

地衣類に含まれる抗生物質の同定

畑中淳之介、藤田剛輝、井上潮音、矢野亜実、後藤啓之、新川幹人、北田絢也
兵庫県立神戸高等学校総合理学科 2 学年

地衣類の中には抗菌活性のある物質を含むものがあることが知られている。我々は地衣類にどのような物質が含まれているのかに興味を持った。地衣類としてコフキデリナリア、ウメノキゴケを用い、その抽出液の成分をTLCによって分離・抽出するとともに、試験菌 (*Bacillus mycoides*) をまいた培地に、その分離した成分を含ませたペーパーディスクを置き、阻止円の大きさから抗菌活性の有無を評価した。その結果、調査した地衣類には複数の抗菌活性のある物質があることがわかった。その後もTLCで詳細な分離を試みたが、物質を特定するまでには至らなかった。

1. はじめに

抗生物質とは、微生物が生産し、他の微生物の発育や代謝や増殖を阻害、抑制する有機物質である。今日では多くの耐性菌が出現しており、新たな抗生物質の発見、開発、実用化が課題となっている。

菌類の中には他の種との競争を有利にするために抗生物質を生産する種が存在する。68 回生の先行研究では、菌類と藻類の共生体である地衣類にも同じように抗生物質を生成する種が存在するという仮説を立て、その仮説を 2014 年度の課題研究で証明した。

我々はこの地衣類に含まれている抗生物質を分離・特定することを目的として、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いた実験を行った。

2. 用いた地衣類と試験菌について

この研究で用いた地衣類は予備実験ではコフキデリナリア (ムカデゴケ科デリナリア属、神戸高校周辺にて採取、写真 1)、本実験ではコフキデリナリアとウメノキゴケ (ウメノキゴケ科ウメノキゴケ属、京都府にて採取、写真 2) を使った。



(写真 1)



(写真 2)

また、抗菌活性を調べるために本研究の予備実験と本実験において用いた試験菌は残留抗生物質の検査でよく用いられる *Micrococcus luteus* (和光純薬、以下 *M.l.* または *M.luteus* と略す)、*Bacillus mycoides* (和研薬株式会社、以下 *B.m.* または *B.mycoides* と略す)、*Bacillus subtilis* (独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー-NBRC、以下 *B.s.* または *B.subtilis* と略す) の 3 種類である。寒天培地は SCD 寒天培地 (一般細菌用、ケニス) を使用した。

3. 予備実験

3.1. 目的

先行研究をもとに、神戸高校周辺に生息する地衣類を対象として、地衣類が抗生物質を含有しているかどうかを検証する。

3.2. 材料

- ・乾燥地衣 I (コフキデリナリア)
- ・試験菌 (*M. luteus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*)
- ・SCD 寒天培地
- ・ペーパーディスク (直径 10mm、枝肉の抗菌性物質検査用、アドバンテック東洋株式会社)
- ・クエン酸アセトン緩衝液: 0.2 mol/L クエン酸溶液と 0.5 mol/L 水酸化カリウム溶液を等量混合した溶液 35 容、アセトン 35 容、及び蒸留水 30 容を混合して調製する。
- ・復水液: ポリペプトン 1g、硫酸マグネシウム七水和物 0.1g、酵母エキス 0.2g、純水 100mL を混ぜたものである。

3.3. 方法

- ① スパチュラで樹皮上の地衣類を削り取る。
- ② 採取した地衣類を電子天秤で 1.0g 量りとり、乳鉢に入れ、乳棒ですり潰す。粉状になった地衣類を遠心管に入れ、クエン酸アセトン緩衝液を 3.0mL 加える。この際、地衣類の粉全体にくまなく緩衝液が浸透する。
- ③ ②の状態を 6 日間放置した後、遠心分離 (3500rpm、2330G) を 15 分間行い、分離した液体の上澄み液を試験液とする。これ以降の④～⑦の操作はクリーンベンチ内で行う。
- ④ 培養している 3 種類の菌のコロニーをループでとりマイクロピペットで復水液を 0.20mL 加える。
- ⑤ マイクロチューブをボルテックスミキサーにかける。
- ⑥ マイクロピペットで⑤のマイクロチューブ内の溶液を 0.20mL 吸い取りスプレッターで培地にまんべんなく広げる。各菌を一つの培地に広げるため、三つの培地を用いる。
- ⑦ 試験液 (①～④で作成したもの) 1.0mL にペーパーディスク 3 枚を十分に浸し各培地に 1 枚ずつ置く。