

ジアセトナミンによる *Bacillus* 属細菌の芽胞化 および物質生産亢進に関する研究

応用生物科学専攻 生命分子化学講座 生態化学生物学 浅里 仁美

1. はじめに

Bacillus 属細菌は、土壌や大気中に普遍的に存在し、通常の栄養増殖サイクルとは異なる芽胞形成能を持つことが特徴とされる *Firmicutes* 門グラム陽性桿菌である。芽胞化した菌体は、その構造による高度な耐久性を有し、熱や酸、UV等からDNAを保護することが知られている。また、*Bacillus* 属細菌の中には芽胞化に連動して抗生物質や酵素、バイオサーファクタントを産生する種が存在する。例えば *B. subtilis* および *B. amyloliquefaciens* では fengycin や bacillaene といった複雑な構造を有する抗生物質が、また *B. thuringiensis* では実際に生物農薬として使用される殺虫性結晶タンパク質 Cry toxin が、芽胞化に連動して活発に産生されることが知られており、現在においても、これら食品・医薬・農薬分野では発酵法を用いた物質生産が主流である。当研究室では、園田・Kimらによって *B. amyloliquefaciens* にオカラを投与することでその芽胞化と抗生物質 iturin A 産生を亢進させることが、池田らによってオカラに含まれる芽胞形成促進物質がジアセトナミン (DA) であることが明らかにされた。本研究では、芽胞化と物質生産亢進の連動性に注目し、DA およびその類縁体化合物であるジアセトンアクリルアミド (DAAM) を投与した *Bacillus* 属細菌の二次代謝産物生産亢進を期待して、その生産性の検証と効率化に取り組んだ。

2. 方法

被検菌として *B. amyloliquefaciens* AHU 2170 株および *B. thuringiensis* NBRC101235 株を用いた。それぞれの細菌株を高栄養培地 (NB, ペプトン培地) で振盪培養 (30°C, 48 h, 100 rpm) し、これを前培養とした。さらに、培養物に直接、あるいは遠心分離による集菌後、MSG (Minimal salts medium + glutamate) 液体培地への菌体懸濁液として、これらに終濃度 400 μM DA 塩酸塩および類縁体を添加し、さらに 48 時間の往復振盪培養 (30°C, 100 rpm) を行った。得られた培養液から菌体を採取し、これを集菌後、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit® で蛍光染色したものを卓上蛍光顕微鏡下 (1500 倍率) で観察し、芽胞形成を確認した。さらに、*B. amyloliquefaciens* 菌体除去後の上清を *n*-BuOH との液液分配に供し、MeOH に再溶解した *n*-BuOH 可溶部を、培地 1~20 mL 相当量でペーパーディスクにチャージし、*F. oxysporum* 分生子混ぜ込み PDA 上で抗真菌活性を測定した。また *B. thuringiensis* では、菌体の超音波破碎処理あるいは CAPS 緩衝液 (pH 11) でタンパク質を可溶化・抽出し、SDS-PAGE に供して Cry toxin タンパク質バンドの検出を試みた。

3. 結果

B. amyloliquefaciens は、control を含むすべての試験区で芽胞の形成が見られたが、真菌菌糸生育阻止円径による抗真菌活性評価を行った結果、DA および DAAM 添加時の菌糸生育阻止活性は有意に上昇していた。また、*B. thuringiensis* では、DA および DAAM 添加により芽胞化と Cry toxin 様結晶タンパク質の産生が観察された。SDS-PAGE で検出される 140 kDa の非常に濃いタンパク質バンドを N 末端側からのペプチドシーケンス (TSNRK) にかけて、これを Cry1B と確認した。