新物質生産菌としての放線菌の多様性 —未知の微生物を探る—

Biodiversity of actinomycetes as microbial resources for the screening of new bioactive compounds
—Searching for unknown microorganisms—

北里大学 北里生命科学研究所
高橋 洋子 Yōko TAKAHASHI

Key words: *Actinobacteria*; *Kitasatospora*; predominant strains; oxidative stress; SOD

はじめに

放線菌は細菌の中で形態分化の進んだ一群であり、その2次代謝産物も多様性に富んでいる。1944年に、*Streptomyces griseus*の生産するストレプトマイシンが発見されて以来、放線菌由来の抗生物質を含む生物活性物質探索が活発に行われ、これまでに発見された微生物由来の生物活性物質の約60%は放線菌由来である。

筆者らは、土壤等の自然界から放線菌を分離してこれらの培養液をスクリーニングに供することにより、約150種に及ぶ新規生物活性物質発見に寄与してきた。これらの中の約10種の化合物が医薬、動物薬あるいは試薬として世に送り出された。これらの過程で、スタウロスポリン（プロテインキナーゼC阻害）生産菌 *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *staurosporeus* AM-2282^{T 1)}、アベルメクチン（抗寄生虫活性）生産菌 *Streptomyces avermectinius* MA-4680^{T 2)}、セタマイシン（抗原虫活性）生産菌 *Kitasatospora setae* KM-6054^{T 3)}あるいは現在開発中であるアクチノヒビン（抗HIV活性）生産菌 *Longispora albida* K01-0003^{T 4)}などを含む新しい放線菌を発見し、2新属、9新種、および2新亜種を提唱してきた。

1. 新しい放線菌の分離

多様な放線菌を分離するために多くの研究者によりさまざまな努力が払われてきた。Table 1には、分離源、試料の前処理、分離培地あるいは培養などの工夫と分離される主な放線菌を示した。

ここでは、筆者らがこれまで行ってきた分離の工夫の中で新規生物活性物質の発見に結びついた主な例を述べる⁵⁾。

(1) 砂漠からの放線菌の分離

分離資源として砂漠の砂を用いて放線菌の分離を試みたところ *Streptomyces* 属の菌株以外に希少放線菌が数多く

分離され、属レベルの同定を行ったところ、*Microbispora*, *Amycolatopsis*, *Saccharothrix*, *Nocardia* あるいは *Actinomadura* などの多様な放線菌が分離された。また、これらの生育温度範囲は15~50℃前後であり、53℃で生育可能な菌株も見られた。一般に、日本の土壤から分離される放線菌の生育温度範囲は13~42℃前後であり、日中60℃にも達するという砂漠環境を反映したものであった⁶⁾。これらの放線菌からは新物質として、panosialin と名づけた α -mannosidase 阻害剤および除草活性を有する 4-chloro-threonine が見いだされた。

(2) 土壤団粒内からの分離

近年筆者らは、分離源として土壤団粒に注目している。一般に土壤は、水圏などと比べ多様な微生物の種が生き残ってきたと考えられている。その理由として、土壤は微細な間隙構造によって仕切られた複雑な構造を形成していることが挙げられている。そこで土壤団粒を破砕し、間隙中に潜んでいる微生物の分離を試みた。

さまざまな環境から採取した土壤試料のブレンダー処理後の破砕されない固まり（直径160~990 μm ）を団粒とした。この土壤団粒は間隙と呼ばれる直径100 μm 以上の貫通した穴と2~100 μm の細管が編み目のように張り巡らされており、前者は降雨などにより団粒外との交流があり、後者は、外側とは行き来が少なく風雨にも比較的さらされずに保湿の役目も果たす構造を形成している。この団粒を強酸性電解水で表面殺菌処理後、超音波で破砕して分離に用いた。団粒外と内部から分離された菌株を16S rRNA 遺伝子配列による系統解析を行ったところ外と内部では分離菌株の種類に違いが見られた。すなわち2項で述べる方法で *Actinobacteria* を選択し、16S rRNA 遺伝子に基づく系統解析を行った。その結果、*Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Cellulomonas* などの属は団粒内外の双方から分離されたが、それぞれに特有の菌株も分離されてくることがわかった。団粒内から分離された菌株の中に、現在2種しか報告例のない *Williamsia* 属に近縁な分類的にも興味深い菌株が含まれていた（投稿中）。

