

報 文

Bacillus 属細菌の産生する抗菌活性物質の
性質ならびに分離・精製*

辻 久生, 辻 美保子**, 出口 剛, 上田 博夫

大阪府立大学農学部
**樟蔭東女子短期大学

(平成元年3月4日受理)

Properties, Isolation and Purification of the Antifungal
Substance Produced by *Bacillus* spp.*

Hisao TSUJI, Mihoko TSUJI,** Takeshi DEGUCHI and Hiroo UEDA

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Mozu-umemachi, Sakai 591, Japan
**Shōin-higashi Women's College, Wakaenishi-shinmachi, Higashiosaka 578, Japan

An antifungal substance in the culture supernatant of *Bacillus* sp. bacteria seems to be water-soluble and acidic polypeptide. The antifungal activity was retained after the culture supernatant was heated at 121°C for 15 min. Crude powder having an antifungal activity was obtained by both acidification and ammonium sulfate fractionation of the culture supernatant. The crude powder was loaded onto a DEAE-cellulose column and the column was eluted with a stepwise manner by raising the sodium chloride concentration in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8): 0.3 M, 0.4 M, 0.5 M, 0.6 M, 0.7 M and 0.8 M. Among them, fractions of F-II, F-III and F-IV eluted with 0.4 M, 0.5 M and 0.6 M sodium chloride, respectively, were purified by gel filtration of Sephadex G-100. The purified powder showed a strong antifungal activity to *Helminthosporium oryzae* and *Pyricularia oryzae* which were used as the test organisms.

緒 言

前報¹⁾において、分離細菌の培養液が、かび、とくに植物病原菌に対し強い生育阻害作用を示すことを報告した。被験菌に *Helminthosporium oryzae* を用いる抗菌活性テストにおいて、阻止円縁辺部で多くの菌糸の破壊と多数の厚膜化した細胞の形成が認められ、厚膜細胞から発芽した密集する分生子柄の先端部に多数の分生子胞子の着生が観察される興味ある現象について報告した。

本報では、抗菌活性物質を培養液より分離・精製する

方法を検討するにあたり、まず、抗菌活性物質の諸性質について検討し、得られた知見をもとに抗菌活性物質の分離・精製を試みた。

実 験 方 法

1. 分離細菌¹⁾による抗菌活性物質の生産

前報¹⁾に記載した培地および培養条件で分離細菌を培養し、抗菌活性物質分離用培養液を調製した。培養液は遠心分離 (10,000 rpm, 15 min) し、上清を、115°C, 15 分間加熱したのち実験に供した。

2. 抗菌活性の測定

検定菌に *Helminthosporium oryzae* IFO 5844 を用い、前報¹⁾に記載した方法に従って測定した。活性の有無およびおよその活性の強さを調べる場合は、ろ紙円板-寒天平板法 (ペーパーディスク法) により、活性の相対

* *Bacillus* 属に属する細菌の一種が産生する抗菌活性物質について (第2報) (第1報: 文献1) 参照
Studies on the Antifungal Substance Produced by *Bacillus* sp. Bacteria (Part 2). For Part 1, see Ref. 1).

的な強さを調べる場合は、円筒-寒天平板法（カップ法）により測定した。なお、活性炭カラムを用いる抗菌活性物質の分離テストにおいて、有機溶剤を用いる溶出液は減圧濃縮し、酸およびアルカリを含む溶出液はそれぞれ中和したのち減圧濃縮し、それぞれの濃縮液について活性を調べた。

3. 溶剤抽出

酢酸エチル、酢酸ブチルおよび *n*-ブタノールを用いた。試験管に培養液を 10 ml 採り、同量の溶剤を加えて激しく攪拌したのち静置して分離する各層の活性を調べた。

4. TLC による確認

培養液を約 1/4 量に減圧濃縮した濃縮液を用いた。TLC には Macherey-Nagel 製 Pre-coated TLC SIL G-25 UV₂₅₄ を用いた。展開液にはベンゼン・酢酸エチル (7:3)、クロロホルム・メタノール (50:1)、メタノール、*n*-ブタノール・酢酸・水 (3:1:1) および *n*-ブタノール・エタノール・クロロホルム・28% アンモニア水 (4:5:2:8) を用いた。それぞれの展開液で展開した TLC 板を紫外線ランプ (2523Å) でスポットを確認しながら展開部分を数個の画分に分け、かきとり法によりそれぞれの画分の活性を調べた。

5. cellulose tubing 透過性

Visking 社製 cellulose tubing (孔径 24Å) に培養液を入れ、同量の蒸留水で周囲を満たし、cellulose tubing の外液を攪拌しながら一夜放置したのち、cellulose tubing の内液と外液の活性を測定した。

6. 酸沈殿

培養液をビーカーに採り、攪拌しながら 0.1 N 塩酸を加え、pH 3.5 付近で生ずる沈殿を遠心分離 (10,000 rpm, 30 min) で集め、得られた沈殿と遠心上清の活性を調べた。なお、遠心上清は中和したのち活性の測定に供した。

7. 熱安定性

培養液を通常の培地殺菌条件 (121°C, 15 min) で加熱処理した。また、培養液 3 ml を 5 ml 容ステンレス製耐圧容器に入れ密封し、130, 140 および 150°C に調節した油浴に 20 分間浸漬したのち急冷し、これらの培養液の活性をカップ法により測定し、除菌ろ過した培養液の活性と比較した。

8. 抗菌活性物質の分離

アセトンを用いる方法：培養液に 0.1 N 塩酸を滴下し pH を約 4.5 に調節して寒剤で冷却し、冷アセトンを攪拌しながら徐々に加え 80% アセトン溶液として抗菌活性物質の分離を試みた。

硫酸塩析による方法：培養液に計算量の硫酸を加え

0.8 飽和溶液とし、一夜低温室 (約 5°C) に放置して生ずる沈殿を遠心分離 (10,000 rpm, 30 min) で集めた。

活性炭カラムによる方法：カラムクロマトグラフィー用活性炭を充填したカラム (1.2×25 cm) に培養液 100 ml を通し、吸着された抗菌活性物質をエタノール、メタノール、アセトン・水 (17:3)、メタノール・塩酸 (メタノール 100 ml に濃塩酸 0.5 ml を加えたもの) およびメタノール・アンモニア (メタノール 100 ml に 28% アンモニア水 2 ml を加えたもの) で、それぞれ 100 ml 用いて抗菌活性物質の溶出を試みた。

DEAE-cellulose カラムによる方法²⁾：酸沈殿で得た粗粉末 50 mg を少量の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶かし、同じ緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose カラム (1.2×25 cm) にチャージし、吸着された抗菌活性物質を食塩濃度の異なる 50 mM リン酸緩衝液で溶出させた。まず、0.3, 0.5 および 0.8 M の食塩濃度の緩衝液それぞれ 100 ml で展開した。また、0.3~1.0 M の食塩濃度の linear gradient elution で各 10 ml ずつ分画し、全量 600 ml で展開し抗菌活性物質の溶出を試みた。ついで、0.3 M より 0.8 M まで 0.1 M の食塩の濃度差をつけた緩衝液を用い stepwise elution による分画を試みた。なお、得られた画分に含まれる物質の存在を Lowry 法³⁾ で確認し、それぞれの画分の活性を調べた。

9. DEAE-cellulose カラムによる培養液の分画

培養液 1000 ml を 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) で平衡化した DEAE-cellulose カラム (2.2×25 cm) に通し、抗菌活性物質を吸着させ、0.3 M より 0.8 M まで 6 段階の食塩濃度の 50 mM リン酸緩衝液で stepwise elution により抗菌活性物質の溶出を試みた。それぞれの溶出液を cellulose tubing に入れ、一夜流水透析して脱塩したのち真空凍結乾燥し、それぞれの画分の粗粉末 (F-II~VI) を得た。

