

放線菌の分離と抗生物質の探索

乙黒 美彩¹・中島 琢自²・宮道 慎二^{3*}

¹山梨大学, ²北里大学, ³製品評価技術基盤機構

(2012年4月25日受付 2012年6月13日受理)

抗生物質は多くの感染症から人類を救い、20世紀を代表する科学の恩恵の一つとされている。わが国では、戦後間もなく始まった新規で有用な抗生物質のスクリーニングと医薬への応用研究が幾多の画期的成果をあげ、生物学の先進的一分野としても発展してきた。ここでは初心者を対象に、自然界から放線菌を分離して抗生物質探索する教育実習プログラムを紹介する。先人たちがどのようにして新しい抗生物質を発見し、夢の新薬につなげて行ったのか、その一端を体験して欲しい。なお、このプログラムはネット配信¹⁾されているNHK教育テレビ10 minボックス「クスリをつくる微生物」に対応しているので、この番組を見ることでより理解しやすい。

1. 分離源の採集と放線菌の分離

1) 分離源の採集と乾燥 放線菌は自然界に広く分布しており、どのような試料からでも分離は可能であるが、ここでは最も分布密度の高い土壌について述べる。自然状態の保たれた場所や田畑などで、土壌表面のゴミを除去し、深さ3~5 cmの土壌試料をスプーンで3杯程度採集する。集めた試料は、濾紙や新聞紙の上に広げ

て大きな粒子は粉碎し3~5日室温で乾燥する。この乾燥によって放線菌胞子の熟成が進み、逆に無孢子性のバクテリアは生息数が激減する。試料の乾燥は放線菌の選択分離に欠かせない重要なプロセスである。

2) 放線菌の分離法²⁾ 放線菌の分離方法は目的によって多種多様であるが、ここでは乾熱処理法と希釈平板法の1種であるSDS-Yeast extract法について述べる。

2-1) 乾熱処理法 (Dry-heating method) : 乾燥した土壌試料をガラス製のシャーレに入れて100°Cで30分程度加熱処理する。この過程で孢子非形成の微生物の大部分が死滅し、相対的に放線菌比率が高まり、分離が容易になる。乾燥と加熱を終えた土壌試料は、図1左の要領で2~3枚の分離培地上にスパーテルでパラパラと薄く土まきし、25~30°Cで5~15日培養後、図1右のように分離する。

2-2) SDS-Yeast extract法 (図2) : 乾燥した土壌試料1 gを10 mlの滅菌水の入った試験管に添加し、ミキサーで十分に攪拌する。この土壌懸濁液0.5 mlをSDS (0.05%, w/v) と酵母エキス (6%, w/v) を含む50 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) 4.5 mlに添加し、40°Cで20分



図1. 乾熱処理法の土まき(左)と釣菌(右)の様子(実際には釣菌は安全キャビネット内で行う)

*連絡先 E-mail: miyadoh@mwb.biglobe.ne.jp

SDS-Yeast extract method

for general actinomycete isolation

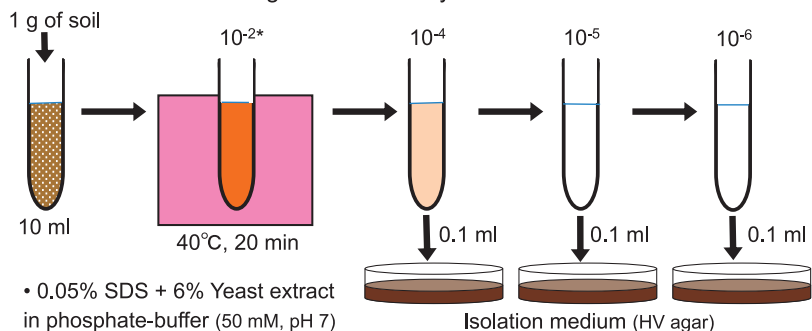


図2. SDS-Yeast extract 法の手順



図3. 分離シャーレ (左), 釣菌 (中央) および選択株シャーレと凍結保存用チューブ (右)

