

《様式B》

研究テーマ 「発酵産業への応用を志向した静岡由来微生物資源からの新規抗菌物質の探索」

研究責任者 所属機関名 静岡大学

官職又は役職 教授

氏名 小谷真也 メールアドレス kodani.shinya@shizuoka.ac.jp

共同研究者 所属機関名 静岡県工業技術研究所沼津工業技術支援センター

官職又は役職 主任研究員

氏名 鈴木 雅博

(令和元年度募集) 第32回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

静岡県の環境中からの細菌の分離を行った。主に、発酵食品の糠漬け、静岡の海洋環境からの菌株の単離を行った。計150株の微生物を分離し、抗菌活性スクリーニングおよびHPLCによる分析を行ったところ、2株の細菌が抗菌物質を生産していることが明らかとなった。糠漬けから単離した菌株は、16S rDNAのDNA配列の解析の結果、*Microbacterium*属に属する放線菌であることが分かった。さらにESI-MSの分析の結果から、生産される抗菌物質は既知のランチペプチドのmicrovionin類縁体であることが明らかとなった。また、16S rDNAのDNA配列の解析の結果、海洋由来の1株の細菌も、放線菌であることが明らかとなり、得られた放線菌Ohya26株に関して化学分析を行った。同時に、静岡県工業技術研究所沼津工業技術支援センターから100株の乳酸菌を中心とする細菌株の提供を受けた。その結果、*Bacillus*属に属する細菌SUG-0056に顕著な抗菌活性が見られた。細菌SUG-0056をLB寒天培地で培養後、菌体をアセトンで抽出し、ODSカラムを用いたHPLCで分取を行った。ESI-MSを測定したところ、 $[M+H]^+$ m/z 906.4にイオンピークが観察された。また、重DMSO中において、 1H NMRの測定を行ったところ、ペプチド性化合物に見られる特徴的なプロトンのシグナルが得られた。DQF-COSYの測定を行ったところ、プロトン間の相関が得られた。分子量と、これらのNMRで得られた情報をもとにデータベースで検索をかけたところ、SUG-0056の生産する化合物は、既知の抗菌物質kurstakin 4であることが明らかとなった。特に、*Bacillus*属の細菌は、サルファクチン等の抗菌ペプチドの生産で知られ、微生物農薬として用いられている株もある。また*Bacillus*属の細菌は土壌に生息する細菌であるため、土壌に定着しやすく、微生物農薬としての産業技術としての実用化の可能性が考えられる。特許出願に関しては、現在のところ、予定はしていない。研究成果については、個々の菌株について論文化し発表する予定である、今後実用化に関して、細菌SUG-0056株の土壌での植物病原菌の防除効果に関して調べていく必要がある。

2. 実施内容および成果の説明（A 4 で、5 ページ以内）

実施内容および成果の説明

本研究では、

研究 1) 静岡県工業技術研究所沼津工業技術支援センターから分譲を受けた

Bacillus sp. SUG-0056 株の生産する抗菌物質

独自に新たに分離した菌株

研究 2) 糠漬け由来抗菌物質生産微生物

研究 3) スルガ湾の海底土から分離した抗菌物質生産微生物

の三つの研究に関して成果が得られたのでその成果を以下に説明する。

研究 1) *Bacillus sp.* SUG-0056 株の生産する抗菌物質

静岡県工業技術研究所沼津工業技術支援センターから分譲を受けた 100 菌株の抗菌物質の解析の結果、*Bacillus sp.* SUG-0056 株が抗菌物質を生産していることが明らかとなった、下の図 1 に *Bacillus sp.* SUG-0056 株の MeOH 抽出液の HPLC 分析の図を示した。ピーク 1-9 まで分取を行い、抗菌活性試験を行ったところ、ピーク 6 に顕著な抗菌活性を認めた。

