N-16

自然界からの微生物由来抗生物質の探索

Search of antibiotics from microorganisms among natural isolates.

○宮内勇樹[1]，谷川実[2]，浮谷基彦[2]，徳久真弓[2]，西村克史[2, 3]
*Yuki Miyauchi[1], Minoru Tanigawa[2], Motohiko Ukiya[2], Mayumi Tokuhisa[2], Katsushi Nishimura[2, 3]

Abstract: Beginning with the discovery penicillin by Alexander Fleming in 1929, the search for antibiotics have been actively carried out. This study was aimed at searching novel antibiotics in microorganisms from the natural world. We isolated 179 microorganisms from 36 natural soil samples and 2 strains among them exhibited antibiotic activity against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.

1. 目的

1929 年の Alexander Fleming による世界初の抗生物質である Penicillin の発見を皮切りに, 近年微生物由来の抗生物質の探索が盛んに行われている. これらの抗生物質は医薬品や抗菌加工製品の抗菌剤などとして使用され, 人々を感染症の恐怖から守っている. 微生物由来の抗菌性物質は有機合成的に作られた物質に比べ, 化学構造, 薬理作用の多様性に富み, 生体への安全性が高いことが知られている. したがって微生物は新奇抗生物質探索において重要な資源であると言うことができる. 本研究では, 自然界からの微生物由来新奇抗生物質の探索を目的とした.

2. 方法

2.1 微生物の単離

土壌試料 (東京近郊の 36 箇所より採取) を滅菌水で懸濁し, 希釈平板法を用い微生物をポテト-グルコース寒天培地 (じゃがいもの煮汁 1 L, グルコース 15 g, 寒天 15 g) 上に生育させた. 生育した微生物をそれぞれ新しいプレートに植え, これを単離菌株とした.

2.2 抗菌活性試験 (Agar piece 法)

寒天培地上に生育した微生物をストローを用いて寒天ごとくり抜き, それを検定菌を塗布した寒天培地 (検定シャーレ) 上に置き, 検定菌を培養した. 培養後, 生育阻止円の有無を確認した.[1]

2.3 抗菌活性試験 (Paper disk 法)

検定シャーレ上に乗せた濾紙 (Paper disk : 直径 0.55 cm) に試料 (10 µl) を滴下し検定菌を培養した. 培養後生育阻止円の有無を観察した.

2.4 抗菌活性試験の検定菌株

Escherichia coli K-12 (*E. coli*, グラム陰性細菌), *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*, グラム陽性細菌), *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, 真核微生物) を使用した.

2.5 グラム染色と光学顕微鏡での観察

菌液をスライドガラス上で熱固定し, クリスタルバイオレット液, サフラニン液で染色後光学顕微鏡で観察した.[2]

2.6 抗生物質生産株の培養と抗生物質の抽出

ポテト-グルコース液体培地を使用し, 30℃で 24 時間培養した. その後, 培養液に培養液と等量のエタノールを加え激しく振盪し, 遠心分離 (10,000 *g*, 20 min, 4℃) の後, 上澄みを抽出物とした.

2.7 抗生物質の溶媒分画

抽出物を減圧乾燥機で乾燥後, 試料を水で溶解し液量の 1/2 量の酢酸エチルを加え, 酢酸エチル層と水層①に分画した. 酢酸エチル層は減圧乾燥機で乾燥後, ヘキサン, メタノール, 水 (ヘキサン：メタノール：水 = 95：95：10) を加え, ヘキサンとメタノール/水画分に分画した. 水層①に n- ブタノールを加え, n-ブタノール層と水層②に分画した. それぞれの画分の有機溶媒を除去後, Paper disk 法により抗菌活性の有無を調べた.

2.8 抗生物質の精製 (カラムクロマトグラフィー)

エタノール抽出物を水で平衡化した DOWEX 50W-X8 (強酸性陽イオン交換カラム) に通し, 1 M NaCl で溶出した. 各 Fraction の抗菌活性を Paper disk 法で測定 (生育阻止円の大きさ r を計測) し, また, 250~700 nm の吸光度を測定した.

