

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：33302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450115

研究課題名(和文) 界面糸状菌における二次代謝の多様性に関する研究

研究課題名(英文) Diversity of secondary metabolites produced by fungi growing on an interface

研究代表者

小田 忍(Oda, Shinobu)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号：00503963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：水/有機溶媒界面に増殖するカビが生産する代謝物のプロファイルを、伝統的培養法の液体培養法や抽出発酵法等のそれと比較した。その結果、伝統的な液体培養法では生産されない多くの脂溶性代謝物が界面培養法の有機溶媒層に蓄積されることを見出した。この事実は、本界面培養法が、新規な医薬候補物質の天然物創薬に新たなツールたり得ることを示唆するものである。事実、*Pichia*属酵母に対する抗真菌活性物質を生産するカビのヒット率は約22%に達し、伝統的な培養法で得られるそれより1桁高いことが確認された。さらに、本界面培養法では、脂溶性二次代謝物合成酵素の遺伝子群が大量に発現していることも確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, it has been observed that secondary metabolite profiles of fungi growing on an interface between a liquid medium and an organic phase (an extractive liquid-surface immobilization system) are drastically different to those gained by conventional submerged, extractive submerged and agar-organic solvent interfacial cultivation systems. The interfacial system are expected as a superior high-throughput screening system for the discovery of new biologically active substances. Indeed, the interfacial screening system yielded a high incidence of antimicrobial activity, with 22% of the fungi tested exhibiting anti fungal activity against a yeast, *Pichia anomala*. Furthermore, it has been observed that higher expression of genes relating the biosynthesis of lovastatin compared with those in the traditional submerged and extractive cultivation systems.

研究分野：応用微生物学

キーワード：糸状菌二次代謝物 生物活性二次代謝物 菌株スクリーニング 抗生物質 スタチン系化合物 抽出発酵 界面バイオリアクター 液面固定化システム

### 1. 研究開始当初の背景

近年、複数の抗菌剤に対して抵抗性を示す多剤耐性菌の世界的拡大が、極めて深刻な問題となってきている。そのような状況下、多剤耐性菌の出現によって無効となった現行の薬剤に替わる新規な抗菌剤の開発が急務であるが、強大な研究開発力を誇るメガファーマにおいてさえも新規な抗菌剤の開発が大きく後退しているのが現状である。その理由としては、経済性の問題以外に、新規な炭素骨格を有した新規物質の発見・創成が極めて困難になってきていることにある。

放線菌やカビは多様な二次代謝系を有しており、様々な生物活性物質を発酵生産することができるが、これらの微生物を抗生物質の供給源とする天然物創薬の分野においても、これまでに見出されていない炭素骨格を有する新規物質の発見は甚だ困難な状況にある。

植物共生菌や昆虫病原菌、海洋性微生物や薬物汚染土壌菌などの特殊な環境に生存する微生物に二次代謝物の多様性を求める戦略が一般的であるが、一方で、培養環境の違いによって微生物が生産する二次代謝のプロファイルが異なることも知られている。

### 2. 研究の目的

近年筆者らは、小さくて軽い中空微粒子を用いてカビの菌体を液体培地液面に固定化して増殖させ、液面に形成されるカビマットを生体触媒とする3種のバイオプロセス、すなわち、水溶性の代謝物や酵素の生産に有用な液面固定化(LSI)システム、水難溶性物質の微生物変換に威力を発揮する液-液界面バイオリアクター(L-L IBR)、脂溶性代謝物の発酵生産に有効な抽出液面固定化(Ext-LSI)システムを開発した。

これら3種のデバイスのうち、Ext-LSIシステム(図1)では、カタボライト抑制や生成物阻害、フィードバック阻害の回避といった実用的にも優れた長所が確認されている。このExt-LSIシステムでは、生産される脂溶性二次代謝物とその有機層中に自動的かつ連続的に抽出されるため、菌体外が水系である伝統的な液体培養法で問題となるような脂溶性代謝物の菌体内蓄積は全く問題にならず、二次代謝物生産量の大幅な向上と、生産される二次代謝物プロファイルに劇的な違いが生じる可能性が高い。

そこで本課題研究では、Ext-LSIと伝統的な培養法である液体培養法、抽出発酵法、そして以前筆者らが報告した寒天ゲル-疎水性有機溶媒との固-液界面培養法の4培養系について、カビによって生産される二次代謝物のプロファイルにどのような違いが生じるかを網羅的に解析することを目的の1つとした。

