

⑥ 自然教育園の落葉より分離された 放線菌について

村松秀行*

Actinomycetes from leaf litter collected in the Institute for Nature Study

Hideyuki Muramatsu*

はじめに

放線菌は細菌界に属する微生物である。2015年にノーベル医学生理学賞を受賞された大村智博士の受賞対象は抗寄生虫薬イベルメクチンであるが、その原体であるアベルメクチンは放線菌の一種である *Streptomyces avermectinius* の生産する化合物である (Burg *et al.*, 1979)。このように放線菌は医薬品などの有用化合物の生産生物として、ペニシリン (Fleming, 1929)、セファロスポリン (Newton & Abraham, 1955)、メバスタチン (ML-236B, メバロチン原体) (Endo *et al.*, 1976) などを生産するカビと並んで非常に有用である。放線菌からはストレプトマイシン (Schatz *et al.*, 1944)、カナマイシン (Umezawa *et al.*, 1957)、プレオマイシン (Umezawa *et al.*, 1966)、タクロリムス (FK506) (Kino *et al.*, 1987)、カスガマイシン (Umezawa *et al.*, 1965) などが発見され、感染症、ガン、高脂血症、免疫関連などの医薬品や農薬、動物薬として、現在に至るまで人類の健康増進と福祉の向上に大きく貢献している。

しかし、現在では微生物産物からの医薬品探索は多くの製薬企業が撤退するなど、下火になっているのが現状である。その理由は化学合成法の飛躍的な進歩や抗体創薬の興隆などに加えて、分離しやすい微生物を用いた探索では新規有用化合物の発見が困難となっていることである。化学合成法が進歩したとはいえ微生物の生産する化合物をはじめとする天然物化合物は、人知を超えた有用化合物の源としていまだにその価値を失っていないと考える研究者も多く (Li & Vederas, 2009)、海洋の微生物 (Fenical & Jensen, 2006) や難培養微生物 (Milshteyn *et al.*, 2014) など、これまであまり扱われてこなかった微生物にアクセスする試みも続けられている。放線菌は主に土壌から分離されるが、筆者らは土壌と同様に身近な環境でありながらあまり活用されてこなかった落葉に着目し、その分離株の多様性や新規性を調査すると同時に実際に医薬品候補化合物の探索に活用している。

放線菌を含めた細菌は動植物では当然のように行われる分布に関する研究が極めて少ない。このこ

*公益財団法人 微生物化学研究会 微生物化学研究所 第2生物活性研究部,
Laboratory of Microbiology, Institute of Microbial Chemistry, Tokyo.

とは細菌の分類体系の未熟さや同定の困難さもその要因となっていたと考えられる。幸い、分子系統の概念及びその解析技術の進歩により、細菌の分類学は近年になって急速に進んでおり、また、未記載種であっても系統情報による解析が可能となっている。系統情報、すなわち遺伝子の塩基配列情報による解析の具体的な例は、配列の相同性検索による分類群の推定や一定の相同値によるグルーピング (OTU; Operational Taxonomic Unit) を便宜的な種として扱う解析が挙げられる。これらの技術は微生物の分布や生態に関する研究や新規分類群の発見に大いに役立つと考えられる。

今回、筆者らは大都市内に遺存された自然林の環境である自然教育園の落葉に生息する放線菌について、その系統的多様性及び新規性について調査を行ったので報告する。

調査方法

2018年6月27日及び7月26日、10月11日に自然教育園にて落葉の採集を行った。採集した落葉は幅5 mm程度に細断したのち、1週間、実験室内にて風乾した。風乾した落葉は以下の2方法にて懸濁液を作製し、原液及びその生理的食塩水による希釈液を土壤放線菌の分離に用いられるフミン酸ビタミン寒天培地 (HV培地) (Hayakawa & Nonomura, 1987) 及び酸性 (pH 5.0) に改変したHV培地に塗抹した。

- ① 風乾落葉 0.5 g を滅菌 PP 製試験管に量り取り、滅菌クローム球を重しとして載せたのち滅菌 0.05% Tween 80 液 20ml を静かに注いで風乾落葉を十分浸漬させた。1時間室温で放置したのち、上清をサンプリングして懸濁液とした。あえて攪拌を行わないことにより、自ら遊走して上清中に現れる運動性放線菌が選択的に分離される。
- ② 上記と同様に風乾落葉を Tween80 液に浸漬したのち重りを除去し、ボルテックスミキサーで激しく攪拌して懸濁液を作製した。作製した懸濁液は 2ml 容のサンプリングチューブを用いて、percoll または ficoll を用いた非連続密度勾配遠心 (比重 1.10 ~ 1.20, 20,000 x G, 10分または 15分) により、比重ごとに分画した。

懸濁液を塗抹した寒天培地は 30℃ で 1 ~ 3 週間培養し、出現したコロニーをイーストエキス・スターチ寒天培地に移植した。移植したコロニーは 30℃ で 1 ~ 2 週間培養し、コロニー PCR に供した。コロニー PCR は KOD FX Neo (東洋紡), PCR プライマーとして 16S001F (5'-GGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') と 16S003R (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTTC-3') を使用し、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長 (約 1.5 kb) を増幅した。PCR サイクルは 95℃, 10 分のプレヒートに引き続き、98℃, 30 秒の熱変性、63℃, 30 秒のアニーリング、68℃, 1 分の伸長反応のサイクルを 40 サイクル実施後、4℃ で保管した。PCR 反応液は希釈し、塩基配列分析に供した。塩基配列分析は 821R (5'-CATCGTTTACGGCGTGGACTAC-3') をシーケンスプライマーとし、サンガー法にて行った (株式会社ファスマックに委託)。得られた配列はエレクトロフェノグラムを目視にて確認したのち、16S rRNA 遺伝子の前半部分約 700 塩基を決定した。塩基配列の相同性検索は Blast 検索にて行った。OTU 解析の閾値は 99% を採用した。OTU 解析は閾値 97% で実施されることも多いが、今回は Stackebrandt らの報告 (2006) を根拠により実際の種間の値に近いものとして 99% を採用した。一部の分類群については、Clustal X version 2.1 (Larkin, 2009) を用いて系統樹を作成した。

結 果

落葉 20 サンプルより、720 株の放線菌を含む細菌を分離した。分離株のうち、678 株について 16S rRNA 部分塩基配列を取得することができた。取得した配列長は 550 ~ 798 塩基で 665 株 (98.1%) が 680 塩基以上であった。678 株のうち 532 株 (78.4%) が放線菌で、放線菌以外の細菌ではアルファプロテオバクテリアが 126 株 (18.6%) で放線菌に次いで多かった。OTU 数は 207 で OTU 当たりの平均分離株数は 3.27 株 / OTU となり、多様な OTU が取得できていることが分かった。放線菌の OTU は 138 (66.6%) と最も多く、次いでアルファプロテオバクテリアが 52 (25.1%) であった (表 1)。放線菌は 16 科 42 属 138 OTU (種相当) であった (表 2)。放線菌の中では *Streptomyces* 属が分離株数、OTU 数ともに最も多く、分離株が 313 株、OTU が 31 であった。また、運動性放線菌の OTU として、*Kineosporia* 属、*Actinoplanes* 属、*Cryptosporangium* 属などに属する 34 が検出された。また、既知種に対して相同値が 99% 未満の新種相当と考えられる OTU は 68 と OTU 全体の約半数であった。これらについては系統樹上でも新種相当であることが確認された (図 1, 2, 3)。

