

Massilia sp. BS-1が生産する青紫色素, 秋青紫 (Shu-Violet)

—新規ビオラセイン生産菌の分離と諸性質—

鈴木 一也*・上松 仁

Bluish-purple Pigments, Shu-Violet, Produced by *Massilia* sp. BS-1
—Isolation and characterization of a novel bacterium producing violacein—

Kazuya SUZUKI* and Hitosi AGEMATU

(平成21年12月3日受理)

In the course of screening for pigments produced by microorganisms, we found a novel bacterium, BS-1 strain, producing a bluish-purple pigment named Shu-Violet (SV). BS-1 strain was isolated from the soil collected at a park in Akita city, Akita Prefecture, Japan, and was found to be a new species belonged to the genus *Massilia* based on its 16S ribosomal DNA sequences. The strain was named *Massilia* sp. BS-1. The strain was a motile aerobic bacterium and also produced biofilm. SV was included in the biofilm. The chemical analysis of the pigment by UV-visible spectrum, mass spectroscopy and ¹H-NMR spectroscopy showed that the pigment was a mixture of violacein and deoxyviolacein. The 16S ribosomal DNA of BS-1 strain displayed 93 % homology with that of its nearest violacein-producing neighbor, *Janthinobacterium lividum*. The antibacterial effect of SV was confirmed for two putrefactive bacteria, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. The minimum inhibitory concentration (MIC) of SV for *B. subtilis* was 1.25mg/L. The high concentration of SV above 20mg/L caused lethal effects on *B. subtilis*. However, SV could not inhibit the growth of *E. coli* even if more than 30mg/L.

1. 緒言

天然色素はその由来から植物界, 動物界に存在するものと, 微生物により作られるものとの分類される。例えば, 植物界の色素としてインジゴ (藍) がある。インジゴは最も古い青紫色の天然染料で, 少なくともBC2000年のミイラを包んでいた麻布が藍で染められていたことが知られている。1800年代の終わり頃まで, インジゴはコマツナギ属 (*Indigofera*) という植物から得られていたが, 1887年にインジゴが2分子のインドールが重合した構造であることが分かったと化学合成法で製造されるようになった。現在でもジーパンなどのデニムの染料として使われている。動物界の色素としては昆虫に由来するカルミン酸 (赤色) やケルメス酸 (赤紫) などがある。一

方, 微生物は様々な色素を生産することが知られているが, 染料として繊維に吸着する染着性を持つ色素は少ない。鮮やかな青紫の色素として唯一ビオラセイン (Violacein) が知られている (Fig.1)。天然色素は合成色素に比べて, 鮮やかさに欠け, また日光で色あせるなどの色の安定性が弱い欠点を持っているが, 抗菌活性などの生理的活性を持つものもあり機能性色素として注目されている。

ビオラセインは, 1882年にアマゾン川流域の土壌や水から採取された細菌 *Chromobacterium violaceum* が生産する青紫色素として報告された¹⁾。その後の研究からこの青紫色素は2つの物質の混合物であることが分かり, 主成分がビオラセイン, 少量含まれる物質をデオキシビオラセインと名付けられて化学構造が決定された²⁾。ビオラセインの化学構造は (3-[1,2-dihydro-5-(5-hydroxy-1H-indol-3-yl)-2-oxo-3H-pyrrol-3-ylidene]-1,3-dihydro-2H-indol-2-

* 秋田高専専攻科学生

one) で表わされる。ビオラセインは青紫色の目立つ色素であることから, *Chromobacterium fluviatile*³⁾, *Janthinobacterium lividum*⁴⁾, *Alteromonas luteoviolacea*⁵⁾, *Pseudoalteromonas luteoviolacea*⁶⁾ などの他の微生物でも生産の報告がなされている。安定同位体を用いた生合成研究から, ビオラセインは2分子のL-トリプトファンが脱炭酸を伴う縮合反応により生成されることが分かった⁷⁾。また, ビオラセインは, 抗菌活性⁸⁾, 抗腫瘍活性⁹⁾, 抗ウイルス活性¹⁰⁾, 抗酸化活性¹¹⁾, 抗原生動物活性¹²⁾ などの広範囲の生理活性を持つことが報告されている。

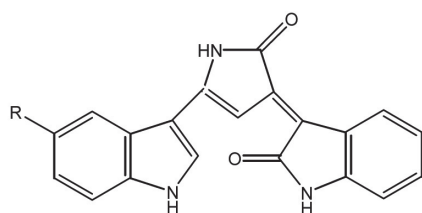


Fig 1. Structures of violacein (R = OH) and deoxyviolacein (R = H).

