

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06936

研究課題名(和文)植物モデル系による内生放線菌の分離法の構築と微生物資源の開拓

研究課題名(英文)Development of isolation method for endophytic actinomycetes using plant model and search for microbial resources

研究代表者

松本 厚子(Matsumoto, Atsuko)

北里大学・感染制御科学府・准教授

研究者番号：20300759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：難培養で未利用な植物内生放線菌が多数存在することから、有用二次代謝産物の探索源として未利用植物内生放線菌を分離・培養し利用することを目的に、植物培養細胞を用いた新しい培養法を開発した。その結果、細胞無添加とは異なる菌株が分離され、植物培養細胞培地でのみ生育する株が得られた。また、植物内生放線菌の分類研究によりKibdelosporangium属の3新種を見出し、植物内生放線菌 *Allostreptomyces* sp. K12-0794 の培養液中からは22員環マクロライドである新規物質hamuramicinを見出した。

研究成果の概要(英文)：There are many untapped endophytic actinomycetes. In order to isolate and culture them as source of new bioactive compounds, new isolation method using cultured cell of plant was developed. Endophytic actinomycete strain, which requires cultured cell of plant for growth was isolated by this method. It was showed by taxonomic study that isolated endophytic actinomycetes were three new species belonging the genus *Kibdelosporangium*, and the 22-membered macrolides, hamuramicin was found in the cultured broth of endophytic actinomycetes *Allostreptomyces* sp. K12-0794.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放線菌 植物内生菌 未利用微生物 微生物資源 分類

1. 研究開始当初の背景

放線菌は、グラム陽性高 G+C 細菌 (*Actinobacteria* 綱) の中でも形態分化が進んだ一群をさし、医薬品を始めとする多数の有用物質の探索源として活用されてきた。しかし、放線菌代謝産物からの生物活性物質の発見数は近年減少している。そこで、新たな探索源を得べく放線菌の分離源を一般に用いられる土壌ではなく植物の根とし植物内生放線菌を分離した結果、これまでに新属 *Phytohabitans* 属 および *Rhizocola* 属 を見出した。一方、16S rRNA 遺伝子による細菌叢解析から植物の根には未だ分離できていない未利用な植物内生放線菌が多く存在することが明らかとなり、未利用資源の利用に向けて分離・培養法の開発がのぞまれた。

2. 研究の目的

(1) 植物モデルの構築

植物内モデルを想定し、液体培養が可能な植物細胞を活用した新しい分離培地を考案する。生きた植物細胞との共培養により、植物細胞と微生物の相互作用を考慮した新たな視点での分離法を開発する。

(2) 植物内生放線菌の応用研究

植物細胞を用いた分離培地により得られた分離菌株の生育因子の探索により、難培養植物内生放線菌の分離や培養に応用し、その二次代謝産物からの新規有用物質探索につなげる。

3. 研究の方法

(1) 植物モデルの構築

①植物培養細胞

Nicotiana tabacum L. BY-2 および *Oryza sativa* C5928 Oc を各々の条件にて1週間液体培養し培養上清と細胞に分けた。細胞は滅菌水で洗浄後、分離または培養に用いた。

②分離試料

25種の植物の根を試料とし、洗浄、表面殺菌、乾燥後、処理した試料は10% w/w になるように希釈液 (0.38% K_2HPO_4 , 0.12% KH_2PO_4 , 0.51% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25% NaCl, 0.005% $Fe(SO_4)_3$) を加えて乳鉢ですりつぶし分離試料とした。

分離は下記の4法を使用した。(図1)

1. 植物細胞との混積
2. 植物細胞培養上清との混積
3. 植物細胞の寒天上スポット
4. 細胞無添加

分離培地は通常放線菌分離に使用する WPA 培地 (1% proline, 0.8% agar, tap water, pH 無調整) に加え、植物細胞培養培地である mLSA 培地 (mLS, 0.8% agar, pH 5.8) または 1/5 mLSA 培地 (1/5 mLS, 0.8% agar, pH 5.8) を用い 27°C で 1 ~ 4 週間培養した。出現

