

長期保存を目的とした放線菌のコメ固体培養

江邊 正平¹, 坂崎 柁寿², 大池 達矢¹, 岡南 政宏^{1,2}, 阿野 貴司^{1,2}

要旨

グラム陽性細菌である放線菌は様々な二次代謝産物を産生している。これまでに放線菌から多くの有用化合物が発見され、現在も放線菌からの新規天然化合物のスクリーニングが行われている。しかしながら放線菌の抗生物質の生産能力は植え継ぎを繰り返すことで著しく低下することが知られている。そのため単離した放線菌株の二次代謝産物の生産能を維持したまま保存するための簡便な方法が求められる。そこで我々はコメを用いた固体培養により作られる麴を参考に、放線菌もコメを用いて固体培養することにより菌株の形質を維持したまま保存可能なコメ培養物を作ることができるのではないかと考えた。本研究では安価なくず米（非主食用米）を用いて放線菌培養物を作製し、3 カ月間の期間にわたって抗生物質生産能が維持できているかを抗真菌活性試験により簡易的に評価した。吸水させたくず米をオートクレーブ処理することにより作製したくず米培地に抗真菌活性物質を生産する研究室保有の放線菌 12 株を各々植菌し培養を試みた。その結果、全ての放線菌株においてくず米表面での増殖が認められた。また培養3 カ月後のくず米培養物を取り出し寒天培地に植菌したところ、全ての放線菌株がくず米培養物の周囲でコロニーを形成した。そして植物病原性真菌との対峙試験を行ったところ、くず米培養物から増殖した放線菌株は植物病原性真菌に対して抗菌活性を示した。以上の結果から放線菌くず米培養物を作製することが放線菌の形質を維持したまま長期保存する方法として有効であることが示唆された。

キーワード：放線菌、抗生物質生産、固体培養、くず米、麴

1. 緒論

放線菌は *Actinobacteria* 門に分類されるグラム陽性細菌である。多くの放線菌は細菌にも関わらず真菌類の糸状菌のように菌糸体で増殖し、菌糸の先端に孢子形成を行うといった他の細菌とは異なった特徴を有する⁽¹⁾。しかし菌糸体で増殖を行うものの放線菌の菌糸は真菌と比較すると細く、また細胞壁も細菌と同様にペプチドグリカンから構成されている⁽¹⁾。放線菌の最大の特徴は有用かつ多様な二次代謝産物を産生しており、日常生活で使用する抗生物質や生理活性物質の3分の2が放線菌から発見されていることである⁽²⁾。さらに *Actinobacteria* 門を代表する *Streptomyces* 属の細菌はゲノム DNA 上に約 20-40 個の二次代謝産物生産のための遺伝子クラスタを含むことが知られており⁽³⁾、今後も放線菌から新規二次代謝産物が発見される可能性が高い。しかしながら放線菌は液体培地や寒天培地による植え継ぎを繰り返すことで抗生物質の生産量が減少することが報告されている⁽⁴⁻⁶⁾。Perlman らの実験では、抗生物質 streptomycin を生産する放線菌 *Streptomyces griseus* を 48 時間毎に新たな液体培地へ植え継ぐことを 9 回繰り返した結果、培養液中の streptomycin の量は 1 回目のわずか 2%にまで減少した⁽⁵⁾。このような抗生物質生産能の低下がみら

受付日 2020 年 7 月 30 日、受理日 2020 年 10 月 22 日

1. 近畿大学生物理工学部 生物工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

2. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

れるなど放線菌は予期しない変異を起こすため、目的とする放線菌の形質を維持したまま菌株を保存することが放線菌を扱う研究を行う上で必要である。放線菌の保存方法として菌体を10%グリセロールと混合して-80°Cのディープフリーザで保存する凍結保存法や、アンプルへ菌体を加えた後に乾燥・溶封するL-乾燥保存法が一般的である⁽⁷⁾。しかしながらこれらの手法はディープフリーザを用意するための初期費用の問題や、ガラスアンプルを加熱し加工するといった工程で生じる作業の危険性や技術面の問題がある。そのため低コストで技術の熟練度に捉われない放線菌の保存方法の開発が必要であると考えた。

