

# 抗菌微生物の探索

生物資源科学部 応用生物科学科

1年 角野 七海

1年 松村 美音

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

准教授 志村洋一郎

## 1. 背景・目的

今日の日本において、食中毒による患者数は減少傾向にある。しかし、いまだ食中毒の危険は身近にある。微生物には、驚くべき能力を持った未知のものが無数に存在するため、食中毒菌の生育阻害を指標として抗菌性物質を生産する微生物を見つけることで、食中毒予防の一助になると考えた。そこで、土や木片、鳥のフンなど天然に存在する微生物を対象にして、それぞれの地元や秋田県内のあらゆるところから試料を集め、集めた試料に含まれている微生物が食中毒の起因菌の一つである黄色ブドウ球菌の生育阻害を示すかどうかを指標に菌株分離を行った。

## 2. 材料および方法

<試験試料>：抗菌活性を示す菌株を分離する試料は、それぞれの出身地や旅行先で収集した。採取場所一覧を表1に示す。なお、試料は市販の使い捨てプラスチックスプーンにて採取し、チャック付きの小さなプラスチックバッグに入れて運搬し、使用まで-80℃冷凍庫に保存した。

表 1. 試料採取場所概要

場 所	採取場所等	場 所	採取場所等
1 秋田県二ツ井町	木の根付近の土	11 秋田県二ツ井町	スギの根付近の土
2 茨城県桜川市	モッコウバラの木片	12 青森県八甲田山	山の土
3 茨城県桜川市	地層の土	13 秋田県田沢湖	姫観音像周辺の土
4 茨城県桜川市	畑の土	14 秋田県二ツ井町	朽木
5 茨城県桜川市	地層の土	15 茨城県桜川市	地層の土
6 茨城県桜川市	木の根付近の土	16 秋田県二ツ井町	スギの根付近の土
7 茨城県桜川市	ヤマボウシの木片	17 愛知県みよし市	庭の土
8 茨城県桜川市	地層の土	18 岐阜県中津川	畑の土
9 茨城県桜川市	木の根付近の土	19 愛知県みよし市	講演の土 (植木有)
10 秋田県二ツ井町	木の根付近の土	20 秋田県船越近隣公園	鳥の糞

<一次スクリーニング>：滅菌生理食塩水（0.9% NaCl 水溶液）9 mL に試料 1 g を懸濁し、10 および 100 倍希釈液を調整した。クリーンベンチ内で検定菌を全面塗布したトリプトソーヤ（TS）寒天平板へ希釈液 10  $\mu$ L を滴下し、培地表面を乾燥させてから 37°C で一晩培養した。培養後、生育阻止円の観察された試料について二次スクリーニングを実施した。検定菌として 2 種の黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* JCM 2151 および JCM 2413 を使用した。

<二次スクリーニング>：一次スクリーニングで活性の観察された試料について、再度滅菌生理食塩水を用いて  $10^3$  まで 10 倍階段希釈液を調整し、生物検定を実施した。活性が見られたコロニーを TS 寒天平板へ画線培養し、37°C で再度培養した。単一コロニーを液体培地に接種し、37°C で一晩振とう培養を行った。振とう培養後、培養液を 1 mL 分取し -80°C で使用まで保存した。検定菌株として *S. aureus* JCM 2151 を使用した。

<生物検定法>：検定菌の一晩培養液を滅菌綿棒にて TS 寒天平板に全面塗布し乾燥させた後、適度に希釈した測定試料や分離菌株を滴下した。37°C で一晩培養後、生育阻止円の有無を観察した。

<分離菌株の簡易同定>：冷凍保存菌株を TS 寒天平板に画線し 37°C 一晩培養後、単一コロニーを採取し、コロニーPCR を実施した。なお、プライマーは 16S リボソーム RNA 遺伝子の全長約 1500 bp を増幅する 27F と 1492R プライマーを用いた。PCR 増幅産物をアガロースゲル電気泳動で確認後、バンドを切り出し、市販キットを用いて精製した。精製された PCR 増幅産物について 27F, 519F, 806R, および 1497R のプライマーを用いて配列解析した。プライマーは Lane の報告[1]を参考にして設計した。得られた 4 つの配列を一つに統合して全体配列とし、NCBI-BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [2]) により菌種の同定を試みた。なお、配列解析は本学バイオテクノロジーセンターへ依頼した。

### 3. 結果

20 種の由来の異なる試料を菌株分離のソースとして、食中毒の起因菌となる黄色ブドウ球菌の生育阻害活性を指標に、一次および二次スクリーニングを実施した（図 1）。スクリーニング結果のまとめを表 2 に示す。一次スクリーニングでは、二種の黄色ブドウ球菌 *S. aureus* JCM 2151 および JCM 2413 を被検菌としてスクリーニングを行い、20 の採取試料のうち 8 つで活性（生育阻止円）を確認した。全て *S. aureus* JCM 2151 を被検菌としたものであり、*S. aureus* JCM 2413 では全ての試料で生育阻止円は確認できなかった。次に、一次スクリーニングで活性の確認された試料を対象に、*S. aureus* JCM 2151 を被検菌として二次スクリーニングを実施し、6 つの試料から 45 菌株を分離した。試料 6, 10, および 17 からはそれぞれ 1 菌株、11 からは 32 菌株から 5 菌株、16 からは 2 菌株から 1 菌株、そして 19 からは 3 菌株、合計 10 菌株を選んで -80°C に凍結保存した。これら活性が高いと思われる 10 菌株について配列解析を行なったが、6 株は上手く読むことができ、3 株は読むことができなかった。読むことのできなかつた 3 株は純粋分離できていないものと考えている。配列解析の読

