

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22318

研究課題名（和文）抗菌物質産生及び細菌捕食能を有する蜂蜜由来菌の探索と蜂病予防への応用可能性の検証

研究課題名（英文）Search for honey-derived antimicrobial-producing bacteria and bacterial predators and evaluation of their potential for prevention of foulbroods in honeybee larvae

研究代表者

高松 大輔（Takamatsu, Daisuke）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・グループ長

研究者番号：60414728

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、国産ハチミツの中に病原体の排除に役立つ可能性のある菌が存在するか探索した。その結果、黄色ブドウ球菌、大腸菌及び蜜蜂の病原体である腐蛆病菌に抗菌効果を示す物質を産生する菌を複数株発見した。ゲノム解析の結果、これらの多くは抗菌ペプチドの遺伝子を保有していた。抗腐蛆病菌活性を示す株の中から10株を蜜蜂用プロバイオティクス候補株として選択し、それらの芽胞を蜜蜂幼虫に摂食させて毒性を確認したところ、5株は幼虫の死亡率を有意に上昇させ、幼虫に毒性を示すと判断された。残りの5株は有意な死亡率の上昇は見られなかったが、幼虫内での発芽・増殖が確認できず、幼虫腸内での抗菌物質の産生を期待できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、国産ハチミツから蜜蜂やヒトの病原体に抗菌活性を示す菌を複数発見することができた。これらはバシラス属菌やペニバシラス属菌などのグラム陽性芽胞形成菌であったが、食用として市販されているハチミツから分離した菌であり、国内でこれらの菌種によるヒトへの健康被害は報告されていないことから、将来的にプロバイオティクスとしての応用も考えられる。一方、蜜蜂に対しては、幼虫に毒性を示す菌が発見された。これらはこれまで蜜蜂の病原体としては認識されていない菌であるため、原因不明の蜂群の不調などに関与している可能性も考えられる。従って、これらの菌のさらなる研究により、蜜蜂の健康維持に貢献できると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we searched for bacteria in Japanese honey, which can be used to eliminate pathogens, and found many bacterial strains that produce antimicrobial substances effective to *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and foulbrood pathogens of honeybees. Genome sequence analysis revealed the presence of antimicrobial peptide genes in the genomes of the strains. Ten strains, which showed strong antimicrobial activity to the foulbrood pathogens, were selected as probiotics candidates for honeybees. However, five of them showed toxicity to honeybee larvae when larvae were fed with the bacteria, and thus they were disqualified as probiotics. Although the remaining five did not show toxicity to bee larvae, neither germination of the spores nor proliferation of the strains was observed in the larval gut, suggesting that these strains also cannot be used as probiotics for foulbrood prevention because antimicrobial substance production from the strains cannot be expected in the guts.

研究分野：獣医細菌学

キーワード：ハチミツ 蜜蜂 抗菌物質産生菌 アメリカ腐蛆病菌 ヨーロッパ腐蛆病菌 黄色ブドウ球菌 大腸菌 プロバイオティクス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

蜜蜂が生産するハチミツはもともと蜂自身の備蓄食であるが、人類も嗜好品として、また健康増進につながる機能性食品として長年利用している。ハチミツは蜜蜂が野外で集めてきた花蜜をもとに生産され、野外に設置された巣箱の中に蓄えられている。従って、ハチミツは無菌なものではなく、その中には様々な細菌が混入している。このような細菌の多くはその特性がほとんど解析されていない菌であり、ハチミツを食べることで蜂もヒトも様々な細菌を生きたまま摂取している。ハチミツ中の細菌の中には、蜜蜂の法定伝染病の病原体である腐蛆病菌に対して発育抑制効果を示す菌も見つけられているが、ごく限られた菌種でしかその特性は解析されておらず、ハチミツそのものの健康増進効果に比べ、ハチミツ中に存在する様々な細菌がもつ潜在的な力についてはほとんど注目されていない。