固体培養とは固体状態の原料を用いて微生物を培養し発酵生産を行う方法である。細菌や酵母、糸状菌など広範な微生物種を用いた固体培養が行われており納豆や味噌、鰹節などの食品製造をはじめとして酵素や有機酸、抗生物質等の生産にも利用されている⁽⁸⁾。また清酒造りで用いられる麴も麴菌 *Aspergillus oryzae* を蒸したコメで固体培養し、コメに孢子を着生、乾燥させることで作られる⁽⁹⁾。我々はこの麴の製造方法に着目し、同じようにコメを基質として放線菌を固体培養することで麴のようになるのではないかと考えた。つまりコメを用いて放線菌を固体培養することでコメの表面で放線菌が休眠した培養物(麴)となり、これを自然乾燥させることで長期間の室温保存が可能となることを期待した。また低コストに放線菌の培養を行うことができるため、培養を行う際の材料としてくず米(特定米穀)に着目した。くず米とは玄米の選別の際に粒径の小さい玄米や色の悪い玄米として分別される非主食用米のことを指し、米菓や味噌、ビールなどの加工食品向けの原料に使われている⁽¹⁰⁾。くず米の成分は玄米に含まれる成分と同じでありながら主食用米と比較して安価であり、さらに炭水化物を74.3%、タンパク質を6.8%、脂質を2.7%、灰分を1.2%含んでいる⁽¹¹⁾。このように微生物の増殖に必要な栄養素を含み、かつ低価格であるくず米は放線菌の固体培養のために用いる培養基質として適した材料になると考えた。本研究では放線菌の抗生物質生産能を維持したまま長期保存することを目的に、くず米を用いた放線菌の固体培養物の作製を試みた。

2. 材料と方法

2. 1 くず米を用いた放線菌の培養

実験には和歌山県内の土壌から単離した抗真菌活性を有する放線菌 *Streptomyces* sp. KT 株⁽¹²⁾を用いた(図1A)。くず米は秋田県大館市で栽培、収穫したイネのうち玄米の選別時に生じた等級外の玄米をくず米として使用した。くず米培地は以下の方法で作製した。100 mL容のコニカルビーカーに10 gのくず米と50 mLの蒸留水を入れ一晚浸漬することでくず米に吸水させた。吸水後、蒸留水を捨てアルミホイルでふたをした後、オートクレーブ処理(121°C、30分)に供し、これをくず米培地とした。くず米培地での放線菌KT株の培養は、potato dextrose agar (PDA) 上で生育するKT株を直径6 mmのステンレスカップで切り抜き、放冷後のくず米培地に植菌、滅菌蒸留水を3 mL加え、室温(24°C)に置くことで行った。KT株の培養後、培養物は室温にて保存した。

2. 2 放線菌くず米培養物を用いた植物病原性真菌に対する抗菌活性試験

放線菌KT株のくず米培養後の抗生物質生産能は抗真菌活性試験により簡易的に評価した。被験菌として植物病原性真菌 *Rhizoctonia solani* K1^(13,14)を使用し、試験はPDAを分注したプレート(直径9 cm)上で行った。放線菌くず米培養物一粒をPDAの端から1.5 cmのところ植菌、反対側の1.5 cmのところには *R. solani* K1のアガーピースを植菌した。PDA上で *R. solani* K1とKT株の培養を室温(24°C)で行い、くず米から増殖したKT株が示す *R. solani* K1の増殖阻害面積から抗真菌活性の評価を行った。