Table 1. Variation in Isolation Methods for Actinomycetes

Habitat	
Cultivated field	<i>Streptomyces</i>
Cultivated paddy field	<i>Micromonospora</i>
Plant matter	<i>Microbispora</i>
Pasture	<i>Micromonospora</i>
Lake sediment	<i>Micromonospora</i>
Mangrove rhizosphere soil	<i>Actinobacteria</i>
Tea field soil	Acidophilic and acid tolerant actinomycetes
Others (Desert soil, Marine sediment, Sea water, and Activated sludge)	
Pretreatment	
Yeast extract (6%, 20 min)	Enrichment of actinomycetes
Heating (100°C, 1 h)	<i>Streptosporangium</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetraspora</i>
Phenol (1.0–1.5%, 30 min)	<i>Dactylosporangium</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Micromonospora</i>
Preculture with CaCO ₃	Enrichment of actinomycetes
Chemotactic method (KCl, γ -collidin, xylose)	<i>Actinoplanes</i> , <i>Dactylosporangium</i>
Medium for isolation	
Addition of antibiotics	
Novobiocin	<i>Actinoplanes</i> , <i>Kitasatospora</i>
Tunicamycin	<i>Micromonospora</i>
Rifampicin	<i>Actinomadura</i>
Chlortetracycline	<i>Nocardia</i>
Macrolide or aminoglycoside	Macrolide or aminoglycoside producer
Addition of humic acid	Rare actinomycetes
Addition of proline	Enrichment of actinomycetes
Gellan gum (substitute for agar)	<i>Actinobispora</i>
Condition for isolation	
High temperature	Thermophilic actinomycetes

Nonomura and Hayakawa (1988), Huck *et al.* (1991), Iwai and Takahashi (1992), Nioh *et al.* (1995), Jiang and Xu (1996), Suzuki *et al.* (1998), Takeuchi and Hatano (1999)

Table 2. Antibiotic Sensitivities of *Kitasatospora* and *Streptomyces*

	MIC (μ g/mL)				
	Ampicillin	Gentamicin	Novobiocin	Tetracycline	Tylosin
<i>Kitasatospora setae</i> KM-6054T	>100	6.25	100	50	100
<i>Kitasatospora cineracea</i> SK-3255 ^T	3.12	12.5	>100	50	100
<i>Kitasatospora griseola</i> AM-9660 ^T	12.5	3.12	100	12.5	25
<i>Kitasatospora griseola</i> OM-5023	6.25	6.25	100	25	25
<i>Kitasatospora phosalacinea</i> KA-338 ^T	6.25	6.25	>100	100	100
<i>Kitasatospora niigatensis</i> SK-3406 ^T	3.12	6.25	>100	100	>100
<i>Kitasatospora niigatensis</i> SK-3412	6.25	3.12	>100	50	50
<i>Kitasatospora niigatensis</i> SK-3421	6.25	12.5	>100	100	>100
<i>Streptomyces griseus</i> IFO12875 ^T	>100	6.25	0.8	25	>100
<i>Streptomyces albus</i> IFO13014 ^T	25	1.6	20	100	>100
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> IFO13472 ^T	<0.8	1.6	<0.8	12.5	0.8
<i>Streptomyces tanashiensis</i> IFO12919 ^T	100	12.5	1.6	50	12.5

(3) 固形剤 gellan gum を用いた分離

Actinobispora 属の選択分離に用いられる⁷⁾ gellan gum を寒天の代わりに用い、培地組成に proline のみを含んだ proline-gellan gum 培地で放線菌を分離した。その結果、抗 HIV 活性を有する新物質アクチノヒビン⁸⁾を生産する菌株が得られ、その分類学的研究の結果、新属 *Longispora albida* K97-0003^T を提唱した⁴⁾。

