

住木・梅澤記念賞受賞講演会記録

2011年11月4日, 学士会館320号室

【2011年度受賞講演, 座長: 長田裕之】

新規生物活性物質探索のための微生物資源の開拓

高橋洋子 (北里大学北里生命科学研究所)

1944年に放線菌 *Streptomyces griseus* の培養液から Streptomycin が発見されて以来, 生物活性物質の探索源として, 土壌試料から多くの放線菌が分離されてきた。また, 新たな菌株を求めてその分離方法が検討されるとともに, Gentamicin の発見がきっかけとなって *Streptomyces* 属以外のいわゆる希少放線菌分離にも力が注がれてきた。

これまでに細菌, 放線菌あるいは真菌の生産する二次代謝産物から抗生物質を含む生物活性物質は約20,000以上報告された。BERDYの報告¹⁾によると1980年までに約5,000, 1990年では約10,000, 2000年までに計約20,000の化合物が発見されている。その生産菌の内訳をみると, 1960年代前半は放線菌由来が70%前後を占めていた。現在では放線菌45%, 真菌38%, 細菌は17%となっている(表1)。

(学) 北里研究所 北里生命科学研究所の創薬科学部門を中心とした創薬研究グループは, 微生物由来生物活性物質の探索を行い, 約450の化合物を発見した²⁾。対象としてきた微生物は主に放線菌と真菌であり, 演者は放線菌群を中心にその分離, 培養および分類を担当し, 新しい微生物資源を得るための様々な分離の試みを行ってき

た³⁻⁸⁾。分離法の工夫では抗生物質耐性を利用した希少放線菌の分離, 走化性を利用した運動性放線菌の分離, 固形剤としてのゲランガムの利用等である。さらに, 土壌の他に, 植物の葉や砂漠の砂等を分離源として用いた。このような, 微生物資源拡大のための研究過程で分類上新規な菌株を見出し, 1新科13新属42新種を提唱した。

一方, これら分離放線菌の培養液から見出された化合物の中で, 医薬, 動物薬あるいは試薬として発展した物質には以下のような化合物があげられる。括弧内には生産菌を示した。抗寄生虫活性を有する Avermectin (新種 *Streptomyces avermectinus* MA-4680^T), プロテインキナーゼ阻害活性を有する Staurosporine (新種 *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *staurosporeus* AM-2282^T, 2007年に *Lentzea albida* に移行), プロテアソーム阻害活性を有する Lactacystin (“*Streptomyces lactacystinaeus*” OM-6519), V-ATPase 阻害活性の Setamycin (新属新種 *Kitasatospora setae* KM-6054^T), Hsp90 阻害活性の Herbimycin (*Streptomyces hygrosopicus* AM-3672), アシル CoA 合成酵素阻害活性の Triacsin (*Streptomyces* sp. SK-1894) などである。

表1. 生物活性物質生産菌¹⁾

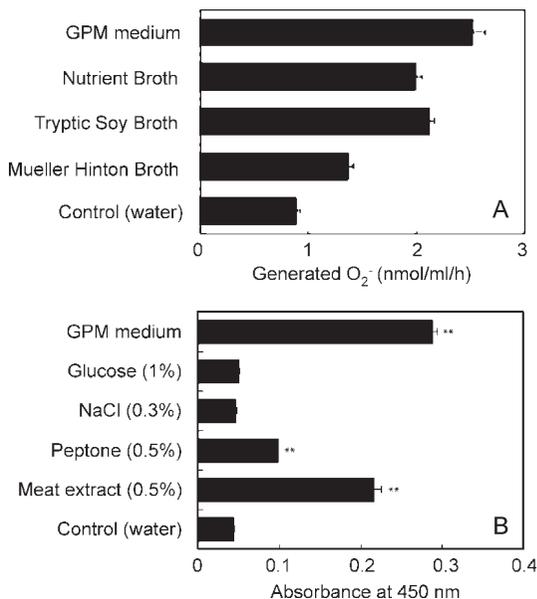
生産菌	活性物質数	(%)
細菌	3,800	17
放線菌	10,100	45
(<i>Streptomyces</i>)	(7,630)	(34)
(希少放線菌)	(2,470)	(11)
真菌	8,600	38
計	22,500	

本講演では、分離方法と分離源についての最近の試みと、これら分離菌株の培養液から得られた新物質について報告する。

1. 活性酸素除去による新規放線菌類の分離と分類

これまでに分離された微生物種は自然環境中の数%程度であり、多くの未知微生物がまだ分離されていないといわれている。我々は、これら未知微生物の分離法を開発すべく検討を行ってきた。その成果の一つとして、一般に研究室で微生物培養のために用いられる寒天培地が活性酸素種を発生する場合があります、その除去物質（ラジカルスカベンジャー）を培地に添加することで出現コロニー数が飛躍的に増大することを見出した。

