

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02934

研究課題名(和文)ポリフェノールを活用した光殺菌の実用化に資するカビ孢子の表面電位解析技術の開発

研究課題名(英文) Studies on the electrostatic surface potential analysis of fungus spores for the improvement of photofungicidal technology by the combination with polyphenols

研究代表者

白井 昭博 (SHIRAI, Akihiro)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学域)・准教授

研究者番号：40380117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：細菌やカビの殺菌において光増感剤を用いた光殺菌は有効な手法である。しかし、それには高価な化合物を使用するため、その殺菌技術を農業分野に適用するためには安価で安全な化合物を探索する必要がある。本研究の成果は、フェノール酸類化合物で処理したカビ孢子の表面ゼータ電位の変化とその化合物の光殺カビ活性の関係性を示したことであり、さらにその解析手法は、バイオマス由来のリグニン分解物からの有用資源の選抜にも有効であることを示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、有効な光殺カビ活性を示す光感受性ポリフェノールを探索するための手法の開発を目的とし、フェノール性化合物で処理したカビ孢子の表面ゼータ電位を解析することで殺カビ特性を有した化合物をスクリーニングする技術の確立を目指した。

その成果は、カビ孢子の表面ゼータ電位の差とフェノール性化合物の光殺カビ活性との間に関係性を認め、その解析法は、様々なフェノール性化合物が含まれるバイオマス由来のリグニン分解物に対しても光殺カビ活性を示す有効な化合物群を選抜できると手法であると示唆されたことである。当該手法を利用することで、光殺菌に適したバイオマス由来のポスト化合物の創出に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：Sterilization combined with photosensitizers is effect on the control of bacteria and fungi. Exploring new safe compounds, which are not expensive, needs to apply the sterilization methods to agricultural field. As results of this study, we found that the treatment of fungal conidia with phenolic acids influenced the surface zeta potential of conidia and produced differences in the zeta potentials between the treated conidia and untreated conidia suspended in water alone. And moreover, the change of zeta potentials was related to the photo-fungicidal activity against the tested conidia. We suggested that the analysis methods are useful for the selection of lignin degradation products from biomass to speculate effective antifungal activity of the lignin productions combined with light exposure.

研究分野：微生物制御工学

キーワード：ゼータ電位 ポリフェノール カビ孢子 光殺菌 バイオマス

1. 研究開始当初の背景

植物病は、微生物(カビ、細菌など)や害虫、栄養の過不足、有害物質、気象などが原因で引き起こされる障害の総称であり、植物病によって農作物の生産可能量の約3割が損失していると報告されている。これに併せて、カビが産生するマイコトキシンによる農作物汚染も深刻な問題である。その損害額は、米国では15億ドル超といわれている。マイコトキシンは、ヒトや動物に食中毒を引き起こし、また強い発ガン性物質となる。従って、人類の食による健康を担保するためには、病原性のカビを殺菌・制御する必要がある。

カビの殺菌・制御として、抗カビ剤の使用は有効な手段である。しかしながら、農作物、食品、家畜飼料への継続的かつ過剰な使用は、消費者による食に対する安全と安心は得られない。さらに、抗カビ剤の大量使用は耐性化が懸念される。深在性真菌症の治療に有効な細胞壁多糖の合成を阻害する特異性の高いエキノキャンディン系抗カビ剤においても、耐性菌の報告例が増加している。従って、安全性が高く、耐性病原菌の出現リスクの低い、抗カビ剤に代わる殺カビ手法の開発が強く望まれている。

そこで申請者は、新しい殺カビ技術として、光増感物質と光を併用する手法に着目した。この手法は既に、癌治療分野で腫瘍細胞を死滅させる手法、photodynamic therapy (PDT) として臨床研究が進んでおり、殺菌分野でも検討され始めている。そして、光増感反応で生成する活性酸素種に寄与した殺菌機構は、細胞膜、タンパク質、DNA などのマルチターゲットな酸化反応に帰するので、耐性化を誘導するリスクが低いと考えられている。その一方で課題はある。これまでにカビに対する PDT 研究が実施されているが、使用された光増感物質は、腫瘍細胞、細菌、酵母に対して有効であった化合物であり、1g で数万円もする化合物がほとんどである。従って、量産コストが技術の波及効果に影響する農作物や家畜飼料の殺カビ処理に可能な化合物の効率的な探索が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、有効な光殺カビ活性を示す光感受性ポリフェノールを探索するための手法の開発を目的とし、フェノール性化合物で処理したカビ胞子の表面ゼータ電位を解析することで殺カビ特性を有した化合物をスクリーニングする技術の確立を目指した。

