

Short Report

Bacillus amyloliquefaciens W-O-1A 株の抗カビ活性に関する研究志村洋一郎¹, 上松仁², 高橋茉佑¹, 加藤蒼¹, 佐藤有里華¹, 松浦成美¹, 稲元民夫¹¹ 秋田県立大学生物資源科学部応用生物科学科² 秋田工業高等専門学校物質工学科

我々は新たな菌株をスクリーニングする中で、糸状菌 W-O-2B 株とそれに拮抗する細菌 W-O-1A 株を見出した。ITS 領域の配列解析で糸状菌 W-O-2B 株は *Trichoderma reesei* と 16S rRNA および DNA ジャイレース (*gyrB*) 遺伝子の配列解析で細菌 W-O-1A 株は *Bacillus amyloliquefaciens* と同定された。また、W-O-1A 株の抗カビ活性を再確認する中で生育阻止円辺縁部に菌糸や胞子が集中することを観察した。*Bacillus subtilis* や *B. amyloliquefaciens* などでは、環境に優しい生物肥料や生物農薬として植物病原菌の制御に使用されるものがある。これら分離株をモデル系とし、抗カビ物質やその作用の分子メカニズムを解明することが、新たな抗カビ剤や微生物製剤の開発に繋がると考えた。そこで、まずは W-O-1A 株の抗カビ物質の精製に取り組んだ。W-O-1A 株の培養液遠心上清を酸処理して得られた沈殿物の抽出液に抗カビ活性を認めた。これを液体クロマトグラフィに供した結果、W-O-1A 株の抗カビ活性は複数の物質から成ることが明らかとなった。

キーワード：*Bacillus amyloliquefaciens*, 抗カビ活性, *Trichoderma reesei*, バイオマス利用, リポペプチド

Bacillus subtilis や *B. amyloliquefaciens* などでは、環境に優しい生物肥料や生物農薬として植物病原菌の制御に使用されているものがある (Fira, 2018; Shafi ら, 2017)。*B. amyloliquefaciens*, 特に垂種 *plantarum* グループは、作物根圏に存在し植物体の成長誘導することや二次代謝産物産生することが知られ、穀類など作物生産の生物肥料や生物農薬としての利用されている (Borriss, 2011)。また、モモ核化症カビ *Botryosphaeria dothidea* に拮抗する SYBC Y47 株 (Li ら, 2016), クワ炭疽病カビ *Colletotrichum dematium* に拮抗する RC-2 株 (Yoshida ら, 2001), テンサイ根腐れ病カビ *Rhizoctonia solani* に拮抗する K103 株 (Zhang ら, 2013), 麦類赤カビ病カビ *Fusarium graminearum* に拮抗する S76-3 株 (Gong ら, 2017) そして収穫後に問題となるアフラトキシン産生カビ *Aspergillus parasiticus* (Siahmoshteh ら, 2018) などに拮抗する菌株が報告されている。それらの抗カビ物質は、いずれもリボソーム非依存的に生合成

されるリポペプチド類 (Non-ribosomal synthesis lipopeptides) の iturin A や fengycin, bacillomycin そして surfactin などである (Fira, 2018)。また、多くの *Bacillus* 属菌は別の細菌を抑制する抗菌物質 (バクテリオシン) なども産生する (Abriouel ら, 2005)。

我々はバイオマス利用のための新たな菌株をスクリーニングする中で、糸状菌 (以下、カビと略) とそれに拮抗する細菌 W-O-1A 株を見出した。また、W-O-1A 株の抗カビ活性を再確認する中で生育阻止円辺縁部に菌糸や胞子が集中する現象を観察した。このような現象はほとんど報告がないため、我々の分離菌株をモデル系として使用し、抗カビ物質やその作用に関する分子メカニズムを解明することが新たな抗カビ剤や微生物製剤の開発に繋がると考え、まずは W-O-1A 株の抗カビ物質の同定を目的に実験を行った。

