

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650148

研究課題名(和文)カビ間の気相を介したコミュニケーション

研究課題名(英文) Volatile organic compounds emitted in the headspace by fungal colonies play some communicating roles between co-cultured ones.

研究代表者

鈴木 孝仁 (Suzuki, Takahito)

奈良女子大学・古代学学術研究センター・特任教授

研究者番号：60144135

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Aspergillus fumigatus と Fusarium solani について、カビ集落から気相に放出される揮発性有機化合物(VOC)の菌増殖に対する影響を調べた。それぞれのカビ種が培養の時間経過と共に放出するVOCをガスクロマトグラフ・質量分析計で定量的に同定したところ、A. fumigatusではヘプタナールが、またF. solaniではヘキサナールが自身の菌糸体成長を抑制する因子であること、F. solaniの放出するベンズアルデヒドは自身の菌糸体成長はほとんど抑制せず、A. fumigatusの成長は抑制することから、多感作用(アレロパシー)物質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Physiological roles of microbial volatile organic compounds (MVOCs) emitted from fungi remain to be unclear. We clarified here the function of MVOCs in terms of their activities on the fungal growth. Application of the co-culturing system in a growth chamber allowed free gas or volatile exchange between a releaser and a receiver, or between the colonies of different growth stage of the same species.

Solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) revealed MVOCs of Aspergillus fumigatus and Fusarium solani. Quantitative analysis of MVOC by GC/MS revealed hexanal from F. solani and heptanal from A. fumigatus working as the self-inhibitor of each growth. Benzaldehyde, released from the colonies of F. solani, played as an allelochemical inhibitor against those of A. fumigatus.

研究分野：微生物生態学

キーワード：MVOC fungal growth self-inhibitor allelochemical Aspergillus fumigatus Fusarium solani
fungal communication GC/MS

1. 研究開始当初の背景

(1)高松塚古墳やキトラ古墳、また各所で所蔵されている文化財では、カビをはじめとする微生物の汚染により、大きな損傷を受けてきた。また人間の生活環境においてもカビ汚染は家具や建物の劣化をもたらし、またカビ自体がアレルゲンとなってアレルギー症を引き起こす。そこで本申請者らはカビの早期検出法の研究に着手し、カビの放出する揮発性有機化合物 (MVOCs) に注目した¹⁻⁴⁾。

(2)本申請者らは、カビが放出する MVOCs が生態系において自己成長制御物質、カビ間の情報伝達物質として機能しているのではないかと仮説を考えるに至った。

2. 研究の目的

(1)カビの孢子出芽から菌糸成長、菌糸体集落形成までのどの時期に、どのような MVOC が気相に放出されるかを同定する。

(2)同種あるいは異種のカビ培養間で、気相成分だけが作用できる実験系を構築して、気相のどの成分が自己成長制御やカビ間の情報伝達に関与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 2 種のカビ *Aspergillus fumigatus* と *Fusarium solani* が放出する揮発性有機化合物 (MVOC) について、バイアル瓶での培養から得られるガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) のクロマトグラムから、市販の当該化合物の希釈系列を対照にして絶対濃度の決定を行った³⁾。

(2) 気相だけを共有する共培養実験には、3.5 cm 径のシャーレの培養基に同種あるいは異種の菌種を植菌し、別の同径のシャーレの培養基には、放出された気相成分を受容する培養を配置して、15 cm 径のシャーレ内 (チェンバー) に並べ、密封状態で共培養した。集落の大きさを成長の指標とした^{5, 6)}。