3. 研究の方法

(1) ポリフェノールで処理したカビ胞子の表面ゼータ電位とその抗カビ活性の関係性の検討(全ての試験において、*Cladosporium cladosporioides* IFM 63149 を用い、ポテトデキストロース寒天培地(PDA)で2週間培養後に胞子を回収して使用した。)

ポリフェノールとして市販のフェノール酸類(フェルラ酸(FA)、バニリン酸(VA)、カフェ酸(CaA)、クマル酸(CA)、没食子酸(GA)、クロロゲン酸(ChA))を用いて、カビ胞子の生育抑制効果を調べた。各フェノール酸の濃度は0.32~5.0 mM、初発カビ胞子濃度は 1×10^6 conidia/mLとし、25 培養(1/8濃度のポテトデキストロース培地を使用)による濁度上昇曲線から、コントロールと比較して濁度上昇を50%以下に抑える最小生育抑制濃度(IC₅₀)を求めた。

およそpH 2~8の範囲でのカビ胞子の表面ゼータ電位を測定し、そのpH依存性を調べた。溶液pHはHClとNaOH溶液で調整し、その溶液にカビ胞子(5×10^6 conidia/mL)を懸濁後、pHとゼータ電位(Litesizer 500, Anton Paar)を測定した。

フェノール酸類濃度0.63~5.0 mMの範囲で、カビ胞子(5×10^6 conidia/mL)を1分間処理後、そのpHとカビ胞子液の表面ゼータ電位を測定した。

フェノール酸類とブルーライトの併用による殺カビ活性を調べた。各化合物の濃度を2.5 mMとし、ブルーライトには405 nmを放射ピークとするLEDを使用し照度を84.6 mW/cm²に設定した。初発生菌数は 5×10^4 conidia/mLとし、60分間の照射後の生菌数をコントロールと比較することで光殺カビ活性を評価した。なお、PDAに形成されたコロニー数を生菌数として扱った。

(2) 草本バイオマス由来のリグニン分解物の光殺カビ活性と表面ゼータ電位の関係性の検討

リグニン分解物には稲わらの水蒸気爆砕リグニンを使用した。稲わらを水蒸気爆砕処理(25 atm, 5 min)し、水洗浄により得た水抽出物、その残渣からエタノールで抽出させたリグニン分解物を取得した。そのリグニン分解

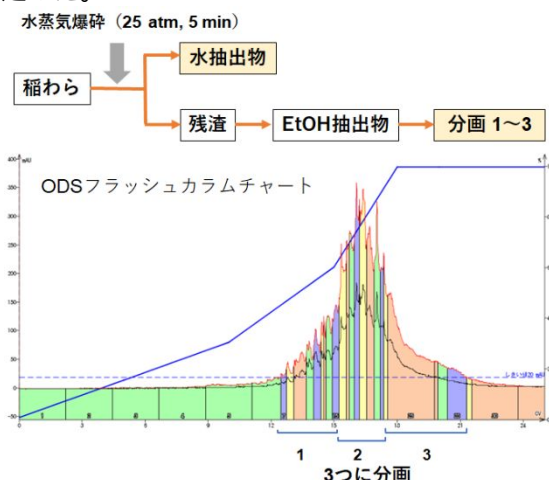


図1 水蒸気爆砕リグニン分解物の取得

物は、ODS フラッシュカラムでさらに3つに分画（親水性画分側から1, 2, 3と略す）され、合計4試料を取得した（図1）。殺菌試験ならびに表面ゼータ電位測定における試料濃度は、総ポリフェノール量（TP量）を採用するため、フォーリンチオカルト法により没食子酸当量に換算し扱った。

光殺菌力の評価は、カビ孢子懸濁液

（ 5×10^4 conidia/mL）に各試料をTP量10 mg/Lで添加し、ブルーライト（84.6 mW/cm²）で照射した。照射前、30分、60分、120分照射後にサンプリングし、生菌数をコロニーカウント法で測定した。

水蒸気爆砕リグニン4試料（水抽出物、エタノール抽出物1~3）のTP量を10 mg/Lとし、カビ孢子懸濁液（ 5×10^6 conidia/mL）を1分間処理後のpHと表面ゼータ電位を測定した。

(3)水耕栽培液の殺菌処理として水蒸気爆砕リグニンを用いた光殺菌の有効性の検証

タデアイを栽培している水耕栽培液を試験液とし、最も光殺菌力が強かったリグニン分解物（エタノール抽出物3）をTP量10 mg/Lになるように添加し、60分間のブルーライト（84.6 mW/cm²）照射によるカビの生菌数への影響を調べた。本試験では、養液中に生存するカビの生菌数が少なかったため、クラドスポリウム孢子を 3×10^3 conidia/mLになるように加え、コロニーカウント用のPDA培地にはクロラムフェニコールを加え、糸状性菌のコロニー数により光殺菌力を調べた。

4. 研究成果

(1) ポリフェノールで処理したカビ孢子の表面ゼータ電位とその抗カビ活性との関係性

フェノール酸類のIC₅₀の決定

図2は、FAを0.32、0.63、1.25、2.0、2.5 mMに調製し、カビの生長による濁度変化を示している。IC₅₀は、コントロールの24時間培養時の濁度変化を1/2以下に抑える最小化合物濃度とし、FAのIC₅₀は2.0 mMに決定された。その他の化合物も同様に増殖阻害効果を調べた結果、VAは5.0 mM、CaAは2.5 mM、CAは2.0 mM、GAは2.0 mM、ChAは1.25 mMと決定された。

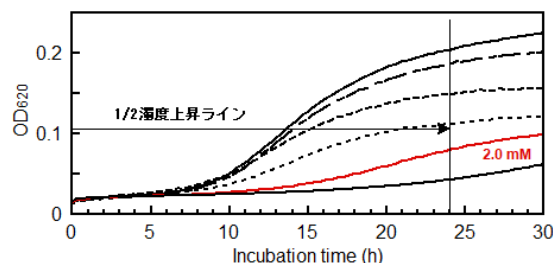


図2 カビの増殖曲線に対するフェルラ酸の添加濃度の影響

pHに影響するカビ孢子の表面ゼータ電位

細菌ならびにカビ孢子の表面ゼータ電位はpHに依存することが分かっている。そこで、試験カビ孢子の各pHにおける表面ゼータ電位を測定した（図3）。そして、3次関数近似曲線式で示し、その式は、 $y = -0.266x^3 + 5.5196x^2 - 37.118x + 48.582$ ($R^2 = 0.9581$) となった。

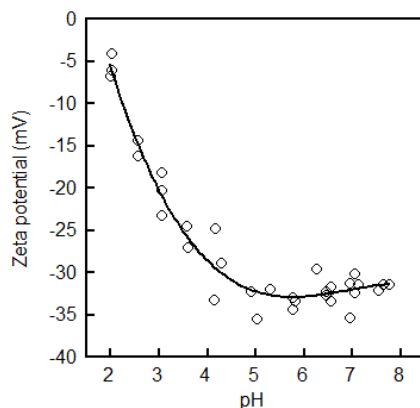


図3 カビ孢子の表面ゼータ電位のpHによる影響

各フェノール酸で処理後のカビ孢子の表面ゼータ電位解析

図4に0.63~5 mMのFAで処理したカビ孢子のゼータ電位を示した（赤シンボル）。FAで処理すると、図3で示した表面ゼータ電位の3次関数曲線式から正の電位の方にシフトすることが分かった。この差を表面ゼータ電位差（mV）とすると、mVと試験濃度の間に相関性があることを見出した。各フェノール酸のIC₅₀を1として増殖阻害濃度（ $\times IC_{50}$ ）を横軸に、それら濃度におけるmVを縦軸にグラフ化した（図5）。その結果、電位差が $\times IC_{50}$ に影響を受けやすいグループ（FA、VA、GA、CA；シンボル、赤線）と受けにくいグループ（CaA、ChA；シンボル、

