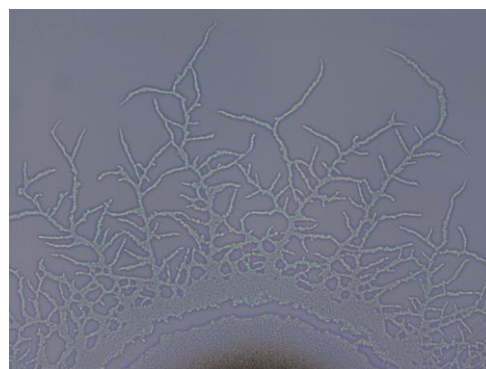


図 1 *Rhodococcus* 属の偽菌糸状のコロニー

果から *Rhodococcus equi*、*Rhodococcus maanshanensis*、*Rhodococcus qingshengii*、*Rhodococcus globerulus* などに近縁の分離株が得られた。驚くことに系統的に新種と推定される分離株が 11 株も見つけることができた。これら、新種と推定される菌株については分類学的な詳細な研究を行い、新種の提案を行う予定である。なお、本研究で収集した分離株は現在、山梨大学にて -80℃にて保全し、NBRC に寄託保全を行った。

### (3) 分類学的同定

*Rhodococcus* sp. 1540-FN-6R 株 (NBRC 108552) と 1540-FN-20 株 (NBRC 108555) の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析から *Rhodococcus* 属の中で独立したクレードを作り、相同性としては *Rhodococcus triatomae* と 98.2-98.6% であることから近縁種である事がわかった。これら菌株のメナキノン、全菌体糖組成、脂肪酸組成などの化学分類学的性状試験の結果から *Rhodococcus* 属である事が同定された。続いて、API ZYM 試験や糖の資化性試験において近縁種である *Rhodococcus triatomae* と性状が異なることから、これら 2 株は新種であることが強く示唆された。また、新種推定株同士も生理的性状が異なることから *Rhodococcus* sp. 1540-FN-6R 株と 1540-FN-20 株は別種の可能性がある。

1540-FN-20 株の電子顕微鏡による観察を行ったところ図 3 のような *Rhodococcus* 属の他の種と類似した rod 状または coccoid 状の形態を示していることがわかった。

一方で、*Rhodococcus* 属が有する難分解性試験について多環芳香族の分解活性を行ったところ、フェナントレンやフルオランテンなどを分解することが分かった。



図2 *Rhodococcus* sp. 1540-FN-20 株の電子顕微鏡写真

*Nocardia* sp. IF2-1 株 (NBRC 108818)は沖縄県石垣市底原の土壌から分離された。この菌株の 16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析から *Nocardia pseudovaccinii*、*Nocardia anaemiae*、*Nocardia vinacea* とクレードを作り、これら既知種との相同性は 98.5-98.9%であった。化学分類学的性状試験ではミコール酸含有菌に特徴的な Arabinose および Galactose が主要な菌体糖成分であり、メナキノン<sub>4</sub>は MK-8(H<sub>4</sub>, ω-cycl.)と MK-8(H<sub>2</sub>)であり、脂肪酸は C<sub>16:0</sub> を主要組成としていた。IF2-1 株の生育至的温度は 30 度であり、耐塩性試験は 2%までであった。生育 pH 範囲は pH 6~9 迄であり、至的生育 pH は 7 であった。

以上のことから、これらミコール酸含有菌が新種であることが強く示唆されたため、NBRC にて菌株を寄託保全した。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

アルカリ-SDS 処理による *Rhodococcus* 属放線菌の選択分離に関する研究

高野 真吾、山村 英樹、中川 洋史、浜田 盛之、乙黒 美彩、田村 朋彦、早川 正幸

日本放線菌学会 2011 年度大会,札幌コンベンションセンター, 2011 年 9 月 8 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.ab11.yamanashi.ac.jp/ABF/No1/hayakawa/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山村 英樹 (YAMAMURA HIDEKI )

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・助教

研究者番号：70516939

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし