

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16031

研究課題名（和文）糸状菌の休眠遺伝子を覚醒するキノ酸を利用した新規天然活性物質の探索

研究課題名（英文）Search for novel natural active substance using quinic acid that express silent genes of filamentous fungi

研究代表者

野中 健一（Nonaka, Kenichi）

北里大学・感染制御科学府・准教授

研究者番号：60421369

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： 土壌糸状菌にキノ酸添加培養時に二次代謝に変化をもたらすことを見出したため、大規模スクリーニングに応用するために汎用性の高い培養条件の検討を行った。保有糸状菌600株を用いて培養液の調製を行い、機器分析で化合物生産性を調査した。これを3回繰り返し、化合物生産性が安定していた6株を選出後、培養条件の検討を行った。キノ酸を0.001～10%まで10段階に調製して培養を行い、これら培養液を用いて6種の病原菌に対し抗菌試験を行った結果、キノ酸濃度0.05%で最も強い活性を示した。

以上より、土壌糸状菌を液体培養時に前述のキノ酸濃度で大規模スクリーニングを実施した際に最も効果を発揮することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未利用遺伝子を発言させるために、直接遺伝子を操作する遺伝子工学的的手法、異種糸状菌の相互作用を利用した共培養法、菌類の光受容体に作用する波長領域を用いた光照射培養法やケミカルエビジェネティクスなど、世界中で様々な方法が検討されてきた。しかし、いずれの方法でも大量の糸状菌サンプルを扱う大規模スクリーニングに利用することが出来ない問題点がある。そこで、申請者等が考案したキノ酸添加培養法で新規化合物を取得するという試みは世界的に見ても実施例がなく、汎用性の面からも生物活性を指標とした大規模スクリーニングに利用できることが期待出来る。

研究成果の概要（英文）： Since it was found that soil fungi cause changes in secondary metabolism during quinic acid-added culture, we investigated highly versatile culture conditions for application to large-scale screening. A culture solution was prepared using 600 strains of fungi, and the compound productivity was investigated by instrumental analysis. This was repeated 3 times, 6 strains with stable compound productivity were selected, and then the culture conditions were examined. Quinic acid was prepared in concentrations of 0.001 to 10% and cultured, and as a result of antibacterial tests against 6 types of pathogens using these cultures, the strongest activity was shown at a quinic acid concentration of 0.05%.

From the above, it is expected that soil filamentous fungi will be most effective when large-scale screening is performed at the above-mentioned quinic acid concentration during liquid culture.

研究分野： 応用微生物学

キーワード： 菌類 二次代謝 天然化合物

1. 研究開始当初の背景

世界初の抗生物質であるペニシリンが青カビの1種から発見されて以来、2010年までに15,000を超える化合物が糸状菌から発見されており、さらに毎年600を超える新規化合物が糸状菌から発見されている (Berdy J Antibiot, 2012)。そのため、糸状菌は放線菌と並び微生物創薬において最も重要な化合物探索源である。申請者の研究グループにおいても、殺虫剤 inscaris のリード化合物である pyripyropene、脂肪酸合成阻害剤 cerulenin など数多くの新規生物活性物質を糸状菌より発見して来た (Omura et al. J Antibiot. 1993; Sano et al. J Antibiot, 1967)。

一方、比較的容易にゲノム情報を入手出来るようになった現在では、糸状菌が保有している二次代謝産物生合成遺伝子の1~2割程しか発現出来ていない事が明らかになって来ており、多くの生合成遺伝子は休眠状態のままであることが分かって来た (Keller et al. Nat Rev Microbiol, 2005)。そこで、このような休眠状態の生合成遺伝子を発現させることができれば、新規天然化合物の取得が期待される。休眠遺伝子を発現させるために、直接遺伝子进行操作する遺伝子工学的的手法、異種糸状菌の相互作用を利用した共培養法、糸状菌の光受容体に作用する波長領域を用いた光照射培養法など、世界中で様々な方法が検討されて来た。

しかし、遺伝子工学的的手法は操作が複雑で膨大な時間と費用を要するため、大量の糸状菌サンプルを扱う大規模スクリーニングに利用する事は出来ない問題点がある。また、異種糸状菌の共培養法ではどのような分類群の組合せでも有効というものではなく、組合せの規則性も解明されていないため、理論的に組合せる菌の種を決定する事が困難である。

この様な中、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤という低分子化合物を培地に添加する非常に簡便な方法で、ヒストンを遺伝子発現しやすい構造にするケミカルエピジェネティクスという方法が確立され、この方法での見出された新規化合物の報告数が増えつつある (e.g., Asai et al. Org Lett, 2012)。しかしながら、この方法においても供試菌株の10%未満でしか有効でないという問題点がある (浅井 & 大島, 化学と生物, 2013)。

