

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名 山梨大学 生命環境学部 生命工学科

職名・氏名 助教・武 晃

1 研究テーマ

希少放線菌から未知なる抗生物質を生産させる革新的培養方法の構築

2 研究の目的

大村智博士らによるイベルメクチンの発見は世界中の人々を救っており、そのイベルメクチンの生産菌である放線菌は今なお抗生物質の探索源として重要である。なかでも *Streptomyces* 属放線菌は、多くの抗生物質を生産することが知られている。長い放線菌研究の中で抗生物質生産の「質」と「量」に関する研究は精力的に行われており、近年、抗生物質の生産する遺伝子の多くは休眠状態にある事がわかってきた。また、非常に入手が困難な希少放線菌は未発見な抗生物質の宝庫と言われている。しかしながら、希少放線菌の抗生物質生産の「質」と「量」に関する研究は多数の複合要因が影響しており未解明な状態にあるため、その宝庫は手付かずの状態となっている。

そこで、本研究では希少放線菌から新規抗生物質を発見するための革新的な培養方法を確立することを目的に、希少放線菌の培養に関するマルチオミクス解析を行い、未知なる抗生物質を生産させる革新的培養方法の構築を行った。

3 研究の方法

Actinoplanes 属放線菌の基準株 10 株を当研究室で *Streptomyces* 属の二次代謝産物の生産培地として用いられている 5 種類の培地にて培養を行い、4 種の検定菌にて抗菌活性試験を行った。最も活性が認められた培地を基礎培地として、成分の除去・置換を行い、活性評価によって *Actinoplanes* 属に適した培地に改良した。その改良培地の効果を当研究室にて分離した新規性の高い *Actinoplanes* 属菌株を用いて、活性評価および HPLC にて検証した。さらに、一般培地、生産基礎培地、改良生産培地にて *Actinoplanes* 基準株を培養し、RNA-seq 解析を行った。そのデータを培地ごとに比較することで、生産培地における遺伝子発現の差を確認した。

4 研究の成果

抗菌活性が確認できたのは *A. nipponensis* NBRC 14063^T、*A. xinjiangensis* NBRC 106528^T、*A. teichomyceticus* NBRC 13999^T の 3 株であった (Fig. 1)。特に活性が多く出たのが Q 培地であり、阻止円の大きさも他の培地に比べて大きいことから Q 培地を基礎培地として改良を

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

行うこととした。

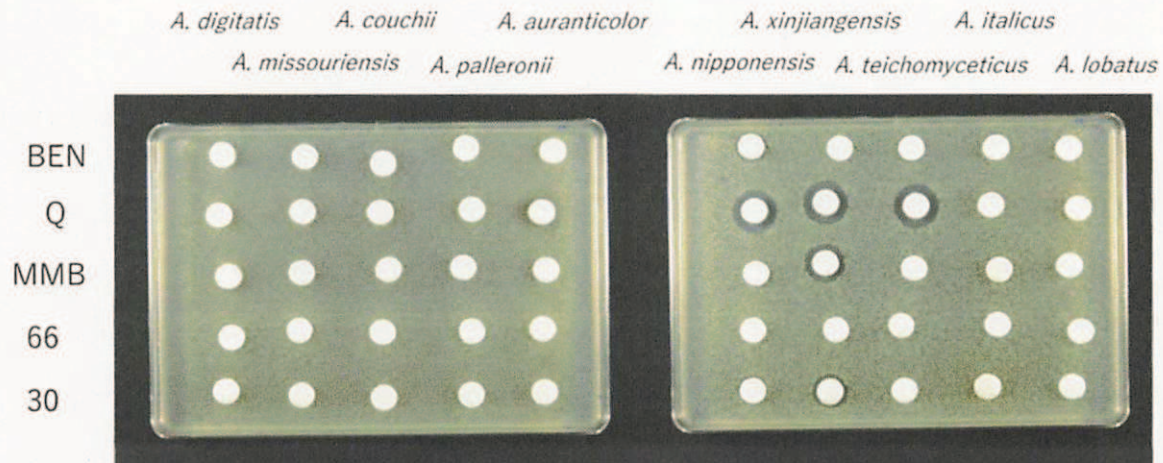


Fig. 1 10種の *Actinoplanes* 属の培養上清の *Bacillus subtilis* に対する抗菌活性の写真

そこで、glycerol, molasses, casein, hipolypepton, CaCO₃ をそれぞれ抜いた培地にて生産培養を行い、抗菌活性試験にて真に必要な培地成分を選定した。結果的に、hipolypepton は抗菌物質の生産に関与しないことが分かった。次に、Q 培地の hypolypepton を抜いた状態で、炭素源である molasses を 1/10, 1/100 量にしたもの、sucrose や dextrin, malt extract に置換した培地を作成した。また一方で、casein を casamino acids や tryptone に置換した培地も作成し、それぞれ生産培養および抗菌活性試験を行った。その結果、molasses を 1/10 量にした培地と casein を tryptone に置換した培地が効果的であることが分かる。結果として、現在の Q 培地では molasses 量が多すぎていることが分かった。以上までの結果および考察を基に新しい改良 Q 培地 (2.0% glycerol, 0.1% molasses, 0.5% tryptone, 0.1% CaCO₃, pH 7.0) を設計した。

