

Bacillus 属 TM-I-3 株の性状および非接触抗菌作用に関わる揮発性物質の探索

The Bacteriological Properties of *Bacillus* Strain TM-I-3 and Analysis of the Volatile Antifungal Compounds Emitted by this Bacteria

本論文は、一次出版論文の”*Biocontrol Science*, 2019, vol. 24, No. 3, pp. 129-136” に掲載された同表題の論文を二次出版投稿したものである。



長崎国際大学 薬学部薬学科
環境毒性学研究室 教授
博士 (薬学) 佐藤 博
Hiroshi Sato



長崎国際大学 薬学部薬学科
環境毒性学研究室 助手
博士 (薬学) 大崎 千尋
Chihiro Osaki

要旨

これまで我々は、長崎県内の土壌から単離・同定した *Bacillus* 属に属する TM-I-3 株の探索を行ってきた。この菌は、対象の真菌に触れることのない状態で抗真菌作用を示す。この非接触的抑制はあらゆる方向からの抑制を可能にし、疾患予防に貢献する可能性がある。今回の研究において、我々は TM-I-3 株の微生物学的性状を明らかにし、この菌が揮発する化合物による抗菌活性を評価した。加えて、非接触的抑制作用のメカニズムを明らかにするため、GC/MS 分析を用いて TM-I-3 株の揮発性抗菌物質を分析した。これより、TM-I-3 株が酢酸、プロピオン酸、イソ吉草酸、2-メチルブタン酸、ベンズアルデヒドといった抗菌活性が報告されている物質を産生していることが分かった。TM-I-3 株は *A. fumigatus*、*C. cladosporioides* および *P. expansum* といった真菌の抑制能力を示すため、今後は代表的な屋内の真菌による汚染やいくつかの肺疾患の予防に繋がる可能性がある。

1. 緒言

これまでいくつかの先行研究において、*Bacillus* 属の菌は抗菌効果や抗真菌効果があることが報告

されている¹⁾⁻³⁾。これまでの全ての研究は、*Bacillus* 属の菌が産生する抗菌物質が対象と直接接触することにより、真菌や細菌の成長を阻害することを示している。しかしながら、*Bacillus* 属を含むいくつかの菌が、特定の菌や真菌に対して高い増殖抑制作用を示す揮発性物質を産生する報告もある^{4), 5)}。精油の揮発性物質による抗菌作用は良く知られているが、対象に触れることなく抗菌作用や抗真菌作用を発揮する利点は、あらゆる方向からの抑制が可能であり、簡便な病気の予防法を提供できる点である^{6), 7)}。これらの特徴を利用し「家庭用微生物製剤」として、すでにいくつかの製品が市場に出回っているが、これらの製品には未だに明確な抗菌性や安全性のエビデンスがない。

我々は長崎県内の土壌から単離・同定した *Bacillus* 属に属する TM-I-3 株が、数種類の真菌に対して非接触的に抗真菌作用を示すことを発見した⁸⁾。それゆえに、今回の研究において、我々は 16S rDNA 塩基配列・分子系統解析、形態学的解析、生理学・生化学的解析より TM-I-3 株の微生物学的性状を明らかにした。加えて、非接触な真菌抑制作用のメカニズムを明らかにするために GC/MS 分析を用いて TM-I-3 株の揮発する抗菌物質を分析した。

2. 材料および方法

2.1 供試験株のスクリーニング

長崎県の土壌から採取した土壌サンプルを 0.2 M のリン酸緩衝液へと混合し、80 °C にて 10 分間加熱した。この溶液を激しく振盪させた後、普通寒天培地 (05514, Nissui Co., Ltd., Tokyo, Japan) の上に広げた。その後、この普通寒天培地を 24 時間から 48 時間かけて 50 °C の温度で恒温した。恒温後、普通寒天培地上に形成された各々のシングルコロニーをグラム染色法によりグラム陽性かグラム陰性か判定した。その後、グラム陽性になった菌株のみをそれぞれヒツジ血液寒天培地 (252201, Becton Dickinson and Company, Tokyo, Japan) に塗り広げ、溶血性の有無を確認した。この中で溶血性を示さない *Bacillus* 種の 1 つを TM-I-3 株とし本研究の供試験株とした。また、この菌株の実験サンプルは(有) T.M エンタープライズ社の碓正男氏により提供された。

