

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510291

研究課題名(和文) 河川流域におけるアクチノバクテリアの多様性解析と遺伝子資源としての保全

研究課題名(英文) Taxonomic evaluation of actinobacteria isolated from river basin and their preservation as genetic resources

研究代表者

早川 正幸 (HAYAKAWA, Masayuki)

山梨大学・医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30126651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アクチノバクテリアはグラム陽性・高GC細菌の一群である。本研究では河川流域におけるこの菌群の分離法を確立し、その多様性を調査することを目的とした。選択分離培地としては5%NaCl含有1/5 NBRC 802培地を用いて、沖縄県西表島の河川と海岸から底泥を採取し、希釈平板法にて分離を試みた。総計194株を分離し16S rDNA相同性検索をすると、*Microbacterium thalassium*を優占種として含む6科10属23種に分類された。また、分離株の内48株は新種と推定された。以上の結果から、河川流域は多様かつ新規なアクチノバクテリアの遺伝子資源として重要な存在意義があることが示された。

研究成果の概要(英文)：Actinobacteria are a group of Gram-positive and high GC content bacteria. The aim of the present study was to establish an effective isolation method for actinobacteria from river basin and evaluate their taxonomic diversity. By using a dilution plating method with 1/5 NBRC 802 medium containing 5% NaCl, a total of 194 actinobacteria were selectively isolated from the river and seashore sediments of Iriomote Island, Okinawa, Japan. According to the 16S rDNA homology search, they classified into 6 families, 10 genera and 23 species. *Microbacterium thalassium* was recognized as the most predominant species. Of 194 isolates, 48 strains were considered as belonging to new species. These results suggest that the river basin is a promising genetic resource for diverse and novel actinobacteria.

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：遺伝子資源 アクチノバクテリア 生態学 分類学 微生物

1. 研究開始当初の背景

放線菌はグラム陽性・高 GC 細菌の一種であり、16S rDNA に基づく系統解析によると order *Actinomycetales* に属している。形態的には培地中に基底菌糸が伸長し、その後、気中菌糸が培地表面から伸長した後に、その先端などに胞子を着生する。代表的な放線菌として *Streptomyces* 属が挙げられる。この属は抗生物質生産菌としてストレプトマイシンなどの医薬品を多く生産することが知られている。放線菌の主な分離源は土壌であり、腐植酸 - ビタミン寒天培地 (HV 培地) を用いることにより多数の放線菌を選択的に分離することが可能となっている。

一方で、放線菌の中には菌糸状の生育を示さないバクテリア様の生活環をもつアクチノバクテリアと呼称される菌群が存在する。代表的な属種としてはエリスロマイシンを生産する *Aeromicrobium erythreum* や難分解性物質を分解する *Nocardioides* 属や *Rhodococcus* 属が知られている。

しかしながら、アクチノバクテリアはバクテリア様の形態を有していることからプレート上において一般的なバクテリアと区物が見つからない場合が多い。そのため、アクチノバクテリアを選択分離するためには何かしらの新しい分離方法を構築する必要がある。そこで、当初の本研究では、アクチノバクテリアの分離に当研究室の研究で有効性が示唆された陰イオン交換樹脂吸着法と HV 培地の併用を試みた。しかしその後、Hamada らにより 5% NaCl 含有 1/5 NBRC802 寒天培地 (以後、SC 培地と略) がアクチノバクテリアの分離にきわめて適していることが発表された。そこで、一般的な希釈平板法と SC 培地を用いてアクチノバクテリアの分離を行い、その分離法の有効性を評価するとともに、分離株の多様性について調査を行った。調査地域としては亜熱帯域に属する沖縄県西表島の河川と周辺の海岸域を対象とした。これまで、河川流域におけるアクチノバクテリアの詳細な分布に関する報告例はない。

2. 研究の目的

(1) SC 培地を用いた河川流域からのアクチノバクテリアの分離

SC 培地はアクチノバクテリアの選択分離培地として Hamada らが開発し、海岸の底泥からアクチノバクテリアを多数分離することに成功している。しかしながら、河川流域における有効性は確認されていない。そこで、山梨県の笛吹川をテストケースとして SC 培地の有効性の評価を行った。