むことのできた 6 株について NCBI-BLAST 解析した結果、塩基の同一性が高い菌株として、*Bacillus wiedmanni*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus mobilis*, *Priestia aryabhatai*, そして *Bacillus subtilis* が検索された。異なる分離源から単離されたものは異なる菌種であった。*Priestia* 属はバチルス属から派生したものであり、分類学的には全てバチルス科の菌であった。

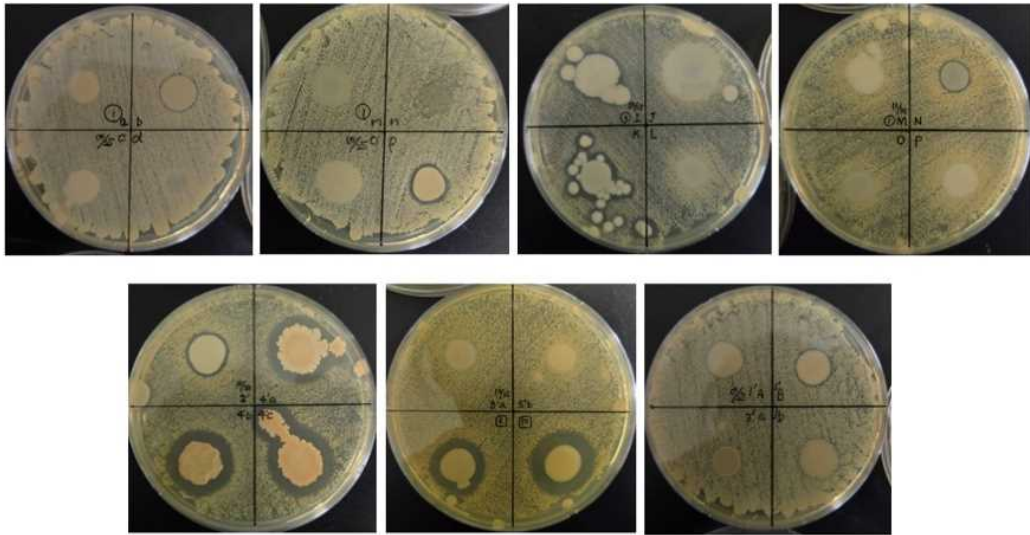


図 1. 二次スクリーニング結果

表 2. スクリーニング結果まとめ

試料 番号*	一次 (被検菌)		二次 (株数)		試料 番号	一次 (被検菌)		二次 (株数)	
	JCM 2151	JCM2413	単離	活性有		JCM 2151	JCM2413	単離	活性有
1	—	—	0		11	○	—	32	5
2	—	—	0		12	—	—	0	
3	—	—	0		13	—	—	0	
4	—	—	0		14	—	—	0	
5	—	—	0		15	—	—	0	
6	○	—	1	1	16	○	—	2	1
7	—	—	0		17	○	—	1	1
8	—	—	0		18	○	—	3	
9	—	—	0		19	○	—	3	3
10	○	—	1	1	20	○	—	2	0

\*, 試料番号は採取場所の通し番号を示す (表 1)。  
○, 活性あり (生育阻止円が観察された) ; —, 活性なし。

**表 3. 分離株の簡易同定結果**

試料番号	株名	*BLAST解析結果	%id.
6	6B	<i>Bacillus wiedmanni</i>	99.8
10	10B	<i>Bacillus toyonensis</i>	99.7
11	1K	<i>Bacillus mobilis</i>	99.5
17	2	<i>Priestia aryabhatai</i>	100
19	4a	<i>Bacillus subtilis</i>	99.7
19	4b	<i>Bacillus subtilis</i>	99.7

\*, NCBI-BLAST解析にて、塩基配列の同一性が最も高いものを示した。

#### 4. 考察

本実験で配列解析した 5 株は *Bacillus* 属そして 1 株は *Priestia* 属であった。*Priestia* 属は *Bacillus* 属から再分類された属のため、全てがバチルス科菌株であった。*Bacillus* 属菌では、グラム陽性菌に効果を示すバシトラシン A やグラミシジン S, ポリミキシン B, コリスチンなどのポリペプチド系抗生物質の生産菌が知られている。分離菌株は黄色ブドウ球菌の生育阻止活性を示したが、前述の抗生物質に類似した抗菌ペプチドあるいはリゾチームと言った溶菌酵素などの産生によるものと考えられた。

*B. subtilis* は抗菌ペプチドの他に、 $\alpha$ -アミラーゼやプロテアーゼ、リゾチームなどの多様な酵素を菌体外へ産生するが、それらは医薬品や食品加工などの分野で産業利用されている。*Priestia* 属は、分類学的に *Bacillus* 属と同じバチルス科に分類されていることから、*Bacillus* 属と同様に酵素を分泌する性質を持つことが類推される [3]。分離菌株の産生する酵素は黄色ブドウ球菌に対して静菌または殺菌的に作用する可能性があるが、二次代謝産物である抗菌ペプチドなどの環境中での生産性は不明である。今後、新たな抗菌物質の同定が期待される。

#### 5. 参考文献

- [1] D. J. Lane (1991) 16S/23S rRNA Sequencing in *Nucleic Acid Techniques Systematics*. p.115-147. Edited by E. Stackebrandt and M. Goodfellow. John Wiley & Sons Ltd.
- [2] S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- [3] Tatiana Z. Esikova, Tatiana O. Anokhina, Tatiana N. Abashina, Nataliya E. Suzina, Inna P. Solyanikova (2021). Characterization of soil bacteria with potential to degrade Benzoate and antagonistic to Fungal and Bacterial phytopathogens. *Microorganisms* **9**:755.