2.2 被験真菌

被験真菌として、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) から分譲された *Aspergillus fumigatus* (NBRC 33022)、*Cladosporium cladosporioides* (NBRC 6348)、*Penicillium expansum* (NBRC 5453) を用いた。これらの真菌は以下順番に *A. fumigatus*、*C. cladosporioides*、*P. expansum* と表記する。

2.3 単離菌 *Bacillus* 属 TM-I-3 株の種の同定

単離菌の同定のため 16S rDNA 塩基配列・分子系統解析を各プロトコールに基づき行った。DNA はアクロモペプチダーゼ (Wako, Osaka, Japan) により抽出され、16S rDNA フラグメントは PrimeSTAR HS DNA ポリメラーゼ (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて PCR 法によって増幅した。この際、使用したプライマーは 9F と 1510R であった。精製された DNA を BigDye™ ターミネーター v3.1 サイクルシーケンスキット (Applied Biosystems, CA, USA) を用いてサイクルシーケンシング法を行った。この際、使用したプライマーは、9F、785F、1099F、536R、802R、1510R であった。

DNA 断面を ABI プリズム 3130xl ジェネティックアナライザーシステム (Applied Biosystems, CA, USA) によって電気泳動し ChromasPro 1.7 シーケンシングソフトウェア (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia) により配列した。この塩基配列を、最も近縁な微生物の 16S rRNA 遺伝子配列の代表と比較した。これより TM-I-3 株の 16S rRNA 配列を微生物同定用 DNA データベース DB-BA 10.0 (Techno Suruga Laboratory, Shizuoka, Japan) と国際塩基配列データベース (DDBJ/GenBank/EMBL) から得た。16S rRNA 遺伝子の相同率は配列の対比較によって計算された。

2.4 形態学的観察

TM-I-3 株の形態学的な特徴を決定するため、光学顕微鏡 BX50F4 (Olympus, Tokyo, Japan) より観察を行った。

2.5 生理学・生化学的解析

Barrow ら⁹⁾の方法に基づき、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、ブドウ糖からの酸/ガス産生、ブドウ糖の酸化/発酵 (O/F) の試験を行った。次に、API 50 CHB kit (bioMerieux, Lyon, France) を用いて、炭素や窒素の同化や酸化/発酵、酵素活性を試験した。また追加試験として、嫌気条件下での生育、20 °C 及び 50 °C 条件での生育、5% NaCl 条件での生育、カゼインの加水分解能およびでんぷんの加水分解能を調べた。

2.6 接触抗真菌試験

各被験真菌をそれぞれ塗り広げたポテトデキストロース培地 (以下、PDA 培地) の中央に滅菌済みのペーパーディスク (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) を置いた。このペーパーディスクの上に数滴の滅菌水を垂らして湿らせた後、37°C で 24 時間恒温した 0.01 g の TM-I-3 株含浸パーライト粉末を乗せた。コントロール群として、未含浸のパーライト粉末を用いた。このシャーレを 27°C で 7 日間恒温した。7 日後に各被験真菌のコロニーの面積を Foxit Reader® (Foxit Japan, Inc., Tokyo, Japan) を用いて測定した。

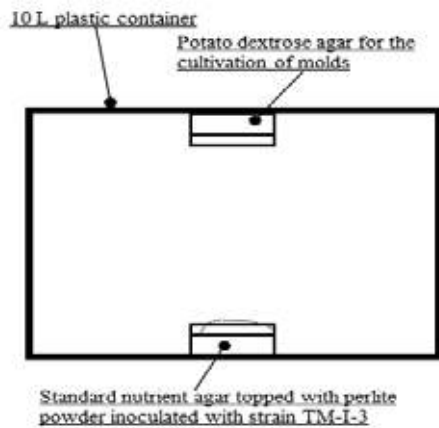


Fig.1 Structure of the experimental equipment used to measure antifungal activity without direct contact with the subject, as viewed from the side. Standard nutrient agar topped with 1.5g of perlite powder inoculated with TM-I-3 is placed at the bottom of a 10 L plastic container is. As a control group, sterilized perlite powder is used. On the opposite side, affixed to the top of the container, is placed potato dextrose agar on which each fungus is applied. This equipment is incubated at 27 °C for 7 d and the growth of the fungus is observed.

