

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660059

研究課題名(和文) リボソーム攻撃性抗生物質の活用による糸状菌の潜在的二次代謝能活性化技術の確立

研究課題名(英文) Development of a novel method for activating the potential of fungi to produce secondary metabolites by utilizing ribosome-targeting antibiotics

研究代表者

保坂 毅 (HOSAKA, Takeshi)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：50391206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでに、リボソーム攻撃性抗生物質を活用した遺伝学的および生理学的に異なる二つのアプローチがバクテリアの潜在能力を引き出す手法として有効であることを明らかにしてきた。本研究において、その手法がバクテリアのみならずカビや酵母(真核微生物)の潜在能力活性化にも有効であることを実験的に証明した。加えて、ハイグロマイシン B 耐性変異および同抗生物質によるホルミス効果でカビの潜在的二次代謝能が向上する現象に着目して、その仕組みについて詳しく解析したところ、リボソーム攻撃性抗生物質を用いた同じ手法でも、カビと細菌とは異なる仕組みで潜在能力が引き出される可能性があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Mutations conferring resistance to ribosome-targeting antibiotics and ribosome-targeting antibiotics at subinhibitory concentrations often dramatically alter the phenotypic profile in bacteria. This study has demonstrated that the concept as described above can be applicable to a variety of eukaryotic microorganisms to elicit their potential, such as the ability of fungi *Monascus pilosus* to produce secondary metabolites, and to alter the phenotypic characteristics of the fission yeast *Schizosaccharomyces Japonicus*. Interestingly, phenotypic and genetic characterization of the secondary metabolite-overproducing Hygromycin B resistant mutant of *M. pilosus* revealed that ribosome-targeting antibiotics in eukaryotic microorganisms could have different mechanisms to those in prokaryotic microorganisms for activating their potential.

研究分野：応用微生物学

キーワード：二次代謝 糸状菌 酵母 リボソーム攻撃性抗生物質 抗生物質耐性変異 ホルミス

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、“薬剤耐性(リボソームを標的とする抗生物質に対する耐性)を付与する自然突然変異を活用し、微生物の翻訳機能を改変・増強することで、その潜在能力を最大限に引き出せる”という独創的な概念「リボゾーム工学」に関する基礎・応用研究を展開してきた [Hosaka T. et al., *Mol. Microbiol.* 61 (2006), Hosaka T. et al., *Nat. Biotechnol.* 61 (2009)]。この概念に基づく(微生物の)潜在能力活性化技術は、抗生物質生産菌である放線菌をはじめ、様々なバクテリアの潜在的二次代謝能を引き出すための有効な手法となっている [Ochi K. & Hosaka T., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013)]。もし同概念が糸状菌や酵母などの真核微生物にも通用するならば、その応用範囲はさらに拡大の一途をたどることが期待されている。世界を代表するような医薬品であるペニシリンやスタチンの骨格は糸状菌の二次代謝産物から見つかっており、糸状菌の潜在能力さえ引き出せれば、まだまだ数多くの有用化合物を発見できる可能性は高い。以上のように、糸状菌や酵母といった真核微生物の潜在能力を引き出し利用するための研究は、応用微生物学を発展させる上での重要課題の一つとして捉えることができる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、真核微生物(カビや酵母)の潜在能力を引き出し高度利用するための新技術を確立することにある。具体的には、リボソームに作用する抗生物質を活用した遺伝学的および生理学的な異なる二つのアプローチ(それぞれ、抗生物質耐性変異の活用、および抗生物質の濃度依存的現象:抗生物質のホルミシス効果の活用)により、糸状菌の潜在的二次代謝能を効率的に引き出せるか否か、加えて、酵母の諸性質を劇的に変えることができるか否かを明らかにする。さ