次に、Ext-LSIを基幹とする抗生物質生産カビの新規な高感度高速し、抗真菌活性物質生産カビのヒット率を伝統的な液体培養法

を基幹とする既存のスクリーニング法のと比較することを次の目的とした。

さらには、コレステロール低下活性物質として重要なlovastatinを対象として、その合成系に関与している遺伝子群の発現の様子をExt-LSI法と他の3種の培養法との間で比較することも目的とした(図2)。

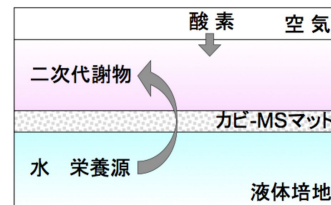


図1. 抽出液面固定化システムの原理。

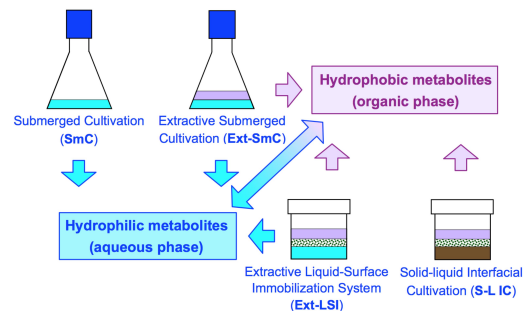


図2. 培養法間での二次代謝物プロファイルの比較。

### 3. 研究の方法

#### 【二次代謝物プロファイルの網羅的比較】

既存の培養法として通常の液体培養法、液体培養系に抽出溶媒(低沸点ジメチルシリコンオイル、信越化学工業製)を添加した抽出発酵法、寒天平板とシリコンオイルの固-液界面に増殖するカビを用いた固-液界面培養法を採用した。培地は汎用されているサブロー培地に鉄、マンガン・カルシウムイオンを微量補強した修正サブロー培地を用いた。Ext-LSI法で用いる中空微粒子にはMMF-DE-1(松本油脂製薬製)、有機層としてはKF-96L-1CS(信越化学工業)を用いた。供試カビとしては、23株の標準株及び当研究室にて分離した有用野生株を採用した。

培養条件としては、シード培養3日間、前培養3日間、本培養7日間とし、液体培養系と抽出発酵系については25°C、200 rpmでの振盪培養、Ext-LSIと固-液界面培養系では25°Cでの静置培養とした。

本培養後、液体培養並びに抽出発酵、Ext-LSIの水層については塩析/EtOAc抽出液/濃縮し、抽出発酵、Ext-LSI、固-液界面培養の有機層についてはカラムクロマトグラフィーによってシリコンオイルを除去した後、EtOAc溶出・濃縮してHPLC-PDA用サンプルを調整した。二次代謝物プロファイルは、HPLC-PDAを用いて解析した。

#### 【界面スクリーニング法の構築と検証】

Ext-LSIを基幹とする抗生物質生産カビの

新規な界面スクリーニング法を開発した。Ext-LSI の中空微粒子層 (表面積 7.1 cm<sup>2</sup>) の中央に 1 mm 角のカビマットを爪楊枝を用いて植菌し、3 日間静置培養してカビマットを形成させた。その後低沸点ジメチルシリコンオイル (KF-96L-0.65CS) を重層し、静置培養を継続した。培地量 5 ml、有機層量 1 ml とし、本培養期間は 7 日間とした。培養終了後、有機層を全量回収し、濃縮後、ペーパーディスク法によって抗(真)菌活性を判定した。対象菌としては、*Pichia anomala* NBRC 10213、*Rhodotorula minuta* NBRC 0387、*Candida utilis* NBRC 0619 の 3 株の酵母を採用した。

#### 【Lovastatin 合成関連遺伝子の解析並びにプロテオーム解析】

*Aspergillus terreus* ATCC 20542 を液体培養法、抽出発酵法、LSI 法、Ext-LSI 法で培養し、各培養系から回収した菌体を凍結・破碎して total RNA を抽出した。これら抽出 RNA についてリアルタイム PCR を行い、lovastatin 生合成関連遺伝子である *lovB*、*lovC*、*lovD*、*lovE* の発現量を各培養系間で比較した。なお、lovastatin 生合成関連酵素のプロテオーム解析も試みたが、タンパク質の発現量が極端に低く、その不安定性が示唆された。

