

朝永振一郎記念

## 第14回「科学の芽」賞 応募用紙

受付番号	SH0061
応募部門	高校生部門
応募区分	個人応募
題名	オカダンゴムシの共生菌による抗カビ物質生産
学校名	出雲高等学校
学年	2年生
代表者名	片岡 征人

※ 個人情報保護のため、入力された項目から抜粋して出力しています。

# オカダンゴムシの共生菌による抗カビ物質生産

島根県立出雲高等学校 2年 片岡 柗人

## 1. 研究の背景・目的

小学1年からダンゴムシを研究しているが、野菜など腐りやすい餌を与えても、飼育ケースは全く掃除したことがないのに、カビも悪臭も発生しないことに気付いた。ダンゴムシのいない飼育ケースは掃除してもすぐカビが生えるのに、なぜなのか？小学4年から防カビ力に注目し、フンと唾液が抜群の防カビ力をもつことまではつきとめた。しかし、家庭での実験には限界があり、カビを抑える原因物質までは特定できないでいた。高校に入学し、設備の整った生物室で実験が可能になったので、今年こそ抗カビ物質をつきとめたい。

今回は、フン中で防カビ力を発揮しているであろう微生物に着目した。

抗生物質生産菌については多くの報告があるが、ダンゴムシのフンから単離した報告は(少なくとも自分で探すことのできた範囲では)ない。それ以外の場所から単離された菌については、カビの抑制の報告は細菌の抑制の報告に比べると少ない。

そこで、オカダンゴムシのフンから様々な常在菌を単離することで、新規性の高い、抗カビ物質生産菌およびそれらが生産する抗カビ物質を発見できるのではないかと期待した。

そして、将来的な実用化を見据えた実験も行い、新しい防カビ薬の開発をめざす。

## 2. 研究方法

被験カビ

※遺伝子解析(外注)と形態観察により菌種を同定

・ *Penicillium chrysogenum* 餅から単離

※実験2・4のみ

・ *Penicillium steckii* 青竹から単離

使用培地

・ PDA 培地 (真菌用) : 1L 中、

ポテトエキス	4.0g	
ブドウ糖	20.0g	
カンテン	15.0g、	pH5.6±

・ ブイヨン寒天培地 (一般細菌用) : 1L 中、

肉エキス	5.0g	
ペプトン	15.0g	
塩化ナトリウム	5.0g	
リン酸一水素カリウム	5.0g	
カンテン	15.0g、	pH7.0±

・ ハートインヒュージョン培地 (一般細菌用) 1L 中、

ハートエキス末	10.0g	
ペプトン	10.0g	
塩化ナトリウム	5.0g	
寒天末(必要時のみ)	15.0g	pH7.2±

・ LB 培地(一般細菌用) : 1L 中、

トリプトン	10.0g	
酵母エキス	5.0g	
塩化ナトリウム	10.0g	
寒天末(必要時のみ)	15g	pH 無調整

### 放線菌培養液の調製

第3章(実験6・7除く)で実験に使用する放線菌(H4株)は、LB液体培地に釣菌し、30℃、120rpm 往復振盪条件で1日以上培養した培養液を使用した。使用直前に、分光光度計を用いて600nm 波長光の透過率(%)を測定、1%以下の値を示すものを使用した。

### カビ孢子懸濁液の調整

第3章で実験に使用するカビ(*P. teckii*)は、寒天培地上からφ7mm コルクボーラーでくりぬいて滅菌蒸留水に入れ、ボルテックスした後、適宜希釈した。これを血球計算盤を用いて孢子数(spores/ml)を計測し、目的の濃度に調製した。

## 3. 各実験の方法と結果

### 第1章 抗カビ物質生産菌の選抜

#### 実験1 : フン中の常在微生物の単離

##### 方法

①自宅庭(出雲市内)より採集、出雲高校地内の土を入れたケースで飼育したオカダンゴムシ(*Armadillidium vulgare*)の体を消毒用エタノールで拭き、滅菌シャーレ内でフンをさせた。

②フン10粒を滅菌蒸留水1mlに入れ、よくすりつ



ぶして懸濁した後、上澄みを 1000 倍に希釈した。

③②を 10  $\mu$ l 平板培地に塗布し 72 時間培養した。培養条件は以下の 3 通り。

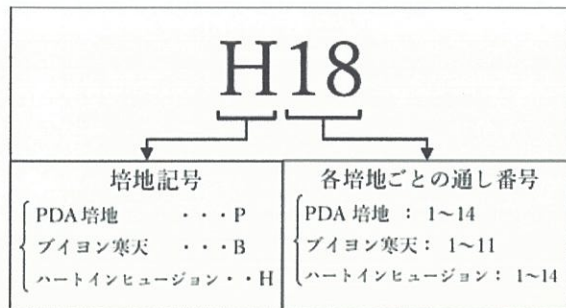
(a) PDA 培地で 27°C

(b) ブイヨン寒天培地で 37°C

(c) ハートインヒュージョン寒天培地で 37°C

④培養終了後、生育した常在菌のコロニーを一つずつ新しい培地に単離し純粋培養した。

単離した株は、**図 1** のように株番号を付した。



**図 1** 株番号の付け方

株	防かび活性		株	防かび活性	
	<i>P.chrysogenum</i>	<i>P.steckii</i>		<i>P.chrysogenum</i>	<i>P.steckii</i>
P1	-	-	B7	No Data	-
P2	-	-	B8	±	±
P3	No Data	No Data	B9	-	-
P4	-	-	B10	-	-
P5	-	-	B11	-	-
P6	+	+	H1	-	-
P7	±	+	H2	+	+
P8	±	±	H3	-	-
P9	-	-	H4	+	+
P10	No Data	No Data	H5	-	-
P11	-	-	H6	-	±
P12	-	-	H7	±	-
P13	-	-	H8	+	+
P14	-	-	H9	-	-
B1	±	±	H10	-	-
B2	-	-	H11	No Data	No Data
B3	-	-	H12	-	-
B4	+	±	H13	+	+
B5	-	-	H14	±	±
B6	-	-			