著者らは微生物の有効利用を目的として機能性微生物の探索を行っている。その一つが微生物が生産する染料として利用可能な機能性色素の探索である。この探索の過程で秋田市内の公園の土壌から青紫色のコロニーを形成する新種の細菌 *Massilia* sp. BS-1 株を発見した¹³⁾。この青紫色素を秋青紫 (Shu-violet, 以後SVと略記) と名付けて構造決定したところビオラセインとデオキシビオラセインであった。これまでに *Massilia* 属の菌によるビオラセイン生産の報告はない。

本報告ではBS-1株の発見と同定, 青紫色素SVの構造決定, SV生産, 抗菌活性について報告する。

2. 実験方法

2.1 培地組成及び培養条件

BS-1株の培養は分離培地 (酵母エキス0.1%, ポリペプトン0.1%, KH_2PO_4 0.1%, (pH 6.8)) を用いた。なお, 寒天平板分離培地は1.5%の寒天を加えた。培養温度は25℃あるいは28℃で振とう培養した。

検定菌の *Bacillus subtilis* および *Escherichia coli* の培養はLB培地 (トリプトン1%, 酵母エキス0.5%, NaCl 1%) を用いて30℃で振とう培養した。

2.2 土壌からのBS-1株の分離

秋田市内の公園から採取した耳かき一杯程の土壌

を1mlの滅菌した生理食塩水に懸濁し, ミキサーで良く攪拌した後に上清0.1mlを寒天平板分離培地 (シクロヘキシミド50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有) に塗布した。28℃で2~3日保温すると青紫色の固いコロニーが生育しBS-1株と名付けた。

2.3 BS-1株の同定

BS-1株のゲノムの16SrDNA領域をPCR法により増幅し, 得られた479bpをシーケンス後, National Center for Biotechnology information (NCBI)¹⁴⁾ のBLASTサーチでホモロジー検索を行った。系統樹解析はMEGA 4を用いて行った¹⁵⁾。

2.4 BS-1株の液体培養によるSVの生産

分離培地2mlを入れた遠沈管に寒天平板からBS-1株を接種し, 28℃もしくは25℃で振とう培養 (レシプロ) を行った。フラスコ培養は分離培地50mlを入れた300ml容のエrlenmeyerフラスコに植菌して振とう培養 (ロータリー) を行った。ジャー培養は3L容のジャーフェーマンターを用い, 培養温度: 25℃, 通気量: 0.5vvm, 攪拌速度: 300rpm, 培養液: 2Lで培養を行った。

2.5 SVの定量

BS-1株が生産したSVの簡便な定量は λ_{max} である570nmの吸光度 (A_{570}) により行った。培養液1mlを1.5ml容のエッペンチューブに取り15,000rpmで5分間遠心して透明な上清を除き, 得られた凝集菌体にメタノール1ml加えて攪拌してSVをメタノールに抽出した。SVは凝集体の中にあるのでメタノールに溶出しにくい時は超音波処理を行い, 再び15,000rpmで5分遠心して沈殿からSVが完全に抽出していることを確認して上清のメタノール液を取り, 570nmの吸光度を測定して $\epsilon = 1.7 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ よりSVの濃度を求めた¹⁶⁾。なお, SVの相対量を比較する場合は A_{570} を用いた。

2.6 SVのHPLC分析

SVのHPLC分析は以下の条件で行った。

Table 1. Analytical HPLC conditions

Column: ZORBAX SB-Aq (ODS, 4.6 I.D. \times 150 L mm)
Mobile Phase: 70% MeOH (v/v)
Flow Rate: 0.5 mL/min
Column Temp.: 40 $^{\circ}\text{C}$
Detection: 570 nm