10. ゲルろ過による精製

9. で得た F-III の粗粉末 (10 mg) を少量の 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶かし、同じ緩衝液で平衡化した Sephadex G-100 のカラム (1.2×120 cm) にチャージし、同じ緩衝液で 6 ml/hr の流速で各 2 ml ずつ分画した。各画分に含まれる物質を Lowry 法で確認した。また、F-II, III および IV の粗粉末 (それぞれ 100 mg) を Sephadex G-100 のカラム (3.0×63 cm) にチャージし、10 ml/hr の流速で各 10 ml ずつ分画し、精製を行なった。

実験結果

分離細菌の培養液に含まれる抗菌活性物質について、

抗生物質をスクリーニングする手順に従ってその性質を検討し、ついで、抗菌活性物質の分離・精製を試みた。

1. 抗菌活性物質の性質

溶剤抽出：各溶剤への抗菌活性物質の移行性を検討した。酢酸エチルおよび酢酸ブチルを用いる抽出では、有機層および水層と、両者の間にコロイド状物質が存在する中間層がある。それぞれの層の活性を調べたところ、水層には強い活性が認められ、有機層には活性は認められず、中間層は弱い活性を示した。*n*-ブタノールでの抽出では、水層に強い活性が認められ、有機層にも弱いながら活性が認められた。

TLC：展開液にベンゼン・酢酸エチル (7:3) およびクロロホルム・メタノール (50:1) を用いた場合は原点に、メタノール、*n*-ブタノール・酢酸・水 (3:1:1) および *n*-ブタノール・エタノール・クロロホルム・28%アンモニア水 (4:5:2:8) を用いた場合は、それぞれ *R_f* 値 0.30, 0.55 および 0.62 の部分に ninhydrin 試薬に陽性を示すスポットが存在し、この部分に活性が認められた。その他の画分には活性は認められなかった。

cellulose tubing 透過性：cellulose tubing を用いる透析で、外液には活性は認められず、内液の培養液が処理前の培養液と同程度の活性を示した。

酸沈殿：培養液に希塩酸を加え pH を変化させて沈殿の生成状態を調べた。培養液は pH 4 付近で白濁を生じ、pH 3.5 付近に調節して放置すると多量の沈殿を生成する。この沈殿を遠心分離 (10,000 rpm, 30 min) で集め、微量の 0.01 N NaOH 水溶液に溶かし、cellulose tubing に入れて蒸留水中で十分透析した透析内液は強い抗菌活性を示した。この溶液は biuret 反応に陽性であった。また、この溶液を数滴ろ紙上に滴下し乾燥させたのち発色テストを行なったところ、ninhydrin 試薬および 2,6-dichlorophenol indophenol sodium 試薬⁴⁾ に陽性であった。沈殿を除去した遠心上清には活性は認められなかった。

熱安定性：培養液を遠心分離 (10,000 rpm, 15 min) して菌体を除去した上清を 115°C, 10 分間加熱処理した場合の活性は、培養液を限外ろ過装置 (孔径 0.30 μm) を用いて得た除菌液の活性と比較し、活性が低下しないことを報告した¹⁾。そこで、この抗菌活性物質が活性を維持しうる限界の温度を調べた。まず、121°C, 15 分間の加熱処理では活性の低下はまったく認められなかった。さらに高温での安定性を調べたところ、130°C の加熱処理では活性の減少が認められ、140°C 以上の加熱処理では培養液が褐変し活性は消失した。

2. 抗菌活性物質の分離・精製

アセトンによる分離：培養液を pH 4 付近に調節し、アセトンを加えたとき培養液は白濁する。これより沈殿を生成させるために一夜低温室 (約 5°C) に静置したが、アセトン溶液には少量の沈降物が認められたが、溶液は白濁した状態であった。遠心分離 (10,000 rpm, 30 min) によって得られる沈殿物は酸沈殿によって生成される沈殿物に比べ著しく微量であった。このアセトン沈殿物を水に溶かした溶液は活性を示した。