**表 1** フン由来株の防カビ活性一覧

+: 活性あり (生育阻止帯を形成)  
 ±: やや活性あり (生育を弱める程度)  
 -: 活性なし

**結果**

(a)PDA 培地・27°Cの条件から 14 株、(b)ブイヨン寒天培地・37°Cの条件から 11 株、(c)ハートインヒュージョン寒天培地・37°Cの条件から 14 株、計 39 株を単離した。単離した菌は、カビ様、細菌様、放線菌様と様々で、コロニーの色・形状も様々だった。

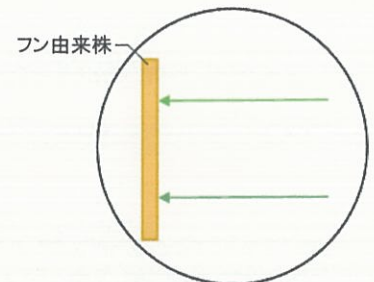
**実験 2 : 防カビ物質生産能スクリーニング**

**方法**

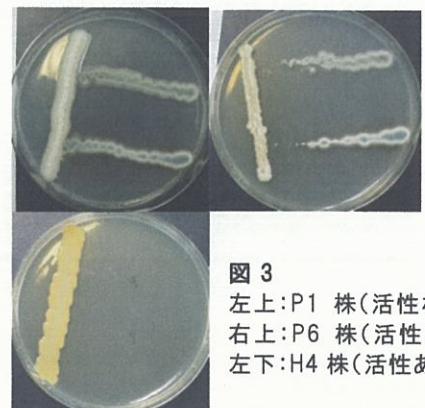
①実験 1 で単離したフン由来株を、それぞれが単離された時と同じ寒天培地に直線状に塗布して、十分にコロニーが生育するまで培養した。

②被験カビ 2 種の孢子を、飛散を防ぐため軟寒天に混ぜ、①のフン由来株の成長したコロニーに直交するように塗布 (**図 2**)。72 時間培養した。フン由来株とカビが混ざると正確に実験できないため、塗布の際、白金耳がフン由来株コロニーに触れないよう注意した。

③培養後、被験カビが生えない生育阻止帯<sup>\*1</sup>を形成したか、観察した。また、抗カビ活性の強度を、



**図 2** 緑矢印: 被験カビを塗布するライン



**図 3**  
 左上: P1 株 (活性なし)  
 右上: P6 株 (活性あり)  
 左下: H4 株 (活性あり)

<sup>\*1</sup> フン由来株が生産した抗カビ物質が寒天培地中に拡散し、濃度勾配を形成することで現れる、カビの成長が抑制される範囲。

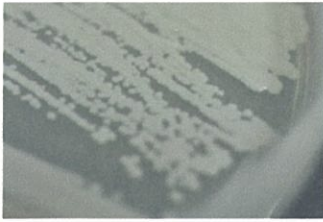


図4 H4株 植え継ぎ後のコロニー クリーム色をしている。

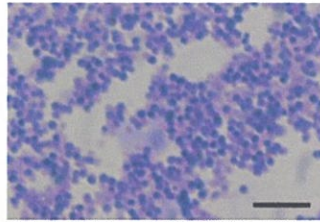


図5 H4株 光学顕微鏡写真 右下の直線が約10 $\mu$ m

生育阻止帯の幅で判定した。

### 結果

各株の結果を表1に示す。

全39株のうち、13の株が防カビ活性を示した。防カビ力の強度は様々であった。

H4株は、シャーレ全体にわたって被験カビの成長を完全に抑制し、濃度勾配の影響はみられなかった。(図3)。

この現象に興味を持ち、H4株を研究対象として選んだ。

## 第2章 H4株の菌種同定

### 実験3：H4株の形態観察

#### 方法

肉眼でコロニーを観察した。次に、グラム染色をして光学顕微鏡1000倍で観察した。

#### 結果

- コロニーは平滑で円状だった。単離した1世代目は黄色をしていたが、植え継いで2世代目以降はクリーム色になった。(図4)
- グラム染色では濃い紫色に染色された。(図5)
- 細胞によって形状が異なっていた。長さ0.6~1.0 $\mu$ m、幅0.6 $\mu$ m程度の球状や短い棒状など、いびつな形をしていた。(図5)