2.7 非接触抗真菌試験

TM-I-3 株含浸パーライト粉末 1.5 g を標準寒天培地（以下、SA 培地）に乗せたシャーレを 37°C で 3 ~4 時間恒温した。また各被験真菌をそれぞれ塗り広げた PDA 培地を用意した。10 L のプラスチック製の密閉箱（幅 21.6×奥行 30.9×高さ 23.8 cm）の内側の底に恒温した TM-I-3 株含浸パーライト粉末に乗せた SA 培地を設置し、密閉箱の天井の蓋の裏に用意した PDA 培地を逆さに固定した（Fig. 1）。これらの密閉箱を 27°C で 7 日間恒温した。7 日後に各被験真菌の面積を Foxit Reader® (Foxit Japan, Inc.) を用いて測定した。

コロニーの面積の平均値を用いて [1] の式から TM-I-3 株の各被験真菌の抑制率 (Inhibition ratio) を求めた。

$$\text{Inhibition ratio} = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100 \dots [1]$$

A_0 は未含浸パーライト粉末と共存させた各被験真菌のコロニー面積の平均値を示し、 A は TM-I-3 株を含浸させたパーライト粉末と共存させた場合の各被験真菌のコロニー面積の平均値を示している。

2.8 TM-I-3 株の揮発性物質の分析

2 mL のバイアルに約 0.01 g の TM-I-3 株を含浸させたパーライト粉末を採取し、37°C で 1 時間恒温した。SPME 装置の Carboxen/PDMS フィルムファイバーをセプタムを通して気相中に曝露し 37°C で 1 時間恒温した。ファイバーを鞘に戻し、その後 GC/MS で分析を行った。GC/MS 分析は Agilent 6890 inert gas chromatography system (Agilent J&W Scientific, CA, USA) を用いた。分離のためのカラムは DB-1 (60 m×0.32 mm i.d., 5.0 μm film thickness; 100% dimethylpolysiloxane) (Agilent J&W Scientific) を用いた。キャリアガスとして高純度ヘリウムガスを使用し、流量は 1.0 mL/min とした。スプリットレス注入を選択し、注入口温度は 250°C まで加熱した。GC オープンを 40°C に設定し、1 分間保持した。その後、温度勾配を 10 °C/min に設定し、280°C まで昇温、その後 20 分間保持した。検出方法は GC/MS フルスキャン、スキャンレンジは 30-300 m/z であった。

3. 結果および考察

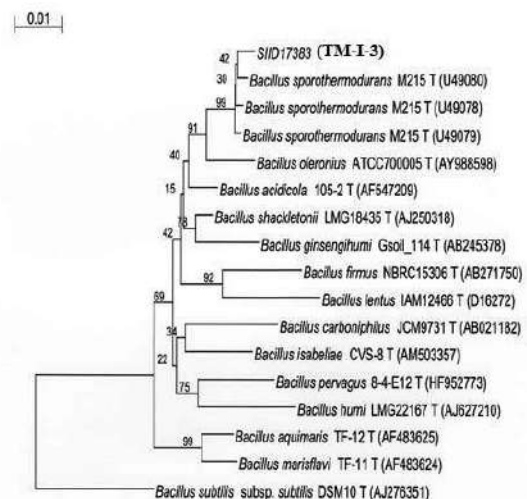


Fig.2 Phylogenetic relationship of TM-I-3, which was isolated from soil in Nagasaki, Japan and analyzed by partial 16S rDNA gene sequences. Branches show bootstrap values and scale are genetic distance.