らに、その仕組みを生化学・分子生物学的な面から解析し、糸状菌や酵母の潜在能力活性化研究に新しい概念と手法を打ち立てることを最終目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、供試菌株として、紅麹菌 *Monascus pilosus* NBRC 4520 と分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* を使用した。また、リボソーム攻撃性抗生物質として、ハイグロマイシン B およびシクロヘキシミドを主に使用し、以下に設定した3つの課題についてそれぞれ検討した。

- (1) 糸状菌の潜在的二次代謝能を引き出すリボソーム攻撃性抗生物質耐性変異の探索と同薬剤によるホルミシス効果の検証
- (2) リボソーム攻撃性抗生物質の活用による糸状菌の潜在能力活性化の仕組みの解析
- (3) 酵母の潜在能力を引き出すリボソーム攻撃性抗生物質耐性変異の探索

4. 研究成果

(1) 糸状菌の潜在的二次代謝能を引き出すリボソーム攻撃性抗生物質耐性変異の探索と同薬剤によるホルミシス効果の検証。薬剤耐性選抜法により、紅麹菌 *Monascus pilosus* NBRC 4520 から 80 菌株のハイグロマイシン B 耐性変異株、および 30 菌株のシクロヘキシミド耐性変異株を取得した。各変異株の二次代謝産物生産性を詳しく調べたところ、ハイグロマイシン B 耐性変異株の 1 菌株が親株に比べて高い二次代謝能を有することが明らかになった [二次代謝能の評価は赤色および黄色色素(抗菌・抗がん性色素)の生産量を指標にした]。一方、紅麹菌 *Monascus pilosus* NBRC 4520 を最小生育阻止濃度(80 µg/mL)よりも低い濃度(最小生育阻止濃度の 1/320~1/40: 0.25~2 µg/mL)のハイグロマイシン B 存在下で培養すると、同菌における赤色および黄色色素の生産量が劇的に増加した [その生産

量は最大でハイグロマイシン B 非添加時の 8 倍に到達した (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のハイグロマイシン B 添加時) (図 1) 以上のように, 紅麹菌 *Monascus pilosus* NBRC 4520 に「ハイグロマイシン B 耐性を付与する」あるいは「ハイグロマイシン B のホルミシス効果を利用する」ことで, 同菌の潜在的二次代謝能を引き出せることが明らかになった。加えて興味深いことに, ハイグロマイシン B を活用した上述した 2 通りの遺伝学的および生理学的なアプローチを組み合わせると, *Monascus pilosus* NBRC 4520 の二次代謝産物生産性が劇的に向上することも実験的に証明できた。本研究で見出された知見は, 糸状菌を対象とした有用二次代謝産物の探索研究の発展に大きく貢献し得る極めて重要な成果となった。