表 1 網ごとの OTU および分離株数

Phylum (門)	Class (綱)	OTU数	分離株数
"Actinobacteria"	Actinobacteria (放線菌)	138	532
	<i>Chitinophagia</i>	1	1
"Bacteroidetes"	<i>Cytophagia</i>	2	2
	<i>Sphingobacteriia</i>	1	1
"Firmicutes"	Bacilli or Firmibacteria	1	1
	<i>Alphaproteobacteria</i>	52	126
"Proteobacteria"	Betaproteobacteria	9	11
	<i>Gammaproteobacteria</i>	3	4
系統データ取得成功株 小計		207	678
系統データ取得失敗株		-	42
分離株 合計			720

表2 属ごとの放線菌 OTU および分離株数

最近縁種との相同値が99%未満のものを新種候補 OTU とした。

属名に * を付したものは運動性放線菌。

Order (目)	Suborder (亜目)	Family (科)	Genus (属)	OTU数	分離株数	新種候補OTU数
Actinomycetales	Corynebacterineae	Mycobacteriaceae	<i>Mycobacterium</i>	3	5	3
		Nocardiaceae	<i>Gordonia</i>	3	16	3
			<i>Nocardia</i>	3	5	1
			<i>Rhodococcus</i>	1	1	0
			<i>Williamsia</i>	1	2	0
	Micromonosporineae	Micromonosporaceae	<i>Actinoplanes*</i>	7	11	6
			<i>Asanoa</i>	1	1	1
			<i>Catenuloplanes*</i>	2	2	1
			<i>Polymorphospora</i>	1	1	1
	Propionibacterineae	Nocardioideaceae	<i>Kribbella</i>	2	3	1
			<i>Nocardioides</i>	6	9	4
		Propionibacteriaceae	<i>Friedmanniella</i>	1	1	1
			<i>Actinokineospora*</i>	1	1	0
			<i>Actinomycetospora</i>	1	2	1
			<i>Pseudonocardia</i>	2	2	2
	Streptomycineae	Streptomycetaceae	<i>Kitasatospora</i>	3	9	1
			<i>Streptomyces</i>	31	313	5
	Streptosporangineae	Thermomonosporaceae	<i>Actinomadura</i>	1	2	0
	Frankiales	Cryptosporangiaceae	<i>Cryptosporangium*</i>	6	20	3
			(新種未定)	<i>Motilibacter*</i>	1	1
Kineosporiales	Kineosporiaceae	<i>Kineosporia*</i>	11	38	4	
		<i>Thalassiella</i>	1	1	1	
Micrococcales	Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas*</i>	5	8	4	
		<i>Oerskovia*</i>	1	1	1	
	Intrasporangiaceae	<i>Phycococcus</i>	1	1	1	
		<i>Agromyces</i>	3	4	1	
		<i>Curtobacterium</i>	2	14	1	
		<i>Herbiconiux</i>	1	2	1	
		<i>Leifsonia</i>	1	2	0	
		Microbacteriaceae	<i>Lysinimonas</i>	1	1	1
			<i>Microbacterium</i>	14	19	8
			<i>Mycetocola</i>	1	1	1
			<i>Plantibacter</i>	1	1	1
		Micrococcaceae	<i>Rathayibacter</i>	1	2	0
	<i>Schumannella</i>		1	1	0	
	<i>Micrococcus</i>		1	1	0	
	<i>Rothia</i>		1	1	0	
	Promicromonosporaceae	<i>Cellulosimicrobium</i>	1	1	0	
<i>Isoptericola</i>		1	3	0		
(新種未定)		<i>Luteimicrobium</i>	2	10	0	
Nakamurellales	Nakamurellaceae	<i>Nakamurella</i>	1	1	1	
合計				138	532	68