(3)密封されたシャーレ内に、MVOC として同定された市販の化学合成薬品を入れ、気相を介したカビ集落形成への影響を調べた。

4. 研究成果

(1) 孢子の出芽と菌子体成長における密度効果

A. fumigatus において、孢子 (分生子) の濃度を 5 μL 当たり 10^6 から 10^3 までに調製し、小シャーレに植菌して、1~6 個をチェンバーに入れて密封し、28°C で培養したところ、植えた分生子数の減少と共に、0.2 日から 1.7 日まで延びた。菌子体の成長速度は植える孢子数に関わりなく、1 日当たり 6 mm であった。しかし、最終的な菌子体の成長量は 6 個以上の小シャーレ培養で 10^5 と 10^2 の孢子数を植えた場合に面積比で約 40%まで低下した。*F. solani* においては、小シャーレ当りの植菌孢子数を 10^5 から 10^2 まで変化させると、発芽が認められるまでに 0.5 日から 3.4 日まで延びた。菌子体の成長速度は植える孢子数に関わりなく、1 日当たり 10 mm であるものの、最終的な菌子体の成長量は 6 個以上の小シャー

レ培養で 10^5 と 10^2 の孢子数を植えた場合にだけ面積比で約 60%まで低下した。最終の増殖量は、単に気相の酸素濃度が成長の制限因子となっているわけではないことが示唆された。

(2) 同種カビでの培養集落間での成長抑制作用

チェンバー内で、気相を共有する複数の小型シャーレ上で様々な培養時間を経過した同種のカビどうしを共培養し、成長の抑制もしくは促進が起こるかどうかを調べた。*A. fumigatus* では、孢子を植えて 2 日目以降の培養 (放出菌培養) は、チェンバーの中心に、後から植えられて置かれた小シャーレ上の培養 (受容菌培養) の孢子発芽を遅延させ、菌糸形成初期の段階で成長を抑制させることが観察された (図 1a)。この際の放出菌培養の孢子植菌数は、 10^2 から 10^3 の範囲の場合に最も成長抑制効果が大きく、放出菌培養のシャーレ数の増加と共に、受容菌培養の菌糸体成長の抑制効果が増加した (図 1b)。

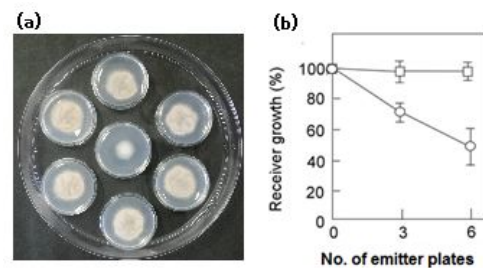


図 1. *A. fumigatus* の気相共培養による自己成長抑制現象 (a)、および受容培養の集落径の放出培養シャーレ数による減少 (b)。対照 (□) は放出培養の集落径。

F. solani では、 10^2 の孢子を植えて 3 日目以降の培養 (放出菌培養) は、 10^2 の孢子を後から植えられ、チェンバーの中心に置かれた小シャーレ上の培養 (受容菌培養) の孢子の発芽を遅延させ、菌糸形成初期の段階で成長を抑制させることが観察された (図 2a)。

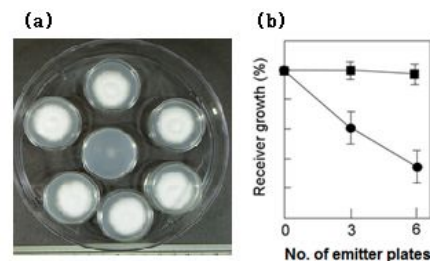


図 2. *F. solani* の気相共培養実験。中央が受容菌 (a)、対照 (□) は放出培養の集落径を示す (b)。

この際の放出菌培養の孢子植菌数は、 10^2 の場合に最も成長抑制効果が大きく、また周囲の放出菌培養のシャーレ数の増加と共に、受容菌培養の菌糸体成長の抑制が強くなった（図2b）。孢子植菌数を 10^3 以上にまで増加させると成長抑制がほとんど見られなくなった。