灰色線)の2群に大別され、赤線グループの化合物におけるゼータ電位差は $\times IC_{50}$ との相関が強いことを表した。

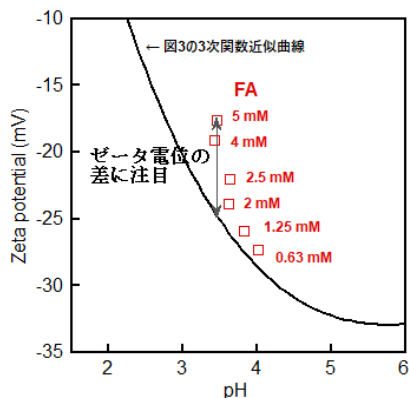


図4 フェルラ酸で処理したカビ胞子の表面ゼータ電位

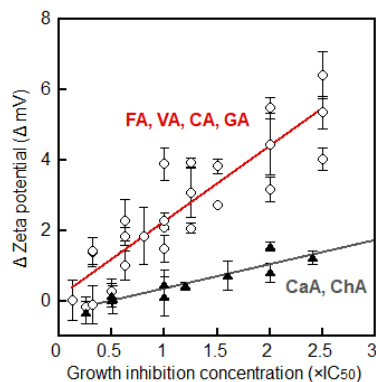


図5 各フェノール酸の増殖阻害濃度におけるカビ胞子の表面ゼータ電位差

6種類のフェノール酸の光殺カビ力を調べた(図6)。図6は、60分間照射後の生菌数を示しており、FA、VA、CAにおいてコントロールと比較して有意な減少を示した。

図6中の赤字で示したフェノール酸は、mVと $\times IC_{50}$ に高い相関が認められた化合物種であり、灰色の化合物は低度の相関を示したグループである。図5と6の結果より、フェノール酸で処理したカビ胞子の表面ゼータ電位を本手法に従い解析することで、有効な光殺カビ活性を示す化合物のスクリーニングを簡易に実行できることが示唆された。また、その解析に要する時間は、ゼータ電位を測定するための5分程度であり、一般的なコロニーカウント法で判定に要する3~4日と比較して大幅な短縮であり、有効な手法であると考えられた。しかしながら、高い相関を示した全ての化合物が光殺カビ活性を示すということではなく、GAのように殺菌活性を示さなかった化合物も含まれた。今後、さらに化合物数を増やして検討する必要があると考えられる。

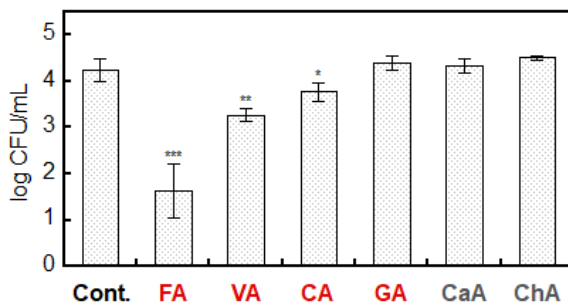


図6 各フェノール酸の光殺菌力
P<0.05*, 0.01** and 0.001*** vs. Cont., t-test.

(2) 草本バイオマス由来のリグニン分解物の光殺カビ活性と表面ゼータ電位の関係性

取得したそれぞれの水蒸気爆砕リグニン分解物 1 gあたりのTP量は、103 mg/g(水抽出物)、356 mg/g(エタノール抽出物1)、316 mg/g(エタノール抽出物2)、131 mg/g(エタノール抽出物3)であった。

各試料の光殺カビ活性の結果を図7に示した。水抽出物は120分間の照射処理でほとんど殺菌効果を示さなかった。一方、エタノール抽出物では同処理により殺カビ活性を示し、注目すべきは抽出物3の殺カビ活性は極めて高く、60分照射で99.9%以上の殺カビ菌効果を示した(赤ライン)。抽出物1と2は60分照射では90%以下の殺カビ効果に止まった。

各リグニン分解物でカビ胞子を処理した後のpHとゼータ電位を測定し、図4のように、ゼータ電位差を求めた(図8)。コントロールと水抽出物においては、電位差はほとんど認められなかった。一方、エタノール抽出物1~3では電位に大きな変化が認められ、光殺カビ活性が最も高かった抽出物3において電位差が最大(-13.0 mV)となった。このマイナス減少は、カビ胞子に化合物が作用したことにより、過分極を引き起こしていると推定された。抽出物3ほどではないが、有意な電位差を与えた抽出物1と2は、抽出物3よりも殺菌速度は遅かったが、有効な殺カビ活性を示していた。以上の結果より、ゼータ電位差と光殺カビ活性との間に関係性が認められ、本研究の成果である表面ゼータ電位解析法は、構造不明な様々なフェノール性化合物が含まれるバイオマス由来のリグニン分解物に対しても光殺カビ活性を示す化合物群を選抜できる手法であると考えられた。