申請者らは HDAC 阻害剤に代わる低分子化合物として着目したキナ酸を利用して *Penicillium* 属糸状菌を培養した際、HPLC プロファイルで無添加時に生産しない化合物を生産誘導する事を見出した。

2. 研究の目的

前申請課題においてキナ酸1%添加時が最も化合物生産性に効果的であり、植物内生菌よりも土壌糸状菌に対しより効果的である事を明らかとし、新規化合物の取得にも成功した。そこで、本申請ではキナ酸が化合物生産に及ぼす有効性を示す糸状菌分類群の拡大と解明、発酵技術と機器分析を駆使したより汎用性の高い培養条件の決定、生物活性を指標としたスクリーニングでの有効性の解明を目的とする。

3. 研究の方法

当研究室保有の10,000株の糸状菌ライブラリーから任意に選択した植物内生糸状菌100株と土壌糸状菌100株を4種類の生産培地 (液体培地・固体培地:各1%キナ酸添加・無添加) で培養し、100% EtOH で化合物抽出を行うことで糸状菌培養液サンプルを計800サンプル調整した。尚、液体培養は27で6日間、固体培養は25で13日間培養を行った。二次代謝に変化が見られた菌株について ITS 領域の配列を決定し、形態的特徴と総合的に属レベルでの分類を行なった。

また、上記植物内生菌および土壌糸状菌に加え、昆虫共生菌、菌寄生菌、水生菌類など、より多様性に富んだ分類群で検証する為に、これら多彩な菌類の収集を日本本土と菌類叢が異なる伊豆諸島から実施することを計画した。

次に汎用性の高い培養条件の検討を行うために、既に保有している糸状菌600株を用いて PDB 培地で培養液の調製を行い、LC-UV 解析で化合物生産性を調査した。これを3回繰り返し、化合物生産性が安定していた *Epicoccum catenisporum* など4株を選出後、培養条件の検討を行った。

フィルター濾過滅菌したキナ酸を0.001~10%まで10段階に調製して添加培養を行い、これら培養液を用いてペーパーディスク法にて6種の病原性微生物 (*Bacillus subtilis*, *Kocuria rhizophila*, *Escherichia coli*, *Xanthomonas oryzae*, *Candida albicans*, *Mucor racemosus*) に対して抗菌試験を行った。尚、ペーパーディスク1枚当たり10 µL の培養物 EtOH 抽出液を染み込ませ、1時間真空乾燥を行った後に抗菌試験に用いた。

4. 研究成果

キナ酸の化合物生産に与える影響の評価：キナ酸の有無による色調変化を調査した。植物内生菌では、液体培地で **100** 株中 **45** 株、固体培地では **100** 株中 **19** 株において変化が見られた。土壌糸状菌では、液体培地で **100** 株中 **68** 株、固体培地で **100** 株中 **34** 株において変化が見られた。

キナ酸が糸状菌の二次代謝に影響を及ぼす分類範囲の調査：上記 **200** 株から二次代謝に変化を及ぼした菌株について属レベルでの分類を行った結果、**Eurotium** 目に属する **Aspergillus** 属、**Penicillium** 属、**Talaromyces** 属、**Capnodia** 目に属する **Cladosporium** 属、**Ramichloridium** 属、**Pleospora** 目に属する **Curvuralia** 属、**Hypocrea** 目に属する **Acremonium** 属、**Beauveria** 属、**Fussarium** 属、**Lecanicillium** 属、**Leptobacillium** 属、**Metarhizium** 属、**Pochonia** 属、**Purpleocillium** 属、**Tolypocladium** 属、**Trichoderma** 属において影響を与えることが明らかとなり、非常に幅広い分類群において影響を与える結果となった。しかし、これらは土壌中からの高頻出菌類であり、植物内生菌であっても土壌と共通して頻出する属に限られた結果となった。

検証する分類群の拡大：本申請課題の間中は新型コロナウイルス感染症蔓延の影響で、離島への渡航を断念する結果となった。土壌糸状菌と植物内生菌で大きな差が見られたことから、昆虫共生菌、菌寄生菌、水生菌類など検討を行っていない分類群に拡大検討する意義が残されているため、今後の課題となる。

抗菌試験：LC-UV 解析で化合物生産性が安定していた **4** 株を選出後、培養条件の検討および **6** 種の病原性微生物に対して抗菌試験を行った結果、キナ酸濃度 **0.05%** で最も強い活性を示した。

以上より、抗菌以外の評価系においても土壌糸状菌を液体培養時に前述のキナ酸濃度で大規模スクリーニングを実施した際に最も効果を発揮することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------