した放線菌は分離培地と同様の培地に釣菌した。分離株は 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列に基づき簡易分類し、4方法での違いを比較した。

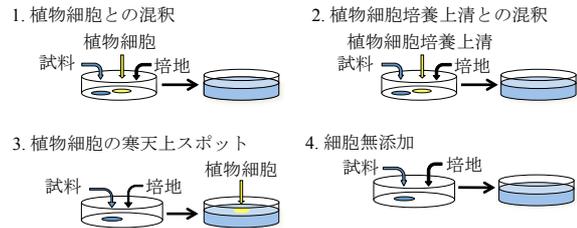


図1 植物細胞を用いた分離法

(2) 植物内生放線菌の応用研究

①植物内生放線菌の分類研究

分離した植物内生放線菌は、16S rRNA 遺伝子に基づき簡易分類し、新規性の高い菌株については化学分類学的、形態学的、生理学的、遺伝学的特徴を精査し、新規放線菌の場合はその特徴を解析した。

②植物内生放線菌からの新規二次代謝産物の取得

分離植物内生放線菌を複数の生産培地で培養し、その二次代謝産物を単離精製し各種機器分析により新規化合物探索を行い、新規化合物については構造決定を行った。

4. 研究成果

(1) 植物モデルの構築

分離培地に植物細胞を加えて分離すると放線菌以外の細菌群の生育も促進され放線菌の分離が困難となったため、分離試料となる植物根の前処理に 60°C、2時間の熱処理を加えることにより細菌群が減少し放線菌が効率的に分離できることを見出した。植物モデルの分離培地は、植物細胞無添加とは異なる分離株が得られ、植物細胞の混積と寒天上スポットでも異なる分類群の放線菌が得られた。これは放線菌に対して植物細胞による異なった作用に起因すると考えられる。一方、植物細胞培養上清との混積法では、植物細胞培養用培地に高濃度にシュクロースが含まれ細菌群の増殖を促進し、分離には不適であった。

植物細胞との混積によりシナモンの根から得られた分離株 *Micromonospora* sp. A-22 は、植物細胞添加培地では生育し、さらに、植物細胞の寒天上スポット培地で培養すると植物細胞の周辺でよく生育した (図2)。また、植物培養上清 30%以上の添加培地では生



図2 *Micromonospora* sp. A-22 の各種培地での生育

育するものの細胞無添加や富栄養培地では生育が確認されなかった。そこで細菌が通過できない膜 (ϕ 0.22 μ m) で仕切られた二槽式培養器を用い、片方に *Micromonospora* sp. A-22、もう一方に植物細胞を入れて培養したところ、A-22 株の生育が確認された (図 3)。生育因子の特定には至らなかったが、植物細胞によって生産される物質が A-22 株の生育に関与しており、本株は本方法によって分離された「難培養放線菌」と言える。一方、本株は *Micromonospora* 属の新種と推定しており、現在分類研究が進行中である。

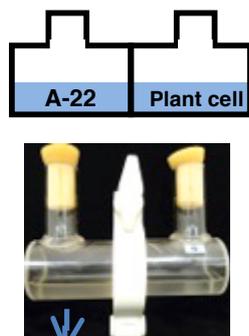


図 3 二槽式フラスコでの培養

(2) 植物内生放線菌の応用研究

① 植物内生放線菌の分類研究

異なる植物の根および根に付着する土壌から分離した 3 放線菌の分類研究の結果、*Kibdelosporangium* 属に属する新種であることが明らかになったので 3 新種 *K. kanagawaense*, *K. rhizovicinum* および *K. rhizosphaerae* を国際誌に発表すると同時に 2 機関(NBRC, TBRC)に寄託した。系統樹を図 4 に示した。本属は現在でも 9 種しか知られておらず、そのうち 3 種が本研究によるものである。