2.7 培養液からのSVの単離精製

3L容のジャーファーマンターで得られた培養液2Lを菌体ごと等量の酢酸エチルで抽出してSVを酢酸エチル層に抽出した。酢酸エチル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後にエバポレーターで減圧下に酢酸エチルを留去して残渣を得た。残渣を70%メタノールに溶かして以下の条件の分取HPLCによるピーク分取を行い、移動相を減圧下に除いてSV-1(デオキシビオラセイン)とSV-2(ビオラセイン)を得た。

Table 2. Preparative HPLC conditions

Column: Inertsil ODS-3 (20 I.D. × 250 L mm)
Mobile Phase: 70% MeOH (v/v)
Flow Rate: 5.0 mL/min
Column Temp.: room temp.
Injection Vol.: 5.0 mL
Detection: 570 nm

2.8 SVの構造決定

¹H-NMRスペクトルはBruker AVANCE-500 (Bruker社製)を用いて溶媒は重メタノール(CD₃OD)で測定した。分子量はAgilent 6320 Ion Trap LC/MSシステム(アジレント・テクノロジー(株)製)を用いたESI-MSで測定した。

2.9 SVの抗菌活性

SVの発育阻止効果を検討するために、*B. subtilis*と*E. coli*を検定菌としてLB寒天平板培地での最小発育阻止濃度(MIC)を測定した。また、SVの致死効果を検討するために、検定菌をLB培地で対数増殖期(培養3時間)まで振とう培養し、DMSOに溶かした様々な濃度のSVを添加して培養を続け、経時的に培養液をLB寒天平板培地に塗布して生育コロニー数を数えた。

3. 実験結果および考察

3.1 SV生産菌BS-1株の分離と同定

BS-1株は寒天平板分離培地上で青紫色素を含むフィルム状の物質を生産して硬いコロニーを形成した。液体培養ではBS-1株は運動性を有する好気性桿菌で、凝集菌体になった(Fig. 2A)。顕微鏡で観察するとフィルム状の物質生産と菌が凝集しているのが分かる(Fig. 2B)。分離液体培地で静置培養をすると培養液の表面に菌膜を形成した。

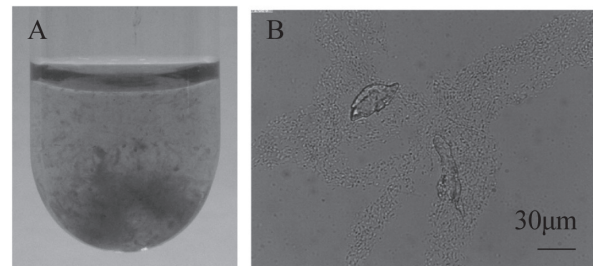


Fig 2. Flocculation of *Massilia* sp. BS-1.

BS-1株を同定するために16S rDNA領域(479bp)の塩基配列を決定した(Fig. 3)。16S rDNAの部分塩基配列に基づく相同性解析の結果、既知菌種との相同性が低く、97.9%の最も高い相同性を示した*Massilia brevitalea*から*Massilia*属の新種であると判断し*Massilia* sp. BS-1と名付けた。*Massilia*属はOxalobacteraceae科に属するグラム陰性菌である。これまでにビオラセインの生産は報告されていない。