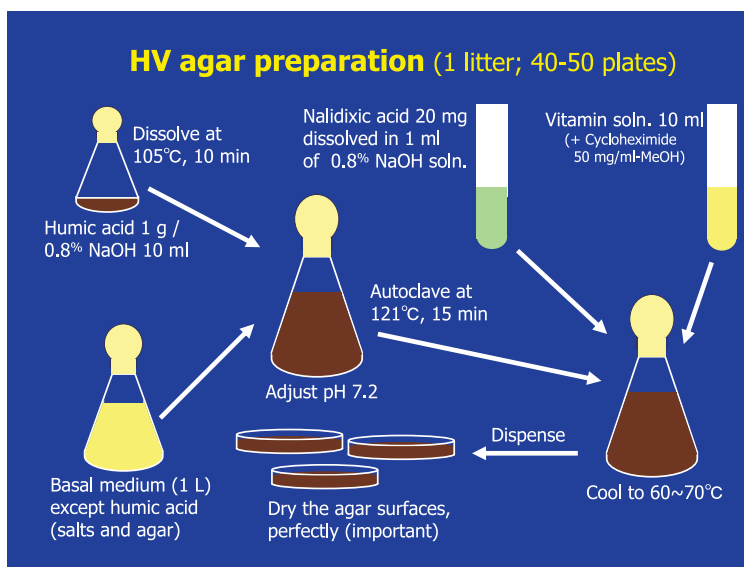


図4. 腐植酸-ビタミン培地 (HV agar) の作り方手順

間時々攪拌しながら加熱する。その後この処理液 1 ml を適宜希釈し、0.1 または 0.2 ml を分離培地上に塗り広げる。培養は 25~30°C で 2 週間程度。SDS (sodium dodecyl sulfate) は主に土壌細菌の殺菌剤として、酵母エキスは放線菌胞子の出芽を促進する活性化剤として効

果のあることが明らかになっている²⁾。

3) 分離株の選択と保存 分離シャーレ (図3左) から放線菌コロニーを殺菌したつまヨウジで4分割した HV agar に画線し移植 (図3中央) する。自然界には病原性細菌の生息も考えられるので、これらの作業はク

グリーンベンチや安全キャビネット内で行う。4分割シャーレは3～5日の培養後、形態観察により重複株を廃棄し、コンタミ株は純化する。選択株は1株ごとYS agar（スターチ1%、酵母エキス0.2%、寒天2%、pH 7.0）に移植し、胞子の着生状態^{4,5)}や色調を観察して、再度、重複株を廃棄する。最終的に選択された株に名前や番号を付けて分離株セットとして保存する。分離株の長期保存は10%グリセロール液を保護剤としストローで打ち抜いた寒天培養片の凍結保存が簡便である⁶⁾（図3右）。

4) 分離株の同定 放線菌を含むバクテリアの同定は、およそ1500塩基対の16S rRNA 遺伝子配列を解読しデータベース解析することで判定できる^{7,8)}。この解析を有料で行う企業もある。

2. 放線菌分離培地の作り方

次に、放線菌の選択分離培地である腐植酸-ビタミン培地²⁾ (Humic acid-vitamin agar, HV agar) の作り方を紹介する。腐植酸というのは植物の最終的な分解残渣で黒褐色の酸性混合物である。自然界ではこの難分解性有機物を主に放線菌が分解しており³⁾、腐植酸を唯一の栄養源としたこの培地は放線菌の選択分離にとって合理的と言える。放線菌にはビタミン要求株もあり、ビタミン類の添加も有効である。土壌には放線菌以外のバクテリアが多数生息しているため、特に生息数の多いグラム陰性細菌の生育抑制にナリジクス酸を添加する。また、カビの生育を抑制するために抗カビ剤の添加も有効である。培地作りの手順（1 l分）（図4）