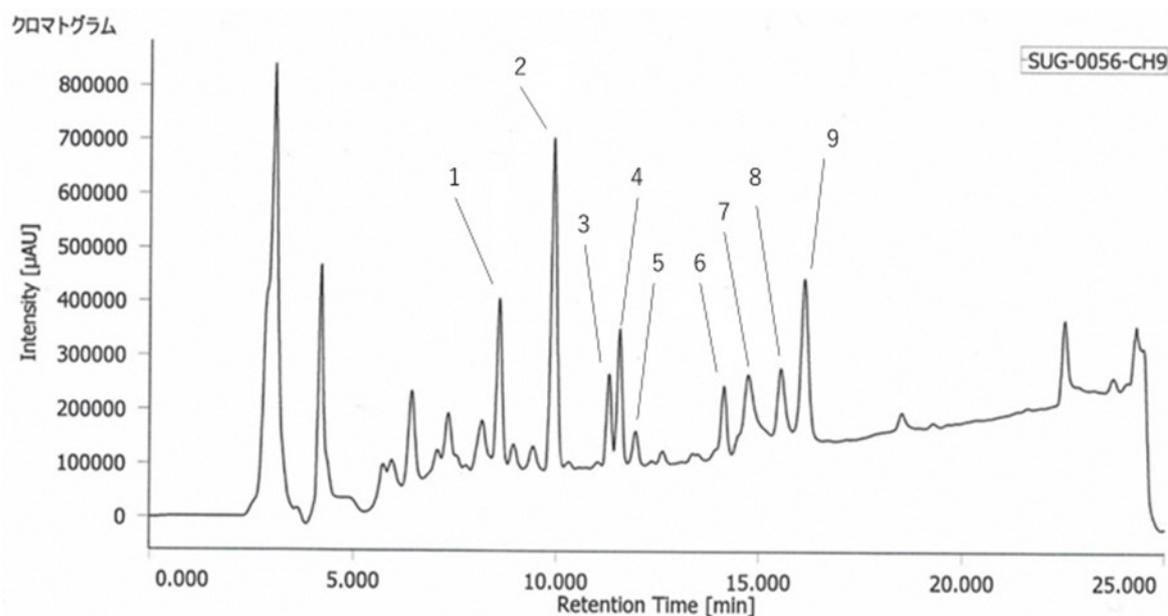


図 1. SUG-0056 株メタノール抽出物の HPLC クロマトグラム

そこで、SUG-0056 のピーク 6 に関して、ESI-MS の測定を行った。その結果、ポジティブイオンモードの測定の結果、906.42 に一価のイオンピーク（図 2）が検出された。

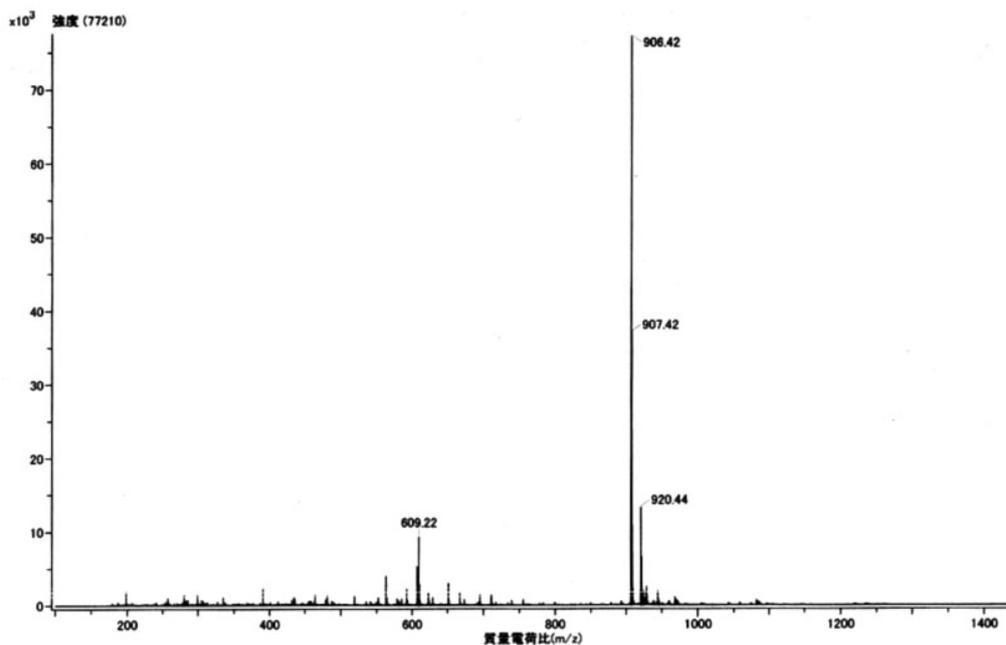


図 2. SUG-0056 株の生産する抗菌物質の ESI-MS スペクトラム

また、ダイオードアレイを備えた HPLC による分析で UV 吸収波長より、ペプチド性の化合物であることが推定された。そこで、 ^1H NMR の測定を行った。その結果、図 3 のように 3.5-5.0ppm 付近に複数のアルファプロトンが観測され、6.5-9.0ppm 付近にアミドプロトンが観察された。これは典型的なペプチド性化合物の性質を表すものであり、さらに COSY スペクトラムを測定した。