材料と方法

菌株スクリーニング

秋田県と青森県の県境付近で採取した樹皮片を滅菌ピンセットで細断し滅菌生理食塩水に懸濁した。懸濁液 0.1 mL を Wickerham 寒天培地 (Wickerham, 1956) に滴下し、滅菌コンラージ棒で全面に塗り広げた後 25℃ で培養した。カビとそれに拮抗する菌株を観察した後、カビはポテトでキストロース (PD) 寒天培地 (日水製薬) の、細菌はトリプトソーヤ (TS) 寒天培地 (日水製薬) の斜面培地に摂取し保存菌株とした。得られた細菌の抗カビ活性の再現性を PD 寒天培地でのバイオアッセイにて確認した。

カビ分離株は ITS (Internal Transcribed Spacers) 領域を、そして細菌分離株は 16S rRNA 遺伝子および DNA ジャイレース遺伝子 (*gyrB*) をコロニーPCR にて増幅し、その増幅産物の配列解析により菌種を同定した。使用したプライマ配列は付録 1 に示す。なお、配列解析は秋田県立大学生物資源科学部バイオテクノロジーセンタに依頼した。

生物検定方法

カビ分離株を PD 寒天培地に接種し胞子が十分に形成されるまで室温で培養した後、胞子液作成用界面活性剤 (相原ら, 2002) を培地上に適量加え、滅菌コンラージ棒で培地表面を懸濁して胞子懸濁液を得た。得られた胞子懸濁液は 4℃ で保存した。

胞子懸濁液を胞子液作成用界面活性剤で適当に希釈し、PD 寒天培地に 0.1 mL 滴下しコンラージ棒で全面塗布した後、抗生物質検定用濾紙 (直径 8 mm, 厚み 1.5 mm, アドバンテック東洋) にあらかじめ TS ブイヨン (日水製薬) で一晚培養した細菌分離株培養液あるいは培養液の遠心上清を滴下、風乾して作成した検定用ディスクを置き、30℃ で培養した。その後、カビの生育阻止円の有無により、抗カビ活性を判定した。また、同方法で、2 種の *Bacillus subtilis* 属由来の市販抗菌物質、iturin A と surfactin (いずれも 0.5 mg, SIGMA), について W-O-2B 株への抗カビ活性を確認した。

抗カビ物質の抽出

細菌分離株は TS ブイヨンで、2 日間、37℃ で振とう培養した。培養液を 10,000 rpm, 20 分の遠心分離に供し上清を得た。Li らの方法 (2016) に従い、W-O-1A 株の 2 日間培養液 1.3 L の遠心上清を塩酸酸性とし、酸沈殿物を得た。酸沈殿物のメタノール抽出液をエバポレータで濃縮乾固したのち滅菌水に懸濁し酸沈殿抽出液を得た。この酸沈殿抽出液を分取液体クロマトグラフィ (HPLC) に供し、得られた画分について生物検定法にて抗カビ活性を確認した。なお、分析用 HPLC は、InertSustain C18 カラム (0.2 μm, φ2.1×75 mm, GL サイエンス) を用い、カラム温度 40℃, 5% アセトニトリルを含む 20 mM 酢酸アンモニウムを移動相とし、アセトニトリルの直線濃度濃勾配で溶出を行った。シグナルは 280 nm の吸光度で検出した。

結果および考察

我々はバイオマス資源の利用を目指し菌株のスクリーニングを行った。その中で、樹皮片の懸濁液を Wickerham 寒天培地上に滴下して培養したところ、糸状菌とそれに拮抗する菌株を見出した (図 1)。カビ分離株を W-O-2B 株とそれに拮抗する細菌分離株を W-O-1A 株とした。

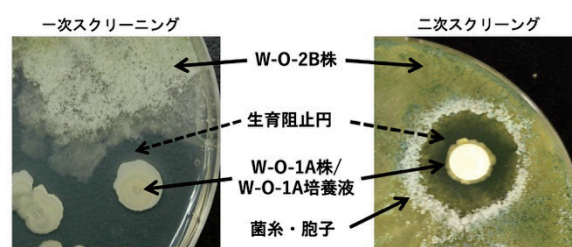


図1. 菌株スクリーニング

W-O-2B 株は ITS 領域の配列で、NCBI-BLAST 解析し、*Trichoderma reesei* (完全世代 *Hypocrea jecornia*) と簡易同定した。また、W-O-1A 株は 16S rDNA 配列による *Bacillus amyloliquefaciens* と高い相同性 (> 99%, 未発表データ) を示し簡易同定した。*Bacillus* 属では、16S rDNA 配列による近縁種間の比較には不十分であるとの報告もあることから (Onodera と Sato, 1999; Wang ら, 2007), *gyrB* の配列解析も実