(3) 異種カビの培養集落間での成長抑制作用

チェンバー内で、気相を共有する2種の小型シャーレ培養間で、成長の抑制もしくは促進が起こるかどうかを調べた。中心に置かれる一方のカビ種の培養（受容菌培養）に対して、周囲を囲むもう一方のカビ種の培養（放出菌培養）の数を変えた場合、および放出菌培養の孢子植菌数、受容菌を置くまでの放出菌の培養日数について検討した。放出菌培養を *A. fumigatus* にした場合には、孢子植菌数は、 10^2 から 10^3 の範囲の場合に最も成長抑制効果が大きく、孢子植菌のシャーレ数の増加と共に、*F. solani* の受容菌培養の菌糸体成長の抑制効果が明瞭になった（図3）。しかし受容菌培養の植菌孢子数が 10^4 を超えた場合には、成長抑制作用はほとんど認められなくなった。

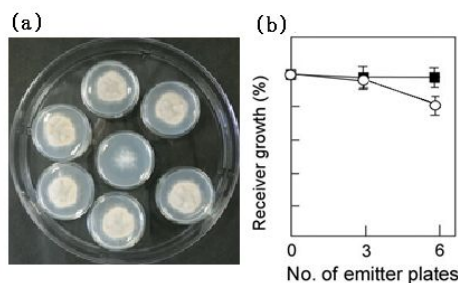


図3. 周囲を囲む放出培養 *A. fumigatus* (○) による *F. solani* 培養 (●) の成長阻害。

また *F. solani* が放出菌培養および *A. fumigatus* が受容菌培養の場合にも、受容菌培養の成長抑制が認められた（図4）。

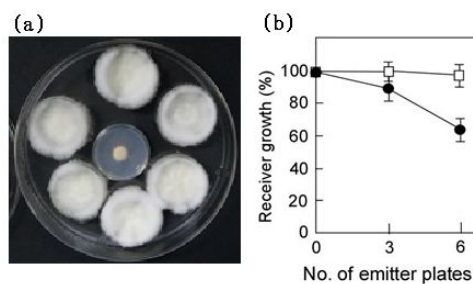


図4. 周囲を囲む放出培養 *F. solani* (□) による *A. fumigatus* 培養 (●) の成長阻害。

(4) *A. fumigatus* および *F. solani* のパイナル瓶培養での菌形体形成に伴って放出される MVOCs の同定と定量

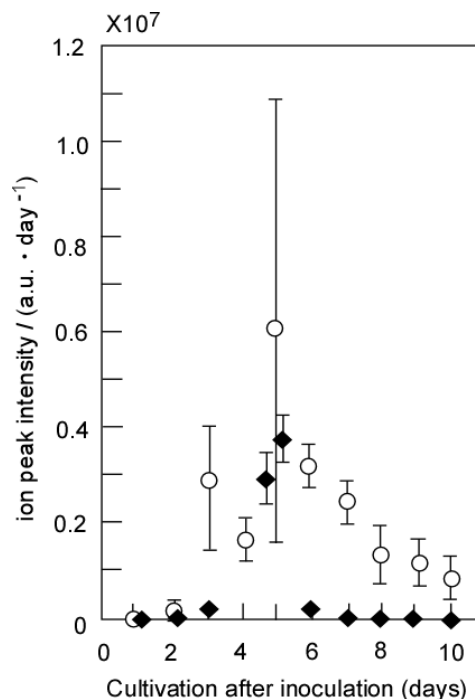


図5. *A. fumigatus* による1日当りのMVOCs放出量。ヘプタナール(○)およびベルガモテン(●)

