

茨城県立水戸第一高等学校の土壌からの抗生物質産生放線菌の単離

楠原 若菜[†], 國府田 宏輔^{†*}[†]茨城県立水戸第一高等学校 生物同好会部 〒310-0011 茨城県水戸市 3-10-1

(2019 年 7 月 22 日 受付; 2019 年 7 月 31 日 受理)

Abstract

放線菌は土壌中に生育する微生物である。放線菌の産生する抗生物質は、アンピシリンやカナマイシンなど、生命科学の研究に欠かせない。また、ヒトに対する薬剤としても利用されている。しかも、放線菌は現在も年間約 150 種類の新種が発見されている。このような放線菌は非常に興味深い生物であり、放線菌が産生する抗生物質も有用な物質として非常に興味深い。そこで私は、放線菌の産生する抗生物質を利用した手法の開発を検討した。まず、茨城県立水戸第一高等学校の土壌から、HV agar 分離培地を用い、SDS-Yeast extract 法または乾熱処理法により土壌から放線菌を単離し、コロニーを採取した。放線菌が分泌する抗生物質の存在を調べるために、放線菌が LB 培地中で大腸菌の生育を阻害できるかを調べた。単離した放線菌を、LB 培地で大腸菌と共に培養し、大腸菌の生育を阻害する抗生物質を産生する放線菌を 35 クローン中、4 クローン単離した。この単離した放線菌の菌体を、大腸菌とユーグレナ (ミドリムシ, *Euglena gracilis*) とともに共培養したところ、大腸菌の生育を抑制しユーグレナの培養を行うことができた。この結果は、この放線菌を用いるだけで、ユーグレナなどの真核性の微生物を、抗生物質などを用いずに開放系で培養できる可能性があることを示唆している。

Introduction

放線菌は、土の中に住む、糸状に生育するグラム陽性細菌である。グラム陽性細菌は、有機溶媒で洗っても染色複合体を失わない細菌を指す⁽¹⁾。放線菌は他の菌から身を守るために、抗生物質を産生する。抗生物質は、ペニシリンを始めとして、薬として利用されているものも多い。土壌から放線菌を単離する方法として、一般的に SDS-Yeast extract 法または乾熱処理法が用いられる。SDS-Yeast extract 法は、土壌細菌の殺菌剤としてドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を用い、かつ、放線菌胞子の出芽を促進する活性剤として酵母エキスを使用方法である。乾熱処理法は、放線菌胞子の耐熱性を利用し、土壌中の微生物を滅菌した上で胞子を出芽させる手法である⁽²⁾。これらの手法で放線菌培養に用いる HV 培地は、抗真菌剤のシクロヘキシミドや、抗菌剤であるナリジクス酸、放線菌の要求栄養であるビタミン剤等を含む放線菌分離培地である。

抗生物質の使用は、医療において非常に有用である一方、薬剤耐性菌が問題になったことがある。薬剤耐性菌は、元来自然界に存在し、抗生物質を長期間連用することで耐性を持たない細菌が死滅し、同時に薬剤耐性菌が生き残ることで耐性菌の支配的な増殖を促進することで生じると考えられている。また、非耐性菌が、抗生物質への感受性を変化させることで耐性菌に変化するものもいる⁽³⁾。そうして薬剤耐性菌が蔓延し、集団感染が起きる。

私は、放線菌の有用性と生物学的な意義に興味を持

ち、放線菌の性質を利用するような研究をしたいと考えた。そこで本校、茨城県立水戸第一高等学校の土壌から抗生物質を産生する放線菌の単離を試みた。

その結果、単離した放線菌 35 クローン中、大腸菌 HB101 K-12 株に対して抗菌作用を示す放線菌のクローンを、4 クローン単離した。この放線菌を抗生物質の抽出なしに利用できる方法を検討するために、放線菌とともに、ユーグレナが別の病原体のコンタミネーションをすることなく開放系で培養することができないかを調査した。放線菌とユーグレナ、混入病原体の想定菌体として大腸菌の 3 種を今日培養したところ、大腸菌の生育を抑制しながらユーグレナの培養に成功することができた。このことから、高等学校においても、抗生物質を抽出したり購入したりすることなく、安価・簡便に、微生物の混入を防いだ実験ができるだろう。