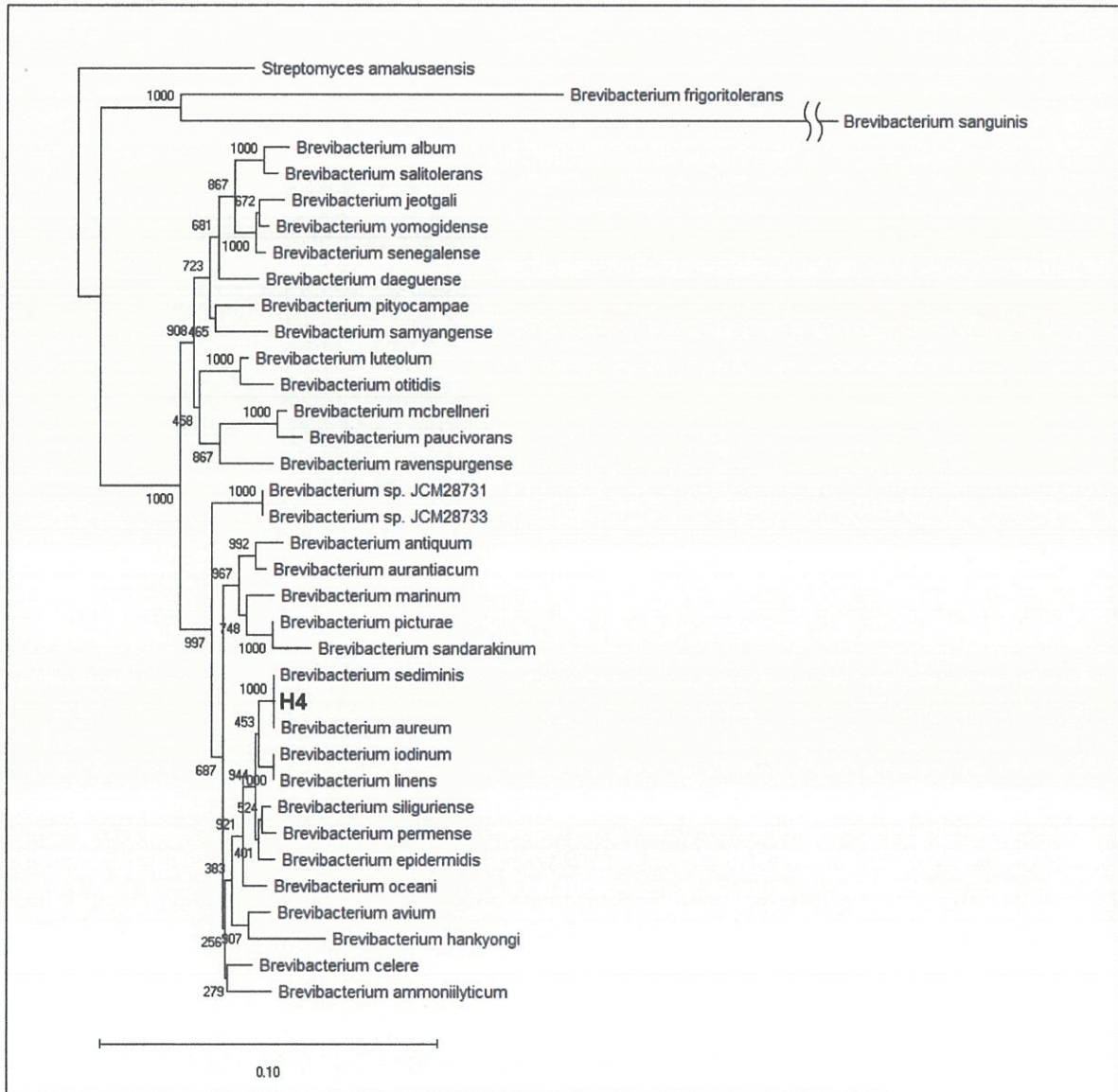


図6 作成した分子系統樹



#### 実験4：16S rDNA 遺伝子解析

##### 方法

細菌の分類手段として長い間使用され、データベースも豊富な16S rDNA領域を、シーケンス解析によって塩基配列を解読した。

解読した配列はまず、BLAST<sup>※2</sup> 検索をして、データベースにある既知生物との相同性を確認し近縁種を予測した。また、属を決定した。

次に、決定した属の全ての既知種の基準株と、外群として *Streptomyces* 属1種の16S rDNAの配列をNCBI(米国立生物工学情報センター)のデータベースから引用し、H4株の配列とともにClustalW<sup>※3</sup> でアライメントを行い、分子系統樹を作成した。系統樹の描画には、フリーソフト: Tree view32 を用いた。

##### 結果

・BLAST 検索では、次の菌種と98%以上の相同性が見られた

*Brevibacterium sediminis* CGMCC 1.15472<sup>T</sup> …100%

*Brevibacterium linens* VKM Ac-2119…99%

*Brevibacterium aureum* Enb12<sup>T</sup>…99%

*Brevibacterium iodinum* DSM 2062<sup>T</sup>…98%

*Brevibacterium epidermidis* NIOT-Cu-18…99%

*Brevibacterium oceani* BBH7<sup>T</sup>…98%

*Brevibacterium permense* VKM Ac-2280<sup>T</sup>…98%

・系統樹解析では、

*Brevibacterium sediminis* CGMCC 1.15472<sup>T</sup>

*Brevibacterium aureum* Enb12<sup>T</sup>

*Brevibacterium iodinum* DSM 2062<sup>T</sup>

*Brevibacterium linens* DSM 20425<sup>T</sup>

と近い位置にあった。(図6)

#### 実験5：生化学性状解析

##### 方法

系統樹解析でH4株と近い位置にあった4種の基準株を、国内のバイオリソースセンターから取り寄せた。

それぞれについて、同定キット: アピ20NEを使用して生化学性状を解析し、結果を比較した。プロトコルは製品説明書に従った。

##### 結果

H4株は、

*Brevibacterium sediminis* JCM 32488<sup>T</sup> と近い反応パターンを示した(表1)