3. 結果と考察

これまでの研究により、当研究室で単離された放線菌 *Streptomyces* sp. KT 株 (図 1A) が新規の抗生物質を生産していることを示唆する結果が得られている (投稿準備中)。このことから KT 株の抗生物質生産能を低下させずに長期保存することが求められた。そこで我々は麴の製造方法を参考に、くず米を用いた KT 株の固体培養を試みた。KT 株をくず米培地 (図 1B) に植菌し室温にて 15 日間の培養を行った。その結果、くず米の表面に KT 株の増殖が認められ、KT 株の培養にくず米培地が利用できることが示された (図 1C)。さらに培養 1 カ月、培養 2 カ月、培養 3 カ月後に KT 株のくず米培養物一粒を取り出し PDA に置いたところ、くず米培養物の周りに KT 株の増殖が認められ、3 カ月の培養後においても再び増殖可能な状態でくず米培養物上に存在していることが分かった。続いて、くず米培養物から PDA 上で増殖した KT 株による抗菌活性を植物病原菌 *R. solani* K1 を用いて評価した。対峙試験の結果、培養日数に関わらず KT 株の増殖に伴う *R. solani* K1 の増殖阻害活性が認められた (図 1D-F)。

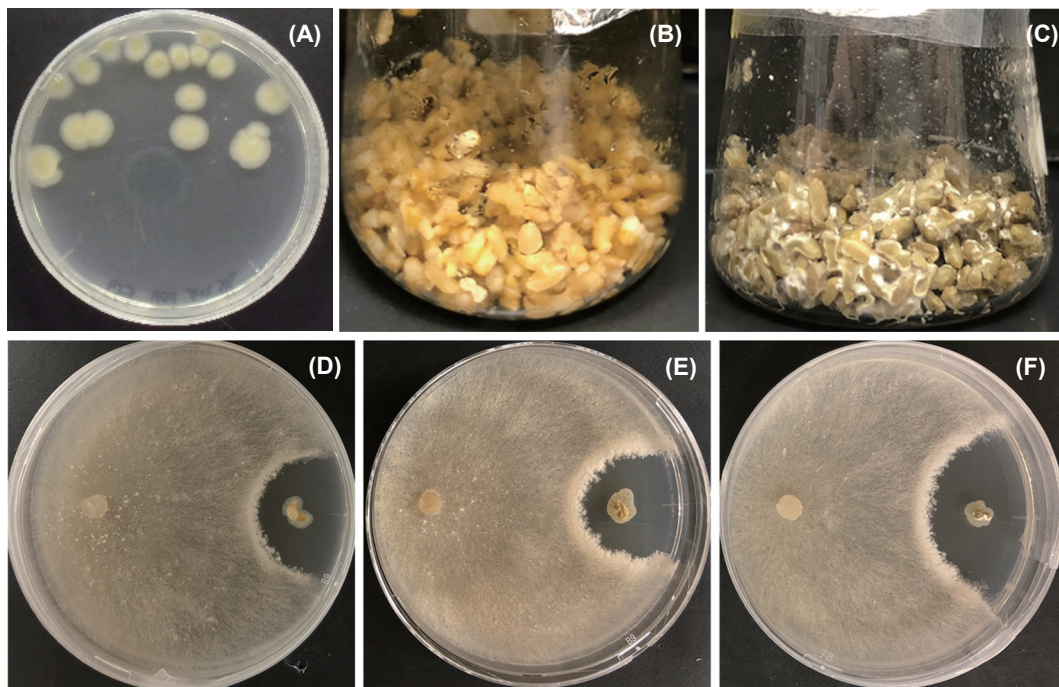


図 1 放線菌 KT 株のくず米培養と培養物を用いた *R. solani* K1 に対する抗真菌活性の評価
PDA で培養した *Streptomyces* sp. KT 株 (A)、植菌前のくず米培地 (B) と KT 株を植菌して 15 日目のくず米培地 (C)、培養 1 カ月 (D)、2 カ月 (E)、3 カ月 (F) 後の KT 株くず米培養物を用いた *R. solani* K1 に対する抗真菌活性 (左: *R. solani* K1、右: KT 株くず米培養物)