3.1 TM-I-3 株の系統樹

Fig. 2 で示すように、微生物同定用 DNA データベース DB-BA 10.0 と国際塩基配列対する BLAST 相同性検索の結果、TM-I-3 株の 16S rDNA 塩基配列

は *Bacillus* 属の 16S rDNA 塩基配列に対し高い相同性を示した。また、*Bacillus sporothemodurans* M215 株の 3 つのアクセッション番号 (U49078, U49079, U49080) に対し相同率 99.1%~99.3% の最も高い相同性を示した。*Bacillus sporothemodurans* M215 株は、全ゲノム配列中に 3 つの配列の異なる 16S rDNA 遺伝子領域を有することが報告されている¹⁰⁾。

微生物同定用 DNA データベース DB-BA 10.0 に対する相同性検索で得られた上位 15 塩基配列を用いた 16S rDNA 塩基配列に基づく簡易分子系統解析の結果、TM-I-3 は *Bacillus sporothemoduran* M215 株の 3 つのアクセッション番号とは異なる分子系統学的位置を示していた。

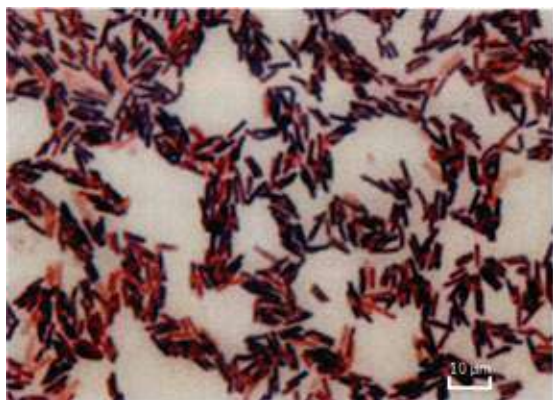


Fig.3 Gram-stained optical microscope image of strain TM-I-3

3.2 形態学的・生理学的・生化学的特徴

Fig. 3 と Table 1 で示すように、形態学的観察および生理学的解析より、TM-I-3 株は好気性条件下で生育し、運動性を有するグラム陽性桿菌で、芽胞を形成し、カタラーゼ反応およびオキシダーゼ反応はともに陽性を示した。これらの性状は、*Bacillus* 属の性状と一致する。しかしながら、API 50 CHB テストでは、Table 2 で示すように、TM-I-3 株は D-リボース、D-グルコースおよび D-フルクトースを酸化するが、D-キシロース、L-キシロースおよび D-ガラクトースは酸化しなかった。さらに、TM-I-3 株はウレアーゼ活性を示さず、アセトインを産生せず、ゼラチンを加水分解し、硝酸塩を還元しなかった。

Table 1. Bacteriological properties of TM-I-3

Test	TM-I-3	
Culture temperature	30 °C	
Morphotype	Rod-shaped (0.8-0.9×2.0-3.0 μm)	
Gram stainability	+	
Presence of spore	+	
Motility	+	
Colony	Medium	Nutrient agar
	Culture time	24 h
	Diameter	1.0-2.0 mm
	Color	Cream color
	Shape	Round
	Surface	Smooth
	Transparency	Opaque
	Viscosity	Buttery
Growth temperature	37 °C	+
	45 °C	+
Catalase reaction	+	
Oxidase reaction	+	
Acid and/or gas production from glucose test	-/-	
Oxidative-fermentation glucose test	-/-	

追加試験の結果は Table 3 に示すように、検体は嫌気条件下では生育せず、20 °C および 50 °C で生育し、5%NaCl 環境下でも生育し、カゼインおよびでんぷんを加水分解しなかった。これらの性状は、16S rDNA 塩基配列解析において近縁性が示唆された *Bacillus sporothemodurans* M215 株の性状と類似点が多く見られた。しかしながら D-グルコース、D-フラクトース、サリシンおよびセロビオースの 4 種類の糖を酸化する点やゼラチンを加水分解する点は *Bacillus sporothemodurans* M215 株の性状と異なる。

その結果、遺伝子解析においては、16S rDNA 塩基配列解析から TM-I-3 株は *Bacillus sporothemoduran* への近縁性が示唆されたものの、両者は完全には一致せず、また生理・生化学的試験においても両者の間には相違が認められた。