#### 4. 研究成果

##### 【二次代謝物プロファイルの網羅的比較】

23 株の標準カビ並びに有用分離カビについて、液体培養法、抽出発酵法、固-液界面培養法、Ext-LSI の 4 種の培養法間での二次代謝物プロファイルの比較を行った。液体培養系については水層、抽出発酵系については水層と有機層、固-液界面培養系については有機層、Ext-LSI については水層並びに有機層中の二次代謝物を HPLC-PDA を用いて解析した。その結果、水層と有機層では二次代謝物のプロファイルが大きく異なっており、水層中には高極性～中極性代謝物、有機層中には中極性～低極性代謝物が多数蓄積していることを見出した(図 3)。また、同じ水層並びに有機層であっても、培養法の違いによって二次代謝物プロファイルに多少の相違が認められた(図 4)。水層からの代謝物の回収(溶媒抽出)では多くの培地由来成分が不純物として混入してきたが、有機層から回収した代謝物には培地由来の不純物の混入は極めて

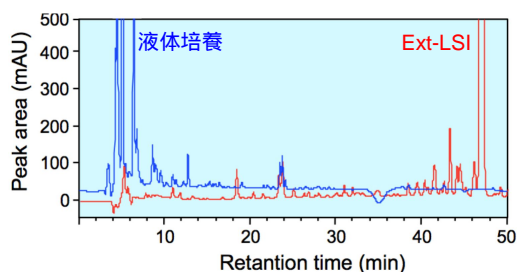


図 3. *Penicillium multicolor* IAM 7153 についての液体培養と Ext-LSI(有機層)間での代謝物比較。

少なかった(図 3)。

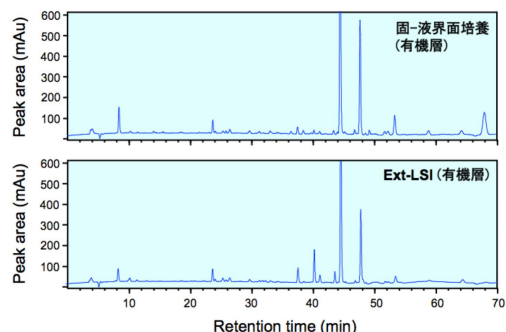


図 4. *Rhizopus oryzae* NBRC 31005 についての固-液界面培養と Ext-LSI 間での有機層中代謝物の比較。

##### 【界面スクリーニング法の構築と検証】

上述の通り多くのカビで、Ext-LSI 系で有機層中に蓄積される二次代謝物のプロファイルと伝統的な培養法である液体培養系の水層中に生産される二次代謝物のプロファイルが大きく異なることが確認された。この事実は、伝統的な手法では生物活性が認められなかった数多くのカビについて、Ext-LSI で培養することによって新規な生物活性物質が見出される可能性があることを意味する。このような想定に基づいて、図 5 に示すようなこれまでにないスクリーニングシステム(界面スクリーニングシステム)を構築した。

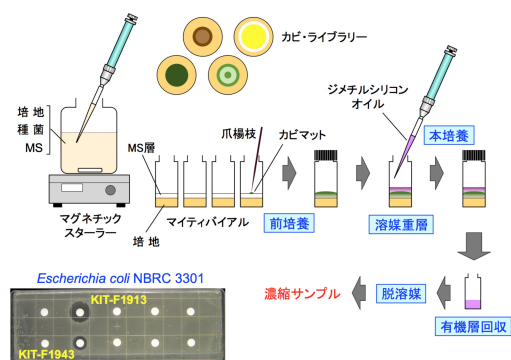


図 5. Ext-LSI を基幹とする界面スクリーニングシステム。

この界面スクリーニングシステムの有用性を検証することを目的に、上記 3 種の酵母に対する抗真菌活性物質生産カビのスクリーニングを、総計 572 株の分離株について実施した。

その結果、Ext-LSI では脂溶性代謝物が自動的かつ連続的に菌体中から有機層中に抽出されるために、生成物阻害並びにフィードバック阻害を効果的に回避することができ、培地量 5 ml、有機層量わずか 1 ml の培養スケールにもかかわらず *P. anomala* NBRC 10213 に対する抗真菌活性物質生産カビのヒット率は約 22%に達した。このヒット率は、従来法(液体培養法)によるヒット率よりも 1 桁高い値であり、本法の高い検出感度を実証