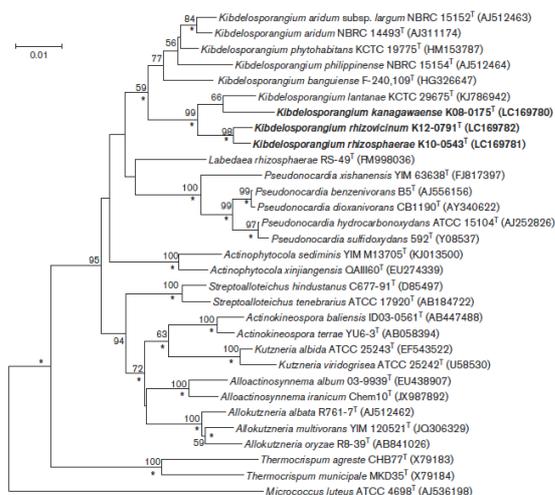


図 4 分離した内生放線菌の系統学的位置

② 植物内生放線菌からの新規二次代謝産物の取得

植物内生放線菌として分離された

Allostreptomyces sp. K12-0794 の培養液中より抗菌活性を有する 22 員環マクロライドである新規物質 hamuramicin (図 5) が単離された。また、生産菌 *Allostreptomyces* 属は 2017 年に提唱された新属で承認株はまだ 1 種で

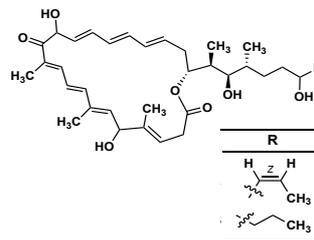


図 5 *Allostreptomyces* sp. K12-0794 の培養液中に見出された hamuramicin

ある。極めて珍しい分類群の放線菌が植物から分離され、新物質の発見につながったことで、植物内生放線菌の微生物資源としての有用性を示すものである。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Mingma R., Duangmal K., Ōmura S., Takahashi Y. and Matsumoto A. Three novel species of the genus *Kibdelosporangium*; *Kibdelosporangium kanagawaense* sp. nov., *Kibdelosporangium rhizosphaerae* sp. nov. and *Kibdelosporangium rhizovicinum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (2017) 67, 1758–1765. 査読有
DOI: 10.1099/ijsem.0.001861
- ② Suga, T., Kimura, T., Inahashi, Y., Iwatsuki, M., Nonaka, K., Take, A., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Omura S. and Nakashima, T. Hamuramicins A and B, 22-membered macrolides, produced by an endophytic actinomycete *Allostreptomyces* sp. K12-0794 *J. Antibiot.* 2018. 査読有
DOI: 10.1038/s41429-018-0055-x

[学会発表] (計 2 件)

- ① 植物細胞との共培養による植物内生放線菌の分離：池田 翔一、武 晃、塩見和朗、大村智、高橋洋子、松本厚子 日本放線菌学会 2016. 9. 8~9, 東京
- ② 植物分離放線菌株 *Allostreptomyces* sp. K12-0794 株が生産する新規物質について：須賀拓弥、木村徹、廣瀬友靖、稲橋佑起、岩月正人、武晃、野中健一、松本厚子、砂塚敏明、塩見和朗、高橋洋子、大村智、中島琢自 日本放線菌学会 2017. 9. 7~8. 長野

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/labo/MicrobialFunctions/saito/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 厚子 (MATSUMOTO, Atsuko)
北里大学・感染制御科学府・准教授
研究者番号：20300759

(2) 研究分担者

中島 琢自 (NAKASHIMA, Takuji)
北里大学・北里生命科学研究所・准教授
研究者番号：40526216

(3) 連携研究者

高橋 洋子 (TAKAHASHI, Yoko)
北里大学・北里生命科学研究所・研究員
研究者番号：80197186

塩見 和朗 (SHIOMI, Kazuro)
北里大学・感染制御科学府・教授
研究者番号：40235502