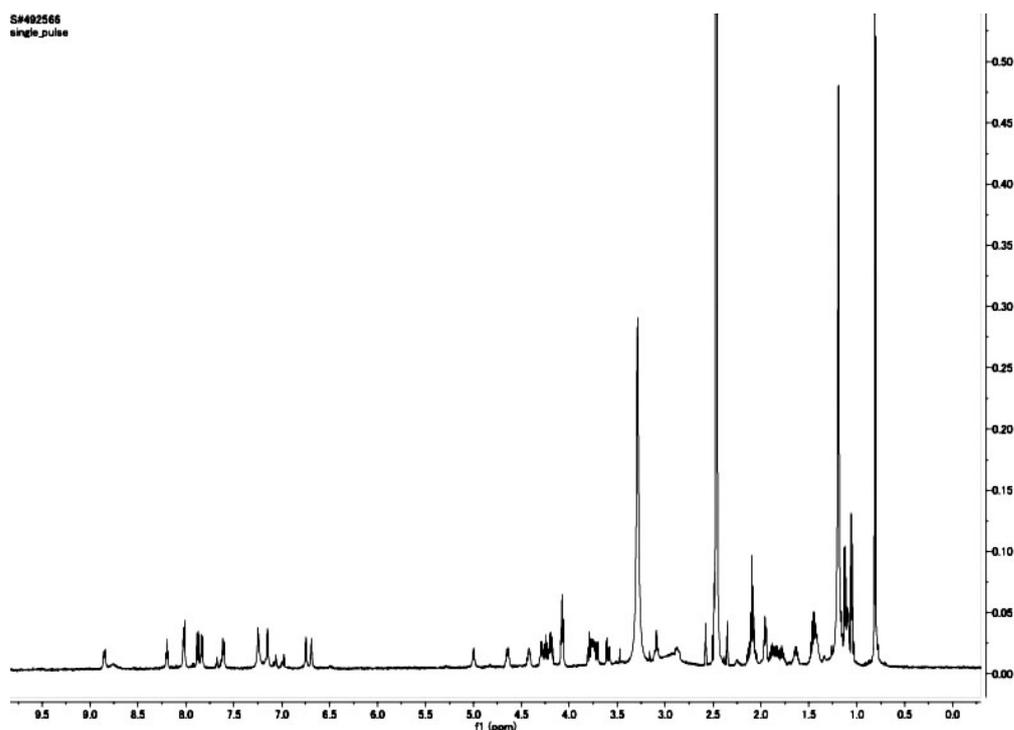


図 3. SUG-0056 株の生産する抗菌物質の ^1H NMR スペクトラム
 二次元 NMR のデータの解析の結果、SUG-0056 株の生産する化合物は、既知化合

物の kurstakin 4 であることが明らかとなった。Kurstakin 4 は *Bacillus thuringiensis* から単離され、2000 年に報告されている (図 4, Hathout et al. J. Nat. Prod. 2000, 63, 11, 1492–1496)。またこのペプチドは非リボソーム系の生合成システムによって生合成されることが報告されている。SUG-0056 株もまた、*Bacillus* 属の細菌であるため、*B. thuringiensis* と類似した生合成遺伝子を有していることが予想される。