これまで研究代表者らは多くのハチミツから *Bacillus* 属、*Paenibacillus* 属、*Brevibacillus* 属、*Oceanobacillus* 属、*Virgibacillus* 属、*Cohnella* 属、*Clostridium* 属菌を含む多様な細菌株を数百株分離してきた。*Bacillus* 属や近縁属の菌の中には抗菌物質産生菌も知られているため、これら分離株の中にも蜜蜂の病原体や医療・獣医療分野で大きな問題になっている多剤耐性菌に抗菌活性を示す菌が含まれている可能性がある。さらに、上記菌株の分離過程において研究代表者らは、あたかも他種の菌を捕食しながら移動しているかのように寒天培地上を遊走する *Paenibacillus lautus* 株も見出している。実際に、自然界には細菌を捕食する細菌 (Bacterial predator) が存在しているが、もしハチミツ中にも Bacterial predator が存在し、それが蜜蜂の病原体や多剤耐性菌をも捕食して殺菌することができるとしたら、生きた抗菌剤として蜂病や耐性菌問題を解決できる新たな感染症予防法や治療法に応用できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が保有するハチミツやハチミツ由来菌株コレクションを用いて、腐蛆病菌や多剤耐性菌を捕食できる菌やその発育を抑制する物質を産生する菌を探索し、プロバイオティクスとしての応用の可能性を探ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### <抗菌物質産生菌の探索とゲノム解析>

(1) アメリカ腐蛆病菌、ヨーロッパ腐蛆病菌、黄色ブドウ球菌、大腸菌の代表株 (標的菌) を塗抹した寒天培地に直径 6mm 程度の穴をあけ、その穴をハチミツ由来菌の培養上清で満たして培養し、標的菌の発育を阻止する (阻止円が形成される) 培養上清を産生するハチミツ由来菌を探索した。ハチミツ由来菌としては、53 ロットの国産ハチミツから分離された 209 株を用いた。

(2) 国産ハチミツを希釈・遠心して得た沈渣を 5% 羊血液加コロンビア血液寒天培地に混ぜて固化し、さらに BHI 寒天培地を重層した後、35°C で 2 日間培養し、沈渣中の芽胞を発芽させた。その後、重層した BHI 寒天培地の表面にコリスチン耐性多剤耐性大腸菌を塗抹し、その発育を抑えるハチミツ由来菌を探索した。国産ハチミツは産地や蜜源が異なる 58 ロットの市販品を使用した。また、分離されたコリスチン耐性多剤耐性大腸菌に抗菌活性を示す菌株については、計 34 菌種 64 株のグラム陽性および陰性菌を標的として用いて、その抗菌スペクトルを調査した。

(3) 標的菌に強い抗菌活性を示したハチミツ由来菌の中から代表株を選び、NovaSeq6000 や PacBio RS II を用いてゲノム配列を決定するとともに、ゲノム中の抗菌ペプチド遺伝子を BAGEL4 (<http://bagel4.molgenrug.nl/>) で検索した。

#### <Bacterial predator の探索>

(1) 寒天培地の一部にアメリカ腐蛆病菌、ヨーロッパ腐蛆病菌、大腸菌、黄色ブドウ球菌を画線接種し、これら標的菌の一部に触れるように接種したハチミツ由来 *P. lautus* が数日間の培養後に標的菌に向かって遊走し、標的菌を捕食する様子があるか観察した。

#### <蜜蜂用プロバイオティクス候補株の選択と評価>

(1) 腐蛆病菌への抗菌活性の強さと範囲からハチミツ由来菌 10 株をミツバチ用プロバイオティクス候補株として選出した。また、選出した 10 株の培養上清を用いて互いに対する抗菌活性を測定し、複数の株を混ぜた状態で使用した場合の最適な株の組み合わせを選択した。

(2) 上記のプロバイオティクス候補株の安全性と有用性を確認するため、各株の芽胞を約  $1 \times 10^5$  個/幼虫/日の容量でミツバチの幼虫に与え続け、幼虫の生存率と腸内での投与菌の増殖の有無を観察した。また、プロバイオティクス候補株のうち、*Brevibacillus halotolerans* J5TS2 株については、栄養型の状態でも幼虫に投与し、幼虫の生存率と腸内での投与菌の増殖の有無を観察した。

### 4. 研究成果

#### <抗菌物質産生菌の探索とゲノム解析>

(1) 解析したハチミツ由来菌 209 株中 44 株の培養上清において、腐蛆病菌に対する抗菌効果が観察された。ヨーロッパ腐蛆病菌に強い発育抑制効果を示したのは *Bacillus paralicheniformis*

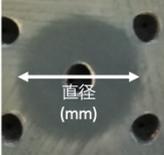
と *Bacillus haynesii* の培養上清で、最大 40mm の阻止円を形成した。*Paenibacillus azoreducens* と *Brevibacillus halotolerans* では、アメリカ腐蛆病菌に対する強い抗菌効果も観察された。  
(表 1 : 赤枠)