Results

放線菌の単離

水戸第一高等学校の土壌から放線菌を単離するために、本校敷地の土手から土を採取した (Fig. 1)。採取した土は、SDS-Yeast extract 法または乾熱処理法により処理した。処理した土は、抗真菌剤であるシクロヘキシミドと、抗菌剤のナリジクス酸、放線菌の要求栄養であるビタミン類を含む放線菌単離培地、HV agar で培養した。SDS-Yeast extract 法で計 31 個のコロニーを、乾熱処理法で 8 個のコロニーを単離した。単離順に、SDS-Yeast extract 法により単離したものには、コロニー #1~#8, #13~#16, #25~#39 とし、乾熱処理法により単離したものには、コロニー #17~#24 の番号をつけた。ただし、SDS-Yeast extract 法により単離しようとしたコ

* Corresponding author. e-mail address: kouda.kousuke.research@

※※※

※※※ = gmail.com

Present address: 茨城県立太田西山高等学校

〒313-0007 茨城県常陸太田市新宿町 210 番地



Fig. 1 水戸第一高等学校の土手

水戸第一高等学校の土手から、土を採取し実験に使用した。

コロニー#9～#12は単離に失敗したため欠番となった。これら35個のコロニーを別の培地に移した (Fig. 2)。

大腸菌に対する抗生物質の産生

単離した放線菌のコロニーが、抗生物質を産生するかどうかを調べるために、大腸菌への抗菌作用を検証した。まず、大腸菌 HB 101 K-12 株を LB 培地上に播種し、単離した放線菌が生育する HV 培地の菌体を含む寒天培地を切り取った。このくり抜いた菌体を、LB 培地上の大腸菌上に乗せ、放線菌が大腸菌の生育を抑

制することを示す生育阻止円（大腸菌の生育が抑制され、大腸菌の生育ができないエリアがくり抜いた放線菌付近に形成される）かどうかを調べた結果、コロニー#3 および#31, #33 および#39 の4つのコロニーにおいて、大腸菌の生育阻止円が見られた (Fig. 3)。

抗生物質を産生する放線菌を利用して、開放系の培養において大腸菌の生育を抑制しながらユーグレナの培養に成功した

大腸菌の生育を抑制する性質を有する放線菌を単離することに成功したので、この放線菌を利用する方法を検討した。本報告では、抗生物質を抽出することなく、利用できる方法について検討した。私は、放線菌の分泌する抗生物質を利用して、別な微生物の培養に利用できないかに着目した。高校では教材としてユーグレナが培養され、主に真核性の単細胞生物の代表例として光学顕微鏡下で観察されることが多い。しかし、クリーンベンチなどの大がかりな設備を有する学校は多くない。一般的には、高校では開放系の、滅菌されていない状態の培養が多いようである。しかしこのこともあって、長期間のユーグレナの培養において、別な微生物がコンタミネーションすることにより、ユーグレナが全滅してしまうことも多々ある。そこで、抗生物質を産生する放線菌を共培養することで、開放系でも他の微生物のコンタミネーションを心配することなく、ユーグレナの培養ができないかと考えた。