表3 OTU リスト

OTU番号	Genus (属)	最近縁種*	同種率 (%)	株数	落葉採集日ごとの株数		
					6月27日	8月10日	10月19日
OTU-0001		<i>M. grossiae</i> PB739 ^T (KM186137)	97.7	2	0	0	2
OTU-0002	<i>Mycobacterium</i>	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>bovis</i> QIA-37 ^T (KY593892)	97.8 - 98.1	2	0	0	2
OTU-0003		<i>M. aquaticum</i> RW6 ^T (KY392537)	97.7	1	0	0	1
OTU-0004		<i>G. westfalica</i> Kb1/Kb2 ^T (AJ312907)	98.4	10	0	1	9
OTU-0005	<i>Gordonia</i>	<i>G. soli</i> CC-AB07 ^T (AY995560)	97.3	1	0	0	1
OTU-0006		<i>G. paraffinivorans</i> HD321 ^T (AF432348)	98.4	5	0	0	5
OTU-0007		<i>N. speluncae</i> N2-11 ^T (AM422449)	99.0	2	0	0	2
OTU-0008	<i>Nocardia</i>	<i>N. lijiangensis</i> YIM 33378 ^T (AY779043)	98.9	2	0	0	2
OTU-0009		<i>N. ignorata</i> DSM 44496 ^T (AJ303008)	99.0	1	0	0	1
OTU-0010	<i>Rhodococcus</i>	<i>R. kunmingensis</i> YIM 45607 ^T (DQ997045)	99.9	1	0	0	1
OTU-0011	<i>Williamsia</i>	<i>W. muralis</i> MA140-96 ^T (Y17384)	100	2	0	0	2
OTU-0012		<i>A. nipponensis</i> NBRC 14063 ^T (--01406301)	97.8 - 98.0	2	1	0	1
OTU-0013		<i>A. friuliensis</i> HAG 010964 ^T (FR733685)	97.7 - 98.0	2	0	1	1
OTU-0014		<i>A. octamycinicus</i> IFO 14524 ^T (AB047494)	98.3	1	0	0	1
OTU-0015	<i>Actinoplanes</i>	<i>A. lichenis</i> LDG1-22 ^T (LC033899)	98.4	1	0	0	1
OTU-0016		<i>A. lichenis</i> LDG1-22 ^T (LC033899)	97.7	1	0	0	1
OTU-0017		<i>A. rectilineatus</i> IFO 13941 ^T (AB037010)	99.9 - 100	3	0	0	3
OTU-0018		<i>A. bogorensis</i> LIPI11-2-Ac043 ^T (LC027115)	98.5	1	0	0	1
OTU-0019	<i>Asanoa</i>	<i>A. siamensis</i> NBRC 107932 ^T (--12775701)	98.5	1	0	0	1
OTU-0020		<i>C. nepalensis</i> NBRC 15583 ^T (--01558301)	99.2	1	0	0	1
OTU-0021	<i>Catenuloplanes</i>	<i>C. niger</i> NBRC 14177 ^T (--01417701)	98.4	1	0	0	1
OTU-0022	<i>Polymorphospora</i>	<i>P. rubra</i> TT 97-42 ^T (AB223089)	97.9	1	0	0	1
OTU-0071		<i>K. antibiotica</i> YIM 31530 ^T (AY082063)	98.5	1	0	0	1
OTU-0072	<i>Kribbella</i>	<i>K. jejuensis</i> HD9 ^T (AY253866)	98.8 - 99.6	2	0	0	2
OTU-0073		<i>N. kribbensis</i> KSL-2 ^T (AY835924)	97.6	1	0	1	0
OTU-0074		<i>N. hwasunensis</i> HFW-21 ^T (AM295258)	100	1	0	0	1
OTU-0075	<i>Nocardioidea</i>	<i>N. ginkgobilobae</i> SYP-A7303 ^T (KP128917)	96.2 - 96.5	2	0	0	2
OTU-0076		<i>N. lianchengensis</i> D94-1 ^T (HQ657322)	98.4	1	0	0	1
OTU-0077		<i>N. hankookensis</i> DS-30 ^T (EF555584)	99.2 - 99.9	3	0	0	3
OTU-0078		<i>N. tritolerans</i> MSL-14 ^T (EF466107)	95.3	1	0	0	1
OTU-0079	<i>Friedmanniella</i>	<i>F. flava</i> W6 ^T (HQ839787)	95.8	1	0	0	1
OTU-0023	<i>Actinokineospora</i>	<i>A. terrae</i> IFO 15668 ^T (AB058394)	99.5	1	0	0	1
OTU-0024	<i>Actinomycetospora</i>	<i>A. chlora</i> TT071-57 ^T (AB514519)	98.3 - 98.4	2	0	0	2
OTU-0025		<i>A. pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T (AY183356)	98.5 - 98.9	2	0	0	2
OTU-0026		<i>A. mediterranei</i> IMSNU 20056 ^T (AJ293754)	98.5	1	0	0	1
OTU-0027		<i>A. halotolerans</i> N4-6 ^T (DQ000196)	99.7	1	0	0	1
OTU-0028		<i>A. pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T (AY183356)	99.0	1	0	0	1
OTU-0029	<i>Amycolatopsis</i>	<i>A. mediterranei</i> IMSNU 20056 ^T (AJ293754)	97.2	2	0	0	2
OTU-0030		<i>A. rhabdoformis</i> SB026 ^T (KF779477)	98.1 - 98.2	2	0	0	2
OTU-0031		<i>A. rifamycinica</i> DSM 46095 ^T (AY083603)	98.9	1	0	0	1
OTU-0032		<i>A. equina</i> SE ^T (HQ021204)	97.4	1	0	0	1
OTU-0033		<i>A. mediterranei</i> IMSNU 20056 ^T (AJ293754)	97.0	1	0	0	1
OTU-0034	<i>Pseudonocardia</i>	<i>P. xishanensis</i> YIM 63638 ^T (FJ817397)	98.0	1	0	0	1
OTU-0035		<i>P. babensis</i> NBRC 105793 ^T (--12170001)	98.8	1	0	0	1
OTU-0036	<i>Kitasatospora</i>	<i>K. saccharophila</i> SK15 ^T (AB278568)	99.0 - 99.9	6	0	1	5

*)括弧内は配列のAccession番号。「--」で始まる番号の配列はNBRC, それ以外はDDBJより入手した。

表3 OTUリスト (続き)

OTU番号	Genus (属)	最近縁種	同値 (%)	株数	落葉採集日ごとの株数		
					6月27日	8月10日	10月19日
OTU-0037	<i>Kitasatospora</i>	<i>K. cineracea</i> SK-3255 ^T (AB022875)	99.5	1	0	0	1
OTU-0038		<i>K. paranensis</i> NBRC 101837 ^T (--11781201)	98.6	2	0	0	2
OTU-0039		<i>S. griseoluteus</i> NBRC 13375 ^T (--01337501)	99.2 - 100	39	0	1	38
OTU-0040		<i>S. kunmingensis</i> NRRL B-16240 ^T (DQ442513)	98.2 - 98.9	2	0	1	1
OTU-0041		<i>S. siamensis</i> KC-038 ^T (AB773848)	98.4 - 99.3	92	0	3	89
OTU-0042		<i>S. siamensis</i> KC-038 ^T (AB773848)	99.0	1	0	1	0
OTU-0043		<i>S. chartreusis</i> NBRC 12753 ^T (--01275302)	98.6 - 99.6	28	0	2	26
OTU-0044		<i>S. exfoliatus</i> NBRC 13191 ^T (AB184324)	99.3 - 99.9	7	0	0	7
OTU-0045		<i>S. aomiensis</i> M24DS04 ^T (AB522686)	99.6	1	0	0	1
OTU-0046		<i>S. camponoticapitis</i> 2H-TWYE14 ^T (KP784807)	98.5	1	0	0	1
OTU-0047		<i>S. drozdowiczii</i> NBRC 101007 ^T (AB249957)	99.3 - 99.5	6	0	0	6
OTU-0048		<i>S. kunmingensis</i> NRRL B-16240 ^T (DQ442513)	98.9	1	0	0	1
OTU-0049		<i>S. xylanilyticus</i> SR2-123 ^T (LC128341)	98.8 - 99.5	3	0	0	3
OTU-0050		<i>S. olivicoloratus</i> T13 ^T (KM229359)	99.9	2	0	0	2
OTU-0051		<i>S. ferralitis</i> SF0p68 ^T (AY262826)	98.6 - 98.7	2	0	0	2
OTU-0052		<i>S. colombiensis</i> NRRL B-1990 ^T (DQ026646)	100	1	0	0	1
OTU-0053		<i>S. costaricanus</i> NBRC 100773 ^T (AB249939)	100	1	0	0	1
OTU-0054	<i>Streptomyces</i>	<i>S. cocklensis</i> BK168 ^T (FR692107)	98.1	1	0	0	1
OTU-0055		<i>S. prunicolor</i> NBRC 13075 ^T (DQ026659)	99.0 - 99.6	25	0	0	25
OTU-0056		<i>S. kaempferi</i> I37 ^T (HE591382)	99.0	3	0	0	3
OTU-0057		<i>S. graminisoli</i> JR-19 ^T (HQ267975)	99.7	1	0	0	1
OTU-0058		<i>S. rhizosphaerihabitans</i> JR-35 ^T (HQ267983)	99.3 - 99.7	5	0	0	5
OTU-0059		<i>S. fildesensis</i> GW25-5 ^T (DQ408297)	99.0	1	0	0	1
OTU-0060		<i>S. microflavus</i> NRRL B-2156 ^T (DQ445795)	99.3 - 99.9	8	0	0	8
OTU-0061		<i>S. nashvillensis</i> NBRC 13064 ^T (AB184286)	98.8 - 99.7	9	0	0	9
OTU-0062		<i>S. andamanensis</i> KC-112 ^T (LC008305)	100	1	0	0	1
OTU-0063		<i>S. violascens</i> NBRC 12920 ^T (--01292001)	99.9	1	0	0	1
OTU-0064		<i>S. aureus</i> NBRC 100912 ^T (--11717601)	99.2 - 99.9	21	0	0	21
OTU-0065		<i>S. glomeroaurantiacus</i> NBRC 15418 ^T (AB249983)	99.2	9	0	0	9
OTU-0066		<i>S. spiroverticillatus</i> NBRC 3931 ^T (AB184814)	99.7	1	0	0	1
OTU-0067		<i>S. cylabdanicus</i> K04-0144 ^T (AB915216)	98.5 - 99.3	38	0	0	38
OTU-0068		<i>S. phaeoluteichromatogenes</i> NRRL B-5799 ^T (AJ391814)	99.3	1	0	0	1
OTU-0069		<i>S. rubidus</i> NBRC 102073 ^T (--11799101)	99.6	1	0	0	1
OTU-0070	<i>Actinomadura</i>	<i>A. nitritigenes</i> NBRC 15918 ^T (--01591801)	99.6	2	0	0	2
OTU-0080		<i>C. minutisporangium</i> IFO 15962 ^T (AB037007)	98.1	1	1	0	0
OTU-0081	<i>Cryptosporangium</i>	<i>C. japonicum</i> IFO 15966 ^T (D85466)	98.7 - 98.9	5	1	0	4
OTU-0082		<i>C. mongoliense</i> NBRC 105887 ^T (--12179401)	99.0	1	1	0	0