a) 基礎培地の準備；無機塩類と寒天18 gを水道水1 lに溶解。容器は1 lの三角フラスコか、やかんを使うとよい。無機塩類の組成は以下の通り。

KCl	1.71 g
Na ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 g
CaCO ₃	0.02 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01 g

b) 腐植酸^{注1)}は溶けにくいので、あらかじめアルカリ水で加熱溶解し保存しておく。すなわち、10 gの腐植酸を100 mlの0.8% NaOH液に懸濁し105°C、10分加熱して溶解した液を保存しておく。この溶液10 ml（腐植酸1 g）を上記の基礎培地に添加しpH 7.2に調整してオートクレーブする。

c) ビタミン類と抗菌剤は高温では失活するので60～70°Cに冷却した後に添加する。ビタミンは市販のアリナミンなど^{注2)}を5 ml添加。ナリジクス酸^{注3)}は10～20 mgを0.8% NaOH液1 mlに溶解して添加。抗カビ剤としてはサイクロヘキシミド50 mgを少量のメタノールに溶解し、あるいはカビサイジン0.75 mgを少量の無菌水に懸濁して添加する。

d) シャーレに培地を広げる。以上の方法で調製した1 lの培地で、放線菌分離用の「HV agar」シャーレが40～50枚作れる。寒天培地の表面はよく乾燥しておく。乾燥が不十分だと運動性バクテリアが培地表面を覆ってしまい放線菌の分離が困難になることが多い。

3. 抗生物質の生産と検定

1943年にストレプトマイシンが発見されて以降、放線菌は抗生物質生産能力に優れた微生物として世界的に注目されてきた。その結果、これまでに発見された抗生物質の3分の2は放線菌の生産物とされている。今回分離した放線菌についても抗生物質（抗菌物質）を生産しているかどうか調べてみよう。

1) 抗菌活性の検定菌株 検定菌株は、目的によって異なるが、ここでは感度が高く国際的な標準株でもある*Kocuria rhizophila* NBRC 12708（2003年までは*Micrococcus luteus*と呼ばれていた）を使ってみよう。この株はNBRCから大学など公的機関は4200円で、企業の場合は8400円で入手できる。この株の他にも*Bacillus subtilis*や*Escherichia coli*、さらには酵母（*Saccharomyces* or *Candida*）などが抗菌スペクトルを調べる上で使用されている。*Kocuria rhizophila*に対しては50%程度の放線菌分離株が何らかの抗菌性を示すが、*Escherichia coli*に対しては分離株の1%も抗菌性を示さないことが分かるだろう。

2) 検定シャーレの作り方 *Kocuria rhizophila*の場合、ハートインフージョン培地などの細菌用液体培地を用いて、37°C、1～2日培養の種菌培養液を準備する。次に、市販のミュラーヒントン培地（38 g/l）をオートクレーブし50°C程度に冷却後、準備した種菌培養液を1%添加し検定シャーレを作成する。この時、培地が熱すぎると種菌が死滅するので注意が必要である。

3) 寒天培地での抗生物質の生産と検定 抗生物質の1次スクリーニング法としては寒天培養法が簡便である。生産用の培地組成はYS agarなどの植え継ぎ培地よりも高栄養の培地が望ましい。たとえば、図5左は分離株をグルコース1%、スターチ1%、ペプトン1%、酵母エキス0.5%、炭酸カルシウム0.3%、寒天2%（pH 7.0）の培地に植菌して28°Cで7日間培養したものである。次に、ここからストローで打ち抜いた寒天片を検定シャーレ上に、直接、表向きに置いて抗生物質の生産性を検定する。検定シャーレは37°Cで1～2日培養すると、図5右のように抗生物質生産株は生育阻止円（ハロー）