KT 株くず米培養物は *R. solani* K1 の増殖を阻害した。しかしながらくず米を用いて KT 株が培養可能であったことから KT 株の増殖に伴い抗生物質がくず米中に生産され、その抗生物質が *R. solani* K1 に対して抗菌活性を示した可能性が考えられた。そこで抗真菌活性が PDA 上で KT 株により生産された抗生物質によるのか、それともくず米中に蓄積した抗生物質に起因するのかを次の方法により検証した。くず米中に蓄積する抗生物質の影響を限りなく小さくするため、KT 株くず米培養物 0.1 g と滅菌蒸留水 900 μ L を混合した懸濁液を作製、PDA に 10 μ L スポットし *R. solani* K1 との対峙試験を行った。その結果、懸濁液から増殖した KT 株も *R. solani* K1 の増殖阻害活性を示した。またその増殖阻止円の大きさは培養 1 カ月後の KT 株くず米培養物を用いて抗菌活性試験を行った時 (図 1D) と同程度であった。このことから一粒のくず米培養物を用いた対峙試験による抗菌活性も PDA 上で放線菌 KT 株が生産した抗生物質によるものであることが強く示唆された。以上の結果から放線菌 KT 株がくず米培地で培養可能

であり、くず米を用いて KT 株を培養することで抗生物質生産能を少なくとも 3 カ月間は維持したまま保存できることが示された。

くず米を用いた放線菌 KT 株の固体培養物の作製により抗生物質生産能を維持したまま長期保存可能なことが示唆された。そこで研究室で保有する *R. solani* K1 に対して抗真菌活性を示す 11 種の放線菌でも KT 株と同様にくず米培地での培養が可能であるか、また抗生物質生産能を維持したままくず米培養物上で生存することができるか試験した。その結果、全ての放線菌株がくず米培地で増殖を示し、くず米培地を利用した培養が可能であった (表 1)。次に、培養 1 カ月後と 3 カ月後のくず米培養物を用いて抗真菌活性試験を行った。結果、全ての菌株の 1 カ月後と 3 カ月後の培養物から放線菌のコロニー形成が認められ、さらに PDA 上で生育した放線菌株は *R. solani* K1 の増殖抑制を示した。以上のことから、放線菌株がくず米培養物上で長期生存可能であり、また PDA 上で再び増殖し抗生物質を生産することが示唆された。くず米培養物の作製による放線菌の抗生物質生産能の維持を評価するため、3 カ月培養物と 1 カ月培養物での *R. solani* K1 の増殖抑制面積から維持率を算出した (表 1)。KT 株、AR2 株、AR3 株、AR10 株、ES1 株、YM1 株では 3 カ月培養物を用いた抗菌活性試験における増殖抑制面積は 1 カ月培養物の増殖抑制面積を上回り、特に ES1 株では 40%以上の面積の増加が認められた。また ES14 株、MS 株、PK1 株も 80%以上の抗生物質生産能の維持率を示し、これら 9 株はくず米培地での固体培養に適していると考えられる。一方、ES9 株、AR1 株、AR4 株はそれぞれ 68%、59%、48%の維持率を示し、これら 3 株ではくず米培養物を作製しても抗生物質生産能を維持できないことが示唆された。この原因として放線菌株の変異による 1 細胞当たりの抗生物質生産量の減少だけでなく、抗生物質生産量が菌数に依存することから長期保存によるくず米培養物中の放線菌数の減少が考えられる。しかしながら抗真菌活性試験だけではこれら要因の判別が出来ない。そのため今後の課題としてくず米培養物当たりの菌数を測定することによる生存性の評価も行う必要性が示された。以上のように放線菌でくず米培養物を作製しても異なる菌株では抗生物質生産能の維持率に違いがあることが分かった。しかしながら実験に使用した 12 株中 9 株の放線菌株は 3 カ月の培養後においても抗生物質生産能を 80%以上維持していた。このことから放線菌の抗生物質生産能の維持を目的としたくず米培養物の作製は全ての放線菌とはいえないものの多くの菌株に適応可能な方法であることを示した。

表 1 くず米培地での放線菌の固体培養による増殖と抗生物質生産能の維持への影響

菌株名	増殖 *1	抗生物質生産能の維持 *2	菌株名	増殖 *1	抗生物質生産能の維持 *2
KT	+	+++	ES1	+	+++
AR1	+	-	ES9	+	+
AR2	+	+++	ES14	+	++
AR3	+	+++	MS	+	++
AR4	+	-	YM1	+	+++
AR10	+	+++	PK1	+	++

