

水圏微生物由来の新奇抗生物質の探索

Search for novel antibiotics from microorganisms in the hydrosphere

○市川彩乃¹, 宮内勇樹², 小池美弥³, 谷川実³, 西村克史^{3,4}*Ayano Ichikawa¹, Yuki Miyauchi², Miya Koike³, Minoru Tanigawa³, Katsushi Nishimura^{3,4}

Abstract: This study was aimed at searching novel antibiotics from microorganisms in the hydrosphere. We isolated 150 microorganisms from 17 samples. Among them a strain (K5-1) exhibited antibiotic activity against *Bacillus subtilis*. This strain was identified as a bacterium in the genus *Streptomyces*.

1. 目的

近年, 抗菌薬の使用に伴う薬剤耐性菌の増加や感染症の複雑化が問題となっている。また化学合成による新奇抗菌薬の開発も容易ではない。そこで有機合成的に作られた物質に比べ, 多様性や生体への安全性に優れる微生物由来の新奇抗生物質に着目した。多くの研究者により土壌に生育する放線菌が生産する抗生物質の研究が行われている。本研究では, 探索が進んでいない水圏に生息する微生物をターゲットとし, 新奇抗生物質を生産する微生物の単離を目的とした。

2. 方法

2.1 野外サンプル採取

野外の池や海から水および水生植物を採取した。水生植物の場合は根や茎をハサミで切り取り採取した。

2.2 野外微生物の単離

水サンプルを滅菌水で希釈後, 希釈平板法を用いて 100 倍希釈 LB 培地に塗布した。水生植物のサンプルに滅菌水を加えホモジナイズした後, デカンテーションにより得た上澄み水を水サンプルと同様に 100 倍希釈 LB 培地に塗布した。生育した微生物のシングルコロニーを新しいプレートに植え, 単離を試みた。

2.3 抗菌活性試験の検定菌

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

2.4 抗菌活性試験 (Agar piece 法)

微生物が生育した寒天培地をストローでくり抜き, 検定菌が塗布された寒天培地 (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調べた。

2.5 抗菌活性試験 (Paper disk 法)

検定シャーレ上に培養液(液体培地を用いて培養し遠心分離により菌体を除いた液)を浸み込ませた濾紙 (Paper disk: 直径 0.55 cm) を置き, 検定菌を培養した。培養後, 生育阻止円の有無を調べた。

2.6 グラム染色と光学顕微鏡での観察

液体培養した微生物をスライドガラス上に熱固定し, クリスタルバイオレット液とサフラニン液で順に染色した (グラム染色)。染色前後の微生物を光学顕微鏡で観察した。

2.7 抗生物質生産微生物の培地の検討

抗生物質生産微生物の液体培養が可能であるのか, どのような培地で生育, また, 抗生物質生産するのかを調べるために, 抗生物質生産微生物を通常の濃度の LB 液体培地と 100 倍希釈した LB 液体培地で培養した。培養後, 遠心分離 (10,000 g, 20 min) し, 培養液を減圧下で濃縮した。濃縮液の抗菌活性試験 (Paper disk 法) を行った。

2.8 微生物の同定

生育阻止円を形成した微生物を培養し Gel Extraction Kit を用いてゲノム DNA を抽出し, これを鋳型として 16S rDNA を PCR を用いて増幅した。アガロースゲル電気泳動を行い目的の増幅産物の鎖長と純度を確認した後, 得られた 16S rDNA 増幅産物を精製し, そのシークエンスを解析した。

1: 日大理工・学部・応化 2: 日大理工・院(前)・応化 3: 日大理工・教員・応化 4: 日大短大・教員・応化

3. 結果

3.1 抗生物質生産微生物探索

東京都内 17 箇所より採取したサンプルから、150 種の微生物を単離した。それらの微生物のうち、葛西臨海公園内蓮池の水から単離した微生物の 1 つ (K5-1) が *B. subtilis* に対し抗菌活性を示した (Fig. 2).



Fig. 1. 寒天培地上の K5-1



Fig. 2. K5-1 の *B. subtilis* に対する抗菌活性

3.2 グラム染色と光学顕微鏡での観察

グラム染色を行った結果、K5-1 はグラム陰性菌であることがわかった (Fig. 3). また、液体培養後の K5-1 を光学顕微鏡で観察したところ、菌糸が観察された (Fig. 4). 以上のことから、K5-1 は放線菌であることが示唆された。



Fig. 3. K5-1 のグラム染色

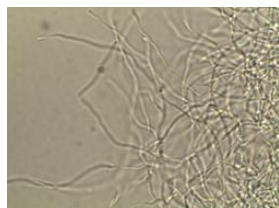


Fig. 4. 液体培養後の菌体の様子

3.3 K5-1 由来抗生物質生産菌の培地の検討

LB 液体培地と 100 倍希釈 LB 液体培地を用いて K5-1 を培養し、Paper disk 法で *B. subtilis* に対する抗菌活性を調べた。どちらの培養液にも抗菌活性が観察された (Fig. 6, Fig.7). これより K5-1 は液体培養においても抗生物質を生産することがわかった。また

菌体外に抗生物質を生産していることと、LB 培地の濃度には影響されないことがわかった。



Fig. 6. LB 液体培地の培養液の抗菌活性 (Paper disk 法)

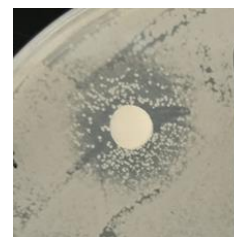


Fig. 7. 100 倍希釈 LB 液体培地での培養液の抗菌活性 (Paper disk 法)

3.4 K5-1 の同定

K5-1 の 16S rDNA を増幅し、シーケンスを解析した。得られた 16S rDNA 配列を用いて属種の同定を試みた。NCBI のデータベース中の配列との相同性を比較した結果、K5-1 は *Streptomyces* 属であることがわかった (Table 1)

Table 1. K5-1 の 16S rDNA 配列と相同性を持つ微生物

生物種	同一性
<i>Streptomyces</i> sp. FZ33	99%
<i>Streptomyces</i> sp. E2N172	99%
<i>Streptomyces violaceorubibus</i> strain LMG 20319	99%
<i>Streptomyces violaceorubibus</i> strain NBRC 15463	99%
<i>Streptomyces tendae</i> strain MCCB 209	99%

4. まとめ

単離した 150 種の微生物から、抗菌活性を持つ微生物を 1 株発見した (K5-1). その抗生物質は *B. subtilis* に対し抗菌活性を示した。K5-1 は液体培養が可能であり、培養液に抗生物質が含まれることがわかった。16S rDNA 配列より、K5-1 は代表的な放線菌である *Streptomyces* 属の細菌と同定された。