

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26304006

研究課題名(和文) 熱帯固有の超希少放線菌・乳酸菌の遺伝的多様性の評価および遺伝子資源保存の基盤整備

研究課題名(英文) Construction of the Foundation of Screening Strategies for Extremely Rare Actinomycetes from Tropical Areas in Myanmar

研究代表者

早川 正幸 (HAYAKAWA, Masayuki)

山梨大学・その他部局等・理事

研究者番号：30126651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はミャンマー連邦の熱帯地域から産業上重要な微生物群である放線菌と乳酸菌に着目し、その探索を行った。放線菌は再水和-遠心沈殿法を用いて113土壌から633株の放線菌を分離し、9科、47属、157種という多様な放線菌が確認され、210株(33.2%)が新種と推定された。この中からVirgisporangium属放線菌の新種提案を行った。乳酸菌については55点の発酵食品より4科8属30種という多様な乳酸菌を確認する事ができた。乳酸菌はLactobacillus属の分離頻度が最も高く、L. pentosus、L. fermentu、L. plantarum等の分離頻度が高かった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on actinomycetes and lactic acid bacteria, which are known as industrially important microorganisms. We aimed to discover extremely rare actinomycetes and lactic acid bacteria in the tropical region of Myanmar. We isolated 633 strains of actinomycetes from 113 soil samples using the rehydration and centrifugation method. These actinomycete isolates belonged to 9 families, 47 genera, and 157 species. Of the 633 isolates, 210 strains (33.2%) were new species candidates. We propose a novel species belonging to the genus Virgisporangium. A total of 253 lactic acid bacteria were isolated from 55 traditional fermented foods using a newly developed method involving co-culture with yeast strains and a conventional dilution plating technique. Lactobacillus was the most frequently recovered genus. Several species, including L. futsaii and L. plajomi, reportedly isolated from other tropical regions, were also isolated among the Myanmar isolates examined in this study.

研究分野：資源保全学

キーワード：微生物 分類学 遺伝子 応用微生物学 細菌

1. 研究開始当初の背景

我が国における気候区分は、国土のほとんどが温帯域に属しており、ごく一部に亜寒帯および亜熱帯気候域が存在している。一方、東南アジアの国々の多くは熱帯域に属しており、日本とは気候も食文化も異なっていることから、近年は熱帯産微生物の探索が多く行われている。例えば、製品評価技術基盤機構 (NITE) は東南アジアを中心とした各国とのアクセススキームを構築し、生物多様性条約に則った微生物菌株の移転を行っている。

微生物の中でも放線菌は歴史的にもストレプトマイシンやイベルメクチンの発見に代表されるように医薬品の探索源として重要な微生物群である。放線菌は土壌や植物根圏、海洋など様々な環境に生息しており、分布数としては土壌が最も多く生息している。その中でも *Streptomyces* 属と呼ばれる分類群が土壌放線菌の大多数を占めており、それ以外の分類群をその希少性から希少放線菌と呼称している。最近、熱帯産の放線菌から新属新種が発見される傾向が多くなっており、例えば、*Actinaurispora* 属放線菌はタイの土壌から 2 株のみが報告されている。このような日本にはない環境から見出される希少放線菌は我々にとっては極めて希少な放線菌であることから「超希少放線菌」と呼称し、本研究の主要な微生物群として着目した。

希少放線菌および超希少放線菌を分離するためには選択分離法と呼ばれる特殊な分離方法がこれまで多くの研究者によって提案されてきた。なかでも再水和-遠心沈殿法は運動性放線菌を選択的に分離が可能な方法として知られている。運動性放線菌はすべて希少放線菌に属しており、熱帯で適用すれば日本では分離できないような超希少放線菌の分離が期待される。

一方、乳酸菌は古くからヨーグルトや乳酸飲料、漬物などに広く利用されており、日本や東南アジアの国々において伝統的な発酵文化が構築されている。放線菌と同様に乳酸菌についても東南アジアを起源とする発酵食品から *Lactobacillus porciniae* などの新種が得られている。特に東南アジアの気候は熱帯であることが多く、日本と比較しても高温環境下で発酵が進行しているという特徴を有している。また、民族あるいは部族ごとに特徴的な発酵食品が受け継がれている点も乳酸菌の分離源としては魅力的である。例えば、フィリピン、タイ、インドネシアには魚醤や甘酒、椰子酒など独特の発酵食品が知られている。