^{注1)} 東京化成工業からニトロフミン酸という試薬名で販売されている（25 g、1600円）。

^{注2)} オリジナルな方法は各種ビタミン類を規定量添加している。

^{注3)} ナリジクス酸は、キノロン系の合成抗菌剤（5 g、2500円、25 g、5700円）。

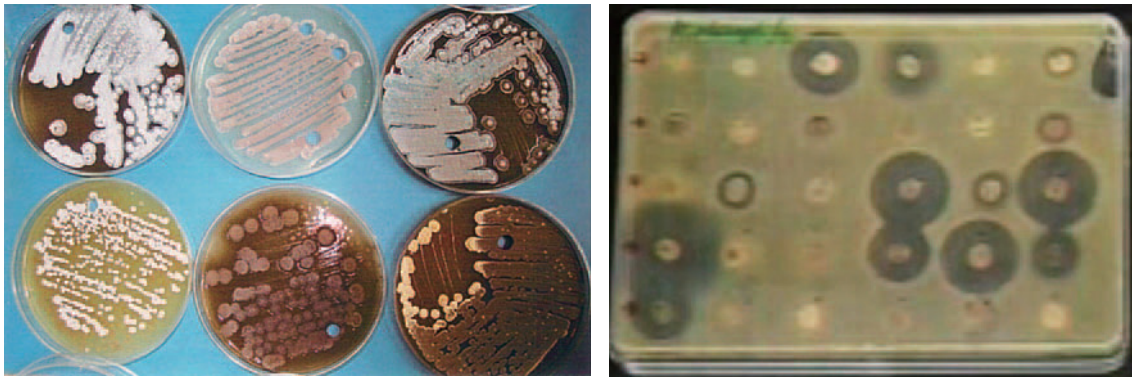


図5. 寒天培養法による抗生物質の生産性試験および *Kocuria rhizophila* による抗菌活性試験



図6. 抗生物質の抽出と精製の流れ. 左から, 液・液分配→エバポレーター(濃縮)→シリカゲルCC

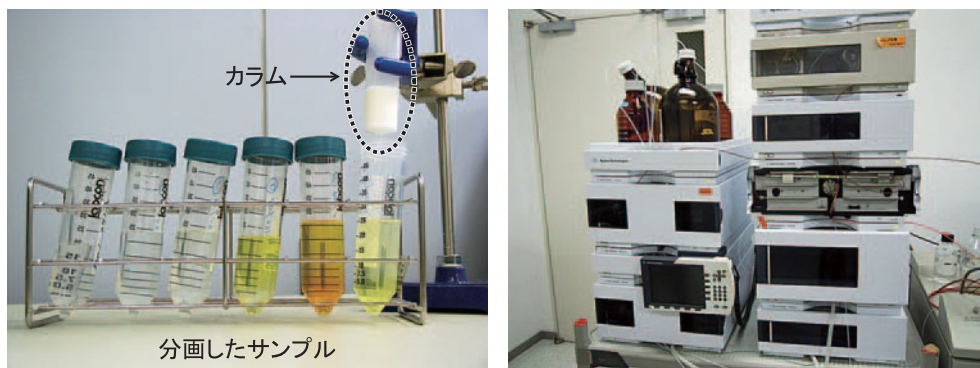


図7. シリカゲル・パックドカラムによる分画 (左) と HPLC 装置 (右)

を形成する. この検定法は Agar piece 法 (AP法) と呼ばれている.

4) 液体培養による抗生物質の生産 1次スクリーニングで選択された株の作る抗生物質の追跡には液体培養が不可欠である. 一般的に液体培養はシード (種菌) 培養と生産培養の二段階で行う. 例えば, シード培養は 20 ml/100 ml 容三角フラスコに植菌して培養し, その培養液 2~3 ml を生産培地 80 ml/500 ml 容三角フラスコに移植する. 生産用培地は, たとえばグルコース 1%, スターチ 2%, 大豆粉 1.5%, ペプトン 1%, 炭酸カルシウム 0.3% (pH 7.0) などが使われ, 25~30°C, 3~5

日の振とう (180~220 rpm) 培養が行われる. 生産性の向上には, 培地・培養条件の検討と共に高力価株の育種が重要である. 抗菌活性 (バイオアッセイ) は培養濾液を染み込ませたペーパーディスクを検定シャーレ上に置いて抗生物質の生産を調べ (ペーパーディスク法), 前述した各種微生物に対する抗菌スペクトルも検定する. 液体培養の規模は, フラスコから 5~50 l のジャー・ファーメンターへとスケールアップして行く.