施し同様の結果を得たことから、これで同定した。

W-O-1A 株の抗カビ活性を PD 培地での生物検定法で再確認したところ、W-O-1A 株の W-O-2B 株に対する抗カビ活性を確認すると同時に生育阻止円辺縁部に菌糸や胞子が集中することを見出した(図 1)。辻ら(1990)は、*Bacillus* 属分離株がイネごま葉枯病カビ *Helminthosporium oryzae* の生育阻害活性を示し、その生育阻止円辺縁部で菌糸の破壊と多数の厚膜化した細胞の存在を報告した。そのため、我々も生育阻止円辺縁部を光学顕微鏡や走査型電子顕微鏡(TM3030, 日立ハイテク)で観察したが、同様な状態は認められなかった(未発表データ)。そのため、抗カビ物質の別の作用点があるものと推測している。

B. amyloliquefaciens SYBC H47 は bacillomycin L, fengicin そして surfactin を産生し、それぞれのカビ菌糸成長に与える影響は、約 40%, 約 45% そして約 10% であり、それらを混合すると約 55% に上昇すること (Li ら, 2016) や *Bacillus methylotrophicus* XT1 CECT8661 では bacillomycin, fengicin そして surfactin が産生されるがこれらが灰色カビ *B. cinerae* に対する活性物質であるとの明確な物質同定は言及していない (Toral ら, 2018) などのことから、W-O-1A 株の抗カビ物質を見積もるために、*B. subtilis* 由来の 2 種の市販抗菌物質 iturin A と surfactin について W-O-2B 株に対する生物検定を実施した。その結果、iturin A でのみ W-O-2B 株の生育阻止円を認めた(未発表データ)。Surfactin はバイオサーファクタント(生物界面活性物質)であり、フィブリン凝塊阻害や赤血球の溶解作用 (Arima ら, 1968; Bernheimer と Avigad, 1970), 微生物のプロトプラストやスフェロプラスの溶解作用 (Hosono と Suzuki, 1983) そしてガン細胞の増殖抑制作用 (Wu, 2017) などが知られている。そのため、W-O-1A 株の W-O-2B 株に対する抗カビ活性に surfactin はほとんど関与しないかあってもごく僅かであると推測している。

W-O-1A 株の抗カビ物質の単離を目指して実験を行なった。W-O-1A 株の 2 日間培養液の遠心上清の酸沈殿物の抽出液に抗カビ活性を確認し、これを逆相 HPLC に供した結果、大きなピークを 10 ほど検出した(図 2)。都合 6 画分として、それぞれの画分

の抗カビ活性を生物検定法にて確認した(図 2)。いずれの HPLC 画分からも大小はあるが生育阻止円とその周囲に菌糸や胞子の集中する現象が観察された。

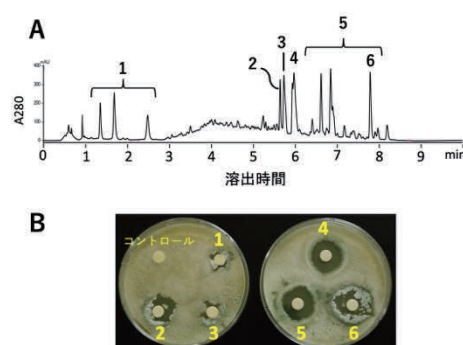


図2. W-O-1A 株の培養液酸沈殿抽出液からの抗カビ物質の抽出

A, 逆相HPLC結果; B, HPLC画分のバイオアッセイ結果(培養4日目); 数字は逆相HPLCで分画した画分番号を示す。詳細はテキストに示す。

このことから、W-O-1A 株の示す抗カビ活性と生育阻止円周辺の菌糸や胞子の集中には複数の抗カビ物質が関わることが明らかとなった。今後、精製を進め、それぞれの画分に含まれる物質を決定する予定である。