この発見は土壌試料中の優先種微生物の代謝産物に注目したことがきっかけとなった。すなわち、環境中の微生物フローラに着目し、土壌中に優先的に棲息する微生物は他の微生物になんらかの影響を与える物質を生産するのではないかと考え、まず優先種微生物を分離しその培養液を培地に添加し、再度同じ培地を用いて分離を行った。その結果、優先種微生物として分離した2菌株の培養液に出現コロニー数の増加効果があることを見出した。この培養液中のコロニー増加因子を解析したところスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）であることがわかった。牛赤血球由来の

図1. 各種培地や培地成分から発生するスーパーオキシドアニオン (O_2^-)

A: 一般的に細菌の培養に用いられる培地を用いて、チトクロームC法により還元型のチトクロームCの蓄積量を測定することによって O_2^- を定量した。
B: GPM培地の培地組成ごとの O_2^- 発生量をWST-1法により比較した。

市販SODでも菌数増加効果が見られ、カタラーゼとの併用で更なる効果が得られた。さらに、分離に用いた寒天培地からスーパーオキシドアニオン (O_2^-) が検出されたことから、これまで生育困難であった活性酸素感受性菌が分離されてきたと考えられる^{4,7,9,10)}。

以下に、1-1. 培地から発生する活性酸素種の検出と定量、1-2. ラジカルスカベンジャーを用いて分離された菌株の分類、1-3. 新属新種 *Patulibacter minatonensis* 近縁菌の土壌試料中における分布頻度、について報告する。

1-1. 培地から発生する活性酸素種の検出と定量

上述したように、分離培地にSODを添加することによりコロニー増加がみられたので、細菌や放線菌の分離に一般に用いられる Glucose Peptone Meat extract (GPM, 1.0% D-glucose, 0.5% peptone, 0.5% meat extract, 0.3% NaCl, 1.2% agar)

培地が活性酸素種を発生するのではないかと考え、 O_2 の定量を試みた。すなわち、Cytochrome C法を用いてGPM寒天培地からの O_2 発生による還元型Cytochrome Cの蓄積量を定量した。その結果、反応液に加えた寒天培地の量と反応時間に対応しての蓄積量が増加し、培地自体が O_2 を発生することが明らかになった⁹⁾。

GPM培地の他にNutrient BrothやTryptic Soy Brothからも O_2 の発生が見られた。また、GPM培地組成中の肉エキスに O_2 の高い発生が見られた(図1)。さらに、GPM培地から発生する活性酸素種を特定したところ O_2 、過酸化水素(H_2O_2)、さらに活性酸素分子種の中で最も毒性が高いと考えられるヒドロキシラジカル($\cdot OH$)が検出された。一重項酸素は検出されなかった¹¹⁾。

1-2. ラジカスカベンジャーを用いて分離された菌株の分類

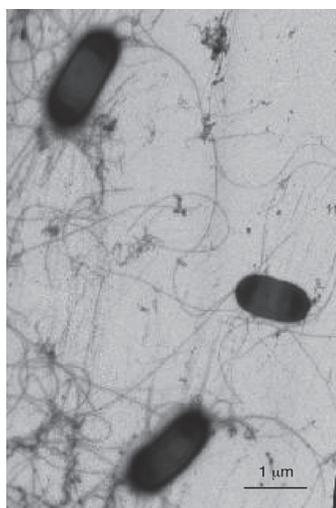
埼玉県の水田土壌を用いて放線菌類の分離を行った例では、GPM培地のみでの出現コロニー数は $2.9 \times 10^7/g$ であるのに対しSODとカタラー

ゼ添加では 6.2×10^7 コロニー/gと無添加の約2倍のコロニー数が得られた。分離菌株を比較したところ無添加では8菌種、添加では14菌種とその種類においても活性酸素除去効果が得られた。

培地から O_2 が発生しラジカスカベンジャー添加で新たな菌株が分離できることがわかったので、その分離株の一つKV-614^T株の詳細な分類学的研究を行った。本菌株の分類学的特徴を図2に示した。長い鞭毛を有する桿菌でありメナキノ組成としてActinobacteria綱(Gram-positive high G+C bacteria)では当時としては報告例の少なかったdemethylmenaquinone-7(DMK-7)を含んでいる。16S rRNA遺伝子の塩基配列による系統樹ではActinobacteria綱の根元に位置し分離例が極めて少ない一群に位置しており、新科Patulibacteraceaeを設けPatulibacter minatonensis KV-614^Tと命名し提唱した¹²⁾。

図3は、データベースに登録されている16S rRNA遺伝子塩基配列の中からPatulibacter minatonensis KV-614^Tに近い20位までを選択して系統樹を作成したものである(2006年データベース)。