硫酸塩析による分離：0.8 飽和硫酸溶液として得られた沈殿は粘着性に富むもので、蒸留水には完全に溶解しにくく、少量の 0.01 N NaOH 水溶液を加えて中性にし不溶物を遠心分離で除き、上清を cellulose tubing に入れて一夜流水透析し、十分脱塩したのち真空凍結乾燥して粗粉末を得た。この粗粉末は強い活性を示した。また、生成した沈殿を除いた硫酸溶液を透析脱塩した溶液には活性は認められなかった。

活性炭カラムによる分離：活性炭を充填したカラムに培養液を通したとき、通過液と洗浄液には活性は認められなかったので、抗菌活性物質はすべて活性炭に吸着されている。この抗菌活性物質はエタノール、メタノール、アセトン・水 (17:3) およびメタノール・塩酸では溶出されず、メタノール・アンモニアでの溶出液に活性が認められた。

酸沈殿による分離：培養液を pH 3.5 に調節し生成する沈殿を遠心分離 (10,000 rpm, 30 min) で集め、少量の 0.01 N NaOH 水溶液に溶かして cellulose tubing に入れ、蒸留水中で十分透析脱塩したのち真空凍結乾燥し、粗粉末 (培養液 1 l 当り約 180 mg) を得た。この粗粉末は活性を示した。

DEAE-cellulose カラムによる分離：酸沈殿で得た粗粉末を用いて、DEAE-cellulose カラムによる分画を試みた。カラム通過液と洗浄液に活性が認められないので、抗菌活性物質はすべて DEAE-cellulose に吸着されている。この DEAE-cellulose より抗菌活性物質を溶出させる予備テストとして、展開溶液に 0.3, 0.5 および 0.8 M の食塩濃度の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を用いて順次展開し、それぞれの溶出液の活性を調べたところ、0.3 M の食塩濃度の溶出液には活性は認められず、0.5 および 0.8 M の食塩濃度の溶出液に活性が認められた。この結果より、抗菌活性物質は 0.5 M 近くの食塩濃度より溶出されると考えられるので、0.3~1.0 M の食塩の濃度勾配を持つ 50 mM リン酸緩衝液で展開し、分画した。それぞれの画分に含まれる物質を Lowry 法で確認し、Fig. 1 に示す溶出曲線を得た。この溶出曲線に

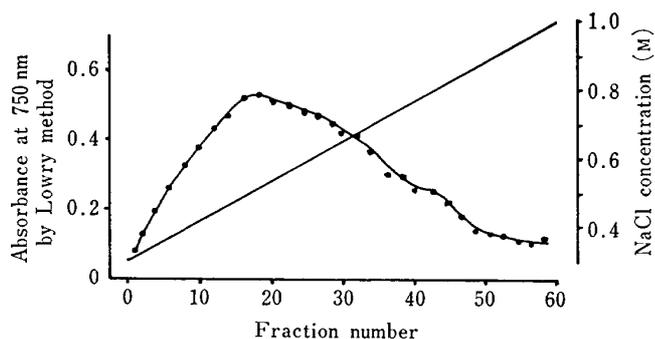


Fig. 1 Elution profile of the antifungal substance in the culture supernatant from a DEAE-cellulose column.

The antifungal substance was applied on a column (1.2×25 cm) of DEAE-cellulose. The column was eluted with a linear gradient of 0.3 to 1.0 M sodium chloride in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8). Fraction volume, 10 ml; —•—, absorbance at 750 nm by the Lowry method; —, sodium chloride concentration.

