

令和 5 年 9 月 8 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05716

研究課題名（和文）天然における異種微生物間の生存戦略の解明

研究課題名（英文）Analysis of life strategies in between bacteria and fungi

研究代表者

志村 洋一郎（Shimura, Yoichiro）

秋田県立大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：60332920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本課題は申請者が分離した糸状菌（カビ）とそれに拮抗する細菌（バチルス）をモデル系として、異種微生物間の相互作用や形態変化など、それぞれの生存戦略に与える分子メカニズムの解明を目的とした。

バチルス分離株はカビだけでなく、細菌や癌細胞の増殖阻害活性を示すことを明らかにした。バチルス分離株の培養液中にニンヒドリン反応を示す複数のペプチド性抗カビ物質を含んでいた。その中で2つの抗カビ物質を高度に精製し、それらのアミノ酸組成を解析した結果、両者ともに新規化合物であることが示唆された。また、ゲノム解析から、バチルス分離株は約410万塩基対からなるゲノムを保持することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は樹皮からカビとそれに拮抗する細菌を単離し、細菌の示す生育阻止円辺縁部にカビ菌糸や胞子が集積することを観察した。この現象の解明は、天然における異種微生物間の生存戦略の解明や新規物質の開発研究に役立つと考え、まずは細菌の抗カビ物質同定を目指した。

細菌分離株は複数の抗カビ物質を生産しており、そのうち2つの抗カビ物質の精製に成功した。塩酸加水分解物のアミノ酸組成を調べたところ、新規物質であることが示唆された。また、ゲノム解析から複数の抗菌リポペプチド合成遺伝子が検索された。抗カビ物質の分子進化の理解や新規薬剤開発、環境負荷の少ない抗カビ剤開発に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was that understanding molecular mechanism of life strategies in between a bacterium with anti-fungal activity and fungi.

We found that cell-free culture medium of the Bacillus isolate shown growth inhibition activity for not only fungi but also bacteria and cancer cell. And the cell-free culture medium included some anti-fungal substances with ninhydrin reaction, these were estimated anti-fungal peptides. We purified two anti-fungal substances and then applied amino acid composition analysis after HCl-hydrolyzate. The results were estimated these were novel substances.

We also performed genome analysis of Bacillus isolate, the result showed that the isolate had about 4.1Mb of genome DNA.

研究分野：微生物学、酵素学

キーワード：抗カビ物質 バチルス トリコデルマ リポペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

天然では、様々な生物が共存して栄養獲得競争をしている。緑膿菌などでは低分子化合物を介した情報伝達機構(クオラムセンシング)によるバイオフィーム形成通じ、放線菌などの抗生物質生産菌ではその生産を通じ自衛的に生息域を確保していると考えられてきた。一方で地衣類は藻類と菌類の積極的な相互作用で栄養分や特殊な二次代謝産物を生産している。しかしながら、天然における異種微生物間の生存戦略や相互作用の多くは未解明である。

申請者は、木質バイオマス利用を目指して菌株分離を実施する中で、糸状菌(カビ)とそれに拮抗する細菌(バチルス属菌)を分離した。カビ分離株はトリコデルマ属糸状菌であり、木質バイオマス利用に有効なものと考えられた。一方で、バチルス分離株の形成するカビの生育阻止円の辺縁部にカビの菌糸や胞子が集中することが観察された。このため、バチルス分離株は抗カビ活性だけでなく、標的の菌糸形状を変化させる生理活性物質を産生することが推測された。そこで、申請者が分離した株をモデル系として、抗カビ活性やカビ菌糸・胞子集積などを指標として、この分子メカニズムを明らかにすることにより、天然に近い状況におけるカビ・細菌間の生存戦略の解明や異種微生物間相互作用の理解深化につながるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、申請者が分離したカビとバチルス属菌をモデル系として用い、バチルス分離株の生産する抗カビ活性の主体の解明、カビ菌糸・胞子の形成促進活性の主体の解明、そして抗カビ活性のカビ菌糸・胞子形成への影響を明らかにし、異種微生物間の相互作用や形態変化など生存戦略に与える影響について分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。特にバチルス分離株の示す抗カビ活性の主体の解明を主な課題として研究を推進した。

3. 研究の方法

(1) 抗カビ物質の調製: バチルス分離株の48時間培養液を遠心分離に供し、得られた上清に塩酸を添加してpH 2に調整した。この塩酸酸性溶液を遠心分離に供し、得られた沈殿物を水に懸濁後、1N水酸化ナトリウム溶液にて中和し、凍結乾燥に供した。乾固物にメタノールを加えて溶出画分を得た。これを以下、メタノール抽出液とする。得られたメタノール抽出液は、10mM酢酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルを移動相とした逆相HPLCに供した。逆相HPLCでピーク分画し得られた画分8, 9, 10, および11についてシリカゲル60F₂₅₄プレートをを用いた薄層クロマトグラフィ(TLC)に供した。TLCは、展開溶媒としてクロロホルム/メタノール/水(65/50/8, 体積比)を使用した。展開・乾燥後、ニンヒドリンスプレーを噴霧し、加熱することで呈色を確認した。