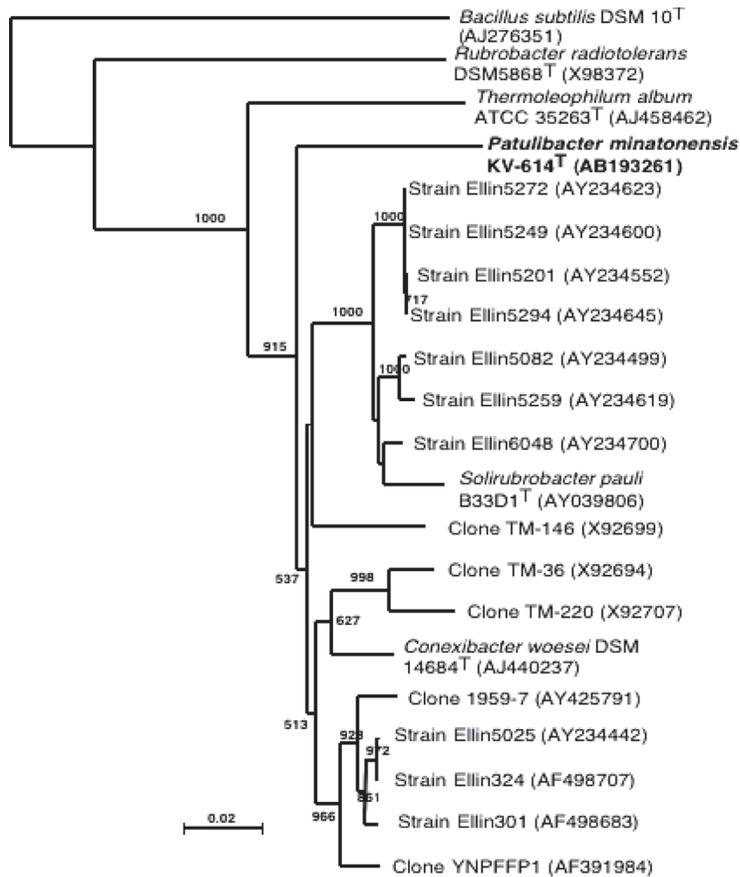
図2. 新科新属Patulibacter minatonensis KV-614^Tの分類学的特徴



透過型電子顕微鏡写真
(ネガティブ染色)

Morphology
Gram-positive
Rod with long flagella
Chemical composition
G+C %; 72
Amino acids in peptidoglycan;
meso-DAP, Ala, Glu
Acyl type of peptidoglycan; Acetyl
Menaquinone; DMK-7
Fatty acids; ω9c C18:1 (63%),
anteiso-C15:0 (10%),
anteiso-C17:0 (8%),
C16:0(4%), C18:0(4%)
Mycolic acids; none

図3. *Patulibacter minatonensis* KV-614^Tに近縁として16S rRNA 遺伝子塩基配列データベースから選択された配列との系統樹



この中には、一般に微生物分離に用いられる培地の200倍希釈寒天培地で3カ月間培養して得られた菌株 (図中でEllinと表示)¹³⁾ や土壌中のDNAクローンのみが知られているいわゆる uncultured 16S rRNA 遺伝子配列 (図中でCloneと表示) が多く含まれていた^{14,15)}。環境中より得られた遺伝子からは存在が示唆されるものの分離例が極めて少ないことを示している。

水田土壌の他に、東京の青山墓地、奄美大島などで採取した計8種類の土壌試料を用いてGPM培地にSOD, カタラーゼ, SOD+カタラーゼ, さらに、活性酸素除去効果が期待される低分子物質のアスコルビン酸ヤルチンを添加して放線菌類の

分離を行った。その結果、これら低分子物質にも効果があることがわかった。表2には、無添加では分離されなかった菌株の分類学的研究から新分類群の提唱に至った菌株と用いられたラジカルスカベンジャーを示した。本方法によって、1新科を含む4新属、8新種の提案を行い承認名となった。

1-3. 新属新種 *Patulibacter minatonensis* 近縁菌の土壌試料中における分布頻度

上述の活性酸素除去法により分離された新科新属の *Patulibacter minatonensis* KV-614^T は、これまで、ほとんど分離例のない、いわゆる uncul-

表2. 分離培地にラジカルスカベンジャーを添加して分離された新分類群の *Actinobacteria*

New taxon	Scavenger	SOD	Catalase	SOD +catalase	Ascorbic acid	Rutin	Reference
New Family							
<i>Patulibacter minatonensis</i> KV-614 ^T		1					12)
New genus							
<i>Humibacillus xanthopallidus</i> KV-663 ^T			1				16)
<i>Humihabitans oryzae</i> KV-657 ^T			1				17)
<i>Oryzihumus leptocrescens</i> KV-628 ^T , KV-647, KV-656		1	1	1			18)
New species							
<i>Arthrobacter humicola</i> KV-651 ^T				1			19)
<i>Arthrobacter oryzae</i> KV-653 ^T			1				19)
<i>Demequina salsinemoris</i> KV-810 ^T , KV-811, KV-816					2	1	20)
<i>Microbacterium aoyamense</i> KV-492 ^T				1			21)
<i>Microbacterium deminutum</i> KV-483 ^T				1			21)
<i>Microbacterium pumilum</i> KV-488 ^T				1			21)
<i>Microbacterium pygmaeum</i> KV-490 ^T				1			22)
<i>Microbacterium terricola</i> KV-448 ^T		1					23)
Total		3	4	6	2	1	