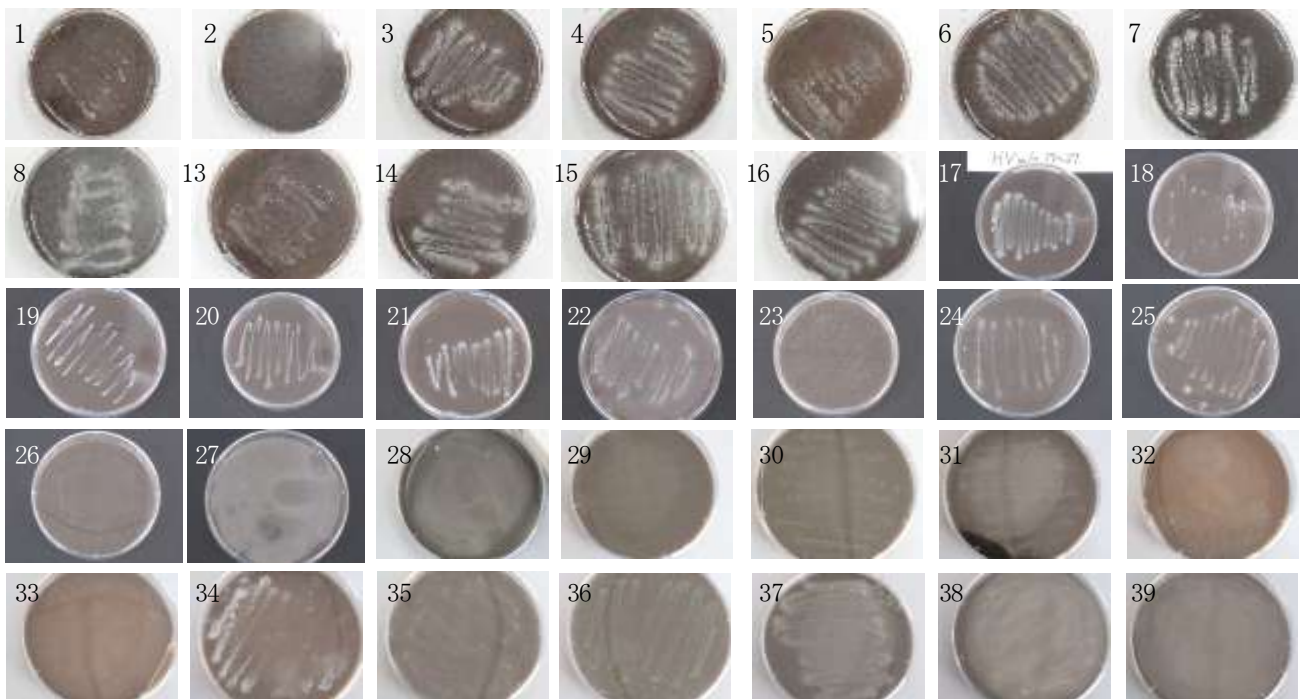
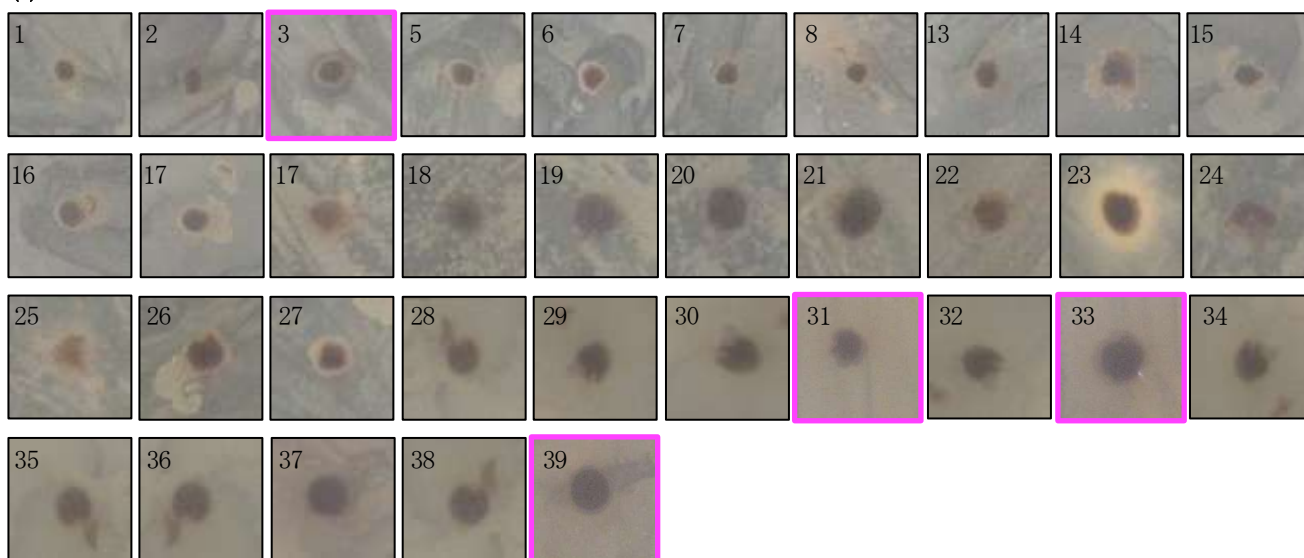


