

# アカガシ落葉中の分解段階の違いによる運動性放線菌の分布特性

村松秀行\*・絵面美穂・五十嵐雅之

公益財団法人 微生物化学研究会 微生物科学研究所 第2生物活性研究部

**Hideyuki Muramatsu, Miho Ezura, Masayuki Igarashi: Characteristics of motile actinomycetes distribution in decomposition process of fallen leaves of *Quercus acuta*. Miscellaneous Reports of the Institute for Nature Study (53): 55–57, 2021.**

Laboratory of Microbiology, Institute of Microbial Chemistry, Microbial Chemistry Research Foundation

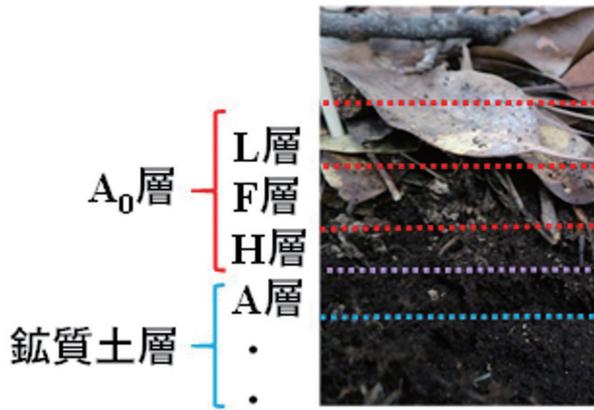
## はじめに

放線菌は主に菌糸状に生育する細菌で土壌を中心に生息すると考えられてきた。抗生物質などの生産者として利用される *Streptomyces* などの主要な土壌放線菌は運動性を持たないが、一部の放線菌はその孢子や栄養細胞が運動性を持ち、運動性放線菌とされる。運動性放線菌は興味深いことに放線菌の系統の中でそれぞれ独立した複数の系統として存在し、*Micromonosporaceae* 科の *Actinoplanes*, *Catenuloplanes*, *Dactylosporangium*, *Pilimelia*, *Pseudosporangium*, *Cryptosporangiaceae* 科の *Cryptosporangium*, *Kineosporiaceae* 科の *Kineosporia*, *Kineococcus*, *Pseudonocardiaceae* 科の *Actinokineospora*, *Actinosynnema*, *Streptosporangiaceae* 科の *Planobispora*, *Planomonospora* などが知られている。*Actinoplanes* は運動性放線菌として最も古く1950年に記載され (Couch, 1950), 土壌以外の水辺環境からも分離されることが報告されていたが (Willoughby, 1971), 近年になって落葉層に多く分布することが認識されつつある (Hop *et al.*, 2011)。筆者らも落葉から多くの未記載種を含む *Actinoplanes* をはじめとする運動性放線菌を得ている (村松, 2019)。孢子の運動性発現にかかわる分子生物学的研究 (Kimura *et al.*, 2019) も進んできているが、その生活史については未だ未解明な点が多い。筆者らはその解明に向けて分解段階の異なる落葉層における運動性放線菌の分布について調査を行った。

## 調査方法

落葉は国立科学博物館附属自然教育園のアカガシ (*Quercus acuta*) の大木下にはほぼ単一種の落葉層として堆積したものを使用した。採集日は2018年10月17日。当日の天候は曇りであった。東京では採集日を含む1週間は曇りがちで日照は少なかったものの降水も少なく、日積算降水量として14日に7.5mmの降水があったほかは11日, 15日, 17日 (当日) に1.0mmが記録されているにすぎない (日本気象協会 HP より)。落葉は垂直方向に分解段階に従って上からL層, F層, H層 (図1) を分別して採集し、直下の土壌も採集した。放線菌以外の細菌の増殖を抑えるため、落葉は細断し1週間室内で乾燥させた。運動性放線菌の分離は早川ら (Hayakawa *et al.*, 2000) によって開発された運動性放線菌の選択的分離法である再水和遠心法を改変して行った。具体的な手順は以下のとおりである。乾燥させた落葉または土壌に試験管内で攪拌を避けながらリン酸緩衝液 (pH 7.0) を加えて1時間静置したのち上清を採取した。その際、落葉にはクローム鋼球を載せて全体が水面下に沈むようにした。上清は3,000rpm, 20分遠心したのち30分静置、さらに遠心上清を採取し接種源とした。この処理によって上清には遊走してきた運動性孢子が選択的に回収され、非運動性の放線菌およびカビの混入を大幅に減らすことができる。接種源は段階希釈を行い分離用寒天培地に塗抹接種し、30℃で21日間培養したのち、出現したコロニーの計数とコロニー分離を行った。得

\* E-mail: muramatsuh@bikaken.or.jp



L層: 葉が原型を留める  
 F層: 原型は崩れるが植物組織識別可能  
 H層: 大部分が数mm以下の微細片

図1. 落葉層 (*Quercus acuta*, 採集地のもの).