Table 2. Physiological tests based on API 50 CHB tests

*Fermentation test, **Biochemical test

Glycerol*	-	N-Acetylglucosamine*	+	D-Fucose*	-
Erythritol*	-	Amygdalin*	-	L-Fucose*	-
D-Arabinose*	-	Arbutin*	+	D-Arabitol*	-
L-Arabinose*	-	Esclin*	+	L-Arabitol*	-
Ribose*	+	Salicin*	+	Gluconate*	-
D-Xylose*	-	Cellobiose*	+	2-Ketogluconate*	-
L-Xylose*	-	Maltose*	+	5-Ketogluconate*	-
Adonitol*	-	Lactose*	-	ONPG**	-
β-Methylxylose*	-	Melibiose*	-	ADH**	-
Galactose*	-	Saccharose*	-	LDC**	-
Glucose*	+	Trehalose*	-	ODC**	-
Fructose*	+	Inulin*	-	CIT**	-
Mannose*	-	Melezitose*	-	H ₂ S**	-
Sorbose*	-	Raffinose*	-	URE**	-
Rhamnose*	-	Starch*	-	TDA**	-
Dulcitol*	-	Glycogen*	-	IND**	-
Inositol*	-	Xylitol*	-	VP**	-
Mannitol*	-	Gentiobiose*	+	GEL**	+
Sorbitol*	-	D-Turanose*	-	NIT**	-
α-Methyl-D-annoside*	-	D-Lyxose*	-		
α-Methyl-D-glucoside*	-	D-Tagatose*	+		

Table 3. Results of the additional physiological tests

Test	TM-I-3
Growth under anaerobic conditions	-
Growth on 5% NaCl	+
Growth temperature	
20 °C	+
50 °C	+
Hydrolysis of casein	-
Hydrolysis of starch	-

3.3 抗真菌試験の評価

TM-I-3 株の接触抗真菌試験において、コントロール群 (未含浸パーライト粉末) と実験群 (TM-I-3 株を含浸させたパーライト粉末) の間で、全ての被験真菌の総面積において有意な差は見られなかった。それゆえに、TM-I-3 株は真菌を抑制する液性の抗生物質を産生しないことが推定された (Fig.4 および Fig. 5)。

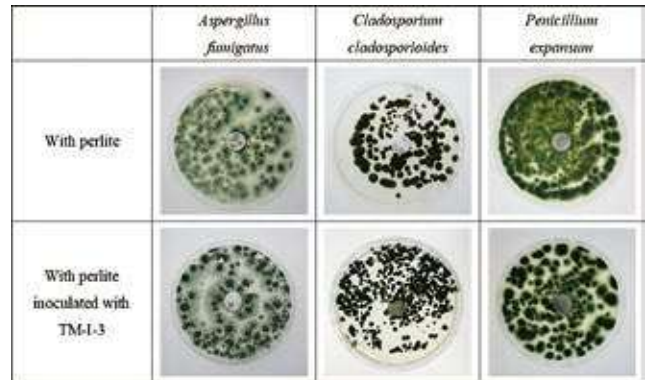


Fig.4 Antifungal activity of strain TM-I-3 upon direct contact with three different fungal strains. “With perlite” images are of the control groups and “With perlite inoculated with TM-I-3” images are of the experimental groups. Plates show growth after 7 d at 27 °C.

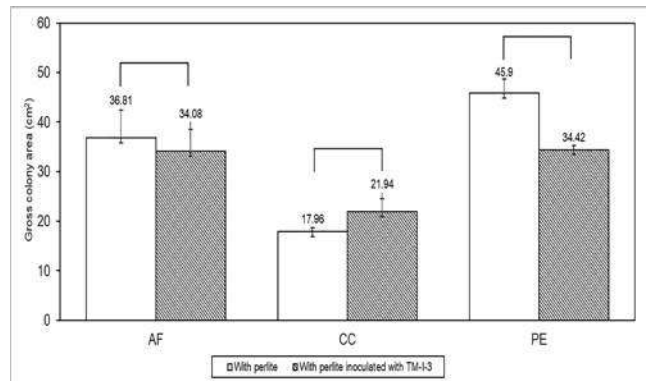


Fig.5 Differences in the gross areas of colonies of each fungus, which were calculated from the images in Fig. 4. (N=3). Statistical significance was calculated by t-test. *p<0.05, **p<0.01.