土壌試料：埼玉県の田んぼ、東京都青山、奄美大島

ured *Actinobacteria* に近縁であった。そこで、本菌株の土壌中における分布を調べることを目的に、本属および近縁属 (*Conexibacter* と *Solirubrobacter*) に特異なプライマーを設計し、土壌から直接DNAを抽出してPCRを行い590bpの特異バンドが検出される頻度をみた (図4)。その結果、東京、埼玉、茨城、千葉、沖縄等で採取した43土壌中31試料から本菌株近縁菌由来のPCR産物が検出された。採取した環境も田んぼ、畑、砂、大木の下など様々であり、実に72%の土壌試料中に *Patulibacter* 属近縁属の菌株が存在していることを示している。

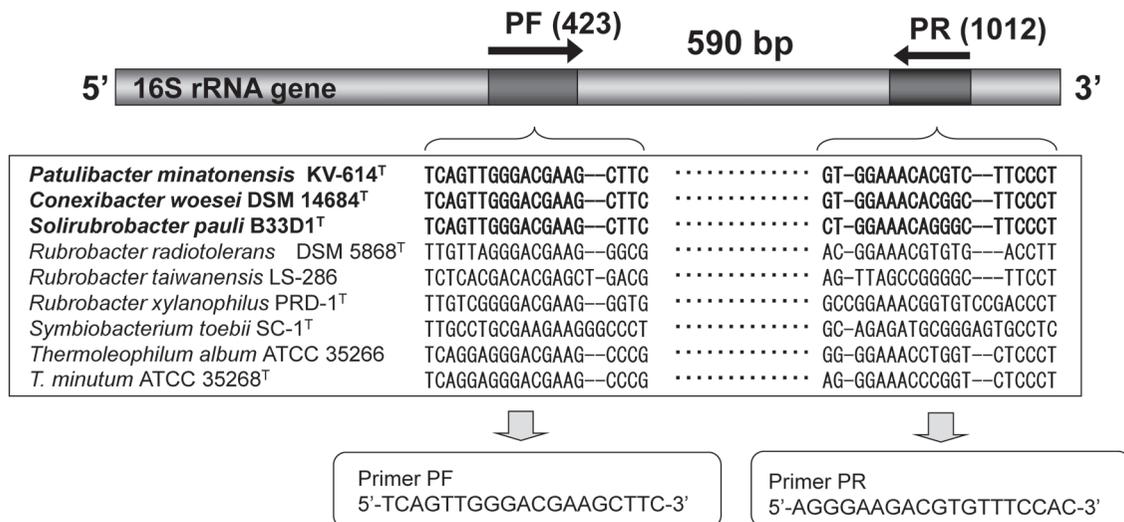
しかし、この結果のみでは、土壌試料中に生息しているのかDNAのみ存在しているかの判別はつかない。そこで、バンドが検出された埼玉県の水田土壌を用いて分離を行った。プレート1枚に出現した91個のコロニーについてコロニーPCRを行ったところ、7コロニーから目的バンドが検

出され、16S rRNA 遺伝子配列解析より5コロニーが *Patulibacter minatonensis* と同種 (相同性が99~100%) で、2コロニーは *Conexibacter* 属の菌株であった。後者2菌株は新種と考えられたので分類学的研究を進め *Conexibacter arvalis* を提唱し承認名となった²⁴⁾。

これらの結果は、これまで分離されなかった菌株が実は自然界に広く分布しており、方法を工夫することによって分離可能になることを示している。

自然環境と実験室との間には大きな隔たりがあることは改めて述べるまでもない。Yeast Extract Broth が蛍光灯の光に晒されると O_2 や H_2O_2 を発生すると報告²⁵⁾ や栄養源の豊富な培地を高圧滅菌すると H_2O_2 が発生し、この培地上で viable but non-culturable (VBNC) 状態になった *Vibrio vulnificus* がカタラーゼ添加で生育可能になったとの報告がある²⁶⁾。