特徴的な青紫色素であるビオラセインの生産菌として、*Chromobacterium violaceum*, *Janthinobacterium lividum*, 海洋細菌である*Pseudoalteromonas*属が報告されている。これらの細菌を含めた系統樹解析を行った(Fig. 4)。一番近縁の*Janthinobacterium lividum*との16S rDNAの塩基配列の相同性は93%であった。この結果より、BS-1株は既存のビオラセイン生産菌とは属が異なる*Massilia*属の新種である。

```

ATTGAACGCTGGCGGCATGCTTTACACATGCAAGTCGAA
CGGCAGCGCGGGGCAACCTGGCGGCGAGTGGCGAACGG
GTGAGTAATATATCGGAACGTACCCAAGAGTGGGGGATA
ACGTAGCGAAAGTTACGCTAATACCGCATACGATCTAAG
GATGAAAGTGGGGGCTCGCAAGACCTCATGCTCCTGGA
GCGGCCGATATCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTTAAAGGC
TCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGACG
ACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGCGC
AAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGCC
TTCGGGTTGTAAAGCTCTTTTGTACAGGAAGAAACGGCT
GGGGTTAATACCTCTGGCTAATGACGGTACCTGAAGAATA
AGCACCGGCTAACTAC
    
```

Fig 3. 16S rDNA sequences of *Massilia* sp. BS-1.

3.2 BS-1株の培養とSVの生産

BS-1株のフラスコ培養の結果から、SVの生産には十分な溶存酸素が必要なこと、培養温度は25℃が最適ことが分かった。そこで、Jar培養を行った。培養経過をFig. 5に示す。培養開始16時間後の対数増殖期末期から急激にSVの生産が始まり、5時

Massilia sp. BS-1が生産する青紫色素, 秋青紫 (Shu-Violet)

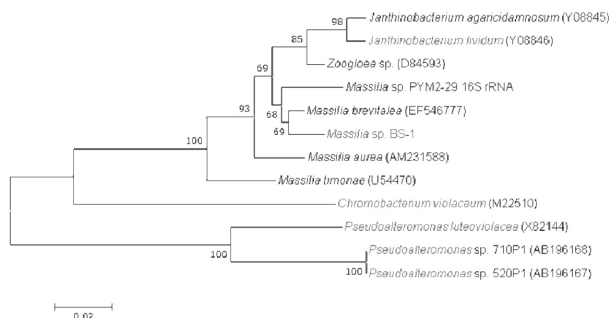


Fig 4. Phylogenetic relationships of *Massilia* sp. BS-1 to its relatives and violacein-producing bacteria constructed by using 16S rDNA sequences.

間後にはほぼSV生産が終了した。培養21時間で A_{570} は0.848であり、これはビオラセイン濃度0.017g/Lに相当する。*C. violaceum*においてビオラセインはautoinducer (AI) を介して起きるクオラムセンシング (Quorum Sensing) と呼ばれる菌数依存的な生物活性制御システムにより生産される¹⁷⁾。おそらくBS-1株においても常に少量のAIを培養液中に分泌していて、菌体濃度がある濃度以上になった時、AI濃度が閾値に達しAIの自己誘導によりAI量が飛躍的に増大して、AIによるSVの生合成遺伝子の誘導が起きると考えている。*C. violaceum*のAIは*N*-acylhomoserine lactoneであるが¹⁸⁾、BS-1株のAIについて現在、研究中である。

BS-1株は多糖を生産して凝集菌体になる。SVは菌体外に分泌されるが水溶性が低い (0.019g/L) ためほとんどが凝集菌体中に蓄積された。培養液を遠心分離するとほとんどのSVは沈殿した凝集菌体から回収された。酢酸エチルで抽出する場合は、菌体を分離することなく全培養液を抽出すると凝集菌体からもSVが完全に抽出され、水層側には白色の凝集菌体が残った。

3.3 SVのHPLC分析

Massilia sp. BS-1が生産した青紫色素SVを凝集菌体からメタノールで抽出してODSカラムを用いてTable 1の条件でHPLC分析した。Fig. 6に示すようにSVは2つの物質SV-1 (デオキシビオラセイン) とSV-2 (ビオラセイン) の混合物であった。SV中の比率はおよそ1:7であった。

3.4 SVの構造決定

Massilia sp. BS-1の培養液から酢酸エチル抽出、分取HPLCによりSV-1とSV-2をそれぞれ0.7mg, 1.3mg精製し、化学構造の決定を可視吸収スペクトル