Fig. 2 水戸第一高等学校の土壌から単離された放線菌のコロニー

放線菌を単離した順に番号を振り分けた。放線菌の単離には、SDS-Yeast extract 法(コロニー#1～#8, #13～#16, #25～#39)または乾熱処理法(コロニー#17～#24)を用いた。(コロニー#9～#12は単離に失敗したため欠番)

(A)



(B)

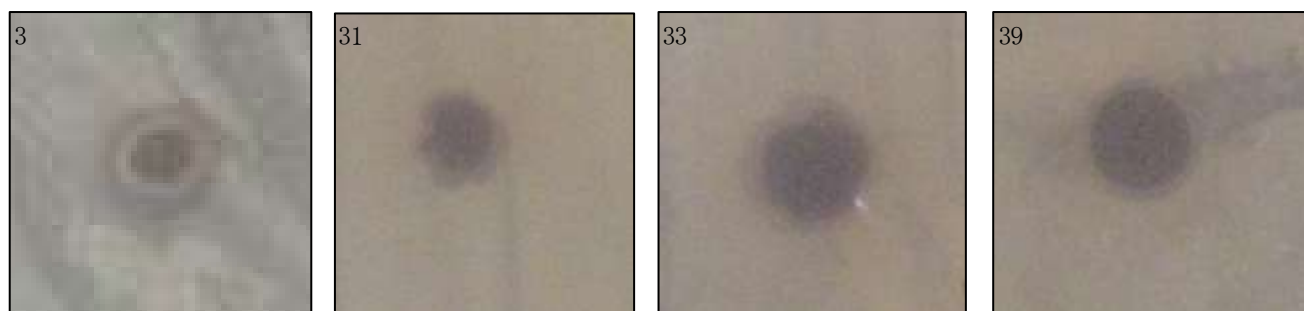


Fig. 3 大腸菌に対する抗生物質を産生する放線菌を4クローン単離した

放線菌を培養したHV培地をくり抜き、大腸菌を播種したLB培地に乗せ、生育阻止円を形成するかどうか検証した。(A) 単離した35クローン。(B) コロニー#3, #31, #33, #39の写真の拡大図。生育阻止円が観察され、抗生物質を産生していることが示唆された。

このことを検討するために、最も生育阻止円の大きかった放線菌(コロニー#3)とユーグレナ、混入病原体の想定菌体として大腸菌の3種を共培養した。その結果、放線菌を添加していないユーグレナと大腸菌のみの培養液(control)に対し、ポジティブコントロールとしてアンピシリンを添加した培養液(w/amp)は、大腸菌の生育に阻害が見られた(Fig. 4)。同様に、放線菌コロニー#3を添加した培養液は、controlに対して、大腸菌の生育抑制が観察された(Fig. 3)。一方、ユーグレナを光学顕微鏡下で観察したところ、ユーグレナの生育には影響がなかった(data not shown)。この結果から、大腸菌の生育を抑制しながらユーグレナの培養に成功することができたとと言えるだろう。高等学校においても、抗生物質を抽出したり購入したりすることなく、安価・簡便に、微生物の混入を防いだ実験ができるだろう。