図4. *Patulibacter*属およびその近縁属に特異的なプライマー



太字: *Patulibacter*属の属する亜綱*Rubrobacteridae*の中で最も近い2属にも共通な配列を示す。

これらの報告と上述した我々のデータは、未知微生物やVBNC状態の菌株の中には酸化ストレスに弱い菌株が多数存在しており、見落とされてきた可能性を示唆している。

2. 植物内生放線菌の分離と分類および新規物質の探索

2-1. 植物の根からの放線菌の分離

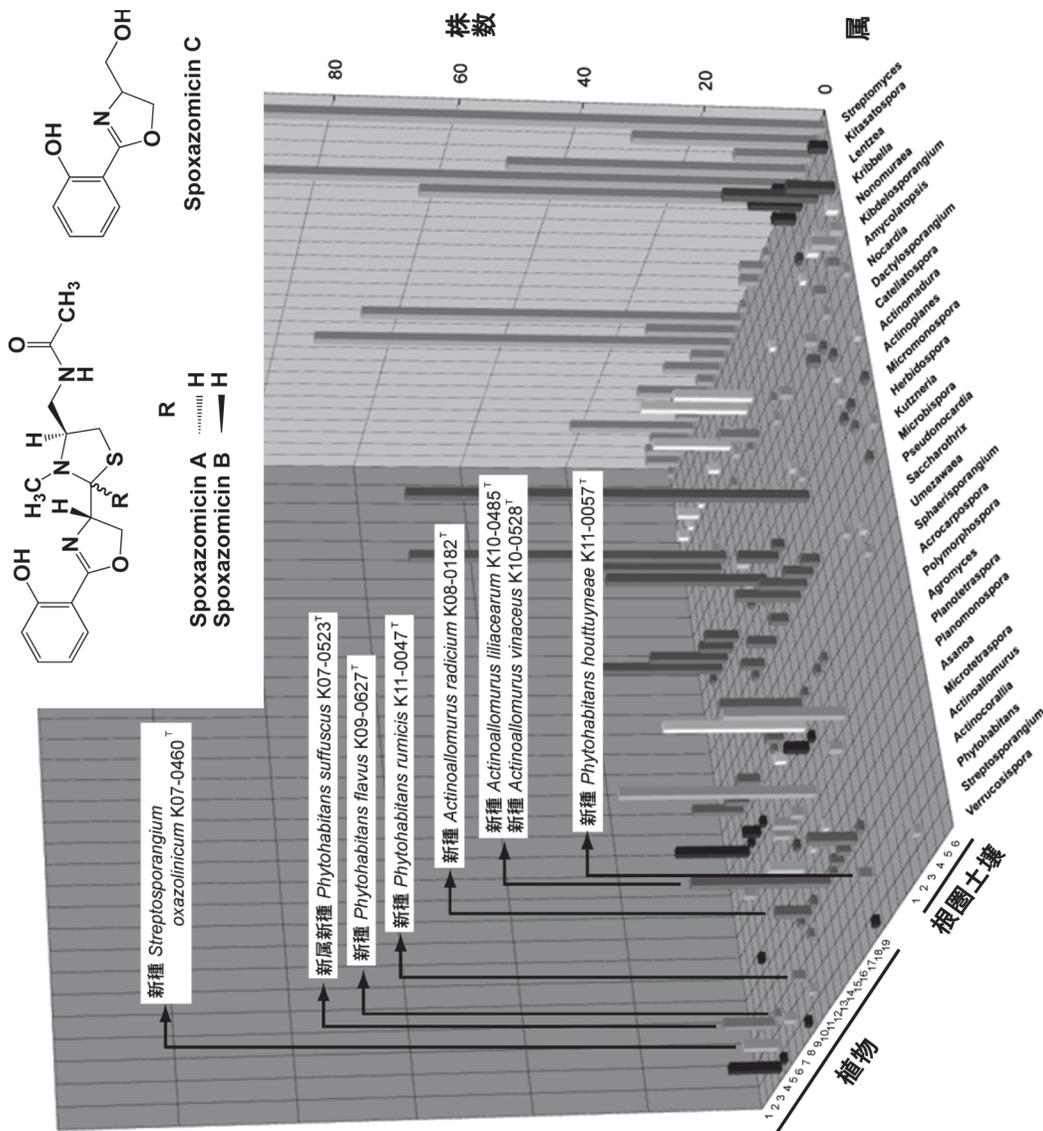
生物活性物質探索のための新たな微生物資源を得るために、植物の根に注目し放線菌の分離を行い、種レベルのフローラを調べるとともに、新規性の高い菌株について分類学的研究を進めた。また、これら分離菌株を物質生産培地で培養し培養液から新物質探索を行った。

19種類の植物の根を採取し、表面殺菌後、すり潰して試料とし、内生放線菌を分離した。この中の6試料については、その根の周囲に付着した土壌つまり根圏土壌から分離を行い、16S rRNA遺伝子配列解析による簡易同定を行った。

図5には、各試料から分離された菌株の推定属とその数を示した。多くの植物試料において

*Streptomyces*属の占める割合は低く、希少放線菌が数多く分離された。植物によってその優位な属は異なるもののその種類も豊富であった。植物試料4番のキンギンソウの場合を見てみると計80株分離され、*Micromonospora*属28.8% (23株, 8種), *Polymorphospora*属16.3% (13株, 1種), *Sphaerisporangium*属11.3% (9株, 2種)の順で多数を占め、土壌中で最も頻度の高い*Streptomyces*属は4株のみであった。さらに、このなかには、新属*Phytohabitans suffuscus* K07-0523^Tと命名し提唱した²⁷⁾菌株が含まれており、この菌株と同一菌株が9株分離された。本属は*Micromonosporaceae*科に属し本属の最も大きな特徴は細胞壁ジアミノ酸として*meso*-ジアミノピペリン酸とL-リシンの2種類を含んでいることである。本属の菌株は、他の場所で採取したキンギンソウ、スイバ、ドクダミ等からも分離され、分類学的研究の結果新たに3種を提唱し承認された²⁸⁾。また、もう一つの特徴として、植物の根から*Actinoallomurus*属の菌株が高頻度に分離されることがわかった。シュロ、リュウノヒゲ等からも分離され、*Actinoallo-*