本研究では熱帯気候に属する地域から試料を採取し、菌株を分析するために日本に持ち帰る必要がある。しかし、微生物は遺伝資源として捉えられているため、生物多様性条約によって原産国の許可なく移動すること

が禁止されている。そこで、我々は、現地でのサンプリングおよび日本への菌株移動については生物多様性条約を遵守するため、NITE の「ミャンマー連邦における生物遺伝資源の保全と持続可能な利用に関する共同事業」に参画することにした。ミャンマー連邦はごく最近になって微生物探索が可能になった国の一つであり、未だ微生物研究者による放線菌および乳酸菌の分離調査が行われていない地域である。

2. 研究の目的

今回、微生物の中でも産業上の重要な微生物群である放線菌と乳酸菌についてミャンマー連邦で分離を行い、日本で分離された菌株と比較を行いながら、新種候補株について分類学的研究を行うことを目的とした。

なお、本研究で用いたミャンマー連邦で分離された菌株については、植物防疫法の管理下で輸入許可および管理が行われた。

3. 研究の方法

【放線菌】

・土壌サンプリング

熱帯地域としてミャンマー連邦南東部のタングー地方のダウェイ、ベイ、コータウンの 3 都市周辺から 29 点の土壌のサンプリングを行った。この地域は、ケッペン気候区分によると熱帯モンスーン気候に属している。土壌試料は約 3-4 間の風乾後に孔径 2 mm の篩を通じたものを供試料とした。

・放線菌の分離

放線菌の分離培地は腐植酸-ビタミン寒天培地を基本培地とし、抗カビ剤としてシクロヘキシミド (50 mg/L) とカビサイジン (5 mg/L)、抗細菌剤としてナリジキシン酸 (20 mg/L) を添加した。分離方法は再水和-遠心沈殿法を用いて、遊走温度を通常の 30℃ と熱帯環境に合わせて 38℃ の 2 種類で分離を行った。培養は室温 (約 25℃) で 2 週間行い、出現した放線菌のコロニーについては Yeast extract-Starch 培地にて純化操作を行った。その後、コロニーの形態や色で重複を除き、282 株を選抜し、日本に持ち帰った。また、2004 年に NITE で分離されたミャンマー産放線菌 351 株を加えた合計総計 633 株について属種の簡易的な同定のため 16S rDNA の塩基配列 (>1200 bp) を決定した。

・放線菌の同定試験

16S rDNA の塩基配列の相同性検索の結果から複数の新種推定株を選定した。そのうちの 1 株については詳細な系統解析、化学分類試験、生理性状試験を行った。具体的には、細胞壁中のジアミノピメリン酸や全菌体糖組成、リン脂質、主要イソプレノイドキノン、主要脂肪酸について化学分析を行い、糖の資化性や生育温度範囲、pH 生育範囲、耐塩性、

酵素活性、分解性などの試験を行った。形態観察として電子顕微鏡による観察も行った。

【乳酸菌】

・発酵食品のサンプリング

乳酸菌の分離源としてミャンマー連邦の中南部に位置するパテイン地区にて発酵食品 29 点を入手した。また、NITE が分離し保有する乳酸菌は中北部のタウンジー地区より入手した 26 点の発酵食品から得られたものである。これら飼料は、野菜の漬物、エビや魚のなれ鮓、発酵ペースト、発酵米麺などである。

・乳酸菌の分離

分離培地には MRS 寒天培地を基本培地として、抗カビ剤としてシクロヘキシミド (50 mg/L) と炭酸カルシウム 0.1 g/L を添加したものをを用いた。各サンプル 1 g を 0.75% の滅菌食塩水に懸濁し、希釈系列を作成した。この溶液 100 μl を分離培地に接種した。これを 30℃、アネロパック・ケンキにて嫌気条件下で 48 時間培養を行った。得られた分離株は日本に持ち帰り、NITE が保有する菌株も併せて属種の簡易的な同定のため 16S rDNA の塩基配列(>1200 bp)を決定した。

