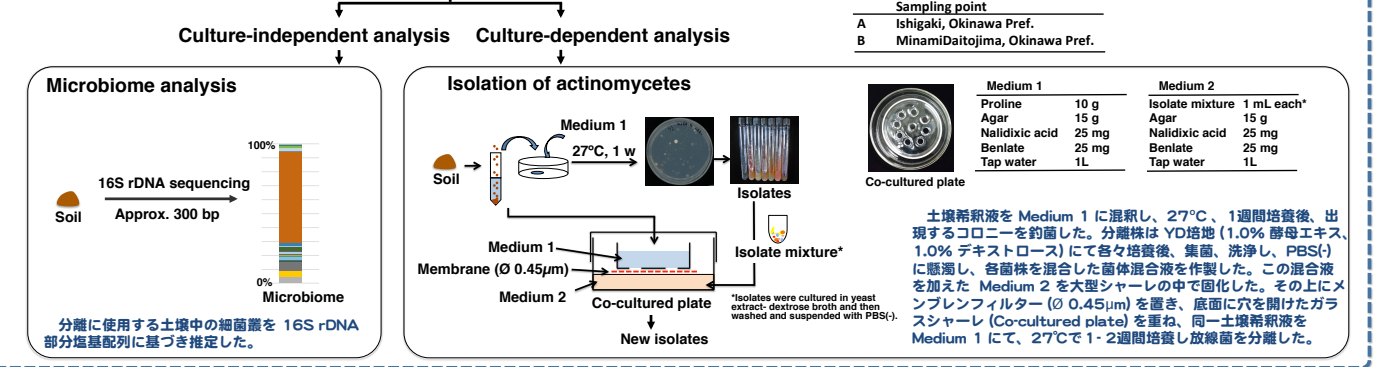


土壤環境をモデルとした培養基による難培養放線菌の分離法の開発と微生物資源の獲得

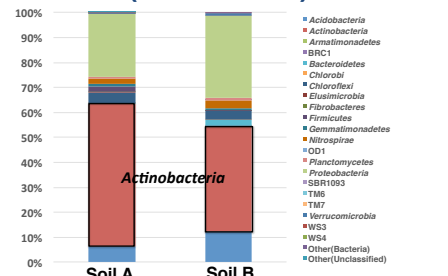
松本厚子 (北里大学北里生命科学研究所)

【要旨】 環境微生物にとって個々に取り出された実験室環境と土壌環境では生育条件が劇的に変化する。そこで、自然環境に近づけた培養条件すなわち土壌中で共存する細菌叢に注目した優占種菌との共培養による難培養土壌放線菌の分離法を開発し、未利用な放線菌資源の取得を試みた。
 2種類の土壌 (A, B) から、22株および18株の放線菌を分離後、土壌ごとに各々菌体混合液を加えた寒天培地の上にメンブレンフィルターを置くことで仕切り、その上で再度分離を行った (Methods)。土壌Aからは51株の放線菌を分離し、25種 (*Streptomyces* 属20種、稀少放線菌3属5種) に分類された。同時に菌体混合液無添加から分離した30株は、21種 (*Streptomyces* 属19種、稀少放線菌1属2種) に分類された。そのうち重複しているのは *Streptomyces* 属7種のみであった。土壌Bからは添加群から100株、24種 (*Streptomyces* 属22種、稀少放線菌1属2種)、無添加群からは62株、20種 (*Streptomyces* 属20種) が分離され、重複種は *Streptomyces* 属15種であった (Results 2)。いずれの土壌においても共培養により異なる菌株が分離され、KV-967 株は近縁種との相関性が低く、新規放線菌と考えられる (Results 3)。
 一方、細菌叢解析から土壌中の *Actinobacteria* に占める *Streptomyces* 属の割合はわずかで、分離できていない放線菌が多数存在することが検証された (Results 1)。