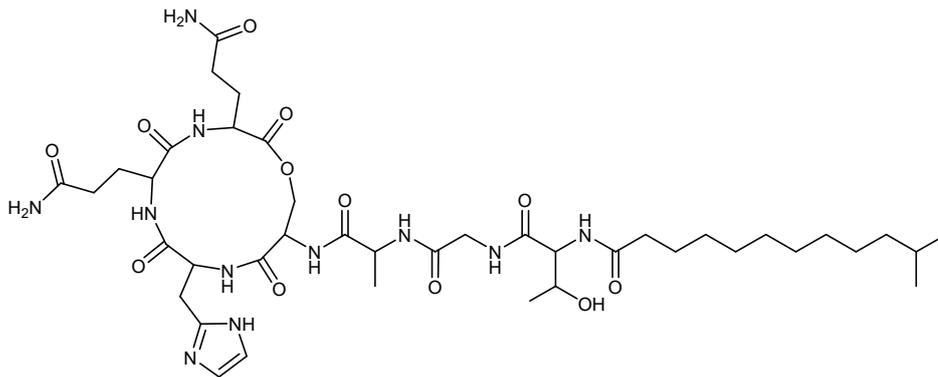


図 4. Kurstakin 4 の化学構造

研究 2) 糠漬け由来抗菌物質生産微生物

静岡県内工場で作られたぬか漬けを LB 寒天培地、MRS 寒天培地それぞれ 3 枚に塗布し 37°C で 3 日から 1 週間ほど培養した。それらの培地で様々な菌が混在していることが確認できたため、見た目から特徴的な菌を選び純粋分離を行った。純粋分離は LB 培地にて 30°C で培養を行った。純粋分離した 30 株に関して、抗菌活性試験を行った。その結果 NK1C2 と命名した菌株に関して、強い抗菌活性が検出された。そこで、16S rDNA の配列の解析を行ったところ、下記のように約 700bp の部分配列を決定することが出来た。Blastn で検索を行ったところ、*Microbacterium* 属の細菌であることが明らかとなった。決定できた NK1C2 の 16S rDNA の部分配列は以下である。

```
GGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGTGAAGCAGAGCTTGCTCTGTGGATCA
GTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCCCTGACTCTGGGATAAGCGCTGAAACGGCGTC
TAATACCGGATACGAGCTGCGACCGCATGGTCAGTAGCTGGAAAGAATTTCCGGTCAGGGATGAGCTCGC
GGCCTATCAGCTTGTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTG
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTAGC
AGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAAAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTAGGGCGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTCTGTCCGCTCTG
CTGTGAAAACCCGAGGCTCAACCTCGGGCCTGCAGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCGGTAGGGGAG
ATTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGATCT
CTGGGCCGTAA
```

LB 培地で培養した NK1C2 株の菌体をミク로스パーテルでかきとり、菌体の二倍量の MeOH で抽出を行った。その抽出液を HPLC で分析したところ特徴的なピークが 2 つ得られた (図 5)。そのため、得られた特徴的な 2 つのピークを分取し、分取したピークを抗菌活性試験及び ESI-MS 測定に供した。その結果、ピーク 1 に関して顕著な抗菌活性が検出された。さらに ESI-MS の測定を行ったところ、ポジティブイオンモードの測定の結果、1007.53 に一価のイオンピーク (図 6) が検出された。