しかしながら、TM-I-3 株の非接触抗真菌試験において、実験群 (TM-I-3 株を含浸させたパーライト粉末) の被験真菌の総面積は、コントロール群 (未含浸パーライト粉末) の被験真菌の総面積より有意に小さかった (Fig. 6 および Fig. 7)。TM-I-3 株を含

浸させたパーライトと共存させた実験群の各被験真菌の抑制率(式[1]より算出)は、*A. fumigatus*、*C. cladosporioides*、*P. expansum* の順に、88.2%、100%、96.4%であった。それゆえに、TM-I-3 株が産出する揮発成分は真菌増殖を抑制することが示唆された。

これらの結果より、TM-I-3 株を用いることによって、代表的な屋内のカビ汚染を引き起こす *C. cladosporioides* の発生を非接触的に抑制する可能性が示唆された。加えて、TM-I-3 株を使用し、輸送中に食品汚染を引き起こす *P. expansum* の増殖を抑えられる可能性がある。さらに、*A. fumigatus* は肺アスペルギルス症の原因菌として知られており、TM-I-3 株は肺疾患の予防に寄与することが期待できる。

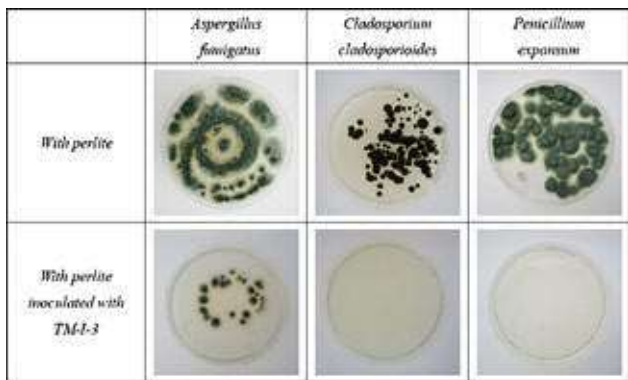


Fig.6 Antifungal activity of TM-I-3 without direct contact with three fungal strains. “With perlite” images are of the control groups and “With perlite inoculated with TM-I-3” are images of the experimental groups. Plates show growth after 7 d at 27 °C.

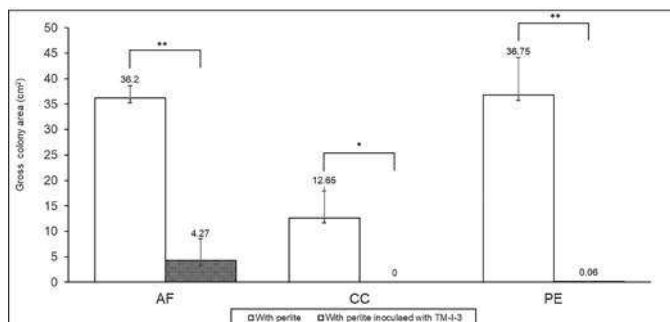


Fig.7 Differences in the gross areas of colonies of each fungus, which were calculated from the images in Fig. 6. (N=3). Statistical significance was calculated by t-test. *p<0.05, **p<0.01.

3.4 GC/MS 分析による TM-I-3 株の揮発性物質の定性

GC/MS 分析により、TM-I-3 株が酢酸、プロピオン酸、イソ吉草酸、2-メチルブタン酸、ベンズアルデヒドといった化合物を揮発していることが示された(Table 4 と Fig. 8)。

Table 4. Volatile compounds emitted by TM-I-3, identified by GC-MS

Compound	Retention time (min)
Acetic acid	10.85
Propanoic acid	13.78
Isovaleric acid	18.02
2-Methylbutanoic acid	18.34
Benzaldehyde	25.74

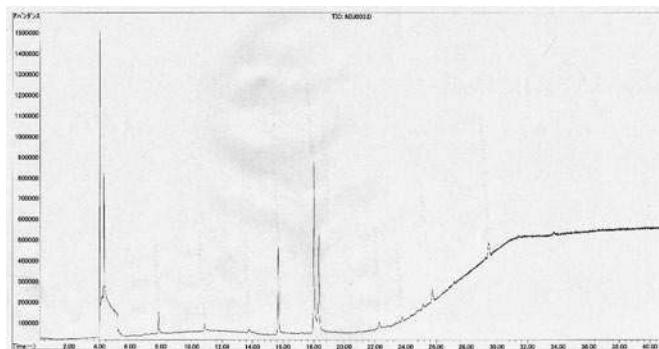


Fig.8 GC-MS-TIC of the volatile compounds from emitted from TM-I-3.