反応/酵素	H4	<i>B. sediminis</i> JCM32488 <sup>T</sup>	<i>B. aureum</i> JCM21516	<i>B. linens</i> NBRC12142 <sup>T</sup>	<i>B. iodinum</i> NBRC15230 <sup>T</sup>	
硝酸塩還元	—	—	—	—	+	
インドール産生	—	—	—	—	—	
グルコース発酵	—	—	—	—	—	
アルギニンヒドロラーゼ	+	+	+	+	+	
ウレアーゼ	+	+	+	+	+	
エスクリン加水分解	—	—	—	—	—	
ゼラチン加水分解	—	—	—	—	—	
βガラクトシターゼ	—	—	—	—	—	
同化	グルコース	W	W	—	—	
	アラビノース	W	W	—	—	
	マンノース	—	—	—	—	
	マンニトール	+	W	—	—	
	N-アセチル-グルコサミン	W	W	—	—	
	マルトース	—	W	—	—	
	グルコン酸カリウム	+	+	—	—	
	カプリン酸	—	—	—	—	
	アジピン酸	+	+	—	—	W
	リンゴ酸塩	+	+	—	—	+
クエン酸三ナトリウム	+	W	—	—	W	
酢酸フェニル	W	W	—	—	—	

表1 アピ20NEでの生化学性状比較

+: 陽性 W: 弱く陽性 —: 陰性

※2 国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJセンターからオンライン上で展開されている、塩基配列相同性検索ツール

※3 国立遺伝学研究所 生命情報・DDBJセンターからオンライン上で展開されている、塩基配列アライメントツール

### 第3章 H4株が生産する抗カビ物質

**実験6**：H4株は、カビの発芽を抑制しているか？

#### 方法

実験2で、H4株によってカビの生育が抑制された各シャーレから、カビ孢子塗布部を培地ごと切り出し、プレパラートを作成した。作成したプレパラートを、光学顕微鏡1000倍で観察した。

#### 結果

H4株は、被験カビの発芽を完全に抑制していた。この2つの株が作用したシャーレは両方とも、被験カビ *P. chrysogenum* および *P. steckii* の孢子から菌糸の伸長は確認されなかった。(図7)

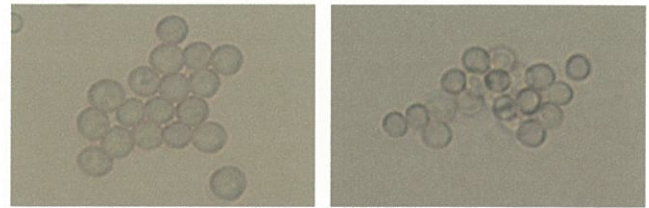


図7 実験6 被験カビ孢子 顕微鏡写真

左: 被験カビ *P. chrysogenum* の孢子、H4株が発芽抑制  
右: 被験カビ *P. steckii* の孢子、H4株が発芽抑制

**実験7**：H4株培養液は抗カビ活性を示すか

#### 方法

- ①H4株をハートインヒュージョン液体培地で7日間、120rpmの往復振盪条件で培養した。
- ②得られた培養液(600nm 光透過率 0.2%)を、15000rpm 10分遠心し、上清を孔径0.2μmのフィルターでろ過滅菌した。
- ③被験カビ(*P. steckii*)の孢子懸濁液を、 $1.7 \times 10^6$  spores/mlに調製し、1ml量り取った。これを15000rpm 10分の遠心によって孢子を沈殿させ、上清を捨てた。
- ④③に②を1ml加え、ピペッティングにより懸濁。
- ⑤④をスライドガラス上に30μl滴下し、滅菌水で濡らしたキムワイブを敷いたシャーレに入れた。(図8)
- ⑥27°Cで24時間培養した。
- ⑦顕微鏡でランダムに孢子を観察し、孢子発芽率を計測した。

コントロール:手順①で液体培地にH4株を入れず、同じ操作を行った。

#### 結果

2群間に有意差はみられなかった(図9)