図5. 植物の根から分離された放線菌の属の分布と新物質 Spoxazomicin の構造



- 植物サンブル
1. ヘライワツタ
 2. ハマボツス
 3. ヒメタムランウ
 4. キンギンソウ 07
 5. キンギンソウ 09a
 6. キンギンソウ 09b
 7. キンギンソウ 09c
 8. スイバ a
 9. スイバ b
 10. シュロ
 11. リュウノヒゲ a
 12. リュウノヒゲ b
 13. リュウノヒゲ c
 14. リュウノヒゲ d
 15. フキ
 16. カラスノエンドウ
 17. オニノガシ
 18. ヨモギ
 19. ドクダミ

- 根圏土壌サンブル
1. キンギンソウ 09b 土壌
 2. キンギンソウ 09c 土壌
 3. スイバ b 土壌
 4. リュウノヒゲ b 土壌
 5. リュウノヒゲ c 土壌
 6. リュウノヒゲ d 土壌

根圏土壌：根の周囲に付着していた土壌
 矢印：提唱した新属新種

murus radicum K08-0182^{T 29)} を新たに提唱し承認された。

一方、これらの根の周囲、すなわち根圏土壌6試料においては、*Streptomyces*属が優位を占め、希少放線菌の分離頻度は低く根内部とは異なるフローラを示した。一般の土壌試料から分離される放線菌の90%以上が*Streptomyces*属を占めると言われており³⁰⁾、根圏土壌からの分離の結果は*Streptomyces*属が多いという点で一般土壌と同様であった。根圏土壌と植物の根内部のフローラが大きく異なることの要因は未解明である。

2-2. 植物内生放線菌を用いた生物活性物質探索

植物内生放線菌の培養液代謝産物について各種生物活性試験とケミカルスクリーニングの一つとしてドラゲンドルフ反応試験を行った。その結果、生物活性評価系ではDinactin, Sinefungin, Aranciamycin, Juvenimicin A3等の既知物質が検出された。一方、ケミカルスクリーニングではSpoxazomicinと命名した新物質を単離することができた(図5)³¹⁾。本物質の生産菌の分類学的研究を進めたところ*Streptosporangium*属に属する新種であることがわかり*Streptosporangium oxazolanicum* K07-0460^Tを提唱し承認された³²⁾。本物質は抗トリパノソーマ活性を有し、既存薬エフ

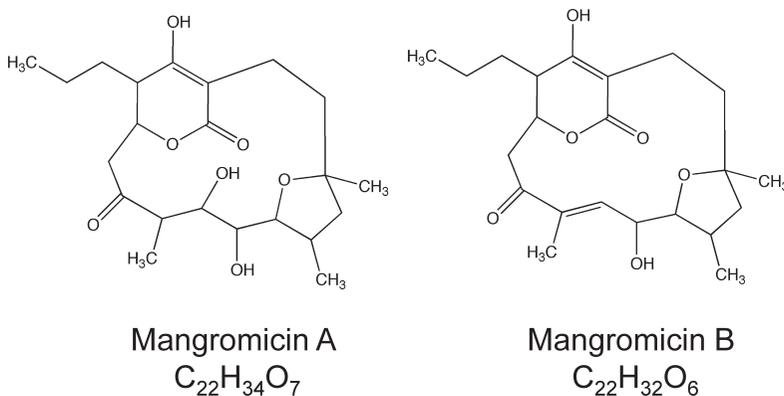
ロチニンおよびスラミンに比較し14~21倍の強い活性を示した。

以上のように、植物から分離された放線菌は分類学的にも生物活性物質探索源としても有用であることが示唆された。

3. マングローブ域由来希少放線菌培養液からの新規物質取得

汽水域に生育するマングローブ林には多様な微生物が生息することが知られている。そこで西表島のマングローブ林堆積泥5試料を採取し、65株の放線菌を分離した。16S rDNA部分塩基配列による簡易同定を行ったところ、*Micromonospora*属が44株と最も多く、次いで*Actinomadura*属、*Verrucosispora*属等の希少放線菌が分離され合わせて51株(83%)を占めた。これら希少放線菌の二次代謝産物の取得を試みた。4種類の生産培地で培養し、LC/UV, LC/MS解析により生産物質の多様性を比較した。この中から比較的生育が良好で新規性が期待される生産物質を含んでいる*Lechevalieria* sp. K10-0216を選択し、可溶性デンプン、脱脂小麦胚芽を主成分とする培地で27°C、7日間の培養を行った。15Lの培養液をエタノールで処理して、酢酸エチル抽出物よりサイクロペンタデカン骨格を有する新規物質Mangromicin A