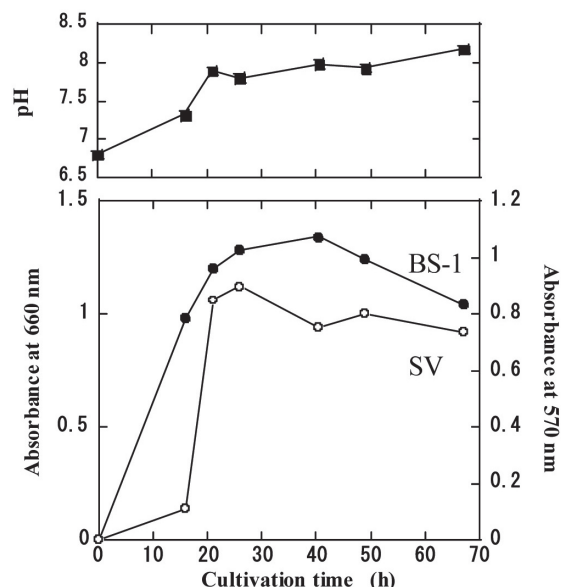


Fig 5. Time courses of cell growth (A_{660}) and SV production (A_{570}) using *Massilia* sp. BS-1. Symbols: ●, optical density of cells; ○, optical density of SV; ■, pH.

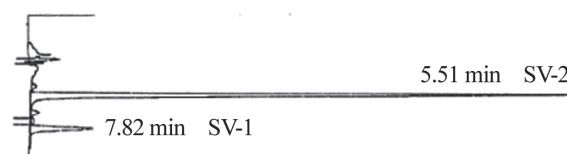


Fig 6. HPLC analysis of SV.

HPLC conditions: column: ODS (4.6 I.D. × 150 L mm); mobile phase: 70% MeOH; flow rate: 0.5 mL/min; column temp.: 40°C; detection: 570 nm

ル測定, ESI-MS測定, ¹H-NMRスペクトル測定により行った。

Fig. 7にSV-1とSV-2の吸収スペクトルを示す。 λ_{max} はそれぞれ560nm, 575nmであった。SV-1の分子量は、ESI-MS分析からm/z: 328.2 (positive), 326.0 (negative) より327と考えた。同様にSV-2の分子量をm/z: 344.2 (positive), 342.1 (negative) より343と考えた。

これらの情報からChapman & Hall/CRC社の化合物辞典 (DVD版)¹⁹⁾でUV = 550~590nm, MS = 327~328で検索したところ、ビオラセイン (MW: 343.34, CAS: 548-54-9) とデオキシビオラセイン (MW: 327.34, CAS: 5839-61-2) がヒットした。

最終的な構造確認は¹H-NMRスペクトル測定で行った。重メタノールで測定したために、フェノー

ル性およびアミン性のHシグナルは観察できなかったが、DMSO-d₆で測定したビオラセインの文献値²⁰と矛盾なく一致したことから、SV-1はデオキシビオラセイン、SV-2はビオラセインと同定した。測定したシグナルの帰属をFig. 8に示す。

3.5 SVの抗菌活性

ビオラセインの腐敗菌に対する抗菌活性は既に報告されている²¹がSVの腐敗菌に対する抗菌活性の検討を行った。枯草菌*B. subtilis*を検定菌として最小生育阻止濃度 (MIC) を求めたところ1.25μg/mlであった。次に、増殖菌体への致死効果を見るために*B. subtilis*をLB培地に植菌して30℃で3時間培養して対数増殖期に達したところで、最終濃度が0, 10, 20, 30μg/mlになるようにSVを添加して、培養液を経時的にLB平板培地に塗布して生菌数を数

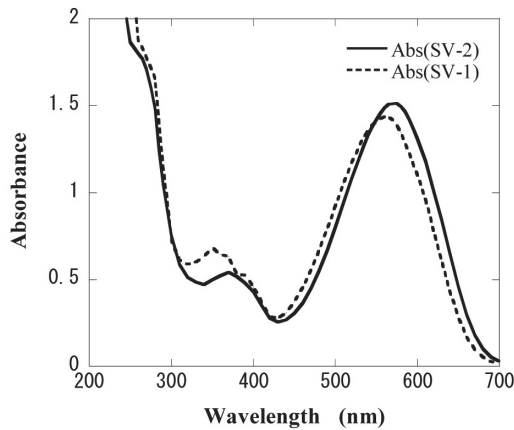


Fig 7. Absorbance spectrum of SV-1 and SV-2.