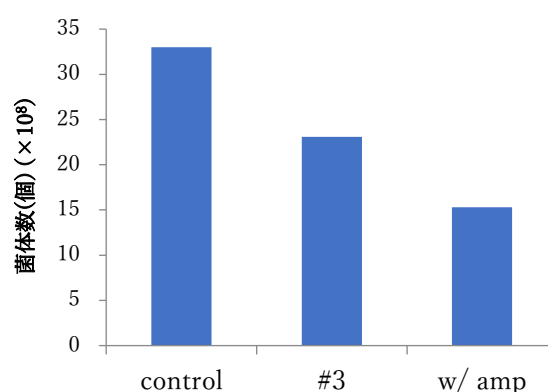


Fig. 4 抗生物質を産生する放線菌を利用し開放系でも大腸菌の生育を抑制しながらユーグレナの培養が可能

LB培地中にユーグレナと大腸菌を添加した。これに、何も添加しなかったもの(control)、または、あらかじめHB培地上で十分に培養した放線菌コロニー#3を含む培地をくり抜いたもの(#3)、50 mg/mlのアンピシリンを添加したもの(w/amp)を添加した。1日共培養後、大腸菌の数を計算した。

Discussion

本実験で単離した放線菌 35 クローン中、大腸菌に対して抗菌作用をもつ抗生物質を産生する放線菌 4 クローンが単離できた (Fig. 3)。HV 培地を用いれば、放線菌の単離は、高等学校でも非常に簡便な操作で単離できる⁽⁴⁾。放線菌から抗生物質を抽出しようとする、有機溶剤を利用しなければならないこともあり、安全性においても高等学校では難しい面がある。そこで私は、抗生物質をヒトに用いる薬として利用するわけではないのであれば、抗生物質を産生・分泌する放線菌そのもの、あるいは放線菌の培養液の上清を回収し、簡易的に抗生物質を利用できるのではないかと考えた。

本校を含む多くの高等学校では、ユーグレナなどの微生物を培養している。しかし、細菌などの微生物が容易に混入し、汚染されることでユーグレナが死滅することが多い。そこで私は、抗生物質を分泌する放線菌を用いて、微生物のコンタミネーションを防ぎユーグレナが簡単に培養できれば、高等学校において簡単にユーグレナの培養が可能になるのではないかと考えている。そのために、放線菌とユーグレナの共培養や、抗生物質を含む放線菌の培地の上清をミドリムシの培地へ添加する手法が考えられる。Fig. 4 に示すように、抗生物質を産生する放線菌と共培養することで、大腸菌の生育を抑制しながら、ユーグレナを培養できることが示唆された。しかし、ポジティブコントロールとして添加したアンピシリンの結果 (Fig. 3 w/ amp) ほど効果的に抑制することはできなかった。LB 培地中でも放線菌が生育できることは確認済みではある (data not shown) もの、共培養しながら分泌される抗生物質の濃度などを最適化しなければ、現実的な利用はまだ難しいと考えられる。今後、定量的に検討しなければならないだろう。一般的に高等学校において、ユーグレナは細胞観察の教材として用いられることが多い。真核細胞で 100 μm 近くあるミドリムシに比べて、原核細胞で小さい放線菌は、邪魔にならずに観察することができるだろう。

また、抗生物質を分泌する放線菌の菌体やその培養液の上清を利用する方法として、水耕栽培の水など、微生物の混入しやすい水への放線菌や培養液の上清の添加も考えられ、これらの実験も行う予定である。ただし、これらの実験を考える上で注意しなければならないのは、薬剤耐性菌の蔓延である。そのためには、ユーグレナの培養や水耕栽培に用いた水は、安易に廃棄せず、単離した放線菌を滅菌し、抗生物質が失活するように、オートクレーブなどの処理を行い、廃棄しなければならないだろう。

また、多様な微生物の生態系が存在する土壤中では、薬剤耐性菌が存在しても、その菌だけが優位に増殖することは一般的に起きていないと考えられる。多様な微生物が競合し複雑な生態系をつくることで、耐性菌