図6. 新物質Mangromicin AおよびB



およびBを得た(図6)。両物質は抗トリパノソーマ活性を有し、特許出願を行った。

まとめ

微生物資源拡大を目的に分離源、分離法を開拓、工夫することによって分離し提唱した13新属は、16S rDNA塩基配列による系統的位置においても、グラム陽性高G+Cバクテリア(*Actinobacteria*綱)の中の広範囲に分布する。いわゆる、菌糸の伸長や胞子を形成する従来の放線菌に加え、桿菌状の菌群等様々である。この中には、活性酸素除去によって分離された4新属8新種や植物の根から分離された1新属7新種が含まれている。ほんの一部であるが、これまで分離されなかった菌株を分離できたことを示している。今回、土壤中に優先的に生息していると思われる細菌が菌体外に多量のSODを生産することを見出したことは幸運であった。自然環境中の微生物間相互作用や、実験室と自然環境とのギャップに思いを巡らし、自然に学ぶことを忘れずに、多様性に富んだ新規微生物の分離に今後とも取り組んでいきたい。

NEWMANら³³⁾によると1981年から2006年の25年間に米国FDA(United States Food and Drug Administration)で認可された医薬品の低分子化合物974のうち天然物や天然物がヒントとなって生まれた物質は63%を占める。また、その構造も多様性に富んでいる。

今回示した、SpoxazomicinsやMangromicinsは有機化学の先生にお聞きしても興味深い構造であるということである。これらの物質を発見できた理由の一つは、分離源を土壌以外の植物の根やマングローブ域に拡大したことであると思われる。しかし、他に大きな理由として二つ挙げたい。一つは、希少放線菌のなかでも研究例が少なく、その中でも生育の良好な菌株に着目し、培養条件の

検討や、代謝産物プロファイル等々、吟味して選択した菌株に集中して取り組んだこと。もう一つは、生物活性に加えケミカルスクリーニング的手法を用いたこと、であると考えている。生物活性評価による選択はその時々の評価系の種類や感度等に左右される。ケミカルスクリーニングはその微生物の能力を最大限に生かそうとする研究者の執念が問われる。

微生物は研究者の想像を超える多彩な構造物を提供してくれることを信じて、今後とも菌株1株ごとにじっくりと向き合い、新規生物活性物質の探索研究に貢献していきたい。

謝辞

微生物由来の生物活性物質探索研究において菌株の分離、培養、分類の重要性を常に説いて下さり、ご指導とご支援を賜った大村 智、現(学)北里研究所名誉理事長に深く感謝申し上げます。また、長年に渡り研究へのご助言とご支援をいただきました岩井 譲、現 北里大学北里生命科学研究所客員教授に感謝いたします。

本講演の内容は、(社)北里研究所 生物機能研究所時代から、現在の北里生命科学研究所在籍の約10年間に行われたものであり、ともに研究を行った松本厚子博士および多くの研究員、大学院感染制御科学府の稲橋佑起君と多くの学生の方々に厚くお礼申し上げます。また、化合物の構造決定では、塩見和朗教授、岩月正人博士、抗トリパノソーマ活性評価では乙黒一彦博士に大変お世話になりました。

参考文献

- 1) BERDY, J.: Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiotics* 58: 1~26, 2005
- 2) ŌMURA, S.: Splendid Gifts from Microorganisms.—The Achievements of SATOSHI ŌMURA and Collaborators—Fourth edition: Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato Univ., 2008

