

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 2月 18日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658030

研究課題名（和文） 表面科学的手法を用いた、糸状菌が認識する表面特性に関する研究

研究課題名（英文） Study on the surface properties that is recognized by fungi using surface scientific method

研究代表者

三宅 晃司 (MIYAKE KOJI)

独立行政法人産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：30302392

研究成果の概要（和文）：いもち病菌、及び、住環境汚染菌を固体基板上に展開し、その成長状態、及び、表面への接着への評価を行った。実用化、及び、抗菌表面の開発に関する特許強化の目的で、貴金属に加え、鉄系材料・酸化物・Siなど数種類の表面において、分子による表面修飾を行い、菌の成長、及び、表面への接着について評価を行った。その結果、特定の分子による表面修飾により、基板に関係なく、表面への接着力が抑制されることを確認し、様々な材料への適用が可能となる技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：In order to analyze the effect of surface functional groups on fungal development, the model plant pathogen *Magnaporthe oryzae* and several fungi known as contaminants of residential environment were cultivated on the molecular modified surfaces with various functional groups. Gold, stainless steel, glass, and silicon were used as substrate. The 'self-assembly' method was used for the surface modification. We discovered that some surface functional groups are involved in the regulation of infectious structure development in *M. oryzae*. Moreover, fungal adherence was suppressed by specific functional group. This result leads to the development of novel antimicrobial modification technique which can apply to various materials.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：微生物学

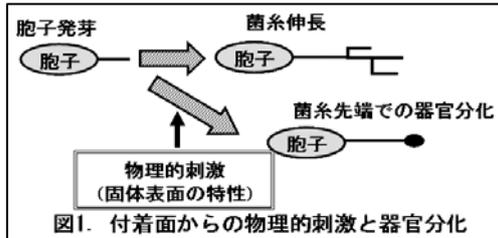
## 1. 研究開始当初の背景

糸状菌は環境適応能力が高く、住環境の至る所で見ることができる。糸状菌のゲノム中には外界の環境変化を細胞内に伝達するシグナル伝達経路のセンサー遺伝子が酵母な

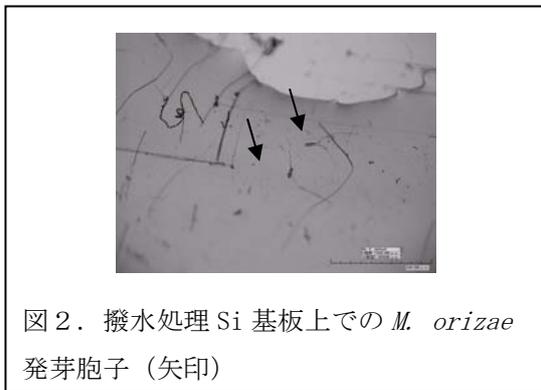
どに比べて非常に多く、糸状菌は多様な外部環境の変化をセンサーにより認識して環境適応していると考えられる。しかし、糸状菌により認識される環境因子のうち、栄養や浸透圧認識などの限られたもの以外はほとん

ど研究が行われていない。

一般的に糸状菌の胞子発芽は水分により開始され、糖、アミノ酸、無機塩といった栄養分などにより発芽菌糸の伸長が誘導される。これに対し、一部の植物感染糸状菌 (*Magnaporthe oryzae*, *Colletotrichum* 属菌など) では「発芽胞子が固体面へ付着」することにより生じる物理刺激により発芽菌糸先端からの感染器官分化が誘導される (図1)。



これまで *M. oryzae* では、テフロン表面上で菌糸先端分化の誘導が見られたことから、菌糸先端での器官分化の誘導には胞子付着面の「硬さ」と「疎水性」が物理刺激として重要であると考えられてきた。しかし、応募者らは金属基板、シリコン基板やガラスを表面工学的に処理して得られた「硬い疎水処理表面」上でも器官分化が誘導されないことを発見し、これまでの定説とは異なり「硬さ」や「疎水性」が菌糸先端からの器官分化を誘導するに十分な因子ではないことを見いだした (図2)。



酵母や糸状菌において、物理刺激として認識される因子に関する研究はこれまでに例がなく、どのような「固体表面の特性」が物理刺激として認識され、環境に適応するために遺伝子発現を誘導しているのか全く明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

糸状菌に物理刺激として認識される固体表面の特性を、「表面工学」と「生物学」の解析技術を融合させることにより詳細に解析する。表面工学的な手法を用いて色々な表

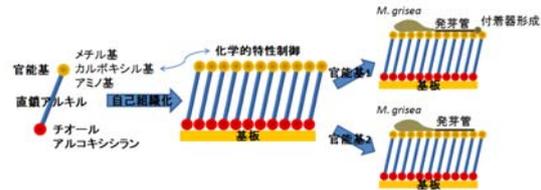
面特性を付加した基板表面を作製し、それらの特性に応答した *M. oryzae* の形態や遺伝子発現プロファイルを解析する。この解析結果から、糸状菌が固体表面のどの特性を認識しているのかを解明し、糸状菌による固体表面認識の新たなモデルを提案する。