本研究は、バイオマス利用菌をスクリーニングする中で *Trichoderma reesei* W-O-2B 株とそれに拮抗する *Bacillus amyloliquefaciens* W-O-1A 株を見出し、W-O-1A 株の抗カビ物質の精製を目的に行った。W-O-1A 株培養液遠心上清の酸沈殿抽出液の HPLC 分析の結果、抗カビ活性には複数の物質が含まれていることが明らかとなった。

一方で、*T. reesei* は古くからセルラーゼ産生菌として知られ、木質バイオマス利用に何かしら応用できるものと考えられた。近年、キノコ類の菌床栽培で *Trichoderma* 属カビによる品質低下や生産環境汚染が問題となることがあるため、我々が分離した菌株をモデル系として、カビ-細菌間の生存戦略の分子メカニズムを解明することは、菌床キノコ栽培などで使用する抗カビ剤選択に有益な情報を与えるとともに新たな抗カビ剤や微生物製剤開発に繋がるものと考えている。

謝辞

本研究は秋田県立大学学長プロジェクト研究費(創造的研究費 2016; 科研費チャレンジ研究費 2018)

および JSPS 科研費 JP19K05716 の助成を受けて実施された。電子顕微鏡観察は秋田県立大学共通機器委員会の世話になった。英文校正は Enago (www.enago.jp) で行われた。この場をかりて謝意を記します。

文献

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews* 35: 201-232.
- 相原真紀, 花澤良, 小菅旬子, 李憲俊, 村松芳多子, 太田利子, 高鳥浩介 (2002). 「孢子液作成用界面活性剤」『かび検査マニュアルカラー図譜』(p. 86) 高鳥浩介監修, テクノシステムズ, 東京.
- Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G. (1968). A crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 31: 488-494.
- Arrebola, E., Jacobs, R., Korsten, L. (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 108: 386-395.
- Berheimer, A. W., Avigad, L. S. (1970). Nature and properties of a cyclic agent produced by *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology* 61: 361-369.
- Borriss, R. (2011). Use of plant-associated *Bacillus* strains as biofertilizers and biocontrol agents. *Bacteria in agrobiology: plant growth response* (pp. 41-76). (Ed.) Maheshwari D. K. Springer, Heidelberg, Germany.
- DunLap, C. A., Bowmanm M. J., Schisler, D. A. (2013). Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: A biocontrol antagonist of *Fusarium* head blight. *Biological Control* 64: 166-175.
- Fira, D., Dimki'c, I., Beri'c, T., Lozo, J., Stankovi'c. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology* 285: 44-55.
- Gong, A., Li, H., Yuan, Q., Song, X., Yao W., He W., Zhang, J., Liao, Y. (2015). Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 10: e0116871.
- Gu, Q., Yang, Y., Yuan Q., Shi, G., Wu, L., Lou, Z., Hou, R., Wu, H., Borriss, R., Gao, X. (2017). Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology* 83: e01075-17.
- Hanif, A., Zhang, F., Li, P., Li, C., Xu, Y., Zubair, M., Zhang, M., Jia, D., Zhao, X., Liang, J., Majid, T., Yan, J., Farzand, A., Wu, H., Gu, Q., Gao, X. (2019). Fengicin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis. *Toxins* 11: 295-305.
- Hosono, K., Suzuki, H. (1983). Acylpeptides, the inhibitors of cyclic adenosine 3' -5' monophosphate phosphodiesterase. III. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase. *Journal of Antibiotics* 36: 679-683.
- Lane, L. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (pp.115-175). (Ed.) Stackebrandt, E. & Goodfellow, M. John Wiley & Sons Ltd. Chichester.
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., Liao, X. (2016) Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of Peach gummosis. *PLoS ONE* 11: e0162125.
- Onodera, Y., Sato, K. (1999). Molecular cloning of *gyrA* and *gyrB* genes of *Bacteroides fragilis* encoding DNA gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 2423-2429.
- Shafi, J., Tian, H., Ji M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31: 446-459.