だけが増殖することが防がれているためであると考えられる。このことに着目し、単離した放線菌の単一クローンを利用するのではなく、同一土壌から単離した放線菌であれば、複数種類混合し培養できるのではないかと考えられる。これにより、より広範囲の抗菌スペクトラムをもった混合抗生物質を利用できるのではないかと考えている。

Materials & Methods

SDS- Yeast extract 法

乾燥した土壌資料 1 g を 10 ml の蒸留水の入ったチューブに添加し、ミキサーで十分にかき混ぜた。できた土壌混濁液 1 ml を、0.05% SDS と 6% 酵母エキスを含む 50 mM リン酸緩衝液 9 ml に添加し、40 $^{\circ}\text{C}$ で 20 分間かき混ぜながら加熱した。その後、そこから 200 μl を取り出し、分離培地上に塗り広げた。

乾熱処理法

土壌試料 1 g を乾熱滅菌機を用い 100 $^{\circ}\text{C}$, 30 分加熱した。試料が冷めた後、乾燥した土を分離培地として用いた HV 培地上にふりかけた。

HV 培地

無機塩類 (1.71 g KCl, 0.5 g Na_2HPO_4 , 0.02 g CaCO_3 , 0.05 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) と 1.8 g agar を 1 L の蒸留水に溶解した。ここに、10 g 腐植酸を 100 ml の 0.8% NaOH 液に混ぜ、105 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間加熱して融解した液の 10 ml を添加し、オートクレーブした。60~70 $^{\circ}\text{C}$ に冷却後に、5 ml ビタミン剤 (タケダ アリナミン錠剤を 10 ml の 30% エタノールに溶解したもの) を添加し、寒天培地として用いた。放線菌の HV agar 分離培地として用いる場合はここに、50 mg シクロヘキシミド、10 mg ナリジクス酸を添加した。

HV 培地を用いた抗生物質の検証実験

放線菌のコロニーを用いた抗生物質生産の検証実験では、次の操作を行った。まず、大腸菌 HB 101 K-12 株を LB 寒天培地 (1% ポリペプトン (トリプトンの代用として), 0.5% 酵母エキストラクト, 1% NaCl, 1.5% agar) 上で培養した。放線菌は、あらかじめシクロヘキシミドおよびナリジクス酸を含まない HV 培地へ移し培養した。この放線菌のコロニーを、先端を切り取ったマイクロピペットのチップで培地ごとくり抜き、大腸菌を植え付けた培地に乗せた。その後、大腸菌を一日培養し、生育阻止円が観察されるかどうかを検証した。

放線菌, ユーグレナ, 大腸菌の共培養

LB 培地中に、一定数のユーグレナ (ミドリムシ, *Euglena gracilis*) と一定数の大腸菌を添加した。これに、

あらかじめ, HB 培地上で十分に培養した放線菌コロニー#3 を含む培地をくり抜いたもの, またはコントロールとして 50 mg/ml のアンピシリンを添加し, 1 日培養した。この培養液を 10^5 倍希釈し, これを LB 培地に播種した。1 日後, 形成された大腸菌のコロニー数をカウントした。このコロニー数から, 共培養後の大腸菌の数を計算した。

References

- 1) R.Y.スタニエ, “微生物学 入門編” 培風館 (1980)
- 2) 乙黒 美彩, 中島 琢自, 宮道 慎二, “生物工学教室 放線菌の分離と抗生物質の探索” *生物工学会誌* (2012), 8.
- 3) Masayuki Hayakawa, Hideo Nonomura, “A New Method for the Intensive Isolation of Actinomycetes from Soil” *Actinomycetol* (1989), 3, 95-104.
- 4) 日本菌学会 編, “菌類の事典” 朝倉書店, (2013).
- 5) http://www.ccn.yamanashi.ac.jp/~hyamamura/about_hosenkin1.html (2015 年現在)
- 6) 田村 隆明, “改訂バイオ試薬調整ポケットマニュアル” 羊土社.