*1: 15 日間の培養後くず米培地上での増殖が認められたものを+とした。

*2: 培養 1 カ月後と 3 カ月後のくず米培養物による *R. solani* K1 の増殖抑制面積から抗生物質生産能の維持率を算出した。維持率 (%) = (3 カ月後培養物での増殖抑制面積 / 1 カ月後培養物での増殖抑制面積) × 100
維持率 100%以上、100%未満 80%以上、80%未満 60%以上、60%未満をそれぞれ+++、++、+、-で示した。

本研究で使用した 12 種類の放線菌のように抗生物質の生産により植物病原菌の増殖を抑制することができるものが存在する。この理由から農業現場で問題となる植物病原菌による農作物の被害を抑えるため、放線菌を用いて植物を病原菌から防除するための研究が行われている⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。しかしながら微生物を用いた製剤を開発する際にコスト面で問題となるのが大量培養法の開発や保存性である⁽¹⁸⁾。本研究で示した放線菌くず米培養物の作製方法は安価な材料を用いており、また室温かつ静置で培養を行うため低コストに培養が可能、かつ保存性に関しても期待できる。このことから放線菌くず米培養物の作製は抗生物質生産能の維持だけでなく、植物病害を防ぐための資材としても展開できる可能性がある。

4. 結論

本研究では抗生物質生産能を維持したまま放線菌を保存することを目的に、くず米を用いた放線菌の固体培養の検討を行った。その結果、研究室で保有する抗真菌活性を有する放線菌 12 株の全てがくず米で培養可能であり、そのうち 9 株は最低でも 3 カ月間は抗生物質生産能を維持したまなくず米培養物として保存できることが示唆された。研究室で保有する大部分の放線菌でくず米培養物の作製による抗真菌活性能の維持が可能であったことから、様々な放線菌に適用できる可能性がある。また放線菌をくず米培地に植菌後、室温で培養と保存を行うだけのこの方法は既存のディープフリーザを必要とする凍結保存法や、作業の危険性や技術を伴う L-乾燥保存法と比較すると安価かつ簡便に行うことが出来るため、新たな放線菌の保存方法となることが期待できる。また日本では放線菌を含む土壌微生物を用いて米ぬかや油粕、くず米などの植物残渣を発酵させることでぼかし肥料を作り、作物生産に使用してきた。放線菌を含むぼかし肥料が古くから利用されてきたことから土壌由来の放線菌の危険性は低いことが考えられる。今回の実験で用いた放線菌も土壌から単離された株であり、それらを用いて作製したくず米培養物もぼかし肥料と同様に安全性が高いことが期待できる。くず米培養による放線菌の形質維持を伴う保存法を確立するため、今後はより長い期間での保存と培養物による抗真菌活性試験を行うことで抗生物質生産能の安定性を評価するとともに、くず米培養を行う前の放線菌株とくず米培養後に培養物から復帰させた放線菌株の抗生物質生産量の定量を行い比較する必要がある。

5. 参考文献

- (1) Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H. P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G. P. (2016) Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43.
- (2) van der Meij, A., Worsley, S. F., Hutchings, M. I., van Wezel, G. P. (2017) Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 392–416.
- (3) Hoshino, S., Onaka, H., Abe, I. (2019) Activation of silent biosynthetic pathways and discovery of novel secondary metabolites in actinomycetes by co-culture with mycolic acid-containing bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 46, 363–374.
- (4) McCoy, A., Williams, E. (1953) Degeneration and regeneration of *Streptomyces griseus*. *Applied microbiology*, 1(6), 307–313.
- (5) Perlman, D., Greenfield, R. B., O'Brien, E. (1954) Degeneration of a *Streptomyces griseus* mutant on repeated transfer. *Applied microbiology*, 2(4), 199–202.