表3 OTU リスト (続き)

OTU番号	Genus (属)	最近縁種	同種率 (%)	株数	落葉採集日ごとの株数		
					6月27日	8月10日	10月19日
OTU-0083		<i>C. arvum</i> NBRC 15965 ^T (--01596501)	98.9 - 99.4	11	3	0	8
OTU-0084	<i>Cryptosporangium</i>	<i>C. cibodasense</i> LIP111-2- Ac046 ^T (LC025527)	98.1	1	0	0	1
OTU-0085		<i>C. japonicum</i> IFO 15966 ^T (D85466)	99.1	1	0	0	1
OTU-0086	<i>Motilibacter</i>	<i>M. rhizosphaerae</i> RS-16 ^T (FM998018)	95.2	1	0	0	1
OTU-0087		<i>K. aurantiaca</i> NRRL B-16913 ^T (AF095336)	98.4 - 99.2	10	1	1	8
OTU-0088		<i>K. mikuniensis</i> NBRC 16234 ^T (AB377117)	98.7 - 99.2	4	2	0	2
OTU-0089		<i>K. aurantiaca</i> NRRL B-16913 ^T (AF095336)	99.2 - 99.3	5	1	0	4
OTU-0090		<i>K. mikuniensis</i> NBRC 16234 ^T (AB377117)	97.6	1	1	0	0
OTU-0091		<i>K. babensis</i> NBRC 104154 ^T (--12006101)	98.6 - 99.3	5	0	0	5
OTU-0092	<i>Kineosporia</i>	<i>K. mikuniensis</i> NBRC 16234 ^T (AB377117)	98.5	1	0	0	1
OTU-0093		<i>K. mesophila</i> YIM 65293 ^T (FJ214362)	99.4 - 99.6	3	0	0	3
OTU-0094		<i>K. rhamnosa</i> I-132 ^T (AB003935)	97.1	2	0	0	2
OTU-0095		<i>K. aurantiaca</i> NRRL B-16913 ^T (AF095336)	98.6 - 99.0	2	0	0	2
OTU-0096		<i>K. rhamnosa</i> I-132 ^T (AB003935)	96.1	1	0	0	1
OTU-0097		<i>K. mikuniensis</i> NBRC 16234 ^T (AB377117)	99.2 - 99.9	4	0	0	4
OTU-0098	<i>Thalassialla</i>	<i>T. azotivora</i> DSD2 ^T (KT630890)	96.2	1	0	0	1
OTU-0099		<i>C. denverensis</i> W6929 ^T (AY501362)	97.5	2	0	0	2
OTU-0100		<i>C. iranensis</i> NBRC 101100 ^T (--11728201)	99.4	1	0	0	1
OTU-0101	<i>Cellulomonas</i>	<i>C. denverensis</i> W6929 ^T (AY501362)	98.4	1	0	0	1
OTU-0102		<i>C. humilata</i> NCTC 25174 ^T (X82449)	98.9	1	0	0	1
OTU-0103		<i>C. massiliensis</i> JC225 ^T (JN657218)	98.4	3	0	0	3
OTU-0104	<i>Oerskovia</i>	<i>O. turbata</i> NCIMB 10587 ^T (X79454)	98.5	1	0	0	1
OTU-0105	<i>Phycococcus</i>	<i>P. endophyticus</i> IP6SC6 ^T (KT327645)	98.7	1	0	0	1
OTU-0106		<i>A. aureus</i> AR33 ^T (KU141338)	99.6	2	0	0	2
OTU-0107	<i>Agromyces</i>	<i>A. lapidis</i> CD55 ^T (AY618217)	98.7	1	0	0	1
OTU-0108		<i>A. salentinus</i> 20-5 ^T (AY507129)	99.4	1	0	0	1
OTU-0109		<i>C. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i> LMG 3645 ^T (AJ312209)	99.3 - 100	13	0	0	13
OTU-0110	<i>Curtobacterium</i>	<i>C. oceanosedimentum</i> ATCC 31317 ^T (GU269547)	98.4	1	0	0	1
OTU-0111	<i>Herbiconiux</i>	<i>H. flava</i> NBRC 16403 ^T (AB583921)	98.5 - 98.8	2	0	0	2
OTU-0112	<i>Leifsonia</i>	<i>L. aquatica</i> NBRC 15710 ^T (--01571001)	99.7 - 99.9	2	0	0	2
OTU-0113	<i>Lysinimonas</i>	<i>L. solfi</i> NBRC 107106 ^T (--12693101)	98.1	1	1	0	0
OTU-0114		<i>M. hominis</i> DSM 12509 ^T (AM181504)	98.5	1	1	0	0
OTU-0115		<i>M. aurum</i> NBRC 15204 ^T (--01520401)	98.5 - 98.9	5	1	0	4
OTU-0116		<i>M. terregens</i> NBRC 12961 ^T (--01296101)	99.5	1	1	0	0
OTU-0117		<i>M. paraoxydans</i> CF36 ^T (AJ491806)	98.9 - 99.7	2	1	0	1
OTU-0118		<i>M. testaceum</i> NBRC 12675 ^T (--01267501)	97.8	1	1	0	0
OTU-0119		<i>M. kyungheense</i> THG-C26 ^T (JX997973)	99.2	1	0	1	0
OTU-0120	<i>Microbacterium</i>	<i>M. maritpicum</i> NBRC 15779 ^T (--01577901)	98.6	1	0	0	1
OTU-0121		<i>M. kyungheense</i> THG-C26 ^T (JX997973)	97.7	1	0	0	1
OTU-0122		<i>M. lacticum</i> NBRC 14135 ^T (--01413501)	99.3	1	0	0	1
OTU-0123		<i>M. testaceum</i> NBRC 12675 ^T (--01267501)	99.3	1	0	0	1
OTU-0124		<i>M. trichothecenolyticum</i> NBRC 15077 ^T (-- 01507701)	98.9	1	0	0	1