4. 抗生物質の抽出と精製

抗菌活性が認められた培養液にどのような抗生物質が

含まれているか確認するためには、培養液から抗生物質の単離・精製を行わなければならない。精製方法にはさまざまな手法があるが、一般的には、培養液の有機溶媒抽出物を順相あるいは逆相のカラムクロマトグラフィー(CC)への吸着溶出で分画し、さらに、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いてより高純度に精製する。順相CCは充填剤の極性が移動相よりも高い樹脂(シリカゲルなど)を用い、脂溶性物質(低極性物質)が先に移動する。一方、逆相CCは充填剤の極性が移動相よりも低い樹脂(ODSなど)を用い、水溶性物質(高極性物質)が先に移動する。図6に一般的な精製手順を図示した。なお、有機溶剤の取り扱いについては規程に従い最大限の注意が必要である。

a) 菌体内内容物も抽出するため培養液に等量のアセトンまたはアルコールを加え激しく振とうする。

b) 遠心分離により上清を回収し、エバポレーターで有機溶媒を留去後、酢酸エチルを加え液液分配による溶媒抽出を行う。あらかじめ、予備抽出実験により抽出時の適正なpH条件(酸性、中性、塩基性)を決めておく。回収した酢酸エチル層は、脱水目的で無水Na₂SO₄を加えることもある。

c) 酢酸エチルを留去後、バイオアッセイにより抗生物質が回収できていることを確認する。確認後、抽出物をシリカゲルCCに供するため少量のクロロホルムに溶解する。

d) クロロホルムで充填したシリカゲルCC上端に試料を慎重にのせる。テーリングを防ぐため高濃度の試料を少量添加するのが望ましい。カラム容量の約3倍量のクロロホルムで洗浄後、100/0, 100/1, 50/1, 25/1, 10/1, 2/1, 0/100(=CHCl₃/CH₃OH)の7段階に割合を変えたクロロホルム-メタノール系溶媒を順次カラム容量の3倍量流して抗生物質を溶出し、バイオアッセイする。

e) シリカゲルCCの活性画分をエバポレーターで濃縮後、ODS CCに供する。ODS CCは水で充填後使用する。試料が水にとけない場合は少量のメタノールを加える(上限12.5%)。試料が解けない場合は懸濁液で供してもよい。シリカゲルCC同様、充填剤の約3倍量の水で洗浄し、同じく約3倍量のメタノール水溶液で順次溶出する。さらに、ゲル濾過(Sephadex LH-20など)の追加

精製も有効で、この場合は化合物の極性以外の要素(分子量)で分画することになり、展開溶媒としてはメタノールを使うことが多い。

f) 得られた活性画分をエバポレーターで濃縮後、HPLC分取を行う。HPLC分取条件を決定するため、まず分析用カラムで試験する。分析条件は5%から100%のアセトニトリル(もしくはメタノール)水溶液でグラジエント分析後、アイソクラティック(均一濃度)の条件を見いだすことが望ましい。この条件が決まれば大量分取用カラムで目的化合物と夾雑物の溶出時間を明瞭に区分することが可能となり目的化合物を単一ピークとして取得しやすい。

以上の精製手順はあくまでも一般的な手法の一例であり、シリカゲルやODSに吸着しない水溶性物質などの精製には不向きである。水溶性物質はゲル濾過やイオン交換CC、カーボン吸着などが使用できる。また、薄層クロマトグラフィー(TLC)などによる精製が有効な場合もある。このような過程を経て採取された高純度の化合物はマスペクトル(MS)や核磁気共鳴(NMR)などの分析装置を使用し、得られた情報をデータベース⁹⁾に照合して構造を推定する。

