

放線菌が生産する抗真菌性物質の検討

岡村 澄夫・伊藤 俊彦・吉田 梨恵子*¹
石川 奨平*², 畑中 浩之*³

Research in the antimicrobial substances by *Streptomices*

Sumio OKAMURA, Toshihiko ITO, Rieko YOSHIDA *¹
Shouhei ISHIKAWA *² and Hiroyuki HATANAKA *³

(2002年11月12日受理)

As a result of examining the microbe group in an environmental cleaning product, *Streptomices* with the possibility of a new species was checked. When this *Streptomices* was separated and cultivated, the coloring substance of a characteristic smell and yellow was checked from the 3rd days of the cultivation. When the antibacterial spectrum was measured in order to check about the existence of production of an antibiotic. The production of a new substance was able to be checked. We examined purification while investigating the character of this anti-fungal substance.

1. 緒言

環境浄化製品中の微生物群について検討した結果、新種の可能性がある放線菌を確認した。この放線菌を分離して培養したところ、培養3日目頃から特有の匂いと黄色の着色物質が確認された。このことから新しい物質の生産が考えられたので、抗生物質生産の有無について確認するため抗菌スペクトルを測定したところ、抗真菌性物質の生産を確認することができた。我々はこの抗真菌性物質の性質を調べるとともに単離精製について検討を行った。

2. 実験

2.1 放線菌の培養法

坂口フラスコに Bennet 培地¹⁾を100ml 入れ、オートクレーブで121度、15分間加圧加熱滅菌した後、放線菌を接種して30度で120時間(5日間)、1分間120往復で振とう培養した。培養終了後、培養液を遠心管に移し、9800rpm で30分遠心分離して上清液と菌体に分けた。

*¹ 秋田高専卒業生(現:長岡技術科学大学)

*² 秋田高専卒業生(現:秋田高専専攻科)

*³ 秋田高専卒業生(現:日本触媒株式会社)

1) Bennet 培地組成: マルトース0.5%, ペプトン0.2%, 肉エキス0.1%, 酵母エキス0.1%

2.2 抗菌スペクトルの測定

180度で30分乾熱滅菌したシャーレに、2.1項と同じように処理したグイヨン培地¹⁾あるいはマルツエキス培地²⁾を約25ml 入れて寒天培地を作成した。これを約37度の恒温培養器に1夜放置して雑菌のコンタミネーションの有無を確認し、これにあらかじめ培養しておいた検定菌³⁾100 μ l をスプレッダーで接種した。この上に2.1項の処理法で得た上清液をしみこませたペーパーディスクを置き、恒温培養器に入れて1日培養した。培養後にペーパーディスク周辺の阻止円によって抗菌力を測定した。

1) グイヨン培地組成: 肉エキス0.5%, ポリペプトン1.5%, 食塩2.25%

2) マルツエキス培地組成: マルツエキス2.0%, 酵母エキス0.2%

3) (G+) *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)

(G+) *Bacillus subtilis* (枯草菌)

(G-) *Escherichia coli* (大腸菌)

Aspergillus niger (クロカビ)

Saccharomyces cerevisiae (酵母)

2.3 培地の検討

放線菌の培養には Bennet 培地を使用してきたが、さらに適切な培地を探索した。Bennet 培地の組成は 2.1 項を、マルツエキス培地の組成は 2.2 項を参照。Waksman 培地および Czapek-Dox 培地の組成は次の通りである。

Waksman 培地組成：ブドウ糖2.0%，肉エキス0.5%，ペプトン0.5%，食塩0.5%

Czapek-Dox 培地組成：スクロース2.0%，硝酸ナトリウム0.3%，リン酸水素二カリウム：0.1%，塩化カリウム：0.05%，硫酸マグネシウム・7水塩0.05%，硫酸鉄・7水塩0.0018%

培養方法は 2.1 項記載の方法と同じである。結果を表 1 に示した。

表 1 抗菌スペクトル

菌種 (通称名)	接種培地	抗菌作用
(G+) <i>Staphylococcus aureus</i> (黄色ブドウ状球菌)	ブイヨン	-
(G+) <i>Bacillus subtilis</i> (枯草菌)	ブイヨン	-
(G-) <i>Escherichia coli</i> (大腸菌)	ブイヨン	-
<i>Aspergillus niger</i> (クロカビ)	マルツエキス	+
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (酵母)	マルツエキス	+