表3 OTU リスト (続き)

OTU番号	Genus (属)	最近縁種	相同率 (%)	株数	落葉採集日ごとの株数		
					6月27日	8月10日	10月19日
OTU-0125		<i>M. yannicii</i> G72 ^T (FN547412)	97.4	1	0	0	1
OTU-0126	<i>Microbacterium</i>	<i>M. lemovicicum</i> ViU22 ^T (JN243353)	99.7	1	0	0	1
OTU-0127		<i>M. album</i> SYSU D8007 ^T (MF399039)	97.3	1	0	0	1
OTU-0128	<i>Mycetocola</i>	<i>M. reblochoni</i> LMG 22367 ^T (DQ062097)	97.0	1	0	0	1
OTU-0129	<i>Plantibacter</i>	<i>P. flavus</i> P 297/02 ^T (AJ310417)	98.8	1	0	0	1
OTU-0130	<i>Rathayibacter</i>	<i>R. tritici</i> DSM 7486 ^T (X77438)	99.2 - 99.3	2	0	0	2
OTU-0131	<i>Schumannella</i>	<i>S. luteola</i> KHIA ^T (AB362159)	99.9	1	0	0	1
OTU-0132	<i>Micrococcus</i>	<i>M. aloeverae</i> AE-6 ^T (KF524364)	99.7	1	0	0	1
OTU-0133	<i>Rothia</i>	<i>R. dentocariosa</i> ATCC 17931 ^T (M59055)	99.6	1	0	0	1
OTU-0134	<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>C. funkei</i> W6122 ^T (AY501364)	99.3	1	0	0	2
OTU-0135	<i>Isoptricola</i>	<i>I. nanjingensis</i> H17 ^T (HQ222356)	99.4	3	0	0	3
OTU-0136	<i>Luteimicrobium</i>	<i>L. subarcticum</i> R19-04 ^T (AB489904)	99.1 - 100	9	0	0	9
OTU-0137		<i>L. xylanilyticum</i> W-15 ^T (JQ039191)	99.7	1	0	0	1
OTU-0138	<i>Nakamurella</i>	<i>N. intestinalis</i> 63MJ-1 ^T (KU379671)	96.9	1	0	0	1
OTU-0139	<i>Brevundimonas</i>	<i>B. intermedia</i> ATCC 15262 ^T (AJ227786)	99.6 - 100	7	4	0	3
OTU-0140		<i>B. intermedia</i> ATCC 15262 ^T (AJ227786)	98.7	1	0	0	1
OTU-0141	<i>Reyranelia</i>	<i>R. massiliensis</i> 521 ^T (EF394922)	97.9	1	0	0	1
OTU-0142		<i>N. lindaniclasticum</i> LE124 ^T (JN687581)	99.2 - 99.9	22	1	3	18
OTU-0143		<i>N. resinovorum</i> NCIMB 8767 ^T (EF029110)	99.4 - 99.9	5	0	1	4
OTU-0144	<i>Novosphingobium</i>	<i>N. gossypii</i> JM-1396 ^T (KP657488)	99.3 - 99.4	3	0	0	3
OTU-0145		<i>N. clariflavum</i> CICC11035s ^T (KU530129)	99.6 - 99.7	6	0	0	6
OTU-0146		<i>N. mathurense</i> SM117 ^T (EF424403)	99.3 - 99.4	4	0	0	4
OTU-0147	<i>Sphingobium</i>	<i>S. limneticum</i> 301 ^T (JN591313)	99.7 - 99.9	2	0	0	2
OTU-0148		<i>S. colocasiae</i> CC-MHH0539 ^T (KU248160)	98.5	1	1	0	0
OTU-0149		<i>S. desiccabilis</i> CP1D ^T (AJ871435)	97.3	1	0	1	0
OTU-0150		<i>S. kyeonggiensis</i> THG-DT81 ^T (KC252615)	98.4	1	0	0	1
OTU-0151		<i>S. kyeonggiensis</i> THG-DT81 ^T (KC252615)	98.4	1	0	0	1
OTU-0152		<i>S. abaci</i> C42 ^T (AJ575817)	98.0	1	0	0	1
OTU-0153		<i>S. leidyi</i> ATCC 15260 ^T (AJ227812)	96.6	1	0	0	1
OTU-0154		<i>S. naphthae</i> DKC-5-1 ^T (KU312690)	97.4 - 98.3	5	0	0	5
OTU-0155		<i>S. gei</i> ZFGT-11 ^T (KF551181)	97.0 - 97.1	3	0	0	3
OTU-0156		<i>S. zeicaulis</i> 541 ^T (KP172592)	99.1	1	0	0	1
OTU-0157	<i>Sphingomonas</i>	<i>S. yanoikuyae</i> NBRC 15102 ^T (--01510201)	97.7	1	0	0	1
OTU-0158		<i>S. yanoikuyae</i> NBRC 15102 ^T (--01510201)	99.7	1	0	0	1
OTU-0159		<i>S. aerophila</i> 5413J-26 ^T (KC735148)	99.9	1	0	0	1
OTU-0160		<i>S. laterariae</i> LNB2 ^T (HM159118)	97.1	1	0	0	1
OTU-0161		<i>S. polyaromaticivorans</i> B2-7 ^T (EF467848)	97.7 - 97.8	2	0	0	2
OTU-0162		<i>S. starnbergensis</i> 382 ^T (JN591314)	97.7	2	0	0	2
OTU-0163		<i>S. trueperi</i> LMG 2142 ^T (X97776)	98.9 - 99.0	5	0	0	5
OTU-0164		<i>S. mucosissima</i> CP173-2 ^T (AM229669)	99.1	1	0	0	1
OTU-0165		<i>S. zeicaulis</i> 541 ^T (KP172592)	98.6 - 98.7	2	0	0	2
OTU-0166		<i>S. colocasiae</i> CC-MHH0539 ^T (KU248160)	99.1	1	0	0	1
OTU-0167		<i>S. polyaromaticivorans</i> B2-7 ^T (EF467848)	98.6	1	0	0	1
OTU-0168	<i>Bosea</i>	<i>B. lupini</i> R-45681 ^T (FR774992)	99.4	1	1	0	0
OTU-0169		<i>B. robiniae</i> R-46070 ^T (FR774994)	98.8 - 99.4	4	0	1	3
OTU-0170	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. erythrophlei</i> CCBau 53325 ^T (KF114645)	100	1	0	0	1