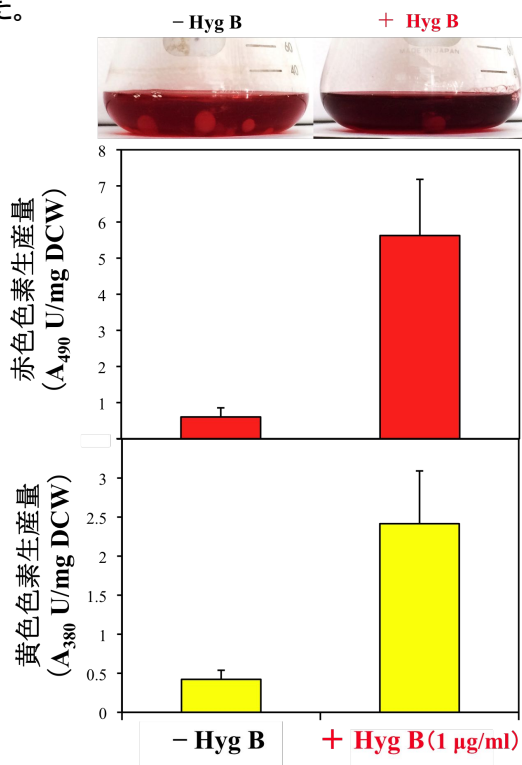


図 1 ハイグロマイシン B (HygB) が紅麹菌 *Monascus pilosus* NBRC 4520 の二次代謝産物生産に及ぼす影響

(2) リボソーム攻撃性抗生物質の活用による糸状菌の潜在能力活性化の仕組みの解析. 本検討では, 紅麹菌 *Monascus pilosus* NBRC

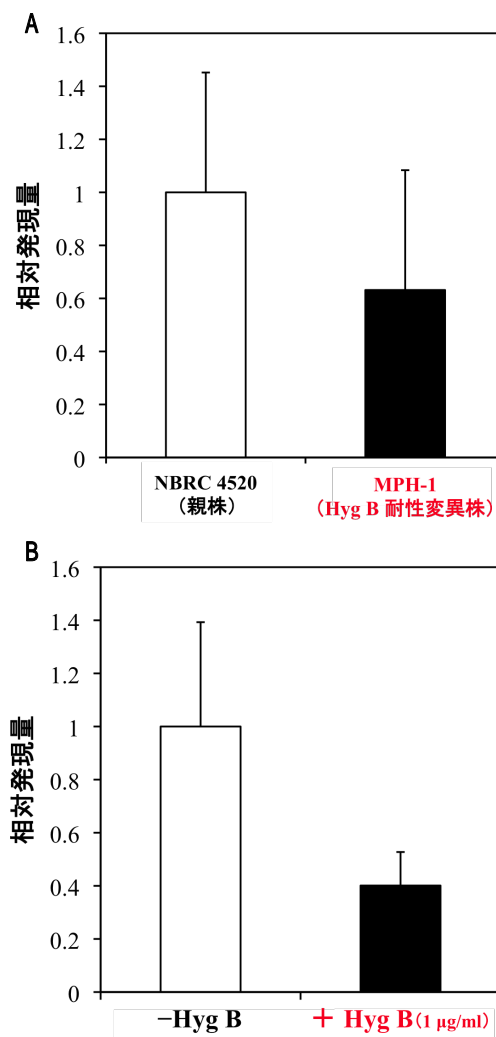


図 2 紅麹菌 *Monascus pilosus* NBRC 4520 における MFS トランスポーター遺伝子の mRNA 発現量

培養 2 日目の細胞から全 RNA を調製し, 定量的 RT-PCR 法により解析した。

A: 親株とハイグロマイシン B (Hyg B) 耐性変異株 MPH-1 との比較。親株の発現量を 1 とした。

B: Hyg B 存在・非存在下での比較。Hyg B 非存在下における発現量を 1 とした。

4520 の親株と (1) の検討で得られた二次代謝産物を高生産するハイグロマイシン B 耐性変異株 (MPH-1) を用いた。これら菌株の全ゲノムを解析したところ, 変異株 MPH-1 は Major Facilitator Superfamily (MFS) トランスポーター遺伝子にフレームシフト変異を有することが明らかになった。この変異に

より MFS トランスポーターの 281 番目以降のアミノ酸配列が大きく変わることから、変異株 MPH-1 では同トランスポーターの機能が変化している可能性が推察された。加えて、定量 RT-PCR による発現解析の結果から、変異株 MPH-1 における MFS トランスポーターの mRNA 発現量が親株の約 60% であることが明らかになった (図 2A)。上述したように *Monascus pilosus* NBRC 4520 は、1 µg/ml のハイグロマイシン B 存在下で培養すると、変異株と同様に二次代謝産物の生産量 (赤色・黄色色素の生産量) が増加する。興味深いことに、そのような条件下でも MFS トランスポーターの mRNA 発現量が低い (ハイグロマイシン B 存在下の発現量は非存在下の約 40% である) ことが判明した (図 2B)。