実験2で生育阻止帯が非常に広く、培養液が抗カビ活性を示さなかったのは、抗カビ物質が作業中に揮発したからではないか？

→次の実験へ

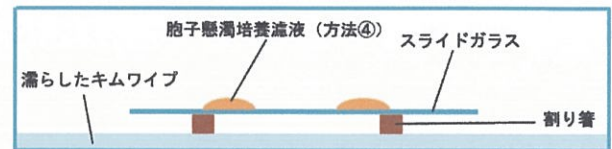


図8 実験7のシャーレの断面図

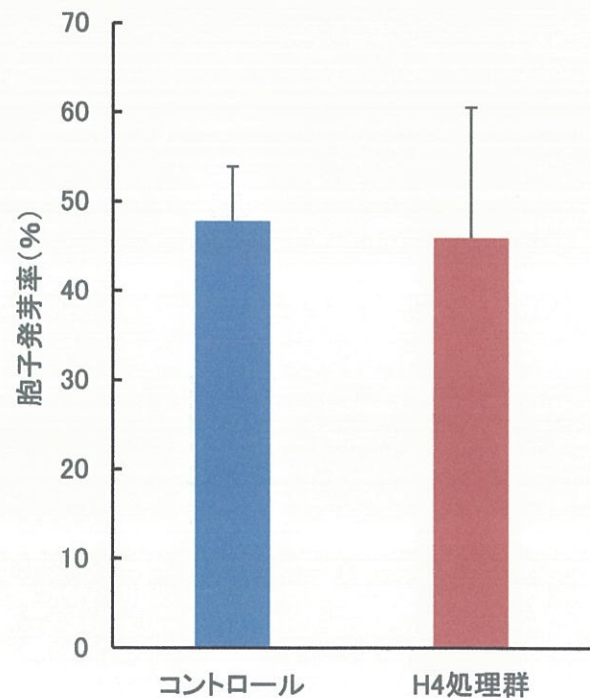


図9 H4株培養液による孢子発芽抑制の検証  
2群間に有意差はない



**実験8：H4株は、揮発性の抗カビ物質を生産するか？**

**方法**(図10)

- ① 2分割シャーレの片側にPDA、反対側にハートインヒュージョン寒天培地を作成した。
- ② ハートインヒュージョン寒天側に H4 株菌液 (600nm 光透過率 1.0%) を 10  $\mu$ l 塗布。
- ③ 27°C で 1 日培養
- ④ PDA 側に被験カビ孢子懸濁液 (1.35  $\times 10^5$  spores/ml) を 10  $\mu$ l 塗布。
- ⑤ 27°C で 3 日間培養
- ⑥ コロニーの形状を裏側からトレースし、これをスキャナで読み込み、画像解析ソフト「lia32」を用いて測定<sup>※4</sup>した。

コントロール：手順②でH4株を培養していないLB

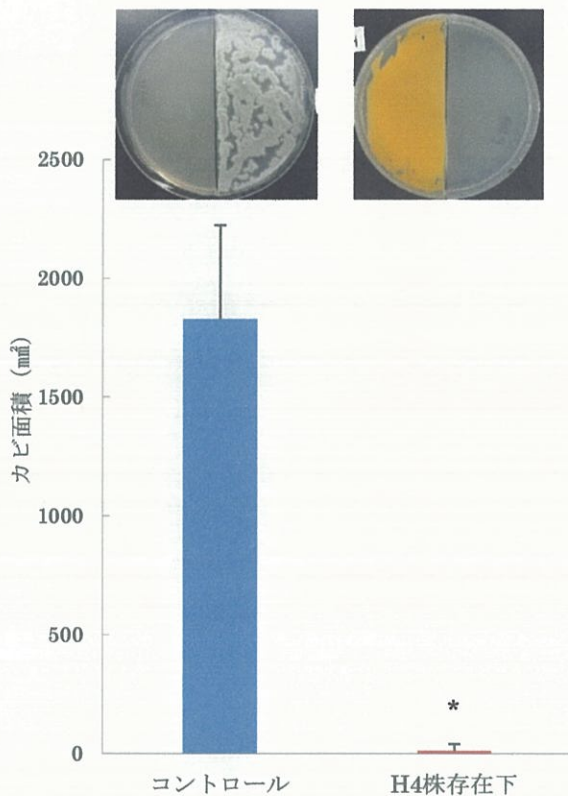


図11 H4株による揮発性の抗カビ効果  
\*: p<0.05 (T検定)



図10 実験8での2分割シャーレの断面図  
抗カビ物質は培地中を移動できないので、揮発した時のみ効果を示す

培地を塗布し、同じ操作を行った。

**結果**

H4株を塗布したものは、コントロールに比べて被験カビの面積が有意に小さかった。(図11)

**実験9：H4株の生産物質は、カビの胞子の成長を抑制しているか？死滅させたか？**

**方法**

- ① H4株培養液(600nm 光透過率 1.0%)を、ハートインヒュージョン寒天培地に 10  $\mu$ l 塗布し、24 時間培養し。
- ② 軟寒天に混ぜた被験カビ (*P.steckii*) の胞子を PDA 培地に 3 点植えた。これを上側に、①を下側にし、向かい合わせて静かに重ね合わせ、ビニールテープで密封。(図12)
- ③ 27°C で 72 時間培養後、H4 株培養プレートを取り外し、さらに 96 時間培養した。この間、24 時間毎に、被験カビのコロニーの面積を lia32 で測定した。

コントロール：手順①でH4株を培養していないLB培地を塗布し、同じ操作を行った。

**結果**

被験菌コロニー面積の推移を図13に示す。コントロール(未処理群)は被験カビのコロニーが順調に生育した。H4株を作用させたカビ(H4処理群)は、シャーレ3枚中1枚の3つは、H4株培養プレート取り外した後も、4日間発芽しなかった。残り2枚の6つは、H4株取り外し後1日間発芽しなかった。翌5日目には若干カビ胞子が発芽したものの、それ以降はほとんど成長しなかった。また、正常なコロニーは発芽してから約2日後には直径10mm程度まで生育し胞子を生産するようになるのに対し、H4株を作用させると、若干の発芽があるものの、面積の拡大はほとんどなく、直径3mm程度にとどまっていた。また、コロニーは非常に硬く、菌糸が密に固まったような状態で、胞子生産はなく、培地から容易に剥がすことができた。(図14)