(2) 亜熱帯の河川流域からのアクチノバクテリアの分離

河川流域においても SC 培地がアクチノバクテリアの分離に適していることが判明したため、沖縄県西表島における河川流域および海岸域からアクチノバクテリアの分離を

試みた。また、分離株の 16S rDNA による簡易同定の結果から多様性の評価を行った。

(3) アクチノバクテリアの分類学的評価

河川流域および海岸域から分離されたアクチノバクテリアについて分離地域により耐塩性試験に違いがあるのかを調査した。

3. 研究の方法

(1) 下記の供試試料を採取し、希釈平板法にて SC 培地および菌糸状放線菌の選択分離培地である HV 培地に接種した。約 2 週間の培養後、菌糸状放線菌 (filamentous bacteria) とアクチノバクテリアを含むバクテリア (non-filamentous bacteria) のコロニー数を計測した。

土壌

- ・ ジャガイモ畑 (山梨県 甲府市)
- ・ トウモロコシ畑 (山梨県 豊富町)
- ・ ネギ畑 (山梨県 旧・三珠町)

河川底泥

- ・ 三富川・上流 (山梨県 山梨市)
- ・ 笛吹川・上流 (山梨県 甲府市)
- ・ 三富川・中流 (山梨県 山梨市)

(2) 沖縄県西表島のヒナイ川の上流から 5 点および下流から 5 点の底泥試料を採取した。また、比較としてヒナイ川河口近隣の海岸域からも底泥試料 5 点を採取した。これら計 15 試料について希釈平板法にて SC 培地に接種し、30 で約 2 週間培養を行った。(1) の実験結果から、得られたコロニーはほぼアクチノバクテリアであると推測されるため、各流域の試料からランダムに 70 株以上を分離し、16S rDNA の塩基配列を決定した。得られた塩基配列は EzTaxon-e database (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon/database>) にて相同性検索を行い、98.7% 以上の相同性を持つものを便宜的にその種として同定した。一方、98.7% 未満の相同性を示した菌株については新種の可能性が高いと判断した。

(3) 西表島の河川および海岸から分離されたアクチノバクテリアについて耐塩性試験を行った。基本培地として NBRC 802 培地に NaCl を 5 ~ 13% まで 1% 毎に加え、分離株の生育の有無を調査した。

4. 研究成果

(1) 山梨県の河川および畑地から SC 培地および HV 培地を用いてアクチノバクテリアが分離を試みた。その結果、畑地土壌の場合、土壌放線菌の分離培地として実績のある HV 培地は *Streptomyces* 属を含む一般的な菌糸状放線菌 (filamentous bacteria) のコロニー形成数が $388 \times 10^4/g$ dry soil であるのに対して SC 培地は $23 \times 10^4/g$ dry soil であることから、SC 培地は一般的な放線菌を 1/10 以下に抑制することがわかった。一方、アクチノバクテ

リアを含んでいると思われる non-filamentous bacteria の数は SC 培地で 2 倍以上に増加していた。また、河川底泥からの一般的な放線菌の分離数は土壤に比べると非常に少ないものの、non-filamentous bacteria は HV 培地では 11.4×10^4 /g dry sediment、SC 培地では $3.7 \times$

Table 1. Microbial populations observed in soil and river sediment using selective media.

	Colony forming unit $\times 10^4$ / g of dried sample			
	Soil (n=3)		River sediment (n=3)	
	HV	SC	HV	SC
Filamentous bacteria	388	23	1.9	0.1
Non-filamentous bacteria	92	242	9.3	3.7
Total	480	265	11.2	3.8

10^4 /g dry sediment が分離された (Table 1)。

HV 培地および SC 培地を用いて土壤および河川から分離した non-filamentous bacteria について、16S rDNA の塩基配列を決定した。その結果、SC 培地を用いると河川試料からアクチノバクテリアを 91% という高い割合で分離することが可能であることがわかった (Table 2)。なかでも、Micrococccineae 亜目に属するアクチノバクテリアが多く分離されたのが特徴的であった。さらに、Table 1 の SC 培地の CFU 値から換算すると河川には 3.3×10^4 /g dry sediment のアクチノバクテリアが生息していることが推定された。以上のことから、SC 培地を用いることにより河川底泥試料からアクチノバクテリアを選択的に分離することが可能であることがわかった。

Table 2. Identification of bacteria isolated from soil and river sediments using selective media.*

	% of total isolates			
	Soil (n=3)		River sediment (n=3)	
	HV	SC	HV	SC
Micrococccineae	22.4	41.6	29.4	81.0
Other Actinobacteria	18.4	2.1	29.4	10.3
Non-Actinobacteria	59.2	56.3	60.8	8.6
Total	100	100	100	100

* Identification was carried out based on the 16S rDNA sequencing analysis.