Actinoplanes 属に分類された新規性の高い当研究室分離株を用いて生産培養を行った結果、抗菌活性試験の結果では阻止円の形成が認められなかった。そこで、二次代謝産物の生産性を検証するために HPLC による定量的な分析を行った。その結果、改良 Q 培地において特に顕著なピーク増加が確認されたのは IN8 株であった (Fig. 2)。

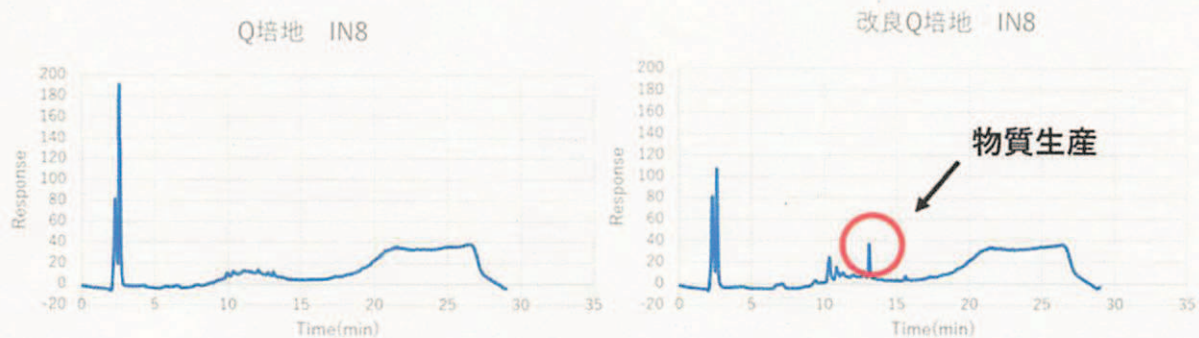


Fig. 2 Q 培地と改良 Q 培地における HPLC プロファイルの比較 (IN8)

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

また KHN0103 株および KHN0219 株においても、Q 培地では確認されなかったピークが出現する傾向が認められた。これらの結果で見られたピークは必ずしも抗生物質であるとは言えないが、改良 Q 培地で培養したことにより、菌株の発現遺伝子が変化した結果であることが分かる。つまり、抗菌活性試験には活性が出なかったが、本実験で扱ったサンプルの 3/13 において、改良 Q 培地で培養したことによる物質生産の誘導が成功したといえるだろう。

活性が強く認められた *Actinoplanes nipponensis* NBRC 14063^T を一般生育培地である YG 培地、Q 培地、改良 Q 培地で培養し、RNA-seq 解析を行った結果、培地間で発現量が変動する遺伝子群が確認された。しかし、本解析は各培地 1 サンプル (n=1) で実施しており、統計的検定は行っていない。Q 培地で発現変動を示した遺伝子数は、828 であり、改良 Q 培地で発現変動を示した遺伝子数は、931 であった。また、Q 培地側に特異的な変動遺伝子は 279 あったが、改良 Q 培地側に特異的な変動遺伝子は、382 あった。以上より、改良 Q 培地では Q 培地よりも追加的な発現変動が生じている可能性が示唆された。

ただし、本解析は生物学的反復を伴わない探索的解析 (n=1) であるため、これらの結果は発現変動の傾向を示すものとして解釈する必要がある。だが、改良 Q 培地で培養された *Actinoplanes* 属には Q 培地よりも多くの遺伝子が発現変動しており、改良 Q 培地は *Actinoplanes* 属の物質生産を促す培地である可能性が示唆された。

5 今後の展望

本研究を通じて、*Actinoplanes* 属における物質生産性は単一成分ではなく、炭素源量、窒素源形態、pH 緩衝能、培地物理特性など複数要因の相互作用によって制御されていることが明らかとなった。また、菌株ごとに最適条件が異なることも示され、今後は菌株特異的な培地最適化が重要であると考えられる。本研究は、当研究室が保有する新種推定 *Actinoplanes* 属株の潜在的生産能力を引き出すための基盤的知見を提供するものであり、将来的な新規抗生物質スクリーニングの効率化に寄与することが期待される。

6 研究成果の発信方法（予定を含む）

本研究は、大村記念微生物資源研究フロウティラに関わるプロジェクトの 1 つであることから、山梨大学医学部にて行われた 2025 年度フロウティラ成果報告会にて発表を行った (<https://flotilla.yamanashi.ac.jp/news/news-67/>)。また、本研究成果は 2026 年度(第 40 回)日本放線菌学会大会(<https://www.actino.jp/>)にて発表する予定である。

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。