(2) 抗菌スペクトルの測定: メタノール抽出液に関し、真菌18種と細菌17株に対して寒天培地での生育阻止円形成直径を測定し、直径が10mm以下を+, 11~19mmを++, 20mm以上を+++, 全くないものを-と評価した。癌細胞に対しては96穴プレートにおける増殖阻害効果をCell Counting Kit-8用い450nmの吸光度を測定し評価した。真菌は予め準備した孢子液、細菌は一晩培養液、癌細胞はB16-BL6マウスメラノーマ細胞株を被検体として用いた。なお、使用した菌株は、株名にJCMのつくものは理化学研究所バイオリソースセンター(理研BRC)より、またNBRCのつくものは(独)製品評価技術基盤機構(NITE)より購入し、それ以外は研究室保有株を使用した。

(3) 抗カビ物質の構造解析: 精製された抗カビ活性画分について、塩酸加水分解産物を簡易迅速アミノ酸組成分析に供した。また、構成アミノ酸についてDL分析を実施した。併せて各種NMRおよびMSを測定した。なお、アミノ酸分析は(株)ハイペック研究所へ依頼した。

(4) バチルス分離株のゲノム解析: バチルス分離株の一晩培養液から、市販DNA精製キットを用いてゲノムDNAを精製した。得られたゲノムDNAはPacBio RSIIを用いたゲノム解析に供した。なお、ゲノム解析は(株)マクロジェンへ依頼した。

4. 研究成果

(1) メタノール抽出物の抗菌スペクトル: メタノール抽出物について、真菌18株、細菌17株、癌細胞1株を被検菌とし、その増殖阻害活性をバイオアッセイにて検定した。真菌18株中10株に、細菌17株中9株(グラム陽性菌6株、グラム陰性菌3株)に生育阻止円を観察した(表1)。癌細胞はB16BL6マウスメラノーマ細胞株について検討した。メタノール抽出物をDMSOに溶解し添加した場合に、無添加区に対し、100mg/ml濃度添加区で約66%増殖阻害されることが明らかとなった(図1)。本研究では、メタノール抽出液について調べたが、複数の物質が含まれることが明らかなたため、今後、それぞれの成分についてその抗菌域を明確にしていく必要がある。

表1. メタノール抽出液の抗菌スペクトル (真菌・細菌)

被検菌 (真菌)	生育阻止円	被検菌 (細菌)	生育阻止円
1 <i>Aspergillus brasiliensis</i> JCM 16265	—	1 <i>Bacillus atrophaeus</i> NBRC 13721	—
2 <i>Aspergillus flavus</i> NBRC 4295	+	2 <i>Bacillus atrophaeus</i> NBRC 14117	—
3 <i>Aspergillus flavus</i> NBRC 6343	—	3 <i>Bacillus atrophaeus</i> NBRC 16183	—
4 <i>Aspergillus niger</i> JCM 16264	—	4 <i>Bacillus subtilis</i> NBRC 3134	—
5 <i>Aspergillus terreus</i> JCM 22435	—	5 <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803	—
6 <i>Aspergillus versicolor</i> NBRC 33027	++	6 <i>Enterococcus faecium</i> JCM 5804	++
7 <i>Aureobasidium pullulans</i> JCM22445	++	7 <i>Enterococcus raffinosus</i> JCM 8733	—
8 <i>Candida albicans</i> NBRC 1393	—	8 <i>Staphylococcus aureus</i> JCM 2151	++
9 <i>Candida albicans</i> NBRC 1594	—*1	9 <i>Staphylococcus aureus</i> JCM 2413	++
10 <i>Chaetomium globosum</i> JCM 22615	++	10 <i>Staphylococcus epidermidis</i> JCM 20345	+++
11 <i>Cladosporium cladosporioides</i> JCM 22444	+++	11 <i>Streptococcus pneumoniae</i> NYSHD DP-2	+
12 <i>Myrothecium verrucaria</i> JCM 22448	++	12 <i>Streptococcus pyogenes</i> RI D58	++
13 <i>Penicillium citrinum</i> JCM 22607	—	13 <i>Escherichia coli</i> NBRC 3301	—
14 <i>Penicillium pinophilum</i> JCM 5593	+	14 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	++
15 <i>Rhizopus oryzae</i> JCM 14556	—	15 <i>Pseudomonas fluorescens</i> NBRC 15842	+
16 <i>Trichoderma viridis</i> JCM 22446	++	16 <i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164	—
17 <i>Trichophyton metaglyphes</i> NBRC 32409	+++	17 <i>Serratia marcescens</i> ATTC 274	++*2
18 <i>Trichophyton metaglyphes</i> NBRC 32412	+++		

生育阻止円
 +++ : 20 mm~
 ++ : 11~19 mm
 + : ~10 mm
 — : 生育阻止円なし
 *1 : 培養上清で+
 *2 : 色素産生抑制あり