(参考実験) 抗生物質精製の一例

放線菌の作る抗生物質、クロラムフェニコール、ロイコマイシン、アンスラサイクリン群(図8)を培養液から酢酸エチルで抽出し、シリカゲルCC(図7)分画とTLC展開(図9)の実験を試みよう。

a) クロラムフェニコール;グラム陽性および陰性細菌、リケッチアなどによる広範囲な感染症に有効な脂溶性中性の抗生物質。現在はあまり使われていない。ベンゼン環に起因するUV 270 nmの強い吸収がある。放線菌培養液に終濃度100 μg/mlを添加し実験材料とした。

b) ロイコマイシン;16員環マクロライドの一種でグラム陽性細菌、マイコプラズマなどに有効な抗生物質(図は類縁体の1つ)。この系統の薬剤は一般に安全性が高い。ジメチルアミノ基-N(CH₃)₂を有するため培養液を塩基性にして溶剤抽出する。培養液に終濃度50 μg/ml添加。

c) アンスラサイクリン群;抗グラム陽性細菌活性を示

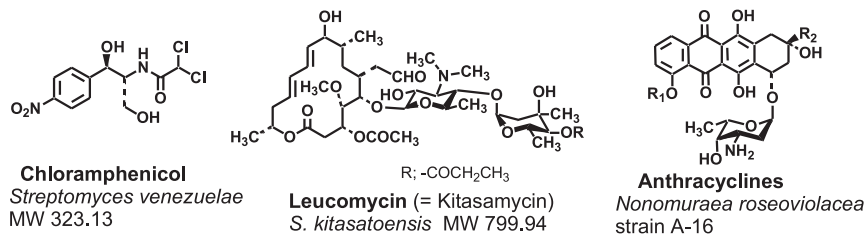


図8. クロラムフェニコール、ロイコマイシン、アンスラサイクリンの構造式

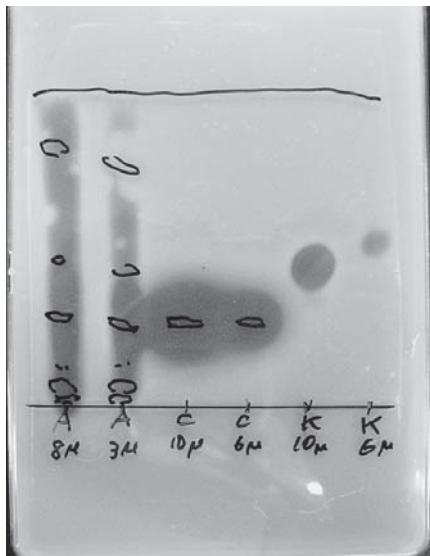


図9. 3つの抗生物質抽出物のTCL展開とバイオアッセイ

し制癌剤としていくつか実用化されている。副作用が強く投与条件は厳しい。キノン骨格の側鎖によって色調やUV吸収などが異なる。半水溶性。10 minボックス「クスリをつくる微生物」で取り上げた菌株の培養液を用いた。

1) シリカゲルCCによる抗生物質の精製 上に示した3つの培養液から抗生物質(クロラムフェニコール, ロイコマイシン, およびアンストラサイクリン類)を酢酸エチル抽出し, 市販のパックドカラム(シリカゲルCC)を用いて精製してみよう。まず, ①図7左のようにカラムを固定し, クロロホルムをカラム容量の3~5倍量流してシリカゲルを十分に湿潤する。②少量のクロロホルムに溶かした酢酸エチル抽出物をゲル上部に慎重に充填。③クロロホルム-メタノール系での溶出を行う。ここでは, 100/0, 100/1, 50/1, 25/1, 10/1, 2/1, 0/100(=CHCl₃/CH₃OH)の7段階とし, ステップごとに順次カラム容量の3倍量で溶出した。④分画された各フラクションはバイオアッセイに供し目的化合物を追跡した。溶出液に浸したペーパーディスクはよく乾燥して有機溶媒を除去した後, 検定に供する。この実験で活性の高いフラクションが絞り込まれれば, HPLC(図7右)やLC/MSなどで分析し市販の標品と比較する。なお, カラムはジーエル・サイエンス社 Silica gel packed column; InertSep SI, 1 g/6 ml, 30本 2万円を用いた。