表3 OTU リスト (続き)

OTU番号	Genus (属)	最近縁種	相同率 (%)	株数	落葉採集日ごとの株数		
					6月27日	8月10日	10月19日
OTU-0171	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. diazoefficiens</i> NBRC 14792 ^T (--01479201)	99.4 - 100	3	0	0	3
OTU-0172	<i>Tardiphaga</i>	<i>T. robiniae</i> R-45977 ^T (FR753034)	99.4	1	0	0	1
OTU-0173		<i>M. tardum</i> RB677 ^T (AB252208)	99.2 - 99.9	11	2	1	8
OTU-0174		<i>M. komagatae</i> 002-079 ^T (AB252201)	99.1 - 99.6	2	0	1	1
OTU-0175		<i>M. pseudosasicola</i> NBRC 105203 ^T (--12111001)	99.8	1	0	0	1
OTU-0176	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. platani</i> PMB02 ^T (EF426729)	99.1	1	0	0	1
OTU-0177		<i>M. aquaticum</i> GR16 ^T (AJ635303)	98.9	1	0	0	1
OTU-0178		<i>M. brachythecii</i> 99b ^T (AB703239)	99.1	1	0	0	1
OTU-0179		<i>M. goesingense</i> iEII3 ^T (AY364020)	98.0	1	0	0	1
OTU-0180	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. aminovorans</i> JCM 8240 ^T (AB175629)	99.9	2	1	1	0
OTU-0181	<i>Methylophila</i>	<i>M. capsulata</i> IM1 ^T (AF004844)	98.4	1	0	1	0
OTU-0182	<i>Agrobacterium</i>	<i>A. larrymoorei</i> 3-10 ^T (Z30542)	99.7 - 100	2	0	0	2
OTU-0183		<i>R. yangtingense</i> H66 ^T (KC934840)	99.6 - 99.7	2	0	0	2
OTU-0184		<i>R. wenxiniae</i> 166 ^T (KR610521)	99.6	1	0	0	1
OTU-0185		<i>R. smilacinae</i> PTYR-5 ^T (KF551141)	98.1	1	0	0	1
OTU-0186	<i>Rhizobium</i>	<i>R. alarii</i> GBV016 ^T (AM931436)	97.2	1	0	0	1
OTU-0187		<i>R. endolithicum</i> JC140 ^T (HE818072)	98.4	1	0	0	1
OTU-0188		<i>R. cauense</i> CCB AU 101002 ^T (JF424608)	98.6	1	0	0	1
OTU-0189		<i>R. metallidurans</i> ChimEc512 ^T (JX678769)	99.7	1	0	0	1
OTU-0190		<i>R. alvei</i> TNR-22 ^T (HE649224)	98.2	1	0	0	1
OTU-0191	<i>Leuconostoc</i>	<i>L. pseudomesenteroides</i> NRIC 1777 ^T (AB023237)	99.9	1	0	0	1
OTU-0192	<i>Burkholderia</i>	<i>B. insecticola</i> RPE64 ^T (AB558208)	98.5	1	1	0	0
OTU-0193		<i>C. jiangsuensis</i> MP-1 ^T (KJ400396)	98.8	1	0	1	0
OTU-0194		<i>C. udeis</i> Hg2 ^T (AY154367)	98.8	1	0	0	1
OTU-0195	<i>Caballeronia</i>	<i>C. humi</i> RA1-5 ^T (AY949193)	98.5	1	0	0	1
OTU-0196		<i>C. pedi</i> LMG 29323 ^T (LT158621)	99.1 - 100	2	0	0	2
OTU-0197		<i>C. jiangsuensis</i> MP-1 ^T (KJ400396)	98.6	2	0	0	2
OTU-0198		<i>C. humi</i> RA1-5 ^T (AY949193)	99.6	1	0	0	1
OTU-0199	<i>Aquincola</i>	<i>A. tertiaricarbonis</i> L10 ^T (DQ656489)	96.4	1	0	0	1
OTU-0200	<i>Ideonella</i>	<i>I. sakaiensis</i> 201-F6 ^T (LC002525)	97.3	1	0	0	1
OTU-0201	<i>Chitinophaga</i>	<i>C. pinensis</i> NBRC 15968 ^T (--01596801)	97.1	1	0	0	1
OTU-0202	<i>Spirosoma</i>	<i>S. aerophilum</i> 5516J-17 ^T (KR024033)	96.9	1	0	0	1
OTU-0203		<i>S. panaciterrae</i> Gsoil 1519 ^T (EU370956)	92.7	1	0	0	1
OTU-0204	<i>Xanthomonas</i>	<i>X. nasturtii</i> WHRI 8853 ^T (KX518637)	98.3	1	0	0	1
OTU-0205	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. abietaniphila</i> ATCC 700689 ^T (AJ011504)	98.9	1	0	0	1
OTU-0206		<i>P. rhizosphaerae</i> IH5 ^T (AY152673)	99.1	2	0	0	2
OTU-0207	<i>Mucilaginitibacter</i>	<i>M. carri</i> PR0008K ^T (JX089330)	97.1	1	0	0	1