抗菌作用+:生育阻止,-:生育阻止作用なし
G+:グラム染色陽性, G-:グラム染色陰性

表 1 によれば放線菌が生産する物質は、クロカビと酵母に抗菌作用を示したが、グラム陽性菌およびグラム陰性菌には抗菌作用はないことがわかった。生物分類学上カビと酵母は真菌類に属するので、放線菌が生産する物質は抗真菌性物質であることが確認された。

3.2 培養条件の検討

微生物は増殖に必要なエネルギーと細胞成分の原料を培地中の栄養源から獲得しなければならない。したがって培地には微生物が必要とする栄養源を含有するものでなければならない。本研究の放線菌も適切な培地で増殖しなければ抗真菌性物質を生産することはできない。本実験では培地および培養時間について、抗真菌性物質の生産量を最大にする条件の検討を行った。

(1) 培地の検討

4 種類の培地について振とう培養を行い、ペーパー

ディスク法で抗菌作用を調べた。結果を表 2 に示した。

表 2 培地の種類と抗菌作用

培地の種類	抗菌作用
Bennet 培地	++
Waksman 培地	+±
マルツエキス培地	+
Czapek-Dox 培地	+

どの培地でも放線菌は生育して抗真菌作用を確認できたが、Bennet 培地で最も多くの抗菌性物質が生産されることがわかった。菌体量も Bennet 培地で最も多かった。

(2) 炭素源の検討

抗生物質の生産量は培地に用いる炭素源によって大きく変化することが知られている。微生物が生育する上でもっとも大切な栄養源である炭素源について比較検討を行った。用いる培地は(1)項の結果から Bennet 培地を基本として 6 種類の炭素源を替えて検討し結果を表 3 に示した。

表 3 炭素源と抗菌作用

炭素源	抗菌作用
ラクトース	+++
ガラクトース	++±
グルコース	++
マルトース	++
スクロース	+±
フルクトース	+

表 3 の結果によれば放線菌の抗真菌性物質生産にはラクトースが最も適切な炭素源であることがわかった。適切な培地として選択した Bennet 培地は炭素源としてマルトースを使用しているが、ラクトースの方が抗真菌性物質の生産にはより適切であることが明らかになった。

(3) 培養時間の検討

これまでの検討は120時間 (5 日間) に固定して実験を行ってきた。これは一般的に放線菌は好気性微生物であること、培養経過 5 日目頃から菌体量に目に見えた変化が見られなくなってきたことによるものである。しかしこの条件と抗真菌性物質の生産量との関係は明らかではないので、培養時間と抗菌力の関係を調べた。24時間ごとに培養液を採取してペーパーディスク法の阻止円の大きさで相対的な抗菌力を測定するとともに、濁度計を用いて660nm

における OD を測定して相対的な菌体量も測定した。培地は Bennet 改変培地（炭素源をラクトースに変更）を使用した。結果を図 1 に示した。

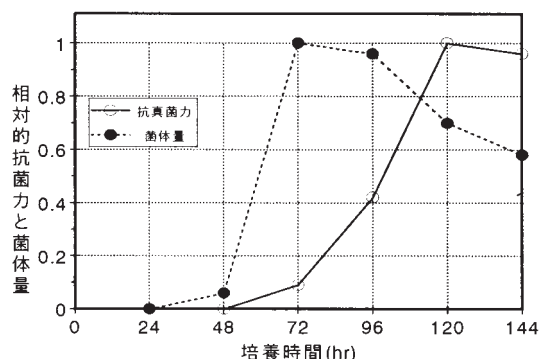


図-1 培養時間と抗真菌力および菌体量

図-1 からわかるように菌体量は48時間目過ぎから急激に増え、ほぼ72時間目頃に最大になり、その後減少傾向にあることがわかる。これに対して抗真菌力は72時間目過ぎから急激に高くなって、ほぼ120時間目頃に最大となることがわかった。

なお、静置培養も試みたが、5日目頃から菌体の増加が確認されたが、10日間培養しても増加はなく、抗真菌作用も10日目頃にわずかに現れる程度であった。放線菌は好気性微生物であり、振とう培養によって酸素を供給した方が生育がよいこと、菌体量が最大になってから抗真菌性物質の生産が始まっていることがわかった。120時間目以降に菌体量が減少するのは、培地に含まれる栄養源を使い切ったこと、自己融解をはじめたことなどが考えられる。