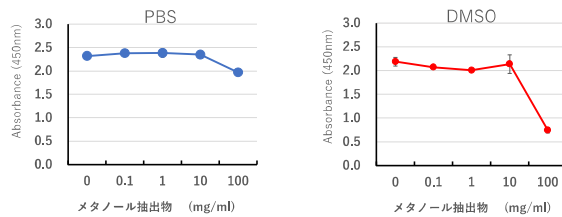


図1. B16BL6マウスメラノーマ細胞株に対する生育阻害効果

(2) 抗カビ物質の精製: メタノール抽出物を逆相 HPLC に供した結果, メタノール抽出には複数の物質が含まれることが明らかとなった (図 2)。前半のピーク画分に明確な抗カビ活性は見られなかった。後半のピーク 9, 10, 11 では, 抗カビ活性が確認された。TLC により画分 9, 10, 11 ではニンヒドリン反応を呈したことから, いずれもペプチド系物質であることが推測された。培養量を増やして精製を進め, 最終的に画分 9 を約 12mg そして画分 10 を約 30mg 得た。

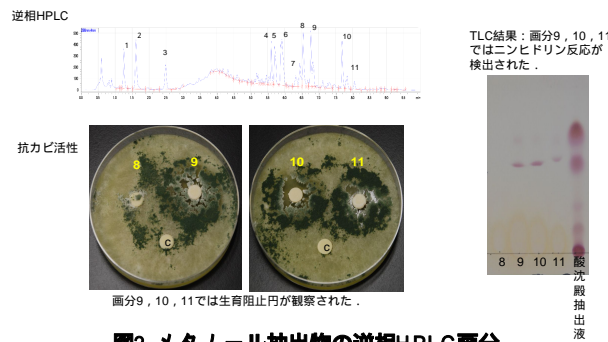


図2. メタノール抽出物の逆相HPLC画分

(3) 抗カビ物質の構造解析: 精製された抗カビ画分 9 と 10 について, 塩酸加水分解による簡易迅速アミノ酸組成分析を実施した。加えて, 画分 9 はアミノ酸 DL 分析を実施し, D-Leu, L-Leu, L-Ile, D-Allo-Ile, L-Glx, D-Tyr, L-Tyr, D-Orn, Pro の 9 種のアミノ酸で構成されることが明らかとなった。これを既知物質のアミノ酸組成と比較すると, 抗菌リポペプチド・プリパスタチンの新規類縁体であることが類推された。今後, LC-MS/MS による配列解析を実施し, 配列を決定する予定である。一方, 画分 10 は, 簡易迅速アミノ酸組成分析のほかに MULDI TOF-MS による配列解析を行い, 既知物質とは異なる組成であり, その配列は, Leu-Ile-Pro-Tyr-Val-Val-Thr-Glu, であることが明らかとなり, 新規物質である可能性が示唆された。しかしながら, NMR 結果と整合性の取れない箇所もあり, アミノ酸組成を精査する必要がある。今後, アミノ酸 DL 分析を行うとともに再度 MS による配列解析を実施する予定である。

(4) ゲノム解析: パチルス分離株は, 約 410 万塩基対からなる環状 DNA をゲノムとして保持することが明らかとなった (図 3)。抗菌リポペプチド・プリパスタチン合成遺伝子群と高い相同性を示す遺伝子群が見出され, 画分 9 がプリパスタチン類縁体である可能性のあることが裏付けられた。また, 検索の結果, 複数の抗菌リポペプチド合成酵素遺伝子群が見出され, パチルス分離株が複数の抗カビ物質を生産することが遺伝子の面からも示唆された。新規物質の可能性が示唆されたため, 本研究で見出した抗カビ物質の生合成経路を解明は, ペプチド系抗カビ物質

の分子進化の理解や新規薬剤開発，環境負荷の低い抗カビ剤開発に寄与するものと考えられた。

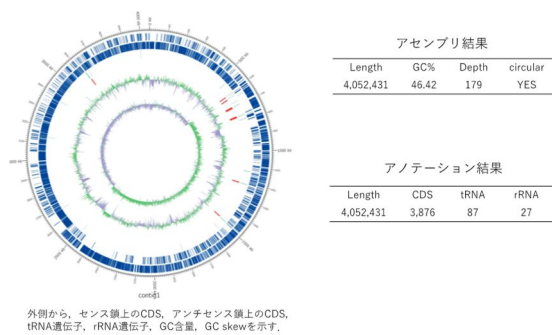


図3. バチルス分離株のゲノム解析概要

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 志村洋一郎、高橋茉佑、加藤蒼、佐藤有里華、尾形友翔、松浦成美、稲元民夫、福島淳、上松仁
2. 発表標題 Bacillus amyloliquefaciens W-0-1Aが産生する抗カビ活性について
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Bacillus amyloliquefaciens W-0-1A株の抗カビ活性に関する研究 https://akita-pu.repo.nii.ac.jp/

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 分 担 者	上松 仁 (Agematsu Hitoshi) (20435407)	秋田工業高等専門学校・その他部局等・嘱託教授 (51401)	

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
---------	---------