- (6) 西村治雄. (1967) 放線菌を中心とした凍結乾燥法による菌株保存. 真菌と真菌症, 8(1), 17–21.
- (7) 田村朋彦. (2006) 第1回 放線菌の長期保存方法. 日本微生物資源学会誌, 22(1), 37–41.
- (8) 佐藤和夫. (1992) 固体培養法による発酵生産 (I) 固体培養法の特徴とその応用. 日本醸造協会誌, 87(8), 558–565.
- (9) 奈良原英樹. (1994) 麴菌と麴 (その2) 製麴における麴菌の扱い. 日本醸造協会誌, 89(12), 954–964.
- (10) 宮武恭一. (2010) 非主食用米需給の特徴と課題. 関東東海農業経営研究, 100(2), 71–76.
- (11) 日本食品標準成分表2015年版 (七訂) .
- (12) Ohike, T., Maeda, M., Matsukawa, T., Okanami, M., Kajiyama, S., Ano, T. (2017) *In vitro* and *in vivo* assay for assessment of the biological control potential of *Streptomyces* sp. KT. Journal of Plant Studies, 7(1), 10–18.
- (13) Phae, C. G., Shoda, M., Kita, N., Nakano, M., Ushiyama, K. (1992) Biological control of crown and root rot and bacterial wilt of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. Japanese Journal of Phytopathology, 58(3), 329–339.
- (14) Asaka, O., Shoda, M. (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and environmental microbiology, 62(11), 4081–4085.
- (15) Amini, J., Agapoor, Z., Ashengroph, M. (2016) Evaluation of *Streptomyces* spp. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for the management of chickpea wilt. Journal of Plant Protection Research, 56(3), 257–264.
- (16) Goudjal, Y., Toumatia, O., Yekkour, A., Sabaou, N., Mathieu, F., Zitouni, A. (2014) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara. Microbiological Research, 169(1), 59–65.
- (17) Errakhi, R., Bouteau, F., Lebrihi, A., Barakate, M. (2007) Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(11), 1503–1509.
- (18) 吉田重信, 對馬誠也. (2013) 植物病害に対する微生物農薬の研究開発における課題と展望. 化学と生物, 51(8), 541–547.

Koji culture of actinomycetes for long-term storage

Shohei Ebe¹, Masatoshi Sakazaki^{1,2}, Tatsuya Ohike¹, Masahiro Okanami^{1,2} and Takashi Ano^{1,2}

Actinomycetes, Gram-positive bacteria, produce a variety of secondary metabolites, including antibiotics. Many beneficial compounds in our life have been discovered from actinomycetes so far and many researchers attempt to isolate new natural compounds. However, it has been known that an antibiotic-producing ability of the actinomycetes is reduced by repeated passages onto fresh growth medium. Thus, it is necessary to establish an alternative method for a long-term storage of the actinomycetes with high antibiotic-producing ability. We focused on a koji-making process which is performed by solid state fermentation using steamed rice with *Aspergillus oryzae* (koji culture) and tried to make the cultured rice medium with actinomycetes to maintain the antibiotic-producing ability during the storage period. In this study, we performed the rice culture of actinomycetes using low-grade rice and evaluated the usefulness of the culture method for maintaining the antibiotic-producing ability. The rice culture medium was prepared by autoclave of a beaker containing water-soaked rice. Each of twelve actinomycete strains with an antibiotic-producing ability was inoculated and cultured in the rice culture medium. As the result of cultivation, it was observed that all actinomycete strains could grow on the surface of rice grains in the beakers. After three months of cultivation, a piece of the cultured rice media of actinomycetes was retrieved from the beaker and was used for an antifungal activity test on an agar plate. All actinomycetes formed colonies on agar plates and showed antifungal activities against a plant pathogenic fungus. These results suggest that the method of koji culture of actinomycetes is effective in maintaining the antibiotic-producing ability.

Key words : Actinomycete, solid state fermentation, antibiotic-producing ability, koji culture

Received 30 July 2020, Accepted 22 October 2020.

1. Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493, Japan

2. Major in Biotechnological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kindai University, Wakayama 649-6493 Japan.