4. 研究成果

【放線菌】

放線菌分離株の 16S rDNA 配列の相同性結果を表 1 に示した。再水和-遠心沈殿法は主に運動性の放線菌の分離に適しており、土壌中の主要属である *Streptomyces* 属の出現を抑制する事ができる。ミャンマーと日本を比べてみると、科と属レベルではほぼ同数の分類群を確認する事ができた。種レベルでは日本により多くの種数が確認されたものの、種レベルの多様性を Shannon 指数で評価を行い、Wilcoxon 符号付順位和検定で有意差を評価したところ、この 2 か国間で有意差は見られなかった。一方、ミャンマー産の分離株の中には既知種との相同性が 97%以下の新属と推定される菌株が 11 株も見つかった。さら

表1 再水和-遠心沈殿法用いて分離されたミャンマーおよび日本の放線菌の分類学的多様性

地域	分離株数 (新種推定 株数*)	科	属	種
ミャンマー	633 (210)	18	47	128
日本	530 (141)	19	46	155

*既知種との 16S rDNA 相同性が 98.7%未満 .
に、新種と推定される菌株もミャンマーでは 633 株中 210 株(33.2%)が存在していた。日本の場合は 530 株中 141 株(26.4%)であった。この 2 か国間での新種推定株の割合はミャン

マーで有意(p<0.01:カイ二乗検定)に高かった。

放線菌分離株の属および種レベルでの同定結果から分類名に基づいてミャンマーおよび日本で重複する属種を調べた(図 1)。その結果、属レベルでは合計 68 属中 27 属(39.7%)が重複しており、種レベルでは合計 233 種中 52 種しか重複していないことが分かった。このことから、両国間では出現する種レベルの多様性はかなりの部分が異なっている事が示された。

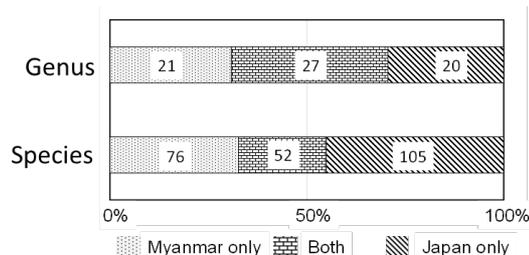


図 1 ミャンマーと日本で分離された放線菌株の分類名に基づく重複

さらに、属レベルの分離株数の両国間の比較を行った結果を図 2 に示した。その結果、*Actinoplanes* 属が共通する優占属であることが分かった。一方、*Krasilnikovia* 属や *Micromonospora* 属、*Couchioplanes* 属などについてはミャンマーでの分離株数が明らかに多いことが分かった。*Krasilnikovia* 属については 1 属 1 種のみが知られている超希少な放線菌であり、今回、ミャンマーから新種と推定される分離株も得られた。

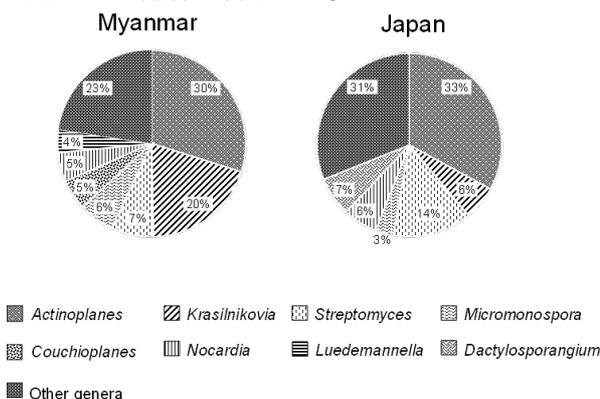


図 2 ミャンマーおよび日本で分離された放線菌の属レベルの分離株数の割合 (%)

本研究でミャンマーから多数の新種と推定される分離株が得られたため、その保全の一つとして新種提案を行った。16S rDNA の塩基配列から *Virgisporangium* 属の新種と考えられる分離株 MM04-1133 株について詳細な分類学的な研究を行ったところ、化学分類性状はジアミノピメリン酸が 3-OH-diaminopimelic acid であり、全菌体糖としてはアラビノース、ガラクトース、グルコース、マンノース、ラムノースおよびキシロースを含み、主要磯プレノイドキノンは MK-10(H₆)