## 3. 研究の方法

モデル糸状菌として *M. oryzae* を使い、微細形状・化学的特性・機械的特性を制御した機能性表面を用いて、糸状菌により認識される表面特性を明らかにする。

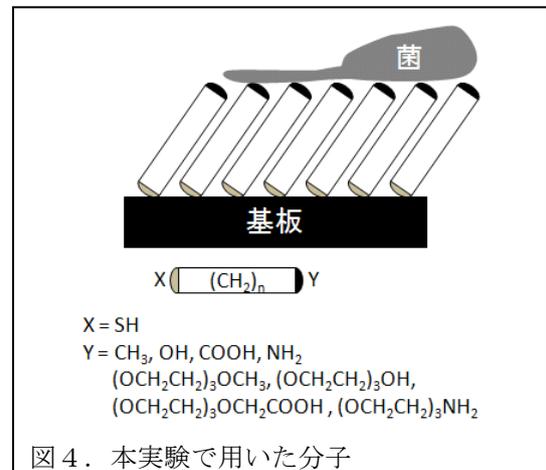
表面特性制のうち、表面の化学的特性制御に注目し、自己組織化分子膜を利用することにより、表面の濡れ性や、末端基の特性を制御し、化学的特性に応答した *M. oryzae* の形態変化および遺伝子発現応答を解析する。

表面の幾何学的な形状及び機械的特性を考慮し、表面形状特性に対する *M. oryzae* の形態と遺伝子発現を解析する。



## 4. 研究成果

今回の実験では、金基板を用い、モデル表面として自己組織化単分子膜 (SAM) によって、表面の濡れ性および化学種を制御した表面を作製した。図4は、本研究で用いた分子である。頭部基 X として、基板との結合を考えチオール基 (-SH) を用いた。末端基 Y としては、表面の濡れ性に関連し、疎水基として、メチル (-CH<sub>3</sub>)、親水基として、アミノ基 (-NH<sub>2</sub>)、カルボキシル基 (-COOH) および水酸基 (-OH) を用いた。加えて、接触角は変化させず、末端基のみの影響を確認すること



を目的として、末端基にエチレングリコール (EG:  $\text{OCH}_2\text{CCH}_2$ ) を導入した分子も用いた。これらの表面を用いて、*M. oryzae* の器官分化を観察した。自己組織化法による分子修飾により、表面エネルギーと官能基を同時に制御することができ、感染器官分化阻害に与える、両者の効果を切り分けて議論することができる。

図5は、金基板を種々の分子で修飾し、水の濡れ性および末端の修飾基を制御した表面を用いて、*M. oryzae* の形態変化および遺伝子発現応答を解析した結果である。図では、付着器形成率と水の接触角の関係を示している。■は基板の金表面、赤い▲はEGユニットを含まないSAM膜表面、青い●は、EGユニットを含むSAM膜表面での結果である。EGユニットを含まない場合には、 $\text{CH}_3$ 、 $\text{NH}_2$ 、 $\text{COOH}$  の順で水の接触角が小さくなるにつれて、付着器形成率が増加した。さらに接触角が小さくなるOHでは、付着器の形成が見られなかった。この結果は、付着器の形成に対して、水の接触角に加えて、表面に存在する化学種も何らかの影響を持っている可能性を示唆している。そこで、水の接触角を大きく変化させず、末端基のみを変えることで付着器の形成がどのように変化するかを確認する目的で、末端基にEGユニットを導入したSAMを用いて、同様の実験を行った。EGユニットを持つ末端基では、水の接触角は、 $38^\circ$  から  $52^\circ$  と、EGユニットを含まない場合と比べて、その変化は少ない。末端がOHおよび $\text{CH}_3$ の場合に、付着器の形成が見られなかった。一方、末端が $\text{NH}_2$ や $\text{COOH}$ の場合では、EGユニットを含まない場合と比較して、付着器形成率が増加した。

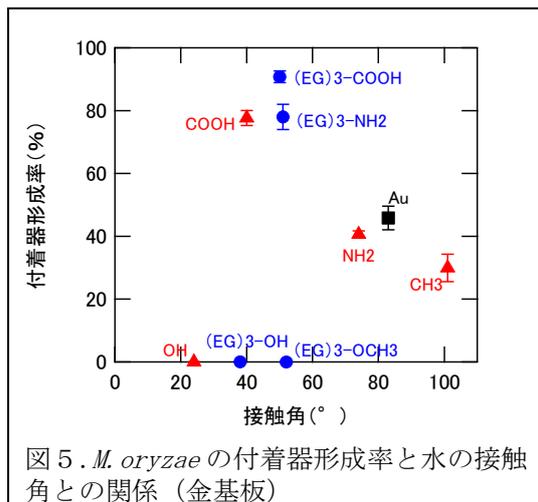


図5. *M. oryzae* の付着器形成率と水の接触角との関係 (金基板)