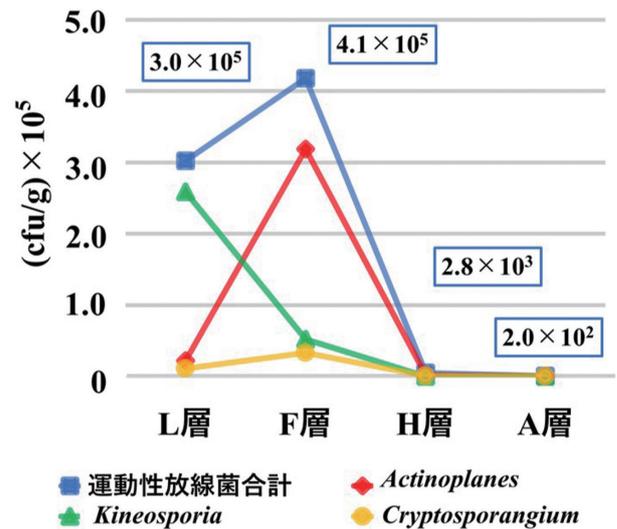


図2. 落葉分解層の各層における運動性放線菌およびその主要属の分布密度. cfu: colony forming unit

られたコロニーからPCRによって系統分類指標である16S rRNA 遺伝子 (約 1.5 kb) を増幅, 塩基配列 (約 0.8 kb) を決定し, 得られた配列情報に基づき属の推定および Operational Taxonomic Unit (OTU) 解析を行った。OTU 解析は塩基配列の相同性によってグルーピングする手法で, 分類群と完全には一致しないケースもあるが多様性等を評価するためなどに利用される。OTU 解析の閾値は種相当にグルーピングできるものとして 99% を使用した。

## 結 果

分離用寒天培地上に出現したコロニー数は, L層で  $(1.4 \pm 0.2) \times 10^6$ , F層で  $(1.1 \pm 0.1) \times 10^6$  と多く, 分解段階の進んだH層では  $(9.3 \pm 1.6) \times 10^4$ , 土壌では  $(1.0 \pm 0.2) \times 10^4$  と分解段階が進むにつれ大幅な減少傾向を示していた。分離コロニー数はL層 256, F層 277, H層 286, 土壌 272であった。それらのうち配列取得成功数はそれぞれ, 230, 258, 268, 246であり, OTU数はそれぞれ, 70, 88, 87, 72となった。各OTUの推定属に基づいた運動性放線菌の各層における密度を図2に示した。L層, F層では乾燥重量 1gあたり  $10^5$  cfu (colony forming unit) と高密度であったが, H層では  $10^3$ , 土壌では  $10^2$  と急激な減少が認められた。優占属はL層では *Kineosporia*, F層は *Actinoplanes* であった。

## 考 察

運動性放線菌はその運動性によって地上に落下した植物遺体等に競合微生物よりも早く到達し, 資源として利用する生存戦略をもつことが容易に推測できるものの, これまでそれを裏付けるデータは得られていなかった。今回の調査では落葉の分解初期 (L層・F層) に運動性放線菌が高密度で検出される一方, 分解段階の進んだ落葉層 (H層), 土壌層からの検出密度は低く分解初期の  $1/100 \sim 1/1000$  になっていた。このことは落葉層の分解の過程で放線菌相の遷移が起こっており, その初期には主に運動性放線菌が関わっていることを示唆している。さらにこの例では運動性放線菌の間でも分解段階に従って *Kineosporia* から *Actinoplanes* へ優占属が遷移していくことも示唆されており, 運動性放線菌の生態解明において重要なものと考えられる。

放線菌は抗生物質などの探索源として利用されており, その生産物は Streptomycin など医薬品として利用されている。今回の調査で多数検出された *Actinoplanes* も糖尿病治療薬である Acarbose など有用な物質の生産菌として知られる (瀬崎・宮道, 2001)。再水和遠心法などの選択分離法の開発によってその収集や研究は進んできており, 今回のような生態的な知見を組み合わせることにより, より多様な *Actinoplanes* をはじめとする運動性放線菌の収集と探索源としての利用が可能になると考えられる。

## 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に深く感謝いたします。

## 引用文献

Couch JN. *Actinoplanes*. A new genus of the Actinomycetales. 1950. Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society. 66 : 87-92.

Hayakawa M, Otoguro M, Takeuchi T, Yamazaki T, Iimura Y. 2000. Application of a method incorporating

differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. Antonie Van Leeuwenhoek. 78 : 171-85.

Kimura T, Tezuka T, Nakane D, Nishizaka T, Aizawa S, Ohnishi Y. 2019. Characterization of zoospore type IV pili in *Actinoplanes missouriensis*. J. Bacteriol. 201 : e00746-00718.

Willoughby, L. G. 1971. Observations on some aquatic actinomycetes of streams and rivers. Freshwater Biol. 1 : 23-27.

瀬崎正次 & 宮道慎二. 2001. 実用化された抗生物質とその関連物質. 日本放線菌学会編 放線菌の分類と同定 : 349-389. 日本学会事務センター.

村松秀行. 2019. 自然教育園の落葉より分離された放線菌について. 自然教育園報告. 50 : 43-56.