表 1 腐蛆病菌に対する阻止円の大きさ

株	菌種	アメリカ腐蛆病菌 (遺伝子型)		ヨーロッパ腐蛆病菌 (遺伝子型)				
		(ERIC II)	(ERIC I)	(CC12)	(CC13)	(CC3)		
J1TS1	<i>Bacillus clausii</i>	10	11	19	33	24		
J3TS3		10	9	16	22	22		
J23TS2		9	9	16	20	21		
J26TS2		11	13	20	24	26		
J27TS4		9	9	17	20	22		
J28TS3			7		12	12		
J30TS1			7		13	13		
J31TS5			8	8	11	18	20	
J32TS2			9	10	16	24	22	
J38TS5			9	9	14	22	20	
J40TS2			<7	8	9	17	17	
J41TS5			9	9	15	23	23	
J41TS6						13	14	
J46TS5			9	9	13	20	21	
J46TS6			9	9	13	20	21	
J49TS2			<7	10	17	23	24	
J49TS5				8	14	19	20	
J1TS3		<i>Bacillus fordii</i>				12		
J28TS1		<i>Bacillus haynesii</i>	<7	8	17	32	32	
J41TS8			10	20	21	34	40	
J43TS1			9	19	33	30		
J46TS2			14	22	34	37		
J2TS5	<i>Bacillus licheniformis</i>	11			<7			
J39TS6		<7						
J7TS3	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	<7	9	11	30	32		
J13TS4		9	9	15	32	34		
J15TS4		8	9	13	32	30		
J23TS8			<7	15	27	29		
J25TS1			10	18	21	34	35	
J27TS1			<7	8	18	32	36	
J28TS7			<7	8	14	29	35	
J31TS1				10	12	32	34	
J32TS1				10	18	17	37	38
J36TS2				10	21	19	36	40
J47TS8			<7	14	20	35	35	
J41TS2		<i>Bacillus sonorensis</i>	9	19	18	36	38	
J5TS4		<i>Bacillus tequilensis</i>	17	15		13	14	
J34TS1		<i>Paenibacillus azoreducens</i>	11	22	17	22	22	
J6TS7	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	9						
J27TS7		19	20					
J2TS6	<i>Paenibacillus relictisesami</i>				19	11		
J6TS6	<i>Paenibacillus telluris</i>	10	10					
J22TS3		12	12	9	9	13		
J5TS2	<i>Brevibacillus halotolerans</i>	27	22	16	21	23		

※ウェルの直径は6mm

- : <7mm
- (浅緑) : 7~10mm
- (中緑) : 11~15mm
- (濃緑) : 16~20mm
- (深緑) : 21~25mm
- (黒緑) : 26~30mm
- (黒) : ≥31mm



(2) 黄色ブドウ球菌に抗菌効果を示したハチミツ由来菌は 49 株見付き、8-13mm の阻止円を形成した。一方、コリスチン耐性多剤耐性大腸菌に抗菌活性を示す物質を産生するハチミツ由来菌も 1 株 (J32CL1 株) 発見した。

(3) J32CL1 株の培養上清は、多様なグラム陽性および陰性菌に抗菌活性を示した。特にクロストリジウム属菌、表皮ブドウ球菌、アメリカ腐蛆病菌、いくつかのレンサ球菌種、*Trueperella pyogenes* などに強い抗菌活性を示したが、ヨーロッパ腐蛆病菌、豚丹毒菌、多くの黄色ブドウ球菌株などには全く抗菌活性を示さなかった。また、大腸菌の中にも全く発育が阻止されない株も存在した。

(4) J32CL1 株のゲノムは、3,982,187 bp の 1 つの染色体で構成され、3,804 個の coding sequence が見つかった。また、BAGEL4 による検索で、Amylocyclicin を含む 3 つの抗菌ペプチド遺伝子の存在が推定された (表 2)。また、その他のゲノム解析をしたハチミツ由来菌は、1 株を除き全ての株で 1~5 種類の抗菌活性または細胞毒性を有すると推測されるペプチドの遺伝子を保有していた (表 2)。