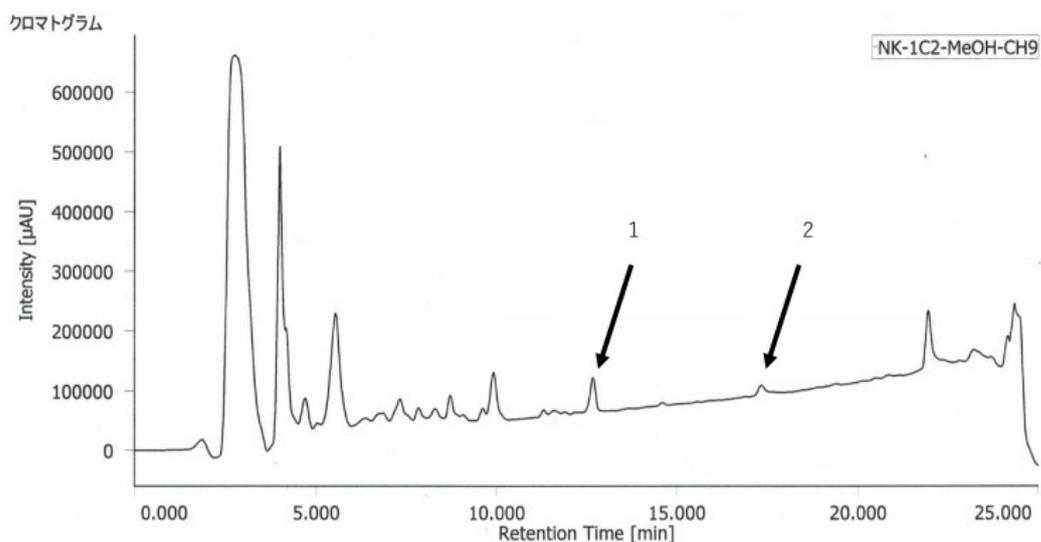


図 5. NK1C2 株の MeOH 抽出物の HPLC 分析

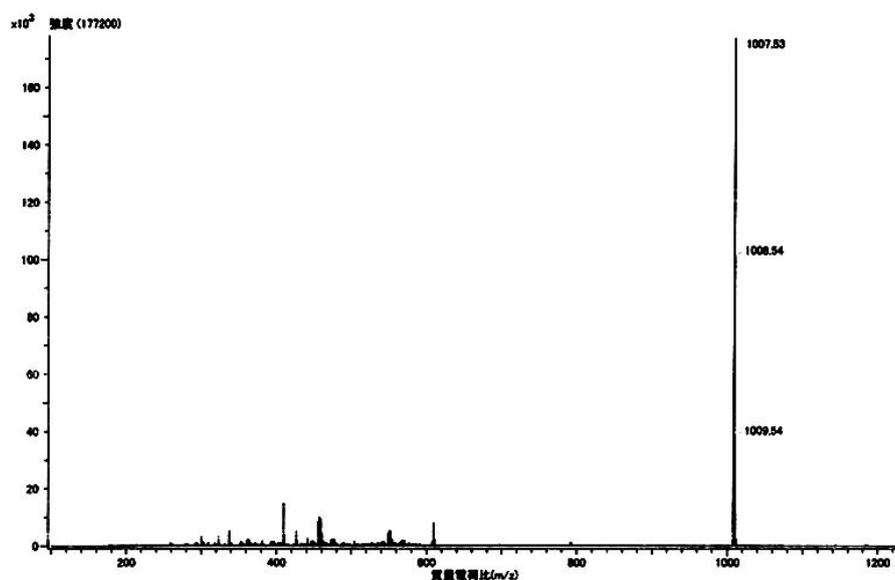


図 6. NK1C2 株ピーク 1 の ESI-MS 分析

また、ダイオードアレイを備えた HPLC による分析で UV 吸収波長より、NK1C2 株の生産するピーク 1 はペプチド性の化合物であることが推定された。また、分子量から、既知化合物 microvionin(図 7)の類縁体であることが推定された。

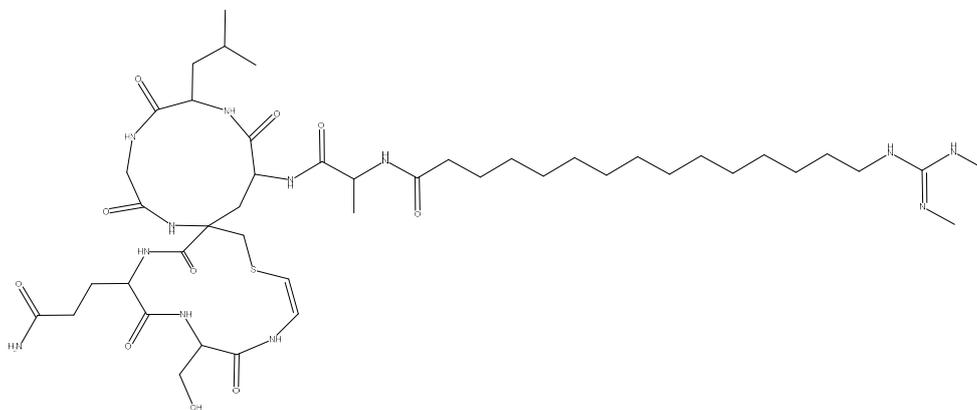


図 7. microvionin の化学構造

研究 3) スルガ湾の海底土から分離した抗菌物質生産微生物

大谷海岸の海底の土から新規抗菌物質生産微生物の分離を行った。培地は、ISP2 寒天培地および ISP3 寒天培地を用いて分離を行った。その結果、Ohya26 株と命名した放線菌を単離した。16S rDNA の配列の解析を行った結果、*Streptomyces* 属に属する放線菌であることが明らかとなった。Ohya26 株の抽出液は、*Micrococcus luteus* に対して強い抗菌活性を示した。ODS カラムを用いた HPLC 分析により、3 つの抗菌活性物質の単離に至った。しかしながら、生産量が少ないため、構造決定に至らなかった。

成果のまとめ

静岡由来微生物資源から抗菌物質を生産する微生物を三種類得ることに成功した。成果 1 及び成果 2 に関しては、既知の抗菌物質もしくは類縁体であった。双方ともに顕著な抗菌活性を有しているため、将来的には産業利用が見込まれる。また、成果 3 に関しては、抗菌物質の生産量が少なく、化学構造決定には至らなかった。今後、微生物育種、培地や培養条件の検討を行い、生産量を上げ、将来的な産業技術への応用を目指す。