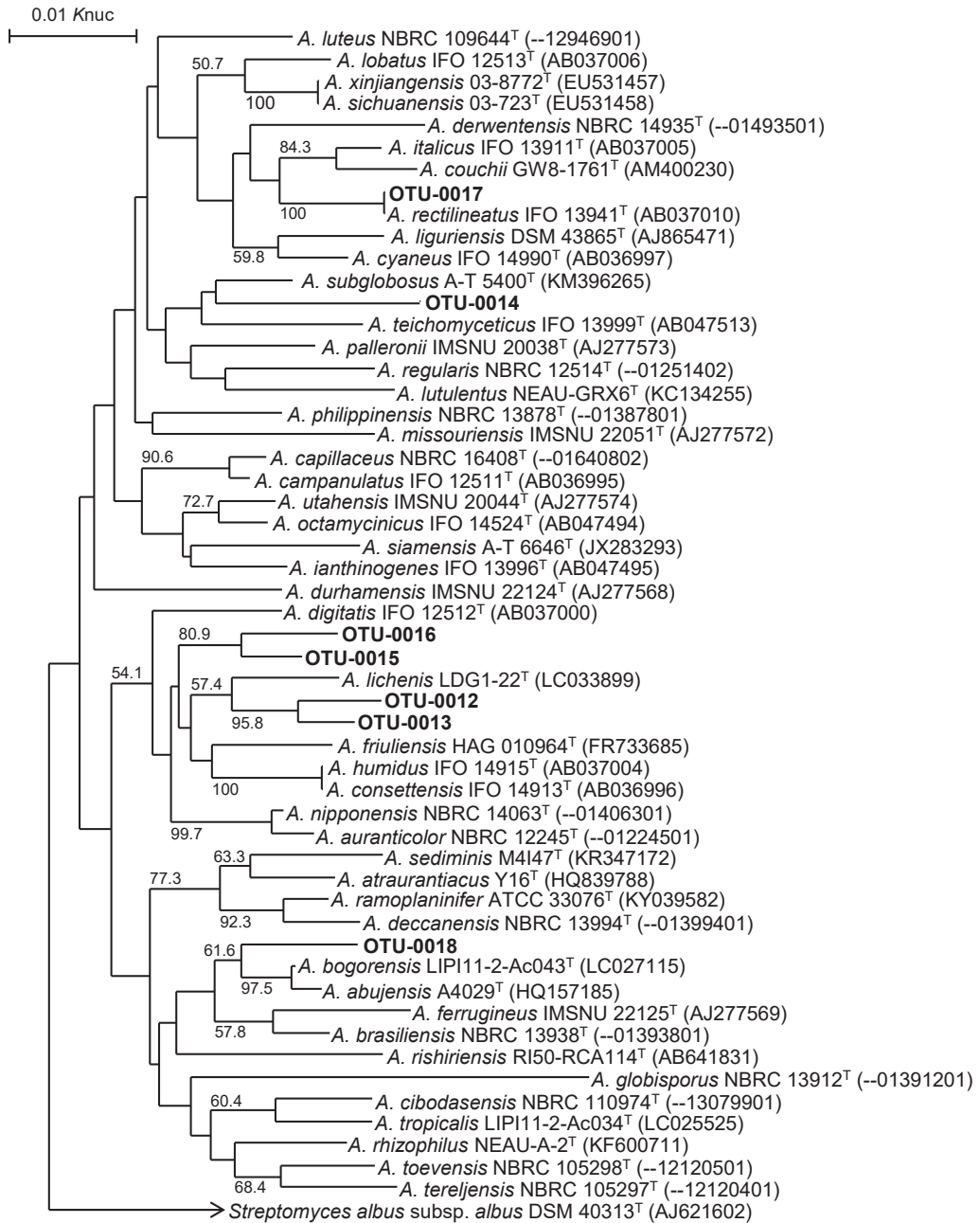


図1 *Actinoplanes* 属に属する OTU の 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列による系統樹

括弧内は配列の Accession 番号. 「-」で始まる番号の配列は NBRC, それ以外は DDBJ より入手した. ブートストラップ値は 50%以上のものを枝に付した.

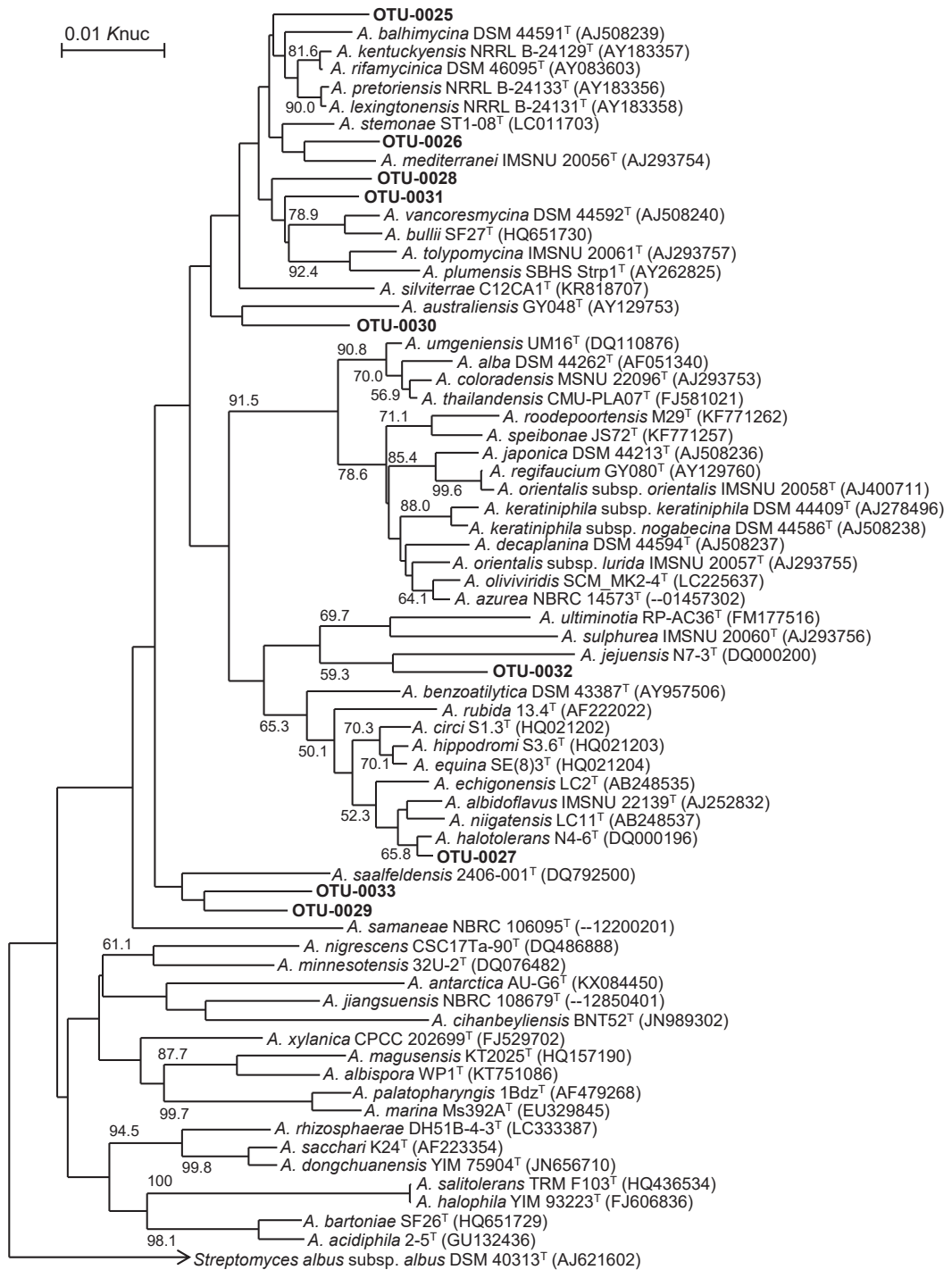


図2 *Amycolatopsis* 属に属する OTU の 16S rDNA 遺伝子部分塩基配列による系統樹

括弧内は配列の Accession 番号.[–]で始まる番号の配列は NBRC, それ以外は DDBJ より入手した。ブートストラップ値は 50%以上のものを枝に付した。近縁の OTU が存在しない一部の種は省略した。