酢酸は広く強力な抗菌活性を示し、特に *P. aeruginosa* や *A. baumannii* といったグラム陰性細菌に対する抗菌効果があることが報告されている¹¹⁾。プロピオン酸は食品の保存料と同様に抗菌用の飼料添加剤として用いられていることが知られている¹²⁾。またイソ吉草酸、2-メチルブタン酸は海洋由来の菌に対して抗菌作用を持つことが報告されている¹³⁾。さらに、ベンズアルデヒドは *P. temperata* により産生され、忌避効果や抗菌作用があることが報告されている¹⁴⁾。

本研究より TM-I-3 株が抗菌作用を持つ気体を産生し、非接触的に真菌増殖を抑制したことが示された。これらの作用機構が複合的な揮発性物質の相加的・相乗的作用によるものか検討するため、今後の

研究においては TM-I-3 株が産生する揮発性物質の定量が求められる。

4. 謝辞

(有)T.M エンタープライズ社の碓正男社長と浦川真二主任研究員の多大なるご協力に深く感謝を申し上げます。

参考文献

- 1) Cubeta, M. A., Hartman, G. L., and Sinclair, J. B. (1985) Interaction between *Bacillus subtilis* and fungi associated with soybean seeds. *Plant Dis.*, 69, 506-509.
- 2) Ferreira, J. H. S., Matthee, F. N., and Thomas, A. C. (1991) Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 81, 283-287.
- 3) Todorova, S., and Kozhuharova, L. (2010) Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 1207-1216.
- 4) Howell, C. R., Beier, R. C., and Stipanovic, R. D. (1988) Production of ammonia by *Enterobacter cloacae* and its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by the bacterium. *Phytopathology*, 78, 1075-1078.
- 5) Fiddaman, P. J., and Rossall, S. (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 119-126.
- 6) Inouye, S., Takizawa, T., and Yamaguchi, H. (2001) Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.*, 47, 565-573
- 7) Ács, K., Balázs, V., Kocsis, B., Bencsik, T., Böszörményi, A., and Horváth, G. (2018) Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens, *BMC Complement Altern. Med.*, 18, e227.
- 8) Ikari, M., and Sato, H. (2016) Microorganism having antibacterial and deodorizing action/Antibacterial agent and method and deodorizing agent and method using this microorganism (in Japanese). *Japan Patent Kokai*, 2016-149963
- 9) Barrow, G. I., and Feltham, R. K. A. (1993) *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- 10) Pettersson, B., Lembke, F., Hammer, P., Stackebrandt, E., and Priest, F.G. (1996) *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 46, 759-764
- 11) Ryssel, H., Kloeters, O., Germann, G., Schäfer, T., Wiedemann, G., and Oehlbauer, M. (2009) The antimicrobial effect of acetic acid—an alternative to common local antiseptics? *Burns*, 35, 3, 695-700.
- 12) Haque, M. N., Chowdhury, R., Islam, K. M. S., and Akbar, M. A. (2009) Propionic acid is an alternative to antibiotics in poultry diet. *Bang. J. Anim. Sci.*, 38, 115-122
- 13) Hayashida-Soiza, G., Uchida, A., Mori, N., Kuwahara, Y., and Ishida, Y. (2008) Purification and characterization of antibacterial substances produced by a marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain. *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1672-1677.
- 14) Ullah, I., Kahan, A. L., Ali, L., Khan, A. R., Waqas, M., Hussain, J., Lee, I. J., and Shin, J. H. (2015) Benzaldehyde as an insecticidal, antimicrobial, and antioxidant compound produced by *Photobacterium temperata* M1021. *J. Microbiol.*, 53, 127-133.