2) 抗生物質抽出物のTLC展開とバイオアッセイ 次に同じく3つの培養液から抗生物質を酢酸エチル抽出し, TLC展開とバイオアッセイ実験(bioautography)をしてみよう。まず, ①各抽出物を少量のアセトンに再溶解し, TLC上にスポットして乾燥。②展開溶媒で図9

上部の波線まで展開。③展開後, TLCを取り出し乾燥によって溶媒を除去して検定平板上に, 直接, TLCを約10分間貼りつけた。④そしてTLCを取り除いた検定平板を培養した結果が図9である。各抗生物質による生育阻止ゾーンが明瞭に形成されている。左から2つはアンストラサイクリン類(A)であり抽出液のスポット量が8 μlと3 μlで, 多成分であることも分かる。中央2つはクロラムフェニコール(C), 右の2つはロイコマイシン(K)である。TLCの展開溶媒は, クロロホルム-メタノール10/1の系で, 検定菌は*Kocuria rhizophila* NBRC 12708を用いた。一方, 油性ペンで描かれたマークはUV吸収のスポットで, ロイコマイシンのスポットは確認されなかった。シリカゲルTLCは, アルミシート, 20×20 cm, 25枚(メルク社No. 105553)を用いた。

以上, 放線菌分離源の採集から抗生物質精製までスクリーニングの基本的な流れを述べてきた。序文でも触れた通り, この分野における日本の研究実績は極めて大きい。新しい抗生物質の発見, 医薬あるいは農薬・動物薬としての有用性の評価, そして工場生産へのスケールアップ, これら一連の研究と開発は日本の生物工学の屋台骨を構築してきたといっても過言ではない。このプログラムは抗菌活性を指標に進めてきたが, 近年, 抗生物質の持つコレステロール低下活性や免疫抑制活性に着目した医薬品も承認され国際的に広く使われている。この分野の研究で重要なことは独創的で合目的なスクリーニング系の確立である。また, 現在ではスクリーニングのいろいろなステップで遺伝子操作に基づくバイオ技術が導入されているが, ここに示した実験手法は全体に共通する基本的な手順と言えよう。

最後に, この原稿の作成に当たり貴重なアドバイスや励ましをいただいた新井守, 橋本一, 堀田国元, 木下浩, 山崎勝久, 櫛田伸明, 井上重治ほか多くの先生方に深く感謝申し上げます。また, この実習プログラム作成を要望された高校の先生たちには, 今後とも, 微生物実験のおもしろさや楽しさを生徒たちに伝え続けていただきたい。

文 献

- 1) http://www.nhk.or.jp/rika/10min2/index_2012_020.html
- 2) 早川正幸・野々村英夫: 土壌放線菌の選択分離法, 毎日学術フォーラム(1993).
- 3) 宮道慎二: 生物工学, 90, 32(2012).
- 4) 日本放線菌学会編: 放線菌図鑑, 朝倉書店(1997).
- 5) <http://www0.nih.go.jp/saj/DigitalAtlas/>
- 6) http://www.nbrc.nite.go.jp/news/news_vol05.html
- 7) 日本放線菌学会編: 放線菌の分類と同定, 毎日学術フォーラム(2006).
- 8) <http://www.bacterio.cict.fr/>
- 9) <http://www.chemnetbase.com>