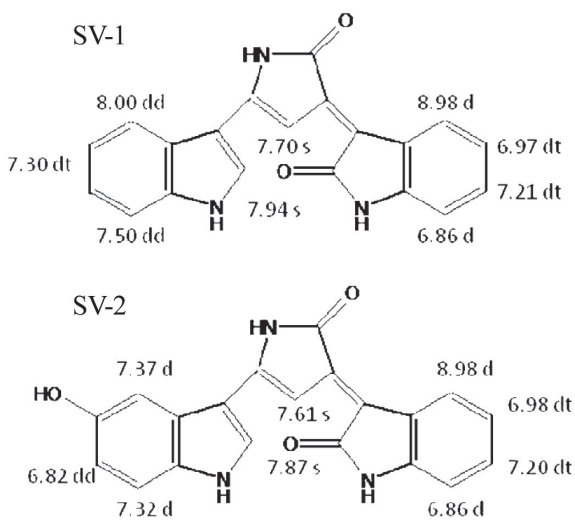


Fig 8. Assignment of ¹H-NMR signals of SV-1 (deoxyviolacein) and SV-2 (violacein).

えた。Fig. 9に示すように20μg/ml以上の濃度で増殖菌体に対する致死効果を示した。同様の実験を大腸菌*E. coli* K12株でも行ったが、MICは検定した最大濃度30μg/mlでも菌が生育し、この濃度においても増殖菌体の致死効果は見られなかった。ビオラセインはグラム陽性菌に対して抗菌活性を示すが、グラム陰性菌の大腸菌や真菌には抗菌活性を示さない²¹。SVの抗菌活性も同様の結果になった。

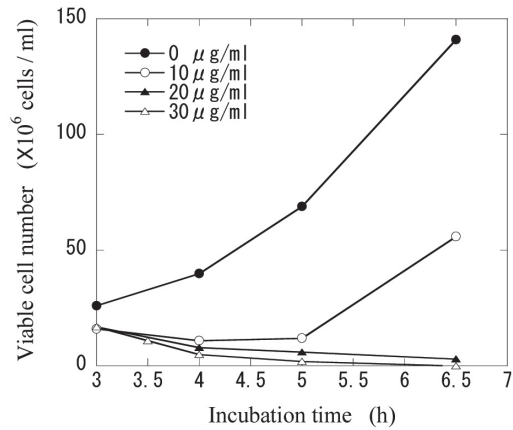


Fig 9. Growth inhibitory and lethal effect of SV in the logarithmic phase of *B. subtilis*.

Symbols : ●, 0μg/ml ; ○, 10μg/ml ; ▲, 20μg/ml ; △, 30μg/ml.

4. 結論

Massilia という属名はフランスのマルセイユで発見された菌であることに由来する。今までに5種が報告されている。BS-1株が秋田市の公園の普通の土壌から分離されたこと、これほど鮮やかな青紫色に目立つ菌が今までに報告されていないことも意外である。現在、*Massilia* sp. BS-1株の新種提案を計画している。

ビオラセインを生産する様々な菌が報告されている。その生合成遺伝子もクローニングされている。おそらく、この生合成遺伝子は水平伝播により属間を超えて広がったものと考えられる。微生物の遺伝子レベルでの多様性は予想以上に活発なのかもしれない。

BS-1株にとってビオラセインを生産することのメリットは、一つは抗菌活性である。少なくともグラム陽性菌は自分のテリトリーであるバイオフィルムから完全に阻害することができる。もう一つは光の遮蔽効果ではないかと考えている。

ビオラセインで注目されているのは, Quorum Sensing と呼ばれる一種の微生物同士のコミュニケーションシステムである。BS-1 株においても Quorum Sensing に関わる AI について研究中である。