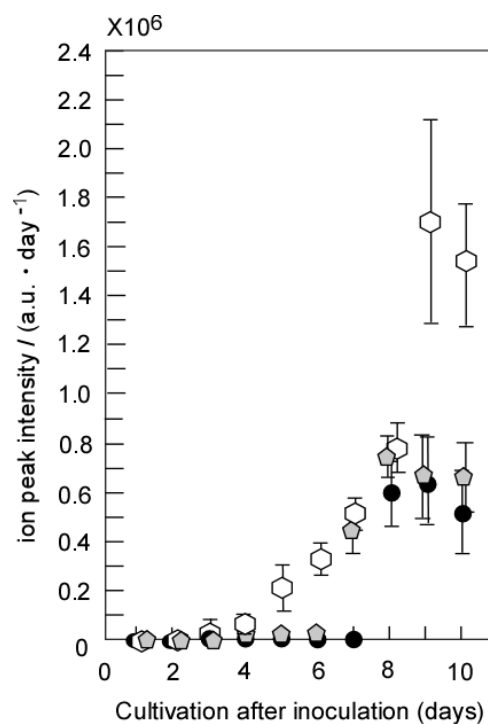


図6. *F. solani* による1日当りのMVOCs放出量。ヘキサナール(●)、ベンズアルデヒド(○)、および2-ペンタデカノン(◇)

A. fumigatus および *F. solani* が放出する

MVOC について、GC/MS による分析と同定を行った(図 5、6)。1 日ごとに気相成分の測定をしては空気に置き換えたことで、培養経過日ごとの 1 日当りの放出量を示している。両カビとも、胞子が発芽する時期には MVOCs の目立った放出が見られないことから、植菌胞子の密度が高い場合に発芽の促進にはたらく因子は少なくとも揮発性物質ではないと推測された。また、菌糸体成長と共に 1 日当りの MVOCs の放出量は、*A. fumigatus* では主にヘプタナール、ベルガモテンの増加が見られ(図 5)、*F. solani* では主にヘキサナール、2-ペンタデカノン及びベンズアルデヒドの増加がみられた(図 6)。なおこれら以外にも 1/10 から 1/100 の濃度で検出された 2-エチル-1-ヘキサノールなどの MVOCs については、データの掲載を省略した。

(5) 気相の成長阻害物質の特定

チャンバーにこれらの市販の当該化合物を 1~10 μL 添加して、2 種のカビの小シャーレ培養の成長に対する影響を調べたところ、ヘキサナール、ヘプタナールは両カビの発芽の遅れと初期の菌糸成長に 1 μL 添加量でも阻害効果が認められた。ベンズアルデヒドは *A. fumigatus* にはほぼ同様の阻害効果が認められたが、*F. solani* に対しては発芽を遅らせるものの、10 μL の添加量でも菌糸体成長には有意な阻害効果が認められなかった。また、ベルガモテンと 2-ペンタデカノンは、両カビの成長には有意な影響が認められなかった。阻害物質であるヘプタナール及びヘキサナールの気相における濃度はバイアル瓶中では、約 0.03 ppm と約 0.001ppm であり、15 cm 径の密封されたチャンバー内でカビ培養が後から胞子を植えられたカビ培養の成長を、気相を介して抑制するのに必要な市販の VOC の添加量は、0.8 mg 以上であった。添加によるチャンバー内の予想濃度は、バイアル瓶中での濃度の 100 倍ほどになった。チャンバー内で自己抑制を起こすのに必要な周囲のカビ培養の量と培養日数を考慮したそれぞれの揮発量の総量を算出したところ、阻害に必要な添加量に近づくことが分かった。そこで MVOC による成長阻害では、気相の濃度そのものが閾値となるのではなく、放出された MVOC の累積量に依存して効果が現れるとの仮説が妥当であると結論した。

よって *A. fumigatus* が菌糸体成長および胞子の発芽を共に自己抑制する現象には、胞子が植えられて 2 日後以降から多く放出されるヘプタナールが関与し、*F. solani* の同様の自己抑制現象にはやはり 3 日後以降から多く放出されるベンズアルデヒドが発芽を遅らせ、さらにその後放出されるヘキサナールが初期の菌糸体成長を抑制すると推定できた。また *A. fumigatus* の培養が *F. solani* の成長