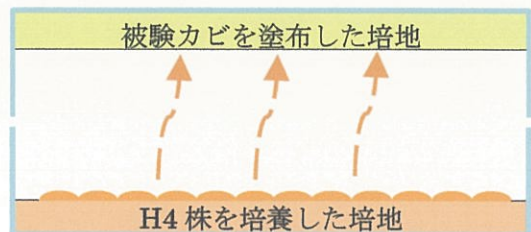


図12 実験9・10で、培地を重ねた状態の断面図

※4 名古屋大学 山本一清氏によって開発されたフリーソフト。画像読み取り精度と図形内のピクセル数から面積を推定する。

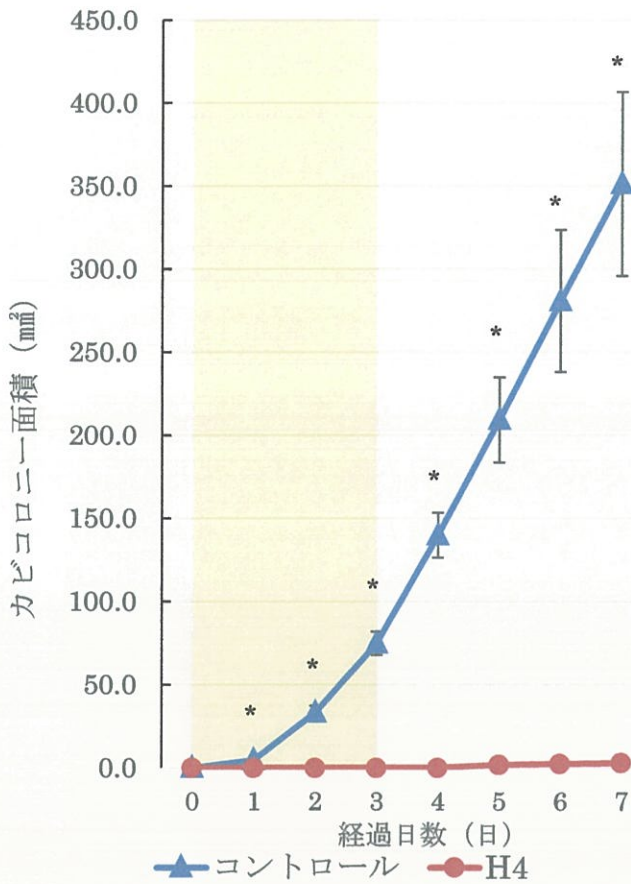


図13 被験カビの発芽前に H4 株を作用させたときの、被験カビのコロニーの面積の推移

黄色の網掛けは、H4 株を重ね合わせていた期間を表している。(H4 処理群は全体を通して9サンプルの平均値を示した。未処理群(control)は、3日目に2サンプル、6日目に1サンプルが孢子の飛散によって計測不能となったため、0~2日は9サンプル、3~5日は7サンプル、6日~7日は6サンプルの平均値をグラフに示した。)

\*:  $p < 0.05$  (各日ごとの二群間の T 検定)

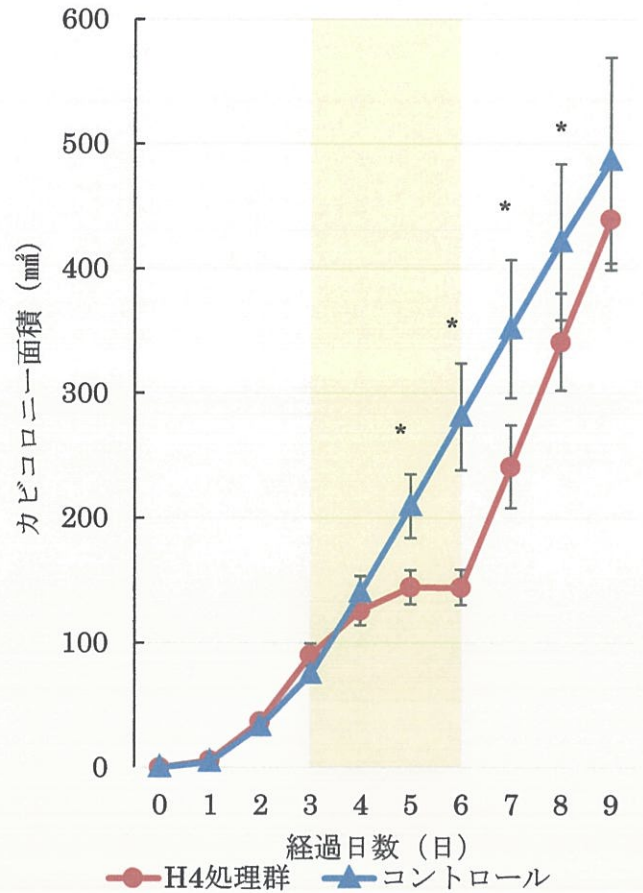


図15 被験カビのコロニー成長後に H4 株を作用させたときの、被験カビのコロニーの面積の推移

黄色の網掛けは、H4 株を重ね合わせていた期間を表している。(H4 処理群は、カビ孢子の飛散によって4日目に1サンプルが計測不能となったため、0~3日は9サンプル、4~9日は8サンプルの平均値を示している。未処理群(コントロール)は、3日目に2サンプル、6日目に1サンプルが、カビ孢子の飛散によって計測不能となったため、0~2日は9サンプル、3~5日は7サンプル、6日~7日は6サンプルの平均値を示している。)

\*:  $p < 0.05$  (各日ごとの二群間の T 検定)