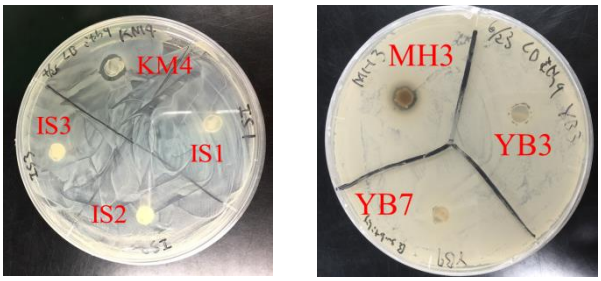
1 : 日大理工・学部・応化 2 : 日大理工・教員・応化 3 : 日大短大・教員・応化

3. 結果

3.1 抗生物質生産株探索

36 の土壌サンプルより 179 種類の微生物を単離し，2 種類の微生物において抗生物質生産が確認された．

東京都目黒川緑道の土から単離された KM4 は *E. coli* (Fig. 1. A), *B. subtilis* に対して，千葉県メッセ大橋前の土譲から単離された MH3 は *B. subtilis* (Fig. 1. B) に対して抗菌活性を示した．しかし，山梨県稲積神社の土壌から単離された IS1~3 (Fig. 1. A), 東京都青梅市やまめの牧場の土壌から単離された YB3 (Fig. 1. B), YB7 は抗菌活性を示さなかった．



A　　B

Fig. 1. 抗菌活性試験. A は *E. coli* を B は *B. subtilis* を検定菌として使用した．

3.2 グラム染色と光学顕微鏡での観察

KM4 はグラム陽性の桿菌であった (Fig. 3). コロニーの形状より，MH3 は放線菌ではないかと考えられた (Fig. 4).

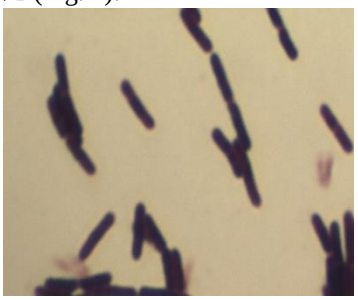


Fig. 2. グラム染色後の KM4 (光学顕微鏡, 対物レンズ 100 倍)

Fig. 3. MH3 のコロニー

3.3 KM4 由来抗生物質の溶媒分画

抗菌活性試験の結果，n-ブタノール画分と水層②画分に活性が確認された．このことから，目的抗生物質は親水性の高い物質であることが分かった．

3.4 KM4 由来抗生物質の精製

カラムクロマトグラフィー後の試料 (Fraction number (F.N.) 1~24) の吸収曲線を測定した結果，260 nm (F.N. 20) と 280 nm (F.N. 6) に吸収ピークが確認された (Fig. 4). 260 nm と 280 nm における各 Fraction ごとの吸光度と抗菌活性試験による生育阻止円の大きさをグラフ化したところ，F.N. 6, 20 付近において吸光度と生育阻止円の大きさのピークがほぼ一致した (Fig. 5). このことから Fig. 4 で検出された 2 つの吸収ピークは目的抗生物質によるものであり，2 種類の抗生物質の存在が示唆された．

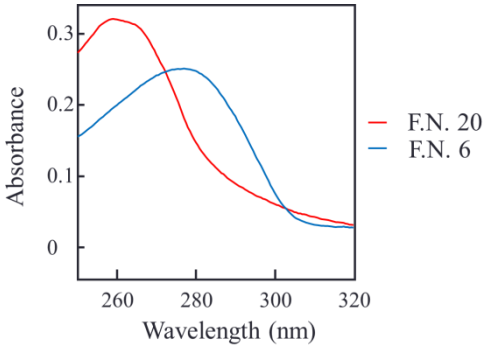


Fig. 4. KM4 由来抗生物質の F.N.6, 20 での吸収曲線 (250~320 nm 拡大)

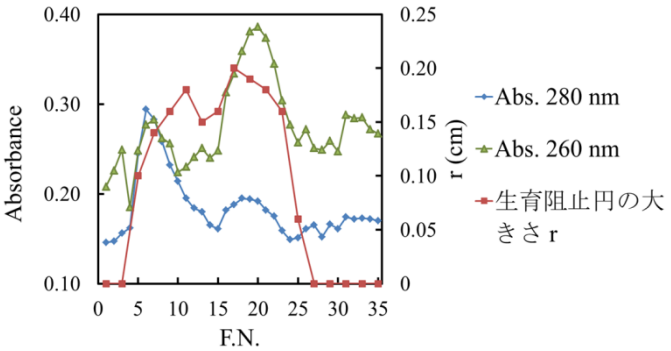


Fig. 5. KM4 由来抗生物質の溶出曲線 (DOWEX 50W-X8)

4. 参考文献

[1] 乙黒美彩，中島琢自，宮道慎二，放線菌の分離と抗生物質の探索，生物工学会誌，第 90 巻，第 8 号，493-498, 2012

[2] 植木厚，微生物実験法，東京化学同人，第 1 版，60-61, 1992