- Siahmoshteh, F., Hamide-Esfahani, Z., Spadaro, D., Shams-Ghahfarokhi, M., Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Food Control* 89: 300-307.
- 辻久生, 辻美保子, 上田博夫. (1990). 「*Bacillus* 属細菌培養液の抗菌活性と培地組成の検討」『日本農薬学会誌』 15: 1-6.
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology* 9: article 1315.
- Veras, F. F., Correa, A. P. F., Welke, J. E., Brandelli, A. (2016) Inhibition of mycotoxin-producing fungi by *Bacillus* strains isolated from fish intestines. *International Journal of Food Microbiology* 238: 23-32.
- Wang, L-T., Lee, F-L., Tai, C-J., Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequence, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1846-1850.
- White, T., Burns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A guide to methods and application* (p. 315-322). (Ed.) Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T. J., Academic Press Inc., San Diego.
- Wickerham, L. J. (1951). *Taxonomy of Yeasts* (Technical Bulletin No.1029). United States Department of Agriculture. Washington D. C.
- Wu, Y., Ngai, S., Goh, B., Chan, K., Lee, L., Chuah, L. (2017) Anticancer activity of surfactin and potential application of nanotechnology assisted surfactin delivery. *Frontiers in Pharmacology* 8: article 761.
- Yoshida, S., Hiradate, S., Tsukamoto, T., Hatakeda, K., Shirata, A. (2001). Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology* 91: 181-187.
- Zhang, B., Dong, C., Shang, Q., Cong, Y., Kong, W., Li, P. (2013). Purification and partial characterization of bacillomycin L produced by *Bacillus amyloliquefaciens* K103 from lemon. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 171: 2262-2272.

〔 令和 2 年 2 月 29 日受付
令和 2 年 3 月 9 日受理 〕

Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* W-O-1A

Yoichiro Shimura¹, Hitoshi Agematsu², Mayu Takahashi¹, So Kato¹, Yurika Sato¹,
Narumi Matsuura¹, Tamio Inamoto¹

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University

² Department of Applied Chemistry, Akita National College of Technology

We found a *Trichoderma reesei* W-O-2B and an antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* W-O-1A in our screening for biomass utilization. Also, we discovered concentrated mycelia and conidia of W-O-2B at the edge of the growth inhibition circle formed by W-O-1A when reexamining antifungal activity. Many strains of both *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens* have been used as an environment friendly biofertilizer and biopesticide. Therefore, we predict that a novel antifungal agent and bacterial agent can be developed by finding a relationship between bacteria and fungi. We also carried out the purification of an antifungal substance produced by W-O-1A. Antifungal activity was found in an extract from the acid precipitation of a supernatant of a centrifuged two-day culture broth of W-O-1A. The extracts were subject to high performance liquid chromatography with reverse phase column and the results showed ten major peaks in the chromatogram, indicating that antifungal activity was composed of some substances.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, antifungal activity, *Trichoderma reesei*, lipopeptide, biomass utilization

付録 A

本研究で使⽤したオリゴ DNA プライマー覧

プライマ名	配列 (5' -3')	増幅部位	適⽤	参考文献
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	ITS 領域 (カビ)	遺伝子増幅, 配列解析	White ら, 1990
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		遺伝子増幅, 配列解析	White ら, 1990
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA 遺伝子	コロニーPCR, 配列解析	Lane, 1991
519F	CAGCCMGCCGCGGTAATWC		配列解析	Lane, 1991
1114F	GCAACGAGCGCAACCC		配列解析	Lane, 1991
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT		コロニーPCR, 配列解析	Lane, 1991
gyrB_F1	ATGTTAGAAATAGATTCTTAGCGGAT	<i>gyrB</i>	遺伝子増幅, 配列解析	本研究
gyrB_R1	CTGTTTGAAGCAGCTTTGAG		遺伝子増幅, 配列解析	本研究

Y = C or T, K = G or T, W = A or T