を阻害する因子はヘプタナールであり、他方で *F. solani* の培養が *A. fumigatus* の成長を阻害する因子はヘキサナールとベンズアルデヒドであると結論できた。新たに形成される成熟胞子が培地である基質に浮遊落下するような場合には、これら MVOCs による自己成長抑制がはたらい、発芽を抑制されることにより、菌糸体全体の生存を維持している可能性も示唆される。また両カビの間での相互作用を調べた実験からは、*F. solani* から放出されるベンズアルデヒドが *F. solani* の菌糸体成長は阻害しないにもかかわらず、*A. fumigatus* の菌糸体成長を阻害することから、この MVOC がカビ間の菌糸体成長におけるアレロパシー原因物質である可能性も示唆された

<引用文献>

- 1) Korpi A, Järnberg J. & Pasanen A.-L. (2009). Microbial Volatile Organic Compounds *Critical Reviews in Toxicology* **39**, 139-193.
- 2) Lemfack, MC, Nickel J, Dunkel M, Preissner, R & Birgit Piechulla, B. (2014). mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res.* **42**, D744-D748.
- 3) Takeuchi, T., Kimura, T., Tanaka, H., Kaneko, S., Ichii, S., Kiuchi, M. & Suzuki, T. (2012) Analysis of volatile metabolites emitted by soil-derived fungi using head space solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry I. *Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Fusarium solani and Penicillium paneum*, *Surface & Interface Analysis*, **44**, 694-698.
- 4) 鈴木孝仁・木内正人・竹内孝江(2014)「文化財の微生物汚染と簡易迅速検査法」483-489, 五十君静信・江崎孝行・高鳥浩介・土戸哲明(監修)「微生物の簡易迅速検査法」
- 5) Roze, L V, Beaudry, R M, Arthur, A E, Calvo, A E. & Linz, J E. (2007). *Aspergillus* volatiles regulate aflatoxin synthesis and asexual sporulation in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7268-7276.
- 6) Brancato, FP & Golding NS (1953). The diameter of the mold colony as a reliable measure of growth. *Mycologia* **45**, 848-864.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

鈴木孝仁、中島明日香、徳山直宣、「文化財保存環境におけるカビ汚染の制御」、古代学、(査読有) 2015 年、7 号、2015、26-31.

木原山奈々、河原一樹、深草俊輔、鈴木孝仁、「膠を分解する真菌の分泌プロテアーゼ-

真菌の生育による文化財微生物汚染の観点から - 』古代学 (査読有) 6号、2014、40-48.

Daiki Asakawa, Takae Takeuchi, Asuka Yamashita and Yoshinao Wada, "Influence of metal-peptide complexation on fragmentation and inter-fragment hydrogen migration in electron transfer dissociation", (査読有) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **25**(6), 2014、1029-1039.

doi: 10.1007/s13361-014-0855-6.

鈴木孝仁「平成24年度(2012年度)独立行政法人日本学術振興会二国間交流事業「ハンガリーとのセミナー」報告書「日本とハンガリーにおける文化財保全のための微生物に関する化学生態学研究」(査読無) 2013、107頁.

本村沙織, 西山要一, 鈴木孝仁「レバノン共和国ティールの地下墓からの分離カビ」古代学、(査読有)、2013、5号、49-53.

鈴木孝仁, 木内正人, 竹内孝江、「文化財の生物被害の現状と対策 11 臭い化合物による汚染微生物の検出技術の開発」, 日本防菌防黴学会誌、(査読無) 41 巻2号、2013、93-97.