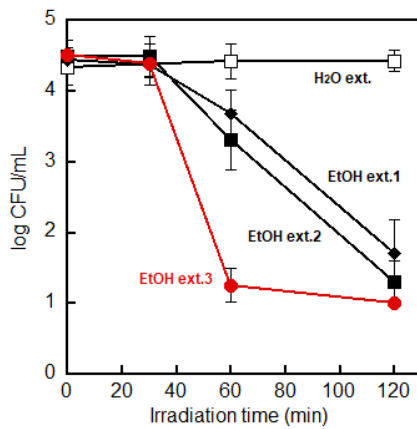


図7 リグニン分解物の光殺菌力

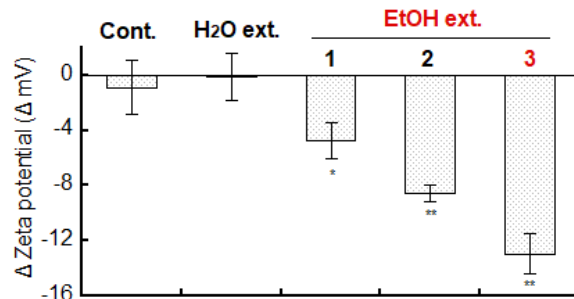


図8 リグニン分解物で処理したカビ胞子のゼータ電位差
P<0.05* and 0.01** vs. Cont., t-test.

(3) 水蒸気爆砕リグニンを用いた水耕栽培液の殺菌

エタノール抽出物 3 を用いて、ブルーライト照射による水耕栽培液の殺菌処理を行った。60 分間照射処理した結果、光のみの処理では糸状性真菌の殺菌率は 4.7%であったが、抽出物 3 と併用した場合、81%殺菌を達成できた。照射時間をさらに延長することにより、より高い殺菌効果が期待できる結果となった。以上より、表面ゼータ電位解析法により大きな電位変化を示し選抜されるリグニン分解物は、栽培液などの光殺菌に実用可能な天然資源であることが示され、本解析法が紫外線やブルーライト光殺菌に適したバイオマス由来のポスト化合物の探索に活用されることで、有効な光殺菌資源の創出に繋がると考えている。

<引用文献>

福田 一徳, 濱本 宏, 橋本 将典, 中山 万奈美, 根津 修, 鍵和田 聡, 大島 研郎, 難波 成任, 我が国における農業関連企業および農家等の植物病に対する対処の実態調査, Jpn. J. Phytopathol. 81, 127-135, 2015.

新見 京子, 新見 昌一, キャンディン系抗真菌薬と耐性機構, Jpn. J. Med. Mycol., 50, 57-66, 2009.

Yin R., et al., Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond, Curr. Opin. Pharmacol., 13, 731-762, 2013.

Wargenau A., et al., On the origin of the electrostatic surface potential of *Aspergillus niger* spores in acidic environments, Research in Microbiol., 162, 1011-1017, 2011.

Shi Y.-g., et al., Alkyl ferulate esters as multifunctional food additives: Antibacterial activity and mode of action against *Escherichia coli* in vitro, J. Agric. Food Chem., 66, 12088-12101, 2018.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akihiro Shirai, Kawasaki Kaito, Koichiro Tsuchiya	4. 巻 229
2. 論文標題 Antimicrobial action of phenolic acids combined with violet 405-nm light for disinfecting pathogenic and spoilage fungi	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology	6. 最初と最後の頁 112411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphotobiol.2022.112411	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 川阪凱士、長宗秀明、白井昭博	4. 巻 なし
2. 論文標題 フェノール酸とブルーライトを併用した真菌の光不活性化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 LED総合フォーラム 2021 in 徳島 論文集	6. 最初と最後の頁 149-150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kaito Kawasaki, Hideaki Nagamune, Koichiro Tsuchiya, Akihiro Shirai
2. 発表標題 Investigation of photoinactivation mechanism of fungal conidia using blue light in combination with phenolic acids
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川阪凱士、土屋 浩一郎、長宗秀明、白井昭博
2. 発表標題 フェノール酸とブルーライトを併用した真菌の光不活性化
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 昭浩 (SUZUKI Akihiro) (00848509)	徳島大学・ポストLEDフォトニクス研究所・特任研究員 (16101)	削除：2022年11月10日
研究分担者	浅田 元子 (ASADA Chikako) (10580954)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（生物資源産業学域）・教授 (16101)	
研究分担者	宮脇 克行 (MIYAWAKI Katsuyuki) (80380111)	徳島大学・バイオイノベーション研究所・准教授 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------