することができた。Ext-LSIでは二次代謝物の発酵生産時においてカタボライト抑制が効果的に回避できることも確認されており、ヒット化合物の実生産にも十分展開できるものと期待される。さらに本スクリーニングシステムでは、培養器の通気攪拌が不要であるうえに煩雑な溶媒抽出も必要がなく、スクリーニング操作のハイスループットも達成可能であった。

#### 【Lovastatin 合成関連遺伝子の解析】

液体培養法、抽出発酵法、LSI、Ext-LSIの4種の培養系でlovastatin合成関連遺伝子である*lovB*、*lovC*、*lovD*、*lovE*の発現量を比較した。その結果、LSI並びにExt-LSI系では他の2種の伝統的な培養法と比較して、大量の*lovB*、*lovC*、*lovD*、*lovE*が発現していることを見出した(図6)。特にExt-LSIでの関連遺伝子群の発現量が多く、それに応じて本培養系におけるlovastatin生産量は他法に比べて1桁高い値となった。

なお、各培養系間におけるプロテオーム解析も試みたが、全培養系ともlovastatin合成関連酵素の存在はほとんど確認できず、培養時間の経過とともにlovastatin合成関連酵素群の分解が進むことが示唆された。

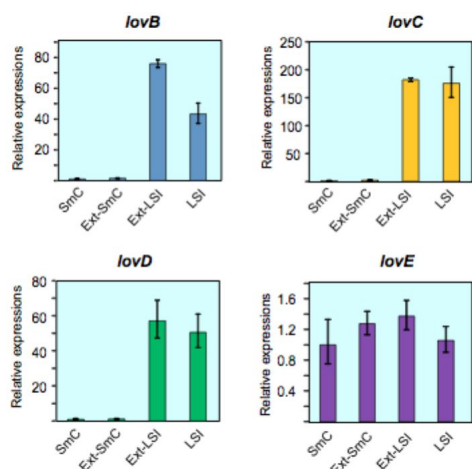


図6.各培養法間におけるlovastatin合成関連遺伝子の発現。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

Oda S, Sakamoto N, Horibe H, Kono A, Ohashi S. Relationship between interfacial hydrophobicity and hydroxylation activity of fungal cells located on an organic-aqueous interface. J Biosci Bioeng 2013;115: 544-546. (査読有)

DOI: 10.1016/j.jbiosc.2012.11.017

Oda S. Morphological, physiological, and biochemical properties of fungal cells located on a liquid-surface and an organic-aqueous

interface. J Biol Macromol 2013;13: 1-11. (査読有)

Oda S, Sugitani A, Ohashi S. Solvent-tolerance of fungi located on an interface between an agar plate and an organic solvent. Biosci Biotechnol Biochem 2014;78: 1971-1974. (査読有)

DOI: 10.1080/09168451.2014.932683

Oda S, Kameda A, Okanan M, Sakakibara Y, Ohashi S. Discovery of secondary metabolites in an extractive liquid-surface immobilization system and its application to high-throughput interfacial screening of antibiotic-producing fungi. J Antibiot 2015; 68:691-697. (査読有)

DOI: 10.1038/ja.s015.59

Oda S. Relationship between interfacial hydrophobicity and hydroxylation activity of fungal cells located on an organic-aqueous interface. Ferment Technol 2015;4: 1000e122 (査読無)

DOI: 10.4172/2167-7072.1000e122

〔学会発表〕(計21件)

飛坂未緒・小田忍・大箸信二. 液-液界面バイオリクターによる11 $\alpha$ -hydroxyprogesteroneの合成. 第65回日本生物工学会大会, (20130918), 広島国際会議場(広島県).

山下晃・小田忍・大箸信二. 界面バイオリクターによるlimonene oxideの合成. 第65回日本生物工学会大会, (20130919), 広島国際会議場(広島県).

小田忍・杉谷彩香・大箸信二. 寒天ゲル有機溶媒界面における糸状菌の有機溶媒耐性. 第65回日本生物工学会大会, (20130920), 広島国際会議場(広島県).

小田忍・杉谷彩香・大箸信二. 界面糸状菌の有機溶媒耐性と新規な非水系微生物変換の可能性. 第17回生体触媒化学シンポジウム, (20131220), 岡山理科大学(岡山県).

城戸良介・杉谷彩香・小田忍・大箸信二. 糸状菌胞子を用いた新規な界面微生物変換プロセス. 2014年度日本農芸化学学会大会, (20140328), 明治大学生田キャンパス(神奈川県).