(2) 亜熱帯に位置する西表島の河川域および海岸域の底泥から分離された総計 194 株のアクチノバクテリアについて 16S rDNA 配列による簡易同定を行った結果を Table 3 に示した。河川底泥については上流域、下流域に分けて比較した。下流域の岸边にはマングローブ樹林帯が広がっていた。同定の結果、アクチノバクテリア分離株は 6 科 10 属 23 種に配属された。何れの分離源からも *Microbacterium thalassium* が主要種として検出されたが、他の属種の組成は分離源によって異なっていた。例えば、*Serinicoccus*

chungangensis、*S. profundi* は下流域底泥のみから、また、*Microbacterium awajiense*、*M. ketosireduccens* は海岸域底泥のみから分離された。一方、194 分離株中 48 株は新種と推定された。特徴としては、海岸から *Demequina* 属の新種推定株が多く分離され、*Lysinimicrobium* 属の新種推定株は上流域から多く分離された。この他にも、*Microbacterium* 属の新種推定株が得られたが、上流と下流、海岸において同程度の株数が得られた。また、少数ではあるが *Micrococcus* 属や *Isoptericola* 属の新種推定株も得ることができた。なお、多様性解析としてシャノン・ウィーバーの多様性指数を用いて上流、下流、海岸から分離されたアクチノバクテリアの多様性を評価したところ、それぞれ 1.06、2.59、2.89 であった。上流域で多様性指数が低くなったのは *Microbacterium thalassium* が極端に多く分布していることに起因している。

以上のことから、河川流域に分布するアクチノバクテリアには多様な属種が存在し、上流、下流、海岸域といったサンプリング場所によって菌叢が異なっていることが分かった。また既知の種に配属できない新種推定株も多く分布していることが明らかとなった。

Table 3. Taxonomic distribution of actinobacteria isolated from up- and down-river, and seashore sediments.*

Family & Genus	Species	Up-river	Down-river	Sea-shore
<i>Gordoniaceae</i>				
<i>Gordonia</i>	<i>branchialis</i>		1	
<i>Demequinaceae</i>				
<i>Demequina</i>	<i>aestuarii</i>			1
	<i>buliformis</i>		1	
	<i>globuliformis</i>			2
	<i>salsinemoris</i>			1
	sp.	1	1	8
<i>Lysinimicrobium</i>	<i>mangrovi</i>	5	2	
	sp.	10	6	4
<i>Intrasporangiaceae</i>				
<i>Serinicoccus</i>	<i>chungangensis</i>		3	
	<i>profundi</i>		2	
<i>Microbacteriaceae</i>				
<i>Microbacterium</i>	<i>aoyamense</i>		4	
	<i>aquimaris</i>			3
	<i>awajiense</i>			9
	<i>binotii</i>	1		
	<i>ketosireduccens</i>			6
	<i>koreense</i>			2
	<i>poriferae</i>			1
	<i>schleiferi</i>			4
	<i>thalassium</i>	42	26	13
	sp.	6	3	5
<i>Micrococccaceae</i>				
<i>Kocuria</i>	<i>polaris</i>		1	
<i>Micrococcus</i>	<i>terreus</i>		2	
	sp.	1		
<i>Nesterekonina</i>	sp.			1
<i>Promicromonosporaceae</i>				
<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>funkei</i>			1
<i>Isoptericola</i>	<i>halotolerans</i>	6	2	
	<i>chiayiensis</i>		1	
	<i>jiangsuensis</i>		4	
	sp.		1	1
Total isolates		72	60	62
Species index (<i>H'</i>)		1.06	2.59	2.89

* Identification was carried out based on the 16S rDNA sequencing analysis.

(3) 塩濃度として NaCl を 1% ごとに 5 ~ 13%

の間で基礎培地 NBRC802 培地に添加し、上流、下流、海岸から分離されたアクチノバクテリアを接種し 7 日間、30 で培養を行い、生育の有無を観察した。その結果、NaCl 濃度 7% まではほぼ全株の生育が認められ、地域差は見られなかったが、9% 以上になると海岸底泥由来株で約 30%、下流底泥由来株は約 10%、上流底泥由来株は約 5% のみが生育した。