3.3 抗真菌性物質の性質

抗真菌性物質の pH に対する安定性と熱に対する安定性を培養後の遠心分離した上清液を使用して実験した。

(1) pH に対する安定性

遠心分離後の上清液を 1N-塩酸あるいは 1N-水酸化ナトリウム水溶液で pH を 2, 5, 7, 9 に調整し、直ちに中性に戻してペーパーディスク法で抗菌作用を検定した。実験の結果を表 4 に示した。

表 4 pH と抗菌作用

pH	抗菌作用
2	+++
5	++
7	++±
9	+++

さらに 3 度の低温および常温で 24 時間放置した後、中性に戻して抗菌作用を検定した。

表からわかるように pH 調整直後の抗菌作用は、どの pH でも失われないことがわかった。しかし、3 度 24 時間および常温 24 時間放置では、全ての pH で抗菌作用が失われることがわかった。これらの結果は抗菌性物質が酸性でも塩基性でも安定であることを示しているが、長時間の酸性、塩基性で失活することがわかった。しかし中性でも抗菌作用が失われている結果には疑問がある。今後の実験では pH 調整後に長時間放置することはないので、詳細な pH と抗真菌作用の関係は今後の検討課題としたい。

(2) 熱に対する安定性

遠心分離後の上清液を 50, 60, 70, 80, 90 度の恒温槽に 5 分間入れ、室温に戻るまで放置してからペーパーディスク法で抗菌作用を調べた。結果を表 5 に示した。

表 5 熱に対する安定性

温度(°C)	抗菌作用
室温	+++
50	+++
60	++±
70	++±
80	++
90	++±

表からわかるように短時間ではあるが、抗真菌性物質は熱に安定であることがわかった。

つぎに沸騰水に対する安定性を 30 分ごとに調べた結果、30 分までは抗菌作用を示したが、60 分以降では抗菌作用は失われた。このことから 30 分以内では比較的安定であることがわかった。

3.4 抗真菌性物質の抽出

培養液を遠心分離して上清液と菌体に分けてそれぞれから抗真菌性物質を抽出し、さらに薄層クロマトグラフによる精製を試みた。

(1) 上清液から有機溶媒による抽出

上清液 50ml に有機溶媒としてジエチルエーテル、クロロホルムあるいは酢酸エチルを 50ml 加えて激しく振とう抽出した。抽出した有機溶媒層と水層についてペーパーディスク法で抗菌作用を調べた。

その結果、水層は抗菌作用を示したが、有機溶媒抽出層は全く抗真菌作用を示さなかった。

つぎに上清液の pH を 2, 7, 9 に調整して直ちに

有機溶媒で抽出をおこなった。抗真菌性物質が酸性であれば pH2 で、塩基性であれば pH9 で抽出されやすいと考えて実験したが、抽出液は全く抗真菌作用を示さなかった。

以上の実験から、抗真菌性物質は非常に水溶性が高く有機溶媒には移りにくい性質の物質である可能性が高いと考えた。上清液を濃縮する方法が考えられるが、試みの実験を行ったところ濃縮中に抗真菌作用が失われることがわかった。水の濃縮には長時間を要するので、抗菌性物質が分解あるいは変質して作用が失われたのではないかと考えた。

(2) 菌体から抽出

これまでの実験は全て遠心上清液について検討してきたが、抗真菌性物質を単離することは困難であることがわかったので、菌体から抽出する実験をおこなった。水溶性が非常に高いと考えられる抗真菌性物質を考慮して、水溶性の溶媒であるメタノールとアセトンを使用した。遠心分離後の菌体には水が含まれているが、これにメタノールあるいはアセトンを加えてかき混ぜ、吸引ろ過した後、溶媒を低温で減圧濃縮した。残った水はベンゼンを加えて低温で減圧下に共沸留去した。少量の水を含んだ残留物は五酸化リンを入れたデシケータで減圧下に乾燥した。最後に結晶化した抽出物に少量のメタノールを加えペーパーディスク法で抗菌作用を調べた。