- 3) MATSUMOTO, A.; Y. TAKAHASHI, M. MOCHIZUKI, *et al.*: Characterization of actinomycetes isolated from fallen leaves. *Actinomycetologica* 12: 46~48, 1998
- 4) MATSUMOTO, A.; Y. TAKAHASHI, A. SEINO, *et al.*: *Longispora albida* gen. nov. sp. nov., a new genus of the family *Micromonosporaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 1553~1559, 2003
- 5) TAKAHASHI, Y. & S. ŌMURA: Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *Int. J. Gen. Appl. Microbiol.* 49: 141~154, 2003
- 6) TAKAHASHI, Y.: Exploitation of new microbial resources for bioactive compounds and discovery of new actinomycetes. *Actinomycetologica* 18: 54~61, 2004
- 7) 高橋洋子: 新物質生産菌としての放線菌の多様性—未知の微生物を探る—。日本農芸化学会誌 78: 1063~1066, 2004
- 8) MATSUMOTO, A.; Y. TAKAHASHI, Y. IWAI, *et al.*: Isolation of Gram-positive bacteria with high G+C from inside soil aggregates. *Actinomycetologica* 20: 30~34, 2006
- 9) TAKAHASHI, Y.; S. KATOH, N. SHIKURA, *et al.*: Superoxide dismutase produced by soil bacteria increases bacterial colony growth from soil samples. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49: 263~266, 2003
- 10) 高橋洋子: 難培養性放線菌の分離と分類および生物活性物質への応用。IFO Res. Commun. 24: 31~42, 2010
- 11) NAKASHIMA, T.; T. SEKI, A. MATSUMOTO, *et al.*: Generation of reactive oxygen species from conventional laboratory media. *J. Biosci. Bioeng.* 110: 304~307, 2010
- 12) TAKAHASHI, Y.; A. MATSUMOTO, K. MORISAKI, *et al.*: *Patulibacter minatonensis* gen. nov., sp. nov., a novel actinobacterium isolated using an agar medium supplemented with superoxide dismutase, and proposal of *Patulibacteraceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 401~406, 2006
- 13) JANSSEN, P. H.; P. S. YATES, B. E. GRINTON, *et al.*: Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2391~2396, 2002
- 14) SAIT, M.; P. HUGENHOLTZ & P. H. JANSSEN: Cultivation of globally distributed soil bacteria from phylogenetic lineage previously only detected in cultivation-independent surveys. *Environ. Microbiol.* 4: 653~666, 2002
- 15) JOSEPH, S. J.; P. HUGENHOLTZ, P. SANGAWAN, *et al.*: Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7210~7215, 2003
- 16) KAGEYAMA, A.; A. MATSUMOTO, S. ŌMURA, *et al.*: *Humibacillus xanthopallidus* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1547~1551, 2008
- 17) KAGEYAMA, A.; Y. TAKAHASHI & S. ŌMURA: *Humihabitans oryzae* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2163~2166, 2007
- 18) KAGEYAMA, A.; Y. TAKAHASHI, T. SEKI, *et al.*: *Oryzihumus leptocrescens* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 2555~2559, 2005
- 19) KAGEYAMA, A.; K. MORISAKI, Y. TAKAHASHI, *et al.*: *Arthrobacter oryzae* sp. nov. and *Arthrobacter humicola* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 53~56, 2008
- 20) MATSUMOTO, A.; K. NAKAI, K. MORISAKI, *et al.*: *Demequina salsinemoris* sp. nov., isolated by agar media supplemented with ascorbic acid or rutin. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1206~1209, 2010
- 21) KAGEYAMA, A.; Y. TAKAHASHI & S. ŌMURA: *Microbacterium deminutum* sp. nov., *Microbacterium pumilum* sp. nov. and *Microbacterium aoyamense* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2113~2117, 2006
- 22) KAGEYAMA, A.; Y. MATSUO, H. KASAI, *et al.*: *Microbacterium awajiense* sp. nov., *Microbacterium fluvii* sp. nov. and *Microbacterium pygmaeum* sp. nov. *Actinomycetologica* 22: 1~5, 2008
- 23) KAGEYAMA, A.; Y. TAKAHASHI & S. ŌMURA: *Microbacterium terricola* sp. nov., isolated from soil in Japan. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 53: 1~5, 2007
- 24) SEKI, T.; A. MATSUMOTO, S. ŌMURA, *et al.*: *Con-*

- exibacter arvalis* sp. nov., isolated from a cultivated field soil sample. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press)
- 25) HOFFMAN, P. S.; L. PINE & S. BELL: Production of superoxide and hydrogen peroxide in medium used to culture *Legionella pneumophila*: catalytic decomposition by charcoal. Appl. Environ. Microbiol. 45: 784~791, 1983
- 26) BOGOSIAN, G.; N. D. AARDEMA, E. V. BOURNEUF, *et al.*: Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. J. Bacteriol. 182: 5070~5075, 2000
- 27) INAHASHI, Y.; A. MATSUMOTO, H. DANBARA, *et al.*: *Phytohabitans suffuscus* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete of the family *Micromonosporaceae* isolated from a plant root. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 2652~2658, 2010
- 28) INAHASHI, Y.: *Phytohabitans flavus* sp. nov., *Phytohabitans rumicis* sp. nov. and *Phytohabitans houttuyniae* sp. nov., isolated from plant roots and emended description of the genus *Phytohabitans*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. (in press)
- 29) MATSUMOTO, A.; A. FUKUDA, Y. INAHASHI, *et al.*: *Actinoallomurus radicum* sp. nov., isolated from the roots of two plant species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. DOI 10.1099/ijs.0.029181-0
- 30) XU, L. H. & C. L. JIANG: Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China. Appl. Environ. Microbiol. 62: 244~248, 1996
- 31) INAHASHI, Y.; M. IWATSUKI, A. ISHIYAMA, *et al.*: Spoxazomicins A–C, novel antitrypanosomal alkaloids produced by an endophytic actinomycete, *Streptosporangium oxazolinicum* K07-0460^T. J. Antibiotics 64: 303~307, 2011
- 32) INAHASHI, Y.; A. MATSUMOTO, S. ŌMURA, *et al.*: *Streptosporangium oxazolinicum* sp. nov., a novel endophytic actinomycete producing new antitrypanosomal antibiotics, spoxazomicins. J. Antibiotics 64: 297~302, 2011
- 33) NEWMAN, D. I. & G. M. CROGG: Natural products as source of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod. 70: 461~477, 2007