以上のことから、河川流域においてアクチノバクテリアを分離するためには SC 培地の使用が最も適切であることがわかった。実際に亜熱帯に位置する西表島の河川上流、下流の底泥さらに海岸の底泥からアクチノバクテリアを分離してみると、多様な属種が分布していることがわかった。分離源を問わず *M. thalassium* が主要種として検出されたが、それ以外の属種の構成は上流、下流、海岸によって異なっていることがわかった。また、新種推定株も多数分離することができた。一方、耐塩性試験の結果から、河川の上流・下流および海岸からの分離株は生理的にも異なる特徴を有していることがわかった。

これらの研究成果については現在、査読付き論文として審査を受ける予定である。

なお、SC 培地を用いて西表島のマングロープ根圏等から分離したアクチノバクテリアの一部の菌株については、詳細な分類学的性状を調べ、新属新種として査読付学術誌へ投稿し、受理されている(詳細は省略した)。

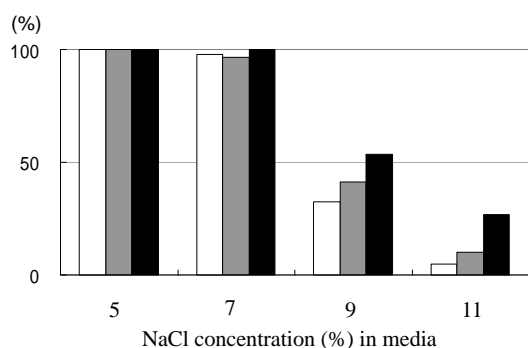


Fig. 1. NaCl tolerance of actinobacteria isolated from up-river, down-river and seashore sediment samples. This figure indicates the percentage of growth positive isolates in each total isolates on the NaCl concentration of 5%, 7%, 9%, 11%, respectively. White bar is up-river isolates (n=44). Gray bar is down-river isolates (n=29). Black bar is seashore isolates (n=41).

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 4 件)

- (1) Hamada, M., Shibata, C., Ishida, Y., Tamura, T., Yamamura, H., Hayakawa, M. & Suzuki, K. *Agromyces iriomotensis* sp. nov. and *Agromyces subtropicus* sp. nov.,

isolated from soil. *Int J Syst Evol Microbiol.* (査読有) 2014; 64: 833-838.

- (2) Hamada, M., Shibata, C., Tamura, T., Yamamura, H., Hayakawa, M. & Suzuki, K. *Janibacter cremeus* sp. nov., an actinobacterium isolated from sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol.* (査読有) 2013; 63: 3687-3690.
- (3) Hamada, M., Tamura, T., Shibata, C., Yamamura, H., Hayakawa, M., Schumann, P. & Suzuki, K. *Paraoerskovia sedimicola* sp. nov., an actinobacterium isolated from sea sediment, and emended description of the genus *Paraoerskovia*. *Int J Syst Evol Microbiol.* (査読有) 2013; 63: 2637-2641.
- (4) Hamada, M., Tamura, T., Yamamura, H., Suzuki, K. & Hayakawa, M. *Lysinimicrobium mangrovi* gen. nov., an actinobacterium isolated from the rhizosphere of a mangrove. *Int J Syst Evol Microbiol.* (査読有) 2012; 62:1731-1735.

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 石黒 圭、山村 英樹、中川 洋史、浜田 盛之、乙黒 美彩、田村 朋彦、早川 正幸。河川流域及び海洋環境からのアクチノバクテリアの分離。日本農芸化学会関東支部 2013 年度支部大会, 2013 年 11 月 22 日, 慶応義塾大学日吉キャンパス。
- (2) 浜田 盛之、柴田 千代、田村 朋彦、小牧 久幸、市川 夏子、小口 晃央、山村 英樹、早川 正幸、藤田 信之、鈴木 健一朗。マングロープ域土壌からの *Lysinimicrobium* 属放線菌の分離と分類学的研究, 2013 年 9 月 5-6 日, メルパルク広島。
- (3) 浜田 盛之、田村 朋彦、山村 英樹、早川 正幸、鈴木 健一朗。海洋堆積物からの *Demequinaceae* 科放線菌の分離と分類学的研究。日本放線菌学会大会, 2012 年 9 月 6-7 日, 府中の森芸術劇場。

〔その他〕

<http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~hyamamura/index.html>

6. 研究組織

- (1)研究代表者
早川 正幸 (HAYAKAWA Masayuki)
山梨大学・医学工学総合研究部・教授
研究者番号：3 0 1 2 6 6 5 1
- (2)研究分担者

山村 英樹 (YAMAMURA Hideki)
山梨大学・医学工学総合研究部・助教
研究者番号：70516939

(3)連携研究者
なし