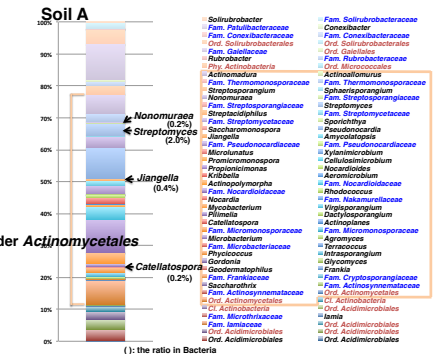
Methods



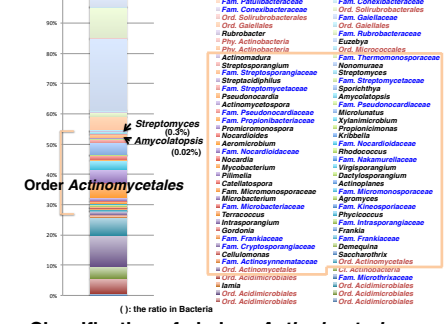
Results 1 (Microbiome)



Classification of phylum level in Bacteria



Classification of phylum Actinobacteria

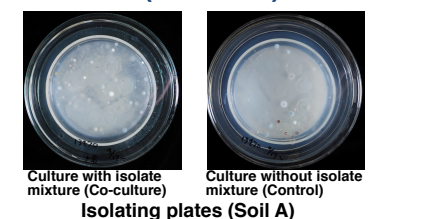


- 2種類の土壌は *Actinobacteria* 門菌を約60%および45%含むことを示した。
- 分離株の多数を占める *Streptomyces* 属およびその他の分離稀少放線菌は *Actinobacteria* 門の中で存在率はわずかであった。

【結論】

- 共培養により非共培養 (通常法) とは異なる菌株が分離された。
- 細菌叢解析から分離株は土壌中のマイナーな菌群で、大多数の放線菌が分離できていないことが確認された。

Results 2 (Isolation)



Classification of isolates (Soil A)

Taxonomy	Co-culture	Control
<i>Catellatospora chokoriensis</i>	1	0
<i>Jiangella alkaliphila</i>	14	1
<i>Nonomuraea candida</i>	1	0
<i>Nonomuraea kuesteri</i>	1	0
<i>Nonomuraea stahlianthi</i>	1	0
<i>Streptomyces coeruleofuscus</i>	4	0
<i>Streptomyces lannensis</i>	4	0
<i>Streptomyces aculeolatus</i>	3	0
<i>Streptomyces echinatus</i>	3	0
<i>Streptomyces granulatus</i>	2	0
<i>Streptomyces caeruleatus</i>	1	0
<i>Streptomyces cinnabarinus</i>	1	0
<i>Streptomyces krungchingsensis</i>	1	0
<i>Streptomyces platensis</i>	1	0
<i>Streptomyces pseudogriseolus</i>	1	0
<i>Streptomyces roseolus</i>	1	0
<i>Streptomyces sasae</i>	1	0
<i>Streptomyces virginiae</i>	1	0
<i>Pseudonocardia hierapolitana</i>	0	1
<i>Pseudonocardia adeliolensis</i>	0	1
<i>Streptomyces neopeptinus</i>	0	3
<i>Streptomyces arenae</i>	0	2
<i>Streptomyces albiflavescens</i>	0	2
<i>Streptomyces albobrisesolus</i>	0	1
<i>Streptomyces cellostiacus</i>	0	1
<i>Streptomyces chartreusis</i>	0	1
<i>Streptomyces lateritius</i>	0	1
<i>Streptomyces malachitofuscus</i>	0	1
<i>Streptomyces naganishii</i>	0	1
<i>Streptomyces palmae</i>	0	1
<i>Streptomyces xanthophaeus</i>	0	1
<i>Streptomyces vitatus</i>	0	1
<i>Streptomyces alboniger</i>	5	2
<i>Streptomyces formicae</i>	4	1
<i>Streptomyces glauciniger</i>	4	1
<i>Streptomyces wuyuanensis</i>	4	3
<i>Streptomyces nogalater</i>	2	2
<i>Phytoactinopolyspora phaeolutelgriseus</i>	2	2
<i>Streptomyces lilacinus</i>	1	1
Total	51	30

Actinomycete strains isolated from two soil samples

Soil	Plate No.	Co-culture		Control	
		1	2	1	2
A	Colony	80	77	65	74
	Isolate	27	27	16	18
B	Colony	66	66	36	60
	Isolate	47	53	31	31

Soil A: Different colonies of actinomycetes were picked up.
 Soil B: Almost all colonies of actinomycetes were picked up.

