

分離放線菌の抗生物質耐性変異に関する研究

大阪府立園芸高等学校 バイオサイエンス科 微生物部

須藤 暁 富田 悠稀 荻野 碧人 小西 一輔

はじめに

先行研究において、本校実習農場の土壌より分離した放線菌は高抗菌活性を有した。その保存株の有用物質（抗菌物質など）生産活性化を目途として研究をすすめた。低濃度の抗生物質（ストレプトマイシン略称 SM、リファンピシン略称 RFP）耐性を獲得した変異株の抗菌活性を調べた結果、変異株は親株より高い抗菌活性を示した。尚、UV 耐性についても調べた結果も併せて報告する。

1. 分離放線菌 A1 株の概要（先行研究）

本校バイオサイエンス科農業環境実習農場から採取した土壌を分離源とした。培地上に生育した放線菌コロニー（図 1）の色は褐色、細胞観察（図 2）から菌糸幅は 0.62~0.83 μm であった。国際標準株（ストレプトミセス グリセウス NBRC 12875）と同等の抗菌活性を有した（図 3）。



図 1 純粋分離 A1 株

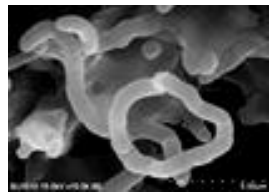
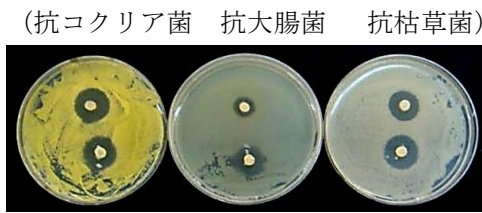


図 2 A1 株細胞 SEM 像 ×10K



(抗コクリア菌 抗大腸菌 抗枯草菌)

図 3 分離放線菌 A1 株(上)と NBRC 12875(下)の抗菌活性試験

又、分離放線菌 A1 株の 16SrRNA 塩基配列を解析し NCBI、DDBJ のデータベース上で相同検索した結果、

両ベースとも *Streptomyces globosus* 種、*Streptomyces toxytricini* 種に 100% の最も高い相同性を示した。

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
<i>Streptomyces toxytricini</i> strain NBRC 12823 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	1458	1458	100%	0.0	100%
<i>Streptomyces globosus</i> strain LMG 19896 16S ribosomal RNA, partial sequence	1458	1458	100%	0.0	100%

2. 分離放線菌 A1 から抗生物質耐性・UV 耐性変異株の作成

食総研成果情報（低濃度ストレプトマイシン耐性変異株はストレプトマイシンの最小発育阻止濃度の 3~50 μg/ml 程度の濃度で取得する）から、抗生物質濃度を 0~16 μg/ml として実験を組み立てた。

準備：

- ・試薬ストレプトマイシン（図 4）、リファンピシン（図 5）
- ・分離放線菌 A1 株前培養液の作成（図 6）
- ・固体培地の作成（図 7）

放線菌培養培地成分	
可溶性デンプン	0.4 %
酵母エキス	0.4 %
麦芽エキス	1 %
Tap water	pH 7.0
agar	1.5 %



図 4



図 5



図 6



図 7

方法：

1. A1 株前培養液 100 μl をシャーレにとりクリーンベンチ内でフタを開けたままで UV を 90 秒間照射した（図 8）。
2. 試験区は区分 A は UV 照射無し、区分 B は UV 照射有りの 2 区分とし、抗生物質濃度（μg/ml）をストレプトマイシンの場合は 0、4、8、16 にリファンピシンでは 0、0.25、0.5、1.0 と設定した。
3. 培地の固化後、区分 A は UV 照射無しの A1 前培養液を 10~100 μl、B は UV 照射有りの A1 前培養液 10~100 μl を加え、コンラージ棒で塗抹し、30℃ で数日間培養した。



図 8 UV 照射処理

結果：

1. ストレプトマイシン・UV 耐性試験の結果（図 9 参照）から、区分 A の 4 μg/ml 濃度で 20 個、8 μg/ml 濃度で 3 個のコロニーが生育した。又、区分 B の 4 μg/ml 濃度で 9 個のコロニーが生育した。

区分 A				
UV 照射				
無し				
区分 B				
UV 照射				
有り				
SM 濃度 (μg/ml)	0	4	8	16
A1 培養液量 (μl)	100	10	10	10

図 9 分離放線菌 A1 のストレプトマイシン・UV 耐性変異株の作成

2. リファンピシン・UV 耐性試験において、濃度 4~16 μg/ml ではコロニーは生育しなかったのより低濃度で試験した。その結果（図 10 参照）、区分 A の 0.25 μg/ml 濃度で 18 個のコロニーが生育した。区分 B の 0.25 μg/ml 濃度でコロニーが 2 個生育した。