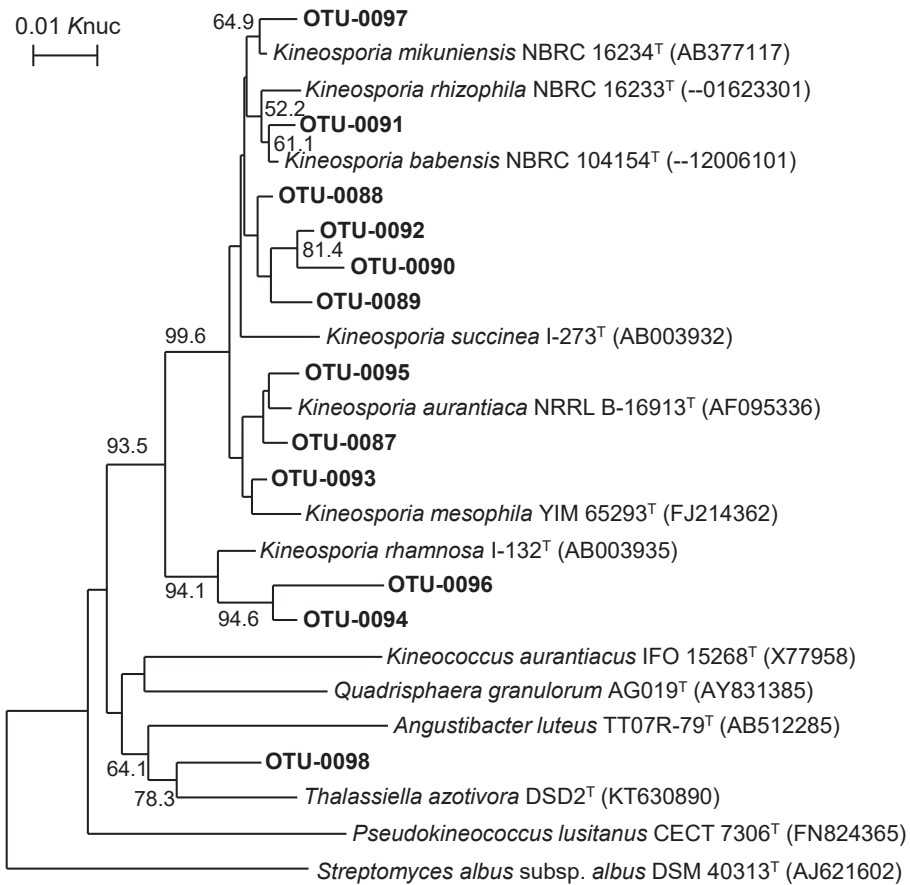


図3 *Kineosporiaceae* 科に属する OTU の 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列による系統樹

括弧内は配列の Accession 番号. 「--」で始まる番号の配列は NBRC, それ以外は DDBJ より入手した. ブートストラップ値は 50%以上のものを枝に付した.

考 察

落葉は土壌と近接した環境であるが、今回の調査は生息する放線菌には両者に違いがあることを示唆している。運動性放線菌は土壌からも見出されるが、今回分離された138の放線菌に属するOUTのうち24.6%にあたる34が運動性放線菌であり、これは奥多摩やマレーシアにおける土壌放線菌の調査(Muramatsu *et al.*, 2003)のデータから算出されるそれぞれ10.6%, 13.0%と比べて高率であると言える。また、土壌からは一定頻度で検出される *Streptosporangiaceae* 科が全く検出されなかった。*Micromonosporaceae* 科内では土壌から比較的高頻度で分離される *Micromonospora* 属が分離されず、その代わりに *Actinoplanes* 属が比較的多く分離された。これらはベトナムの土壌と落葉から分離された放線菌についての報告(Hop *et al.*, 2011)とも傾向は一致しており、一般的な傾向である可能性が高い。さらに新種候補が多いことも特徴で、これは落葉由来の放線菌研究が比較的少ないことを反映していると考えられる。今回は、大都市内に遺存された自然林の環境である自然教育園での調査であったが、非常に多様な放線菌を検出することができた。分離株数が1株のOTUも多く、全体で126、放線菌のみで80ものOTUが該当し、さらなる調査によってOTU数は増加することが期待される。このように落葉の放線菌は多様で新規性が高く、医薬品探索などの応用研究に有用であることが示唆された。また、今回の調査報告が放線菌の分布や生態的な研究にも役立つことも期待したい。

謝 辞

今回の研究に関して、自然教育園へのご紹介の労を取っていただいた国立科学博物館の細矢剛博士、落葉採集の許可及び便宜を図っていただいた遠藤拓洋氏をはじめとする自然教育園の皆様へ深く感謝いたします。また、分離を担当した吉田珠実氏、塩基配列決定を担当した安藤里奈氏に深く感謝いたします。

引 用 文 献

- Burg R. W., Miller B. M., Baker E. E., Birnbaum J., Currie S. A., Hartman R., Kong Y-L., Monaghan R. L., Olson G., Putter I., *et al.* 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 15 : 361-367.
- Endo, A., Kuroda M., Tsujita Y. 1976. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot. (Tokyo)* 29 : 1346-1348.
- Fenical, W. & Jensen, P. R. 2006. Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Biol.* 2 : 666-673.
- Fleming, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* Br. *Exp. Pathol.*, 10 : 226-136.
- Hayakawa, M. & Nonomura, H. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferment. Bioeng.* 65 : 501-509.
- Hop, D. V., Sakiyama, Y., Binh, C. T. T., Otoguro, M., Hang, D. T., Miyadoh, S., Luong, D. T., Ando, K. 2011. Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: isolation and genus-

- level diversity. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 64 : 599-606.
- Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, M., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H. 1987. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 40 : 1249-1255.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 23 : 2947-2948.
- Li, J. W.-H. & Vederas, J. C. 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*. 325 : 161-165.
- Milshteyn, A., Schneider, J. S., Brady, S. F. 2014. Mining the metabiome: identifying novel natural products from microbial communities. *Chem. Biol.* 21 : 1211-1223.
- Muramatsu, H., Shahab, N., Tsurumi, Y., Hino, M. 2003. A comparative study of Malaysian and Japanese actinomycetes using simple identification method based on partial 16S rDNA sequence. *Actinomycetologica*. 17 : 33-43.
- Newton, G. G. F. & Abraham, E. P. 1955. Cephalosporin C, a new antibiotic containing sulphur and D-*a*-aminoadipic acid. *Nature* 175 : 548.
- Schatz, A., Bugie, E., Waksman, S. A. 1944. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 55 : 66-69.
- Stackebrandt, E. & Ebers, J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol. Today*. 33 : 152-155.
- Umezawa, H., Ueda, M., Maeda, K., Yagishita, K., Kondo, S., Okami, Y., Utahara, R., Osato, Y., *et al.* 1957. Production and isolation of a new antibiotic, kanamycin. *J. Antibiot. (Tokyo)* 10 : 181-188.
- Umezawa, H., Hamada, M., Suhara, Y., Hashimoto, T., Ikekawa, T. 1965. Kasugamycin, a new antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5 : 753-757.
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., Okami, Y. 1966. New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot. (Tokyo)* 19 : 200-209.