[学会発表](計22件)

竹内孝江、「ニオイ分析によるカビ種推定ソフトウェア研究」, 第334回ガスクロマトグラフィー研究会特別講演会(招待講演) 2014年12月12日、東京都大田区産業プラザコンベンションホール

鈴木孝仁、竹内孝江、木村知子、田中春菜、木内正人、「医真菌 *Aspergillus fumigatus* と *Fusarium solani* に見られる揮発性有機化合物による自己増殖抑制と多感作用」, 第58回日本医真菌学会総会・学術集会、2014年11月1~2日、神奈川県横浜市横浜産易ホール

木村知子、櫛彰子、釣沙也加、山田悠貴、柘田基子、鈴木孝仁、竹内孝江、「土壌由来カビから放出される揮発性有機化合物のIMSおよびGC/MSデータの多変量解析」, 第17回日本水環境学会シンポジウム、2014年9月8日、滋賀県彦根市滋賀県立大学

Takae Takeuchi, Shoko Ichii, Tomoko Kimura, Yoshitaka Nakamura, Toshiki Sugai, Takahito Suzuki, Tomohiro Akashi, "Development of software for identifying soil-derived fungal species with PLS analysis of SPME GC/MS and IMS data of microbial volatile organic compounds for conservation technology of cultural properties.", 20th International Mass Spectrometry Conference, 2014年8月27日、Geneva, Switzerland.

Takae Takeuchi, Haruna Tanaka, Shoko Ichii, Tomoko Kimura, Takahito Suzuki, Yoshitaka Nakamura, Toshiki Sugai, Tomohiro Akashi, "Can GC-MS and IMS data of MVOCs identify fungal species?

Development of a software for conserving cultural heritage sites?", 5th Asia Oceania Mass Spectrometry Conference (招待講演)、2014年7月18日、北京大学、China.

竹内孝江、「質量スペクトル解析における基礎理論と文化財保存への応用」, 理研シンポジウム:物質構造解析2014(招待講演)2014年6月20日、埼玉県和光市理化学研究所.

釣沙也香、紅朋浩、鈴木孝仁、木村知子、柘田基子、岩下孝、小林啓、竹内孝江、「*Aspergillus nidulans* の揮発性代謝物のGC/MS分析とセスキテルペン生成関連遺伝子の探索」, 第62回質量分析総合討論会、2014年5月15日、大阪府吹田市ホテル阪急エキスポパーク.

竹内孝江、櫛彰子、中村義隆、紅朋浩、菅井俊樹、「揮発性代謝物質のイオンモービリティによる汚染微生物の検出ソフトウェアの開発」, 第3回イオン移動度研究会、2014年4月19日、千葉県習志野市東邦大学.

釣沙也香、紅朋浩、鈴木孝仁、竹内孝江、「*Aspergillus nidulans* の揮発性代謝物のGC/MS分析とセスキテルペン生成関連遺伝子の探索」, セスキテルペンの構造解析」, 日本化学会第94春季年会、2014年3月27日、名古屋大学東山キャンパス

竹内孝江、「ニオイで菌を探る:文化財環境における真菌検出システムの開発」, 鳥取大学ポストグローバルCOE公開シンポジウム「きのこの香りを科学する」, 菌類の揮発性物質の機能、役割とその利用」, 2014年3月1日、東京都上野区国立科学博物館上野本館 講堂.

Takae Takeuchi, Shoko Ichii, Yoshitaka Nakamura, Toshiki Sugai, Masato Kiuchi, Tomohiro Akashi, "Development of a combined SPME-IMS system and the software for detecting and identifying fungal species". 9th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '13 (ALC '13), 2013年12月2日、アメリカ合衆国ハワイ州コナ市

Takae Takeuchi, Shoko Ichii, Tomoko Kimura, Takahito Suzuki, Masato Kiuchi, Yoshitaka Nakamura, Toshiki Sugai, Tomohiro Akashi, "Fungal odor detection technique and software for identifying fungal species: Analysis of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by SPME-GC/MS and IMS for conservation technology of cultural properties", (招待講演), Workshop on Strategic Japanese-Croatian Cooperative Program, 2013年11月14日、奈良市東大寺ミュージアム講堂

坂上美緒、鈴木孝仁、木村知子、木内正人、竹内孝江、「揮発性有機化合物に注目した貧栄養の水環境に生育する細菌に関する研究」, 第16回日本水環境学会シンポジウム、2013