と MK-10(H₈)であった。主要脂肪酸は iso-C_{16:0} と anteiso-C_{17:0} であった。さらに糖の資化性などの生理性状試験の結果から近縁種 *Virgisporangium ochraceum* と *Virgisporangium aurantiacum* と明確に区別できることから *Virgisporangium* 属の新種として提案した。

【乳酸菌】

乳酸菌の分離株について 16S rDNA の塩基配列を用いて既知種との相同性検索を行った。その結果を属毎および主要属である *Lactobacillus* 属の種レベルの分布を図 3 に示した。ミャンマーから分離された乳酸菌は 4 科 8 属 30 種と多様な分類群が検出された(図 3a)。この中でも *Lactobacillus* 属は分離頻度が 80% で最もよく分離ができた属であった。次いで、*Weissella* 属、*Enterococcus* 属、*Pediococcus* 属、*Leuconostoc* 属、*Lactococcus* 属、*Streptococcus* 属、*Vagococcus* 属の順に多く分離されていた。一方、主要属である *Lactobacillus* 属については種レベルの分布は *Lactobacillus pentosus*、*Lactobacillus fermentum*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus farciminis* 等の分離頻度が高かった(図 3b)。また、*Lactobacillus futsaii* と *Lactobacillus plajomi* といった熱帯地域特有の種も分離された。

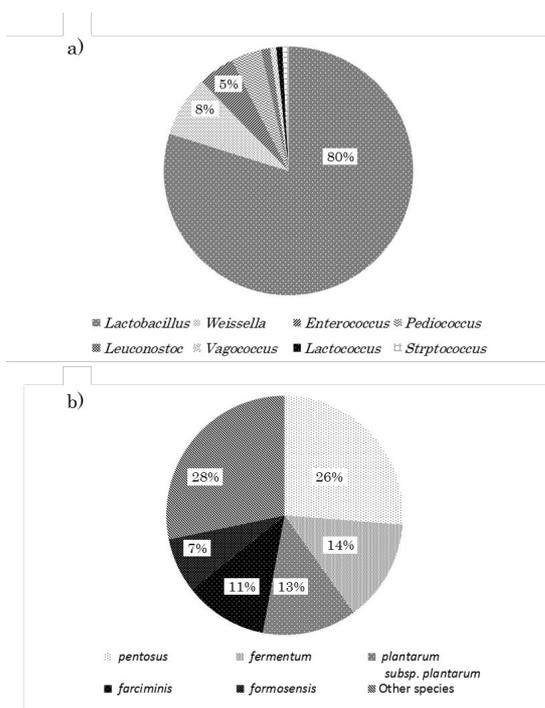


図 3 ミャンマーの発酵食品から分離された乳酸菌の分離頻度(a)と *Lactobacillus* 属内における種レベルの分離頻度(b)

以上のことより、放線菌については 19 科、47 属、157 種という多様な放線菌がミャンマーに存在するという事を明らかにした。この中には *Krassilnikovia* 属の割合が顕著に高く、*Planomonospora* など超希少な放線菌が存在していた。また、新種と推定される菌株も多数存在しており、詳細な分類学的な研究結果

から *Virgisporangium* 属の新種を提案した。この他の新属新種推定株については現在も詳細な分類学的研究を行っている。

乳酸菌については 4 科、8 属、30 種に配属された。*Lactobacillus* 属が最も多く 80% (202 株) を占め、*Weissella* 属、*Enterococcus* 属、*Pediococcus* 属、*Leuconostoc* 属等がそれに続いた。このうち、新種推定株は 12 株が存在しており、ミャンマーの発酵食品には日本では見いだされないような貴重な分離株を得ることが可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Yamamura, H., Miyazaki, S., Ikoma, K., Nakagawa, Y., Hamada, M., Otoguro, M., Tamura, T., Ando, K., Phay, N & Hayakawa, M. (2017) *Virgisporangium myanmarensis* sp. nov., a novel motile actinomycete isolated from an antihill soil in Myanmar. **Journal of Antibiotics**, Accepted (査読あり)
2. 早川 正幸 (2016) 熱帯に生息する超希少微生物の分離探索基盤の構築 **IFO Res. Commun.**, 21-38. (査読なし)