小田忍・岡南雅教・榊原雄介・大箸信二. 液-液界面培養法を基幹とする抗生物質生産カビの感度高スクリーニング法. 2014年度日本農芸化学学会大会, (20140329), 明治大学生田キャンパス(神奈川県).

小田忍. 界面バイオリクターを用いたテルペン類の超高濃度微生物変換. 第58回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, (20140920), 和歌山大学(和歌山県).

小田忍. 水-有機溶媒界面に増殖するカビを用いた物質生産技術. 新化学技術推進協会ライフサイエンス技術部会反応分科会講演会, (20150121), 新化学技術推進協会(東京).

野村聖也・佐野元昭・小田忍・大箸信二. 抽

出液面固定化システムにおける lovastatin 合成関連遺伝子の高発現. 2015 年度日本農芸化学会大会, (20150327), 岡山大学 (岡山県).

小田忍・竹内侑・黒澤渉・水谷勉・今井俊夫・山口芳美・大箆信二. 固体表面の防カビ性能を評価するための新規なバイオアクセシ. 2015 年度日本農芸化学会大会, (20150327), 岡山大学 (岡山県).

城戸良介・小田忍・大箆信二. 液面固定化システムによる糸状菌胞子の生産に対する疎水性樹脂の効果. 2015 年度日本農芸化学会大会, (20150327), 岡山大学 (岡山県).

田中耀・小田忍・大箆信二. 新規な固-液界面バイオリアクターの開発. 第 67 回日本生物工学会大会, (20151026), 城山観光ホテル (鹿児島県).

城戸良介・熊本真里奈・小田忍・大箆信二. アルギン酸カルシウムゲル包括固定化糸状菌胞子を用いた新規非水系微生物変換システム. 第 67 回日本生物工学会大会, (20151026), 城山観光ホテル (鹿児島県).

野村聖也・徳武成昭・小田忍・佐野元昭・大箆信二. 抽出液面固定化システムの界面物性変化がスタチン生産株の二次代謝に及ぼす影響. 第 67 回日本生物工学会大会, (20151027), 城山観光ホテル (鹿児島県).

藤田昌寛・小田忍・大箆信二. 界面糸状菌における二次代謝物の多様性に関する研究. 第 67 回日本生物工学会大会, (20151027), 城山観光ホテル (鹿児島県).

小田忍・伊崎奈津美・宮崎優・谷川絢美・河原範夫・川口真央・新谷一博. バイオフィルムの新規な定量法, Plate-hanging 法. 第 67 回日本生物工学会大会, (20151028), 城山観光ホテル (鹿児島県).

小田忍・松田和樹・大箆信二. 新規な糸状菌保存法: 菌蓋凍結保存法. 第 8 回北陸合同シンポジウム, (20151030), 山中温泉山中座 (石川県).

城戸良介・小田忍・大箆信二. 界面培養法における疎水性樹脂による糸状菌胞子生産性の比較. 第 8 回北陸合同シンポジウム, (20151030), 山中温泉山中座 (石川県).

野村聖也・佐野元昭・小田忍・大箆信二. 抽出液面固定化システム及び液面固定化システムにおける lovastatin 合成関連遺伝子の高発現. 第 8 回北陸合同シンポジウム, (20151030), 山中温泉山中座 (石川県).

小田忍. 多剤耐性菌症、インプラント感染症とバイオフィルムの問題. 第 7 回医工連携フォーラム, (20160227), 金沢医科大学 (石川県).

④ 小田忍・馬場俊樹・中西真美・大箆信二. 単細胞微生物用液-液界面バイオリアクターの開発. 2015 年度日本農芸化学会大会, (20160330), 札幌コンベンションセンター (北海道).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 胞子または芽胞を用いた非水系物質変換方法およびバイオリアクター.

発明者: 小田 忍

権利者: 金沢工業大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-038375

出願年月日: 2014 年 2 月 28 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://kitnet.jp/laboratories/lab0167//index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 忍 (ODA SHINOBU)

金沢工業大学・バイオ・化学部・教授

研究者番号: 00503963

### (2) 研究分担者

佐野 元昭 (SANO MOTOAKI)

金沢工業大学・バイオ・化学部・准教授

研究者番号: 80410299

### (3) 連携研究者

大箆 信一 (OHASHI SHINICHI)

金沢工業大学・ゲノム生物工学研究所・教授

研究者番号: 90387340