は特定のピークは存在せず、酸沈殿により得た粗粉末は幅広いイオン強度の領域で溶出される複数の物質が含まれる混合物であると考えられる。

DEAE-cellulose カラムの食塩濃度による stepwise elution: 予備テストにより抗菌活性物質は単一の物質でないと考えられるので、展開溶液の食塩濃度を 0.3 M より 0.8 M まで 0.1 M ずつ段階的に変化させる 6 段階の stepwise elution で溶出を試みた。粗粉末 (180 mg) を少量の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に溶かし、同じ緩衝液で平衡化した DEAE-cellulose カラム (2.2×25 cm) に抗菌活性物質を吸着させたのち、それぞれの食塩濃度の 50 mM リン酸緩衝液 200 ml で溶出した。それぞれの画分の活性を確認した結果、0.3 M 食塩濃度の画分には活性は認められず、0.4, 0.5 および 0.6 M の食塩濃度の画分の活性は強く、0.7 および 0.8 M の食塩濃度の画分には弱い活性が認められた。

DEAE-cellulose カラムによる培養液中の抗菌活性物質の分離: 培養液に含まれる抗菌活性物質の分離を効果的に行なうために、培養液を直接 DEAE-cellulose カラムに通し、抗菌活性物質を吸着させ分画する方法を検討した。培養液の DEAE-cellulose カラム通過液と洗浄液には活性は認められず、抗菌活性物質はすべて DEAE-cellulose に吸着されている。このカラムを 0.3 M より 0.8 M までの 6 段階の食塩濃度の 50 mM リン酸緩衝液それぞれ 200 ml で stepwise elution により各 10 ml ずつ分画した。各画分に含まれる物質を Lowry 法で測定し

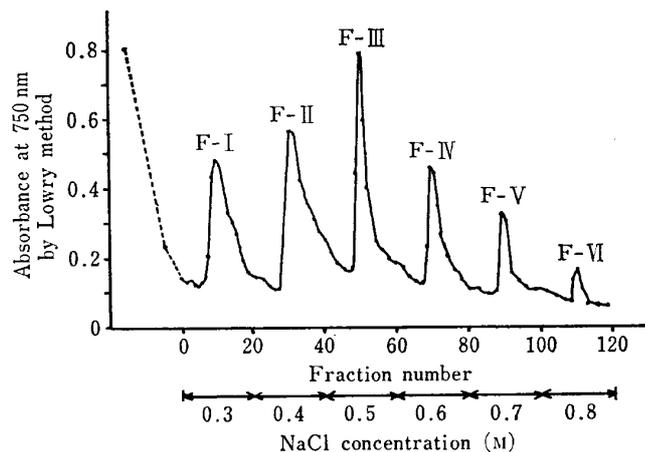


Fig. 2 Elution profile of the antifungal substance in the culture supernatant from a DEAE-cellulose column.

The culture supernatant was applied on a column (2.2×25 cm) of DEAE-cellulose. The column was eluted with a stepwise manner of 0.3 to 0.8 M sodium chloride in 50 mM phosphate buffer (pH 6.8). Fraction volume, 10 ml.

Fig. 2 に示す溶出曲線を得た。0.3 M 食塩濃度の溶出液 (F-I) には活性は認められず、0.4, 0.5 および 0.6 M の食塩濃度の溶出液 (F-II, III および IV) には強い活性が認められ、0.7 および 0.8 M の溶出液 (F-V および VI) の活性は微弱であった。活性を示す F-II~VI の溶出液を cellulose tubing に入れ、一夜流水透析し、十分脱塩したのち真空凍結乾燥し、それぞれの画分の粗粉末を培養液 1 l 当たりそれぞれ 81, 78, 43, 11 および 6 mg 得た。