これらの結果から、水の接触角すなわち濡れ性が菌糸先端からの器官分化を誘導するのに十分な因子ではないことが分かる。この結果から、単純に表面の疎水性、親水性といっ

た濡れ性だけではなく、表面の官能基の種類やその分布が菌糸先端での器官分化の誘導に強く関与していることを明らかにした。

さらに、基板による影響を調べるため、Si基板を用いた実験も行った。図6は、Si基板を種々の分子で修飾し、水の濡れ性および末端の修飾基を制御した表面を用いて、*M. oryzae* の形態変化および遺伝子発現応答を解析した結果である。図では、付着器形成率と水の接触角の関係を示している。■は基板のSi表面、赤い▲はEGユニットを含まないSAM膜表面、青い●は、EGユニットを含むSAM膜表面での結果である。加えてSi表面をプラズマにより親水化処理した表面も比較のため用いた。Si基板の場合には、表面処理により、付着器形成率が減少した。特に、Si基板とEGユニットを含むSAM膜表面での結果を比較すると、水の接触角は  $27^\circ$  (Si) と  $25^\circ$  (SAM) とほとんど同じであるにもかかわらず、付着器の形成率に大きな違いがみられる。加えて、 $\text{CH}_3$  末端のSAMでも付着器の形成が見られなかった。これは、金基板は表面の凹凸が大きいのにに対し、Si基板は、非常に平坦な表面であることが起因していると考えられる。

以上の結果を総合すると、菌糸先端からの器官分化を誘導する因子としては、水の濡れ性だけでなく、表面の化学種や表面の形状等、様々な因子が影響していることが示唆された。

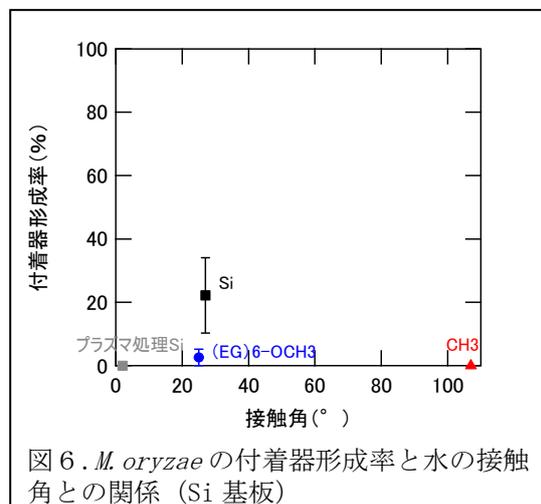


図6. *M. oryzae* の付着器形成率と水の接触角との関係 (Si基板)

図7は、分子修飾した表面上に生育したカビの光学顕微鏡像である。図7(a)は、分子修飾していない基板の結果である。図中の矢印は感染器官であり、菌糸先端での器官分化が誘導されているのが分かる。一方、分子修飾を行った基板では、表面の官能基の違いにより、感染器官分化が阻害されたり (図6(b))、菌の吸着が極端に弱くなる (図6(c)) などの特徴を示す表面が得られた。特に図6

(c)の結果は、菌の吸着が弱く、たやすく流れ落ちる傾向を示すことから、表面修飾により、たとえ菌が生育しても、簡単に洗浄可能な表面が形成できる可能性を示している。

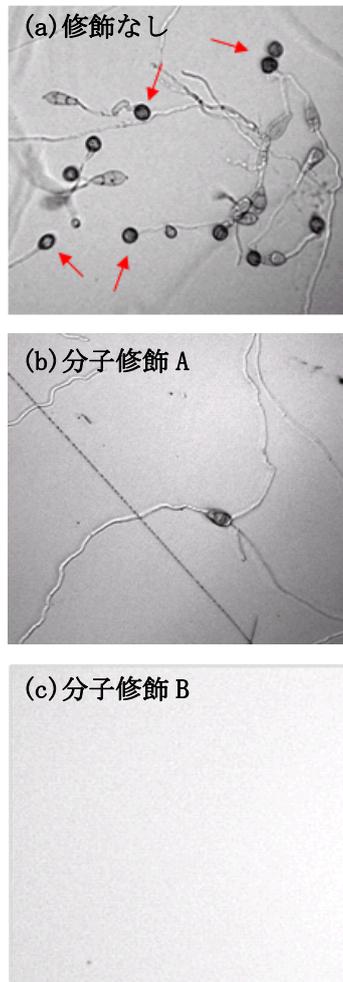


図7. 分子修飾によるカビの表面認識の違い

このようにして作製した表面のうち、*M. oryzae* の吸着が極端に弱くなる結果が得られた表面について、他の住環境汚染菌を固体基板上に展開し、その成長状態、及び、表面への接着への評価を行った結果、当該表面は、菌の種類によらず、接着力を抑制できることが明らかになった。

これらの結果をもとに、研究助成期間を過ぎてしまったが、特許を出願した。これまで研究発表が全くないのは、特許出願に備え、外部発表を控えていたためである。

## 5. 主な発表論文等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三宅 晃司 (MIYAKE KOJI)

独立行政法人産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：30302392

### (2) 研究分担者

中野 美紀 (NAKANO MIKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・先進製造プロセス研究部門・研究員

研究者番号：20415722

西村麻里江 (NISHIMURA MARIE)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物・微生物相互作用研究ユニット・主任研究員

研究者番号：30370670