年 11 月 9 日、沖縄県那覇市琉球大学

竹内孝江、鈴木孝仁、中村義隆、菅井俊樹、木内正人、紅朋浩、「土壌由来カビ分析における MS 技術の新展開 揮発性代謝物 MVOC のプロファイル解析」第 16 回日本水環境学会シンポジウム、2013 年 11 月 9 日、沖縄県那覇市琉球大学

竹内孝江、「フラグメンテーション機構の研究: On-および Off-Resonance CID」第 5 回 LC/MS ワークショップ、2013 年 10 月 25 日、静岡県掛川市

鈴木孝仁、「画材膠から分離された *Aspergillus parasiticus* と分泌されるプロテアーゼ」第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会、2013 年 9 月 27 日、東京都新宿区京王プラザホテル

鈴木孝仁、木原山奈々、河原一樹、宮路淳子、中沢隆、「膠に生育する真菌 *Aspergillus parasiticus* が分泌する中性金属プロイテアーゼ」、日本植物形態学会第 25 回大会、2013 年 9 月 12 日、北海道札幌市、北海道大学。

竹内孝江、釣沙也香、木村知子、鈴木孝仁、木内葉子、Berl R. Oakley、紅朋浩、「*Aspergillus nidulans* の揮発性代謝物の GC/MS 分析とセスキテルペン生成関連遺伝子の探索 I. ノックアウト株と発現誘導株」第 61 回質量分析総合討論会 2013 つくば、2013 年 9 月 12 日、茨城県つくば。

坂上美緒、鈴木孝仁、木村知子、木内正人、竹内孝江、「SPME/GC/MS 法による貧栄養の水環境に生育する細菌由来揮発性有機化合物 (MVOC) の同定 I. *Brevundimonas vesicularis*, *Pseudomonas fluorescens* および *Sphingomonas paucimobilis*」第 61 回質量分析総合討論会 2013 つくば、2013 年 9 月 11 日、茨城県つくば。

T. Takeuchi, S. Ichii, Y. Nakamura, T. Sugai, T. Akashi, M. Kiuchi, T. Suzuki, "Analysis of microbial volatile organic compounds for conservation technology of cultural heritage: development of software for fungal species identification", 44th IUPAC World Chemistry Congress, 2013 年 8 月 13 日, Istanbul, Turkey.

²¹Takeuchi, Shoko Ichii, Yoshitaka Nakamura, Toshiki Sugai, Masato Kiuchi, Tomohiro Akashi, "Development of software for detecting and identifying fungal species using GC/MS, LC/MS and IMS data of microbial volatile organic compounds", 61st ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2013 年 6 月 13 日, Minneapolis, MN, USA.

²²竹内孝江「文化財保存のための環境モニターシステムの開発 カビ臭質量スペクトルおよびイオンモビリティデータベースとカビ種推定ソフトウェア "MVOC Finder"」第 2 回イオン移動度研究会(招待講演) 2013 年 5 月 18 日、大阪府堺市大阪府立大学サイ

エンスホール。

〔図書〕(計 2 件)

鈴木孝仁、木内正人、竹内孝江、株式会社テクノサイエンス、「文化財の微生物汚染と簡易迅速検査法」、2014、790 (483-489)。

竹内孝江、化学同人、「イオンの計算化学」、2013、536(157-166)。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 孝仁 (SUZUKI, Takahito) 奈良女子大学・古代学学術研究センター・特任教授
研究者番号：60144135

(2) 研究分担者

竹内 孝江 (TAKEUCHI, Takae) 奈良女子大学・自然科学系・准教授
研究者番号：80201606

(3) 研究分担者

木内 正人 (KIUCHI, Masato) 独立行政法人産業技術総合研究所・ユビキタスエネルギー部門・主任研究員

研究者番号：50356862

2014 年 3 月 10 日以降は連携研究者として参画