区分 A				
UV 照射				
無し				
区分 B				
UV 照射				
有り				
RFP 濃度 (μg/ml)	0	0.25	0.5	1.0
A1 培養液量 (μl)	10	10	10	10

図 10 分離放線菌 A1 のリファンピシン・UV 耐性変異株の作成

3. 抗生物質耐性・UV 耐性変異株の抗菌活性試験

準備：

- ・試料の作成

A1 株、変異処理株各コロニーから作成した各培養液を放線菌培養用高栄養寒天培地に塗抹し 25℃ で 4 日間培養し、全面コロニーを作成した（図 11）。



図 11 試料(各区分の全面コロニー) (左から SM 耐性株、SM・UV 耐性株、RFP 耐性株、RFP・UV 耐性株)

- ・検定菌は NBRC より譲渡を受けたコクリア菌、大腸菌、枯草菌を使用した。
- ・検定用培地はミューラーヒントン寒天培地を使用した。

方法：アガーピース法

1. 3 株の細菌培養液 100 μl をミューラーヒントン寒天培地に滴下しコンラージ棒で塗抹した。
2. 試料の供試はアガーピース法を用い、試料 4 区分（A1、A1SM、A1UV、A1SMUV 株、又は A1、A1RFP、A1UV、A1RFPUV 株全面コロニー）を口径 5mm のストローで打ち抜いた寒天片を置床し 30℃ で 48 時間培養した。

結果と考察：

1. ストレプトマイシン・UV 耐性株の抗菌活性試験の結果（図 12、表 1 参照）から、UV 耐性株には効果がみられなかったが、SM 耐性株、SMUV 耐性株は高い抗菌活性を示した。SM 耐性株の抗菌性能向上はリボソームに關与する遺伝子の突然変異と想定される。



図 12 放線菌 A1 の SM 耐性・UV 耐性変異株の抗菌活性試験

n=1

n=2

(シャーレ左はコクリア菌、中央は大腸菌、右は枯草菌、培地上部に親株、左部に SM 耐性株、下部に UV 耐性株、右部に SM・UV 耐性株を置床)

表 1 分離放線菌 SM 耐性・UV 耐性株の抗菌活性試験 (阻止円直径 mm 2 回平均値)

試料種類	検定菌	コクリア菌	大腸菌	枯草菌
親株	18	13	19.5	
SM 耐性株	20	15	21.5	
UV 耐性株	18.5	13	19.5	
SM・UV 耐性株	20.5	15	22.5	

2. リファンピシン・UV 耐性株の抗菌活性試験の結果（図 13、表 2 参照）から、UV 耐性株には効果がみられなかったが、RFP 耐性株、RFP・UV 耐性株はコクリア菌と枯草菌いわゆるグラム陽性菌に対してより高い抗菌活性を示し、阻止円の大きさは SM 耐性変異株を凌いだ。リファンピシン耐性変異株の抗菌活性の向上は DNA 遺伝子の突然変異と想定される。

尚、RFP・UV 耐性株と RFP 耐性株の抗菌活性は同等であり、先の SM 耐性株と同様に UV 処理による効果がみられなかった。

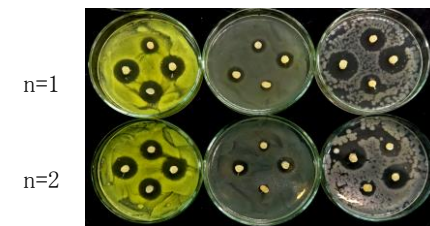


図 13 放線菌 A1 の RFP 耐性・UV 耐性変異株の抗菌活性試験

n=1

n=2

(シャーレ左はコクリア菌、中央は大腸菌、右は枯草菌、培地上部に親株、左部に RFP 耐性株、下部に UV 耐性株、右部に RFP・UV 耐性株を置床)

表 2 分離放線菌 RFP 耐性・UV 耐性株の抗菌活性試験 (阻止円直径 mm 2 回平均値)

試料種類	検定菌	コクリア菌	大腸菌	枯草菌
親株	17.5	12.5	19	
RFP 耐性株	21	15	23.5	
UV 耐性株	19	11	18	
RFP・UV 耐性株	21	15	23	

今後の課題：

- ・複数種 (SM、RFP) の抗生物質耐性株の作成とその抗菌活性
- ・UV 耐性株作成における UV 照射時間条件の検討
- ・抗生物質耐性変異株の抗真菌 (酵母、カビ) 活性、防虫効果
- ・抗生物質耐性変異株の遺伝子変異解析

参考文献：低濃度ストレプトマイシン耐性変異による微生物の有用生産能力増強 (2009 食総研研究担当者：岡本晋)