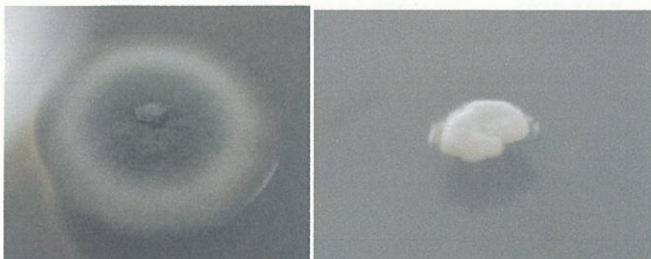


図14  
左: 通常のカビの発芽後3日目のコロニー  
右: H4 処理群の発芽後3日目のコロニー

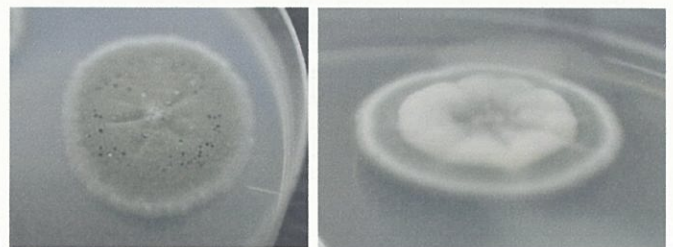


図16  
左: 通常のカビのコロニー  
右: 成長途中に H4 株の作用を受けたカビのコロニー



## 実験 10 : H4 株生産物質は、既に成長してしまったカビでも抑制するか?

### 方法

- ① H4 株について、実験 9 手順①と同様に培養した。
  - ② 軟寒天に混ぜた被験カビ (*P.steckii*) 胞子を PDA 培地に 3 点ずつ植え、27°C で 72 時間培養した。
  - ③ 培養終了後、②と①を図 12 のように静かに重ね合わせ、ビニールテープで密封。27°C でさらに 72 時間培養した。
  - ④ ①を取り外し、27°C でさらに 72 時間培養した。
  - ②～④の間、24 時間毎にコロニー面積を測定した。
- コントロール: 手順①で寒天培地に H4 株を培養していない LB 培地を塗布し、同じ操作を行った。

### 結果

被験カビのコロニー面積の推移を図 15 に示す。control (未処理群) は、被験カビのコロニーが順調に成長した。

H4 処理群は、被験カビが最初 3 日間でコロニーを形成、胞子生産した状態に、H4 株を作用させると、被験カビは徐々に成長が減速し、6 日目にはほとんど成長が止まった。H4 株を取り外すと、被験カビは成長を再開した。しかし、9 日目に表面を観察すると、中心付近が白く大きく盛り上がり、コロニーの縁の近くに残った緑色の部分も白みがかっており、正常なコロニーの状態ではなくなっていた。(図 16)

## 第 4 章 H4 株とダンゴムシの共生関係

### 実験 11 : H4 株はダンゴムシのフンに常に存在するか?

#### 方法

- ① H4 株に特異的な PCR 用プライマーを作成した。本来は、H4 株の種に特異的なプライマーを作成すべきであるが、*Brevibacterium* 属菌の 16S rDNA 配列は似ているものが非常に多く、種に特異的なものは作れなかった。そのため、今回は、16S rDNA の内側で変異が起こる部位をプライマーの配列として選択し、*Brevibacterium* 属に特異的なプライマーセット: *Brevibacterium* F と *Brevibacterium* R (ターゲット配列長: 478bp) 作成することができた。(図 17)
- ② 実験 1 を行ってから約 1 年後の 2019 年 8 月 6 日に、①自宅庭から採取 ②出雲高校地内から採取 ③自宅庭から採取し、出雲高校地内の土を入れたケースで飼育 の 3 条件のオカダンゴムシについて、実験 1 と同様の方法でフンを採取した。
- ③ 採取したフンから、土壌用 DNA 抽出・精製キッ

ト: ISOIL for Beads Beating (ニッポンジーン社製) で DNA を抽出・精製した。プロトコルは製品の標準プロトコルに従った。

- ④ 得られた DNA の 16S rDNA 領域を、PCR で増幅した。PCR 反应用試薬は、KOD FX (東洋紡社製) を使用した。プライマーセットは、ユニバーサルプライマー: fD1 と rP2 (ターゲット配列長: 1500bp 前後) を使用した。各プライマーの配列は文献<sup>7)</sup>から引用した。
- ⑤ 得られた PCR 産物を、2%アガロースゲル電気泳動を行い、フン中の何らかの細菌の 16S rDNA が増幅できていることを確認した。
- ⑥ ④で得られた PCR 産物を①で作成した特異的プライマーを使用して PCR 増幅した。
- ⑦ ⑥で得られた PCR 産物を、2%アガロースゲル電気泳動を行い、478bp の位置にバンドが現れるか確認した。

### 結果

3 条件のオカダンゴムシのフンからはいずれも、478bp の位置にバンドが検出された。(図 18)

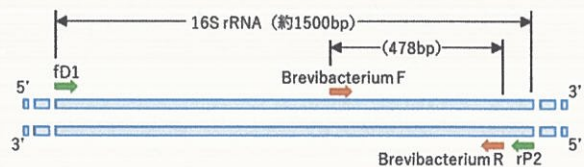


図 17 実験 11 で使用したプライマーの位置関係  
水色の長方形で DNA の 2 本鎖を、色付き矢印で各プライマーの結合位置を示した。

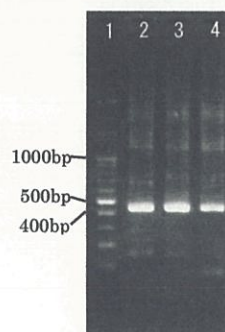


図 18 実験 11 特異的プライマーを用いた PCR 産物のアガロースゲル電気泳動  
1. DNA ラダーマーカー 2. 自宅庭で採取 3. 出雲高校地内で採取 4. 自宅庭で採取し、出雲高校地内の土で飼育。



## 4. 考察

### 第1章

- オカダンゴムシのフンには様々な菌が含まれており、その中にはカビの生育を抑制する働きを持つ種が複数存在している。

### 第2章

- H4株は *Brevibacterium* 属の放線菌である
- H4株は、*B. sediminis* の可能性が最も高い。  
この種に関しては論文が1件(Ping Chenら、2016年)のみだった。グラム陽性、かつ、この論文で報告された細胞の形状およびコロニー性状と近いことから、*B. sediminis* の可能性は高い。また、この論文では深海から単離したと報告されているが、培養条件は普通寒天で28℃と書かれており、CO<sub>2</sub>分圧等特殊な条件の記述もない。したがって陸上ででの生育は可能であると考えられる。  
⇒H4株は、*Brevibacterium* sp.