(4) *Kitasatospora* 属菌株の選択分離

1982 年に筆者らが提唱した放線菌の新属 *Kitasatospora* 属は形態では *Streptomyces* 属に類似するが、細胞壁ペプチドグリカンのジアミノ酸として meso 型と LL 型の 2 種類のジアミノピメリン酸異性体を含んでいることが大きな特徴である。本属はこれまで 13 種の報告があり、これらの多くが構造的にも活性的にも多様な新物質を生産している。このような背景のもと、新物質探索のための微生物

物資資源としても興味深いと考え、本属の選択分離を試みた。すなわち、本属がノボビオシンに耐性であることを見だし (Table 2), この性質を利用して土壌よりノボビオシン耐性菌を分離した。結果として、4 新種を発見し、抗原活性物質セタマイシンおよび除草活性物質フォスアラシンの発見につながった^{9), 10)}。最近、ネパールのカトマンズ標高 5000 m の試料からも分離されたとの報告があり、本属の菌株はさまざまな環境に広く分布していると思われる。

以上、環境と分離法について述べてきたが、さまざまな環境の試料を用い、あるいは、分離法を工夫することにより今後も新しい菌株を分離することが可能であると考えられる。

2. 新たな微生物資源を求めて

(1) *Actinobacteria* への微生物資源拡大

放線菌由来の新物質探索が活発に行われ多くの新物質が発見されたが、近年その数は減少傾向にある。こうしたなかで筆者らは、微生物資源を拡大する目的でグラム陽性高 G+C バクテリア (Class *Actinobacteria*) 全体を探索源に加えることとした。*Actinobacteria* は現在約 150 属知られており、従来から探索源として用いられてきた放線菌はこの中の約 70 属である。その他の属は新物質探索のための微生物資源としては、ほとんど用いられてこなかった。これら菌株のコロニーは、柔らかくグラム陰性菌やグラム陽性低 G+C バクテリアとの識別が困難である。そこで Roller らの PCR 法¹¹⁾を応用し簡便な識別法を確立した¹²⁾。この方法を用いて分離された菌株から *Actinobacteria* を選択しスクリーニングに供給した。その結果、1(2)で述べた土壌団粒内分離菌株の培養液より新規抗結核菌物質が発見された。なお、生産菌は *Rhodococcus* 属に属する 1 菌株であった。

(2) 優先種微生物の代謝産物を応用した未知微生物の分離

今日まで発見された微生物は、地球上の全微生物の約 1% 未満とも言われている。

筆者らは、未分離株の取得を目的として土壌試料中の優先的に生育する優先種微生物の代謝物を利用した分離を試みた。すなわち、環境中の微生物フローラに着目し、土壌中に優先的に棲息する微生物は他の微生物に何らかの影響を与える物質を生産するのではないかと考え、優先種微生物の培養液を培地に添加し微生物分離を行った。その結果、ある種の優先種微生物が生産するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) に菌数増加効果があることを見いだした。分離に用いた寒天培地から活性酸素 (O_2^-) が検出され

Fig. The Number of Colonies and Levels of O_2^- on Glucose-Peptone Meat Extract Agar Medium Supplemented with SOD or SOD Plus Catalase. SOD: bovine erythrocytes, 39 U/plate; Catalase: bovine liver, 300 U/plate

たことから、これまで生育困難であった活性酸素感受性菌が分離されてきたと考えられる。市販の SOD でも菌数増加効果が見られ、カタラーゼとの併用でさらなる効果が得られた (Fig.)¹³⁾。この方法で分離された菌株の 16S rRNA 遺伝子による系統解析を行ったところ、いわゆる土壌から直接 PCR 法によって得られた uncultured 16S rRNA 遺伝子配列に高い相同性を有する菌株が見つかった。

自然環境と実験室との間には大きな隔たりがあることは改めて述べるまでもない。イーストエキストラクトブロスが蛍光灯の光にさらされると活性酸素や過酸化水素を発生するとの報告¹⁴⁾や rich medium をオートクレーブ滅菌すると過酸化水素が発生し、*Vibrio vulnificus* の過酸化水素感受性細胞がカタラーゼあるいはピルビン酸の添加で生育可能になったとの報告がある¹⁵⁾。また、早川、原山らは、大腸菌を低温保存したときに生じる viable but non-culturable (VBNC) 状態の細胞がカタラーゼ、ピルビン酸、カテキンなどの活性酸素スカベンジャー添加で培養可能になったと報告している。