Classification of isolates (Soil B)

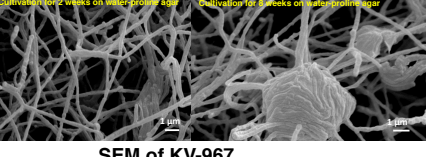
Taxonomy	Co-culture	Control
<i>Actinomyces regiflavum</i>	2	0
<i>Actinomyces spibonae</i>	1	0
<i>Streptomyces angustimyceticus</i>	1	0
<i>Streptomyces arenae</i>	1	0
<i>Streptomyces capomus</i>	1	0
<i>Streptomyces chartreusis</i>	2	0
<i>Streptomyces fulvisissimus</i>	1	0
<i>Streptomyces lannensis</i>	1	1
<i>Streptomyces tanashiensis</i>	3	0
<i>Streptomyces humidus</i>	0	1
<i>Streptomyces pulveraceus</i>	0	1
<i>Streptomyces rhizosphaerihabians</i>	0	1
<i>Streptomyces flavocinereus</i>	0	2
<i>Streptomyces koyangensis</i>	0	2
<i>Streptomyces granulatus</i>	1	1
<i>Streptomyces griseolus</i>	1	1
<i>Streptomyces zaomyceticus</i>	1	2
<i>Streptomyces globosus</i>	1	3
<i>Streptomyces neopeptinus</i>	2	1
<i>Streptomyces badius</i>	2	2
<i>Streptomyces violaceus</i>	2	2
<i>Streptomyces scabiei</i>	3	1
<i>Streptomyces puniceus</i>	3	2
<i>Streptomyces roseolus</i>	5	2
<i>Streptomyces curcui</i>	5	4
<i>Streptomyces pratensis</i>	8	2
<i>Streptomyces phaeolutelgriseus</i>	11	11
<i>Streptomyces exfoliatus</i>	14	10
<i>Streptomyces flavovirens</i>	19	5
ND	9	6
Total	100	62

- 共培養の有無に関わらず2土壌からの主な分離株は *Streptomyces* 属であったが、異なる菌株が多数分離された。
- 共培養により稀少放線菌の分離率がわずかに上昇した。

Results 3 (Taxonomy of isolate, KV-967)

The closely related strains based on blast search

Name	Strain	Similarity(%)
1	<i>Jiangella alkaliphila</i>	DSM 45079 97.1
2	<i>Jiangella muralis</i>	DSM 45357 96.7
3	<i>Jiangella mangrovei</i>	DSM 45237 96.6
4	<i>Jiangella alba</i>	KE-3 96.6
5	<i>Phytoactinopolyspora alkaliphila</i>	EGI 80629 96.5
6	<i>Haloactinopolyspora alkaliphila</i>	EGI 80088 96.4
7	<i>Haloactinopolyspora alba</i>	YIM 61503 96.2
8	<i>Jiangella gansuensis</i>	DSM 44835 96.0
9	<i>Phytoactinopolyspora halotolerans</i>	YIM 96448 96.0



Phylogenetic tree with KV-967 and related strains

- 共培養により分離した KV-967 株は *Jiangella alkaliphila* DSM 45079 属と最も高い相関性を示したがその値は低かった (97.1%)。
- Jiangella* 属を含む *Jiangellaceae* 科の各種との系統解析結果もまた、いずれともクラスタを形成しないことを示した。