その結果、メタノールあるいはアセトン抽出物はどちらも非常に強い抗真菌作用を表すことがわかった。

したがってこの後の実験は全て菌体抽出物について行うことにした。

3.5 抗真菌性物質の単離精製

(1) 薄層クロマトグラフ条件の検討

菌体抽出物は混合物と考えられるので、薄層クロマトグラフによって抗真菌性物質を分離するため、展開溶媒の検討を行った。薄層板はシリカゲルが 0.25mm の厚さで蛍光物質入りのものを使用し、スポットの検出には 254nm の紫外線ランプを使用した。その結果、アセトン抽出物を最も多くのスポットに分けたのは、クロロホルム 5 とメタノール 1 (容量比) の混合溶媒であった。メタノール抽出物は、はっきりとしたスポットには分かれにくかった。これはアセトンよりもメタノールの方が多くの物質を溶解するので分かれにくかったのではないかと考えた。したがって今後の検討には、菌体のアセトン抽出物を使用することにした。

(2) 抗菌作用の確認

薄層クロマトグラフに用いた 5cm×2cm の小さな薄層板で展開後、酵母を接種した培地に乗せて抗菌作用を調べた結果、原点に近い 2 つのスポット (スポット A, B と略称) に強い抗真菌作用があることがわかった。

スポットの検出に 254nm の紫外線ランプを使用した。抗真菌性物質が紫外線を吸収しなければ、スポットの確認ができないことになるが、本実験によって抗真菌性物質は 254nm の紫外線を吸収する構造を有することが明らかになった。

(3) 抗真菌性物質の単離精製

厚さ 0.25mm で 5cm×2cm のシリカゲル薄層板で抗真菌性物質のスポット位置がわかったので、つぎにシリカゲルの厚さが 2mm で 20cm×20cm の薄層板にアセトン抽出物を帯状に塗布してクロロホルム 5, メタノール 1 の溶媒で展開して、抗真菌性物質を単離精製した。展開終了後、目的のスポット A, B を別々にかき取りアセトン抽出して抗真菌性物質を得た。

放線菌の培養を繰り返して行い、引き続き薄層板による単離精製を行ってスポット A, B の成分を集めた。スポット A, B は原点に近くしかも接近しているため、完全に単一のものには単離精製できなかった。さらに紫外線を吸収しない成分の混入も考えられたが、量が非常に少ないためさらに精製する操作は行わなかった。

3.6 単離精製物と培養日数の検討

成分 A, B は共に強い抗真菌活性を示すこと、薄層クロマトグラフのスポット位置が近いことなどから、お互いに近い構造の物質であることが予想される。

したがって培養日数と活性との関係を調べることにより、成分 A, B の生成量の変化がつかめるのではないかと考えて実験を行った。培養日数として 4 日、5 日および 6 日目の 3 つの培養液について、これまでと同じように処理して薄層クロマトグラフによる単離精製を行い、得られた粉末の物質 A, B を 1.5ml のメタノールに溶解し、100, 500 および 1000 倍に希釈して抗真菌作用との関係を調べた。結果を表 6 に示した。

表からわかるように成分 A は 6 日培養でも抗真菌活性を示したが、B は 6 日目に活性を示さなかった。すなわち、B は培養 6 日目には消失したことがわかる。このことは成分 B は培養日数と共に成分

表 6 A, B 成分の培養日数と活性

希釈 倍率 (倍)	抗真菌活性					
	4日		5日		6日	
	A	B	A	B	A	B
100	+	+	+	+	+	-
500	+	+	+	+	+	-
1000	+	+	+	+	+	-

A に変化したのか、あるいは酵素などによって分解したのかは今回の実験だけでは明確にはできなかった。さらに詳細な検討が必要である。

4. 今後の課題

放線菌が生産する抗真菌性物質の培養条件、性質および物質の単離精製について検討したが、まだ多くの検討課題が残っている。

- (1) 抗真菌性物質を単一物質に精製する。

- (2) 抗真菌性物質の構造を解明する。
- (3) 精製化合物の性質を詳細に検討する。
- (4) さらに強い抗真菌活性化合物を目標に誘導体の合成を行う。

5. 参考文献

- 1) 堀越弘毅, 秋葉暁彦, 微生物学入門 (オーム社)
- 2) 村尾澤夫, 荒井基夫, 応用微生物学 (培風館)
- 3) 小澤満美子, 業務用環境浄化微生物の 1 製品中の微生物群について (平成10年度卒業論文)
- 4) CD-ROM 世界大百科事典
- 5) 日本微生物学協会編集, 微生物辞典 (技報堂出版 (株))
- 6) 長倉, 井口他, 理化学辞典・第五版 (岩波書店)
- 7) 今堀和友, 山川民夫監修, 生化学辞典・第 3 版 ((株)東京化学同人)