これらの結果は MFS トランスポーターの発現低下や機能変化が紅麹菌の二次代謝能向上に関与することを強く示唆した。細菌の潜在能力活性化にはリボソーム変異が関与することが知られている。以上のことから、リボソーム攻撃性抗生物質を用いた同じ手法でも、糸状菌と細菌とでは異なる仕組みで潜在能力が引き出されることが判明した。

(3) 酵母の潜在能力を引き出すリボソーム攻撃性抗生物質耐性変異の探索。リボソーム攻撃性抗生物質を用いた遺伝学的手法 (抗生物質耐性変異の活用) および生理学的手法 (抗生物質の濃度依存的効果: ホルミシスの活用) により糸状菌以外の真核微生物の潜在能力を引き出すことにも有効か否かを検討した。その結果、ジャポニカス分裂酵母 *Schizosaccharomyces japonicus* の親株と薬剤耐性選抜法によりこの親株から取得した 153 菌株の G418 耐性変異株を用いた種々の生理学的分析から、G418 耐性変異には分裂酵母の性質 [細胞の形状, 耐糖性 (高濃度グルコース存在下での生育), 耐凍性, 発泡性, および代謝産物の生産性] を劇的に変化させる作用があることを実験的に証明でき

た。そのような性質をもたらす G418 変異の同定には至らなかったが、以上の結果から、リボソーム攻撃性抗生物質を活用した遺伝学的手法が分裂酵母の潜在能力を引き出すことにも有効である見通しを新たに得ることができた。

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 3 件)

1. 保坂毅, 今井優, 放線菌における抗生物質ホルミシス効果による二次代謝活性化 (Activation of secondary metabolites by the hormetic effects of antibiotics in streptomycetes), バイオサイエンスとインダストリー 74, 516-518, 2016, 査読有.

2. 保坂毅, 抗生物質ホルミシスの理解と応用, 生物工学会誌 (大村智先生ノーベル賞受賞記念特集-微生物由来天然物の実用化と未来) 94, 399-400, 2016, 査読無.

3. 保坂毅, 放線菌の潜在能力発現に関わる薬剤耐性変異の特性解析と抗生物質発掘への応用, 日本放線菌学会誌, 28, 9-14, 2014. 査読無.

[学会発表] (計 5 件)

1. Maruyama T, Geho W, Hamauzu R, Hosaka T, Isolation and phenotypic characterization of G418-resistant mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*, The 13th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms, October 17~18, 2016, East Lake International Conference Center, Wuhan (China).

2. 保坂毅, 抗生物質の濃度依存的現象「抗生物質ホルミシス」の理解と応用, 第 68 回日本生物工学会大会シンポジウム, 2016 年 9 月 29 日, 富山国際会議場・ANA クラウンプラザホテル (富山県富山市), 招待講演.

3. 保坂毅, 抗生物質ホルミシスの分子生物学

的機構の理解と放線菌の二次代謝研究への応用, 第10回ゲノム微生物学会年会シンポジウム, 2016年3月5日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区), 招待講演.

4. 保坂毅, 抗生物質ホルミシスの分子生物学的機構の解析とその応用, 第5回遺伝研研究会, 2015年11月6日, 国立遺伝学研究所(静岡県三島市), 招待講演.

5. Hosaka T., Ribosome-targeting antibiotics at subinhibitory concentrations potentiate secondary metabolite production by streptomycetes, Society for Industrial Microbiology and Biotechnology Annual Meeting, August 3, 2015, Sheraton Philadelphia Downtown Hotel Philadelphia (USA). 招待講演.

[その他]

ホームページ等

信州大学学術情報オンラインシステム SOAR,
<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.OULNjFkV.html>

信州大学応用分子微生物学研究室 HP,
<http://appl-mol-microbiol-shinshu-u.jimdo.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

保坂 毅 (HOSAKA, Takeshi)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号 : 50391206

(2) 研究協力者

濱渦 亮子 (HAMAUZU, Ryoko)

信州大学・農学部・応用分子微生物学研究
室・研究補佐員

研究者番号 : なし