ゲルろ過による精製: DEAE-cellulose カラムによる分画で得た粗粉末を Sephadex G-100 を用いるゲルろ過で精製した。F-III の粗粉末 (10 mg) を用いる予備テストで Fig. 3 に示すように精製された画分 (Fraction no. 25~40 の画分) を得ることができた。また、F-II および IV についても予備テストを行ない、同様の結果が得られたので、F-II, III および IV の粗粉末それぞれ 100 mg を Sephadex G-100 のカラム (3.0×63 cm) にチャージし、10 ml/hr の流速で各 10 ml ずつ分画した。各画分に含まれる物質を Lowry 法で確認しながら分画液を集め、cellulose tubing に入れ蒸留水を用いて透析し、十分脱塩したのち真空凍結乾燥し、精製粉末それぞれ 87, 85 および 78 mg を得た。この精製粉末を 0.2% 濃度の水溶液とし、被験菌に *H. oryzae* および *Pyricularia oryzae* を用いて活性を測定した (Table 1)。また、F-V および VI の粗粉末についても同濃度として活性を測定

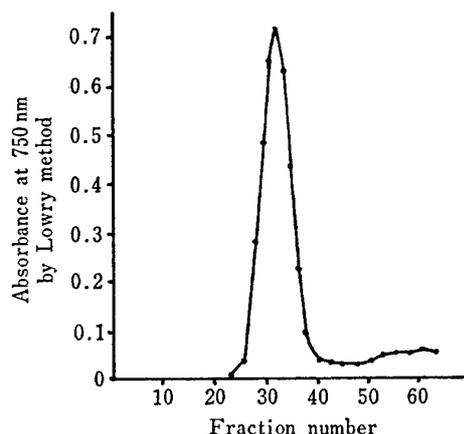


Fig. 3 Elution profile of the antifungal substance from a Sephadex G-100 column.

The antifungal substance (F-III, 10 mg) obtained from a DEAE-cellulose column, was put on a column (1.2 × 120 cm) of Sephadex G-100 equilibrated with 20 mM phosphate buffer (pH 6.8). The column was developed with the same buffer at a flow rate of 6 ml per hour. Fractions of 2.0 ml were collected.

Table 1 The antifungal activity of each fraction obtained with DEAE-cellulose column chromatography and gel filtration of Sephadex G-100.

Fraction	Activity	
	<i>Helminthosporium oryzae</i> (mm)	<i>Pyricularia oryzae</i> (mm)
F-II	23.0	30.0
F-III	23.5	29.5
F-IV	21.0	26.0
F-V ^{a)}	16.0	23.0
F-VI ^{a)}	17.5	25.0

The activity was tested by the cylinder plate method, and was represented by the diameter of an inhibited zone. 0.2% aqueous solution of the substance obtained from each fraction was tested. 0.2 ml of the test solution was poured into each cylinder.

^{a)} For F-V and VI, crude substances fractionated through a DEAE-cellulose column were used.

した。

考 察

分離細菌の培養液は種々のかびに対し生育阻害作用を示す。培養液の抗菌活性について検討を行なう場合、前

報¹⁾に従い培養液を 110°C, 10 分間加熱後供試料とした。さらに高温での抗菌活性の安定性を検討したところ、培養液に含まれる抗菌活性物質は少なくとも通常の培地の殺菌条件である 121°C, 15 分間の加熱までは活性を維持することができる耐熱性の物質であると考えられる。

溶剤抽出において、すべての水層に活性が認められることより、抗菌活性物質は水溶性であると考えられる。酢酸エチルおよび酢酸ブチル抽出で、中間層に活性が存在することは、溶剤の添加により凝集する物質に抗菌活性物質が吸着されていると考えられる。また、*n*-ブタノール抽出で有機層に弱い活性が認められることは、有機層に溶け込んだ水とともに移行した抗菌活性物質によるものと考えられる。また、TLC でのかきとり法により、活性を示すスポットが脂溶性物質に対して用いられる展開液では原点に留り、水溶性の抗生物質の確認に用いられる展開液で展開されることから、この抗菌活性物質が水溶性であることは明らかである。

この抗菌活性物質は、孔径 24Å の cellulose tubing を透過せず内液に残存するので高分子の化合物であると考えられる。この cellulose tubing は抗菌活性物質の分離・精製の段階で、透析による脱塩の操作に利用することができる。