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Yamamura, H., Maeno, M., Miyazaki, S., Ikoma, K., Ando, K., Phay, N. & Hayakawa, M. (2016) Construction of the Foundation of Screening Strategies for Extremely Rare Actinomycetes from Tropical Areas in Myanmar. The Third Myanmar-Japan International Symposium (Patheingyi University, Myanmar). 2016 年 12 月 3 - 4 日
2. Higashiyama, Y., Yamamura, H., Maeno, M., Ando, K., Phay, N. & Hayakawa, M. (2016) Isolation and taxonomic study of the genus *Krassilnikovia* and related taxa selectively isolated by using modified RC method from Japan and Myanmar. The Third Myanmar-Japan International Symposium (Patheingyi University, Myanmar). 2016 年 12 月 3 - 4 日
3. 東山 優樹、山村 英樹、中川洋史、安藤 勝彦、Nyunt Phay、早川 正幸 (2016) ミャンマーと日本で分離された *Krassilnikovia* 属の分類. 2016 年度日本放線菌学会大会, 東京大学(東京都・文京区) 2016 年 9 月 8 - 9 日
4. 乙黒 美彩、前田 康太郎、標 智仁、岸本 宗和、安藤 勝彦、Nyunt Phay、早川 正幸、柳田 藤寿 (2015) ミャンマー産発酵食品からの共培養による乳酸菌の分離とその発酵特性. 2016 年度日本農芸化学会大会. 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市) 2016 年 3 月 29 日
5. Maeno, M., Miyazaki, S., Ikoma, K., Ando, K., Phay, N., & Hayakawa, M. (2015) Isolation of motile actinomycetes by using

modified RC method from Japan and Myanmar. The Second Myanmar-Japan Symposium (Patheingyi University, Myanmar) 2015年12月5 - 6日

6. Maeda, K., Otoguro, M., Kishimoto, M., Yanagida, F. & Hayakawa, M. (2015) Development of a new isolation method for lactic acid bacteria using co-culture. The Second Myanmar-Japan Symposium (Patheingyi University, Myanmar) 2015年12月5 - 6日
7. Yamamura, H., Shoya, M., Hamada, M., Ando, K., Pay, N. & Hayakawa, M. (2015) Taxonomical study of *Planomonospora* sp. RD501994 isolated from Myanmar. The Second Myanmar-Japan Symposium (Patheingyi University, Myanmar) 2015年12月5 - 6日
8. 宮崎 頌矢、生駒 航大、山村 英樹、中川洋史、浜田 盛之、田村 朋彦、安藤 勝彦、Nyunt Phay、早川 正幸 (2015) ミャンマーで分離された運動性希少放線菌 RD501994 株の同定. 2015年度日本放線菌学会大会, 富山国際会議場(富山県・富山市) 2015年9月7 - 8日
9. 生駒 航大、山村 英樹、中川洋史、安藤 勝彦、Nyunt Phay、早川 正幸 (2015) ミャンマーで分離された希少放線菌における分類学的な多様性と二次代謝産物生合成遺伝子の分布. 2015年度日本放線菌学会大会, 富山国際会議場(富山県・富山市) 2015年9月7 - 8日
10. 前田康太郎、乙黒美彩、岸本宗和、柳田藤寿(2015) 共培養による乳酸菌の新規分離法の開発(酵母エンハンス法) 2015年度日本農芸化学会大会. 岡山大学(岡山県・岡山市), 2015年3月27日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

<http://hyamamura.wixsite.com/appl-microbiology>

6. 研究組織

(1)研究代表者

早川 正幸 (HAYAKAWA, Masayuki)

山梨大学・その他部局等・理事

研究者番号：30126651

(2)研究分担者

山村 英樹 (YAMAMURA, Hideki)

山梨大学・総合研究部・准教授

研究者番号：70516939

乙黒 美彩 (OTOGURO, Misa)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：20635099