### 第3章

- 実験8で、2分割シャーレで抗カビ効果を示した。  
⇒この株が生産する抗カビ物質は揮発性がある。
- 実験2で、シャーレ内で抗カビ物質が揮発していたことによって、濃度勾配の影響が見られなかったと考えられる。
- 実験9で、9つ中3つのカビはH4株の作用を中断した後も発芽しなかった。  
⇒H4株生産物質がカビ胞子を死滅させられる可能性がある。
- 実験6でH4株が作用したカビは孢子から菌糸が伸びていなかった。実験8・9でも、発芽する前のカビの成長を抑制していた。
- 実験10で、すでに成長したカビは、H4株の作用を受けると成長が停止し、作用を中断すると成長を再開した。  
⇒H4株生産物質は、カビが発芽前でも、既に成長していても、抑制効果がある。
- 実験9・10で、H4株の作用を中断した後、成長を再開したカビのコロニーには、明らかな形質の異常が見られた。  
⇒H4株生産物質は、カビの形質にその影響が残る。

## 第4章

- 実験11で、H4株に特異的なプライマーを用いてPCR反応を行うと、実験1から1年後にサンプリングしたフンから目的のバンドが検出された  
⇒H4株は、出雲市内の自宅庭や出雲高校地内に生息するダンゴムシのフンに、安定的に存在している。

## 5. 今後の課題・展望

- 今回は、PDA培地、ブイヨン培地、ハートインヒュージョン培地の3つを使用してフンから菌を単離したが、他の培地を使用すれば更に他の菌を単離できる可能性がある。

### H4株(*Brevibacterium* sp.)について

- 実験9・10で、カビの成長を「抑える」ことはできるとわかったが、物質の濃度を上げたり、H4を重ね合わせる期間を延ばしたりすることで完全に「殺菌」することまで可能かどうか、今後確認したい。しかし、揮発性の物質の濃度をコントロールすることは容易ではない。
- H4株が単離されてから1年後に再び検出できたことは、H4株(*Brevibacterium* sp.)とダンゴムシとの何らかの共生関係を示唆するものと考えられる。H4株と最も近縁であるとわかった *B. sediminis* は、これまでにインド洋の深海からのみ単離されている(Ping Chenら 2016年)。このことと、H4株がオカダンゴムシのフンにいることとの関係は、追求していくと学術的価値があるかもしれない
- 今回、H4株生産物質は、カビが既に成長してしまっても効果を発揮することが確認できた。これは将来、予防的に使うだけでなく、医療分野での治療薬としての利用や、生活の中で既に生えてしまったカビの除去など、工業的な利用についても期待が高まった。今後も研究を進め実用化につなげたい。

## 6. 参考文献

- 1) Ping Chen, Limin Zhang, Jian Wang, Jisheng Ruan, Xiqiu Han & Ying Huang (2016), *Brevibacterium sediminis* sp. nov., isolated from deep-sea sediments from the Carlaberg and Southwest Indian Ridges, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 66 No. 12, pp. 5268-5274
- 2) A. S. Motta & A. Brandelli (2002),



Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevibacterium linens*, *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 92 No. 1, pp. 63-70

3) 乙黒 美彩, 中島 琢自, 宮道 慎二 (2012). 「放線菌の分離と抗生物質の探索」 『*生物工学会誌*』 Vol. 90 No. 8 pp. 493-498

4) 新井守, 岡崎浩 (1967). 「微生物のスクリーニング法 I - I 抗生物質及び生理活性物質」 『*化学と生物*』 Vol. 5 No. 5 pp. 294-303

5) 小西 正朗, 堀内 淳一 (2015). 「細胞の増殖を捉える一計測法から比速度算出まで」 『*生物工学会誌*』 Vol. 93 No. 3 pp. 149-152

6) 陰山大輔 (2014). 「ワラジムシ目の体内に生息する共生微生物の多様性と機能」 『*Edaphologia*』 Vol. 95 pp. 7-14

7) C. Ota-Tsuzuki, A. T. P. Brunheira & M. P. A. Mayer (2008), 16S rRNA region based PCR protocol for identification and subtyping of

*Parvimonas micra*, *Braz J Microbiol*, Vol. 39 No. 4, pp. 605-607

8) Y. Kanda & Bone Marrow (2013), Investigation of the freely-available easy-to-use software “EZ” (Easy R) for medical statistics. *Transplantation*, Vol. 48 pp. 452-458

## **8. 謝辞**

島根大学 上野誠先生には、実験を進めるにあたり技術的な指導をいただきました。

原孝宏様をはじめとした、公益財団法人島根県環境保健公社の皆様には、被験カビの菌種同定にご協力いただきました。

出雲高校の関係の先生方には、この研究にご協力いただき、大変お世話になりました。

お世話になった方々に深く御礼申し上げます。