この抗菌活性物質は biuret 反応および ninhydrin 試薬に陽性でありペプチド化合物と考えられる。また、2,6-dichlorophenol indophenol sodium 試薬に陽性であり、酸沈殿で抗菌活性物質が pH 3.5 付近で沈殿することより酸性物質と考えられる。

これらの結果より、分離細菌が生産する抗菌活性物質は pH 3.5 付近に等電点を持つ水溶性の高分子ペプチド化合物と考えられる。

ついで、培養液より抗菌活性物質を分離する方法を検討した。タンパク質の一般的な分離法を用い、抗菌活性物質の分離を試みた。溶解度を利用する分離法として、アセトンによる分別法、塩析による分別法および酸沈殿法について検討した。アセトンを用いる場合、タンパク質の構造によって沈殿しにくい場合がある。この抗菌活性物質も、アセトンの添加により培養液は白濁するものの、沈殿を生ずるまでには至らなかった。硫酸塩析による分離では、抗菌活性物質を沈殿させることはできるが、沈殿が粘濁であるために遠心分離による分別に困難をきたした。培養液に希塩酸を添加する酸沈殿法によって抗菌活性物質を容易に培養液より分離することができた。

DEAE-cellulose はタンパク質の分離に適しているの

で広範に利用されている。酸沈殿法によって得た粗粉末の DEAE-cellulose による分画で、食塩濃度を変える linear gradient elution により抗菌活性物質は複数の化合物であると推定される。そこで、stepwise elution により分画した結果、抗菌活性物質にはイオン強度の違いにより溶出部位の異なる多種類の物質が含まれることを確認した。この抗菌活性物質は培養液より直接 DEAE-cellulose に吸着させ、stepwise elution により分画することによって効率よく分離することができたので、この方法を抗菌活性物質分離の有効な手段として利用する予定である。

DEAE-cellulose により分離された粗粉末を Sephadex G-100 によるゲルろ過で精製した。得られた溶出曲線 (Fig. 3) より、抗菌活性物質の分子サイズは比較的均一なものと考えられる。また、精製粉末は被験菌 *H. oryzae* および *P. oryzae* に対し、強い生育抑制作用を示した。

要 約

- 1) 分離細菌によって生産される抗菌活性物質は pH 3.5 付近に等電点を持つ水溶性の高分子ペプチド化合物と考えられる。
- 2) この抗菌活性物質は少なくとも 121°C, 15 分間の加熱までは活性を維持することができる耐熱性の物質である。
- 3) この抗菌活性物質は培養液へのアセトンの添加で

は沈殿させにくい。

- 4) 硫酸塩析では、抗菌活性物質の沈殿が得られるが粘濁なため多量処理には不適當である。
- 5) 酸沈殿法により抗菌活性物質を容易に培養液より粉末として分離することができる。
- 6) 酸沈殿法で得た粉末を DEAE-cellulose で分画し、複数の抗菌活性を示す画分を得た。
- 7) 培養液を直接 DEAE-cellulose に通し、抗菌活性物質を吸着させ、これより 0.4~0.8 M の食塩濃度の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) を用いて stepwise elution により抗菌活性物質を分画することができる。
- 8) 培養液より抗菌活性物質の分離に、DEAE-cellulose を使用するバッチ法で大量処理が可能である。
- 9) Sephadex G-100 を用いるゲルろ過で、比較的分子サイズが均一な抗菌活性物質を得ることができた。

引 用 文 献

- 1) 辻 久生・辻美保子・上田博夫: 農薬誌 **15**, 1 (1990)
- 2) H. A. Sober & E. A. Peterson: *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 1711 (1954); **78**, 756 (1956)
- 3) O.H. Lowry, N.J. Rowebrough & R.J. Randall: *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951)
- 4) C. Passera, A. Pedrotti & G. Ferrari: *J. Chromatog.* **14**, 289 (1964)