これらの報告と上述した筆者らのデータとも考え併せると自然界には未知の菌株あるいは VBNC 状態の菌株の中には酸化ストレスに弱い菌株が多数存在しており、これまでのわれわれの技術ではこれらの菌株は分離されずに見逃されてきたのではないかと考えられる。

おわりに

Micrococcus luteus が自己の休眠細胞を活性化するバクテリアルサイトカイン、resuscitation-promoting factor (Rpf) を生産し、この Rpf は他の *Actinobacteria* の休眠細胞

胞も活性化するとの報告がある¹⁶⁾。自然界で営まれている微生物間コミュニケーションの実態を知ることは困難を極めるが、自然に学び、自然からヒントを得ることはできる。視点を変えたさまざまなアプローチによって多様性に富んだ新規の微生物を分離することは大いに可能であると言える。

また、培地由来の酸化ストレスという現象に遭遇し、改めて培地組成も含めた培養技術の重要性を認識した。遺伝子解析や遺伝子操作が急速に発展し、目的とするゲノムを自由自在に創り得たとしても、コロニー形成のための固形培養あるいは物質生産のための液体培養いずれにしても、最終的には培養という操作抜きには目的を達成することはできない。この培養技術を体系化し、より化学的に捕らえることができれば放線菌（微生物）の潜在機能研究はさらに飛躍すると考える。

- 1) Y. Takahashi, M. Shinose, A. Seino, Y. Iwai, and S. Ômura: *Actinomycetologica*, **9**, 19–26 (1995).
- 2) Y. Takahashi, A. Matsumoto, A. Seino, J. Ueno, Y. Iwai, and S. Ômura: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 2163–2168 (2002).
- 3) S. Ômura, Y. Takahashi, Y. Iwai, and H. Tanaka: *J. Antibiot.*, **35**, 1013–1019 (1982).
- 4) A. Matsumoto, Y. Takahashi, A. Seino, Y. Iwai, and S. Ômura: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 1553–1559 (2003).

- 5) Y. Takahashi and S. Ômura: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **49**, 141–154 (2003).
- 6) Y. Takahashi, A. Matsumoto, A. Seino, Y. Iwai, and S. Ômura: *Actinomycetologica*, **10**, 91–97 (1996).
- 7) S. Suzuki, K. Takahashi, T. Okuda, and S. Komatsubara: *Can. J. Microbiol.*, **44**, 1–5 (1998).
- 8) H. Chiba, J. Inokoshi, M. Okamoto, S. Asanuma, K. Matsuzaki, M. Iwama, K. Mizumoto, H. Tanaka, M. Oheda, K. Fujita, H. Nakashima, M. Shinoses, Y. Takahashi, and S. Ômura: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **282**, 595–601 (2001).
- 9) Y. Takahashi, A. Seino, Y. Iwai, and S. Ômura: *Zentralblatt für Bakteriologie*, **289**, 265–284 (1999).
- 10) K. Tajima, Y. Takahashi, A. Seino, Y. Iwai, and S. Ômura: *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **51**, 1765–1771 (2001).
- 11) C. Roller, W. Ludwig, and K. H. Schleifer: *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 1167–1175 (1992).
- 12) L. Yu, Y. Takahashi, A. Matsumoto, A. Seino, Y. Iwai, and S. Ômura: *Actinomycetologica*, **16**, 1–5 (2002).
- 13) Y. Takahashi, S. Katoh, N. Shikura, H. Tomoda, and S. Ômura: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **49**, 263–266 (2003).
- 14) P. S. Hoffman, L. Pine, and S. Bell: *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 784–791 (1983).
- 15) G. Bogosian, N. D. Aardema, E. V. Bourneuf, P. J. L. Morris, and J. P. O'Neil: *J. Bacteriol.*, **182**, 5070–5075 (2000).
- 16) G. V. Mukamolova, A. S. Kaprelyants, D. I. Young, M. Young, and D. B. Kell: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8916–8921 (1998).