謝辞

SV-1 と SV-2 の構造決定には, メルシャン株式会社生物資源研究所 一色邦夫博士のご協力を頂きました。ここに深く感謝します。

参考文献

- 1) Boisbaudran, L.D.: Matiere colorante se forme dans la cole de farine. Compt. Rend., **94**, 562 (1882)
- 2) Laatsch, Hartmut, et al.: Spectroscopic properties of violacein and related compounds: crystal structure of tetramethylviolacein. Physical Organic Chemistry (1972-1999), 1331-9 (1984)
- 3) M.O. Moss, C.Ryall, N.A. Logan: The classification and characterization of *chromobacteria* from a lowland river. J. Gen. Microbiol., **105**, 11-21 (1978)
- 4) T. R. Oberhofer: Cultural and biochemical characteristics of clinical isolates of unusual colistin-resistant pseudomonads. J. Clin. Microbiol., **12**, 156-160 (1980)
- 5) S. A. McCarthy, T. Sakata, D. Kakimoto, R. M. Johnson: Production and isolation of purple pigment by *AIteromonas luteoviolacea*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., **51**, 479-484 (1985)
- 6) L.H. Yang, H. Xiong, O. O. Lee, S.H. Qi, P. Y. Qian: Effect of agitation on violacein production in *Pseudoalteromonas luteoviolacea* isolated from amarine sponge. Lett. Appl. Microbiol., **44**, 625-630 (2007)
- 7) A. Z. M. Ruhul Momen and Tsutomu Hoshino: Biosynthesis of Violacein: Intact Incorporation of the Tryptophan Molecule on the Oxindole Side, with Intramolecular Rearrangement of the Indole Ring on the 5-Hydroxyindole Side. Biosci. Biotechnol. Biochem., **64**, 539-549 (2000)
- 8) N.Duran, S.Erazo, V.Campos: Bacterial chemistry-II: antimicrobial photoproduct from pigment of *Chromobacterium violaceum*. An. Acad. Bras. Cienc., **55**, 231-234 (1983)
- 9) N.Duran, P.S. Melo, M.Haun: In vitro evaluation of violacein on AIDS-related lymphoma-and human tumor cell lines. Proceedings of the XXV Annual Meetings of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Sociedade Brasileira de Bioquimica e Biologia Molecular SBBq, Caxambu, MG, Brazil, p.150 (1996)
- 10) D. Rettori, N.Duran: Production, extraction and purification of violacein: an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. World J. Microb. Biotechnol., **14**, 685-688 (1998)
- 11) M. B. M. De Azevedo, et al.: Biological activities of violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with β -cyclodextrin. J. Incl. Phenom. Macrocyclic Chem., **37**, 93-101 (2000).
- 12) L. L. Leon, C.C. Miranda, et al.: Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. J. Antimicrob. Chemother., **48**, 449-450 (2001)
- 13) 鈴木一也, 津谷浩晃, 上松仁: *Massilia* sp. BS-1 が生産する青紫色素, 第60回日本生物工学会大会講演要旨集, 11p18, p209 (2008)
- 14) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- 15) <http://www.megasoftware.net/>
- 16) R. V. Antonio, et al.: Genetic analysis of violacein biosynthesis by *Chromobacterium violaceum*. Genetics and Molecular Research, **3**, 85-91 (2004)
- 17) Paul Williams, et al.: Look who's talking: communication and quorum sensing in the bacterial world, Phil. Trans. R. Soc. B., **362**, 1119-1134 (2007)
- 18) Kay H. McClean, et al.: Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactones. Microbiology, **143**, 3703-3711 (1997)
- 19) <http://www.chemnetbase.co/>
- 20) Tsutomu Hoshino, et al.: Biosynthesis of Violacein: a Novel Rearrangement in Tryptophan Metabolism with a 1, 2-Shift of the Indole Ring. Agric. Biol. Chem., **51**, 965-968 (1987)
- 21) Yoshitoshi Nakamura, et al.: Production of

Antibacterial Violet Pigment by Psychrotropic
Bacterium RT102 Strain. *Biotechnology and*

Bioprocess Engineering, 8, 37-40 (2003)