表 2 BAGEL4による抗菌ペプチド遺伝子検索結果

株名	菌種名	BAGEL4で検出されたペプチド
コリスチン耐性多剤耐性大腸菌に抗菌活性を示すハチミツ由来菌		
J32CL1	<i>Bacillus</i> sp.	Amylocyclicin, UviB, LCI
腐蛆病菌に抗菌活性を示すハチミツ由来菌		
J1TS1	<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	BsaA2
J2TS5	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sonorensin, Lichenicidin_A1, Lichenicidin_A2(2個)
J2TS6	<i>Paenibacillus albobatus</i>	Gallidermin
J5TS1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Sonorensin, Lichenicidin_A1, Lichenicidin_A2(2個)
J5TS2	<i>Brevibacillus halotolerans</i>	Laterosporulin, UviB (3個)
J5TS4	<i>Bacillus</i> sp.	Subtilosin_(SboX), Subtilosin_A, Subtilin
J6TS7	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	Paeninodin
J14TS5	<i>Paenibacillus lautus</i>	Paeninodin
J22TS3	<i>Paenibacillus</i> sp.	Lichenicidin_A1, Thusin_beta2
J23TS8	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	Sonorensin, Enterocin_Nkr-5-3B, Plantaricin_W, Haloduracin_alpha, Lichenicidin_A2
J25TS1	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	Sonorensin, Enterocin_Nkr-5-3B, Plantaricin_W, Haloduracin_alpha, Lichenicidin_A2
J26TS2	<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	BsaA2
J27TS7	<i>Paenibacillus dendritiformis</i>	Paeninodin, viridisamide_A_AgeE (a cyanobactin)
J32TS2	<i>Alkalihalobacillus clausii</i>	BsaA2
J34TS1	<i>Paenibacillus azoreducens</i>	検出されず
J36TS2	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	Sonorensin, Enterocin_Nkr-5-3B, Plantaricin_W, Haloduracin_alpha, Lichenicidin_A2
J41TS2	<i>Bacillus sonorensis</i>	Sonorensin, Lichenicidin_A2, Haloduracin_alpha, Plantaricin_W
J41TS8	<i>Bacillus</i> sp.	Sonorensin, Enterocin_Nkr-5-3B, Plantaricin_W, Haloduracin_alpha, Lichenicidin_A2

<Bacterial predator の探索>

(1)ハチミツ由来 *P. lautus* 株が標的菌を捕食する様子は観察されず、本研究ではハチミツから Bacterial predator は発見できなかった。

<蜜蜂用プロバイオティクス候補株の選択と評価>

(1)腐蛆病予防用プロバイオティクス候補株の互いに対する抗菌活性を調べた結果、互いに殺し合わず、かつ広範囲な腐蛆病菌の増殖抑制が期待できるハチミツ由来菌の組み合わせとして表3の組み合わせが示唆された。

表3 腐蛆病菌増殖抑制に効果的であると考えられるハチミツ由来菌の組み合わせ

No.	株の組み合わせ
1	<i>P. azoreducens</i> J34TS1
2	<i>A. clausii</i> J1TS1, <i>P. dendritiformis</i> J27TS1
3	<i>A. clausii</i> J1TS1, <i>B. halotolerans</i> J5TS2
4	<i>A. clausii</i> J26TS2, <i>B. halotolerans</i> J5TS2
5	<i>B. sonorensis</i> J41TS8, <i>Bacillus</i> sp. J41TS2
6	<i>B. sonorensis</i> J41TS8, <i>B. paralicheniformis</i> J25TS1, <i>B. paralicheniformis</i> J36TS2, <i>Paenibacillus</i> sp. J22TS3
7	<i>B. sonorensis</i> J41TS8, <i>B. paralicheniformis</i> J25TS1, <i>B. paralicheniformis</i> J36TS2, <i>P. dendritiformis</i> J27TS1

(2)プロバイオティクス候補株 10 株の蜜蜂幼虫への毒性を調べた結果、5 株は幼虫の死亡率を有意に上昇させ、幼虫に毒性を示すと判断された。一方、残りの 5 株は有意な死亡率の上昇は見られなかったが、幼虫内での芽胞の発芽や発芽した栄養型菌の増殖も確認できず、幼虫腸内での抗菌物質の産生を期待できなかった。

(3)腐蛆病菌に強い抗菌活性を示し、栄養型の状態でも幼虫の餌であり強い抗菌活性を示すローヤルゼリー内である程度耐えられる *B. halotolerans* J5TS2 株を栄養型のまま幼虫に投与したが、やはり幼虫腸内での増殖は観察されなかった。

以上の様に、本研究では、国産ハチミツから腐蛆病菌や多剤耐性大腸菌などに抗菌活性を示す菌を複数見つけることができたが、腐蛆病菌への活性が強い菌はミツバチ幼虫内では増殖しないか、幼虫に毒性を示したため、これらの菌の腐蛆病予防への応用のためには、さらなる研究と工夫が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本真理子、高松大輔
2. 発表標題 国産蜂蜜に混入している菌の薬剤耐性および抗菌物質産生性
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡本真理子、高松大輔
2. 発表標題 国産蜂蜜から分離した細菌の薬剤耐性および抗菌物質産生能の解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岡本 真理子  (Okamoto Mariko)  (50828069)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・研究員   (82111)	
研究協力者	大倉 正稔  (Okura Masatoshi)  (60508315)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・主任研究員   (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------