

真菌の混合培養による新規生物活性物質生産の活性化とその機構の解明

塚本 佐知子

熊本大学大学院 生命科学研究部

研究の目的

古来、人類は微生物が生産する有用二次代謝産物を医薬品等に活用してきた。しかし、近年のゲノム解析技術の発達により、菌体が多く二次代謝生合成遺伝子群を保有しているにもかかわらず、純粋培養ではそれらの一部が発現しているにすぎないことが分かってきた。そこで、発現していない休眠遺伝子群を活性化させる方法の研究が世界中で行われている。これまで当研究室では、医薬シーズとなる化合物を探索するため独自に確立した種々のアッセイ系を用いて、海洋生物や微生物から多くの新規生物活性物質の取得に成功した。そして、研究室において土壌や海洋生物、植物等から 3,000 株の真菌を単離したが、休眠遺伝子群を活性化させることにより、新規性の高い生物活性物質を取得できる確率が高くなると考えた。そこで本研究では、複数の真菌の混合培養により、純粋培養では生産していない新規化合物を生産させ、その生産の機構を解明することを目的とする。その結果、真菌の代謝産物プロファイルを一気に拡大できると考えている。

方法

真菌の混合培養法として液体培地と寒天培地での培養が考えられるが、当研究室で行った研究では、液体よりも寒天などの固体培地を用いた培養の方が、より多くの代謝産物を生産する傾向が強いことがわかっている。そして、成長阻害物質が生成している場合、寒天培地上で混合培養した場合には、どちらの真菌が成長阻害物質を生成しているのかを肉眼で判断することができる。また、阻害した部分を顕微鏡で観察することにより孢子や菌糸に形態変化が起きたかどうか分かる。そこで本研究では、寒天培地を用いて混合培養のスクリーニングを行い、新規代謝産物の取得を目指した。

(1) 混合培養スクリーニング

2 種類の真菌を麦芽エキス寒天培地上で培養し真菌の接触部分を MeOH 抽出した。そして、混合培養で得られた抽出物の成分と、単独で培養した真菌の MeOH 抽出物の成分を、LC-MS を用いて比較した。

(2) 混合培養による新規代謝産物の取得

混合培養スクリーニングにおいて新規物質の生成が認められた 2 種の真菌 (*Irpex lacteus* (13S052) と *Phaeosphaeria oryzae* (13S070)) を麦芽エキス寒天培地上

で大量に混合培養し、新たに生成した成分を精製した。

結果

阿蘇の植物から採取した *Phaeosphaeria oryzae* (13S070) と *Irpex lacteus* (13S052) の組み合わせで混合培養を行ったところ、接触部で緑色色素の産生が認められた (図 1)。そこで、色素部分を抽出し LC-MS で分析した結果、色素以外にも混合培養により新たに生成した化合物の存在が認められた (図 2)。これらの化合物を単離し構造解析するために、共培養を大量に行い抽出物を精製した。混合培養により新たに生成した緑色色素 (図 2 のピーク 1) は、構造決定により *hypoxyxylerone*¹⁾ (図 3) であると同定した。そして LC-MS 分析により、生成量はかなり少ないが *hypoxyxylerone* の類縁体が複数含まれることがわかった。そして、麦芽エキス寒天培地上では *I. lacteus* および *P. oryzae* のいずれも *hypoxyxylerone* を生成しなかったが、米培地を用いた場合には *I. lacteus* が *hypoxyxylerone* を生成した。この結果から、*hypoxyxylerone* の生産菌は *I. lacteus* であることがわかった。したがって、*I. lacteus* は、麦芽エキス寒天培地上で *P. oryzae* との物理的接触あるいは分泌された化学成分の影響により *hypoxyxylerone* を生成するようになったと考えられる。一方、ピーク 2 の化合物は共培養によって新たに生成した新規化合物であることがわかった²⁾。

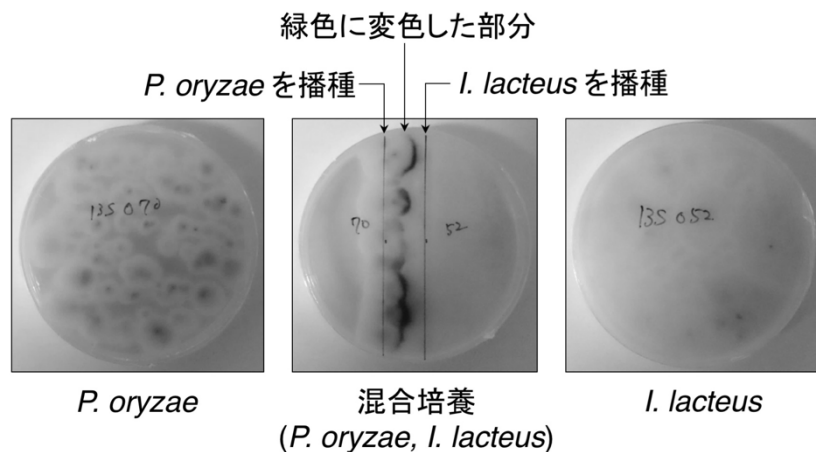


図 1. 2 種の真菌 (*P. oryzae* (左)、*I. lacteus* (右)) の単独培養と混合培養 (中央)。混合培養では、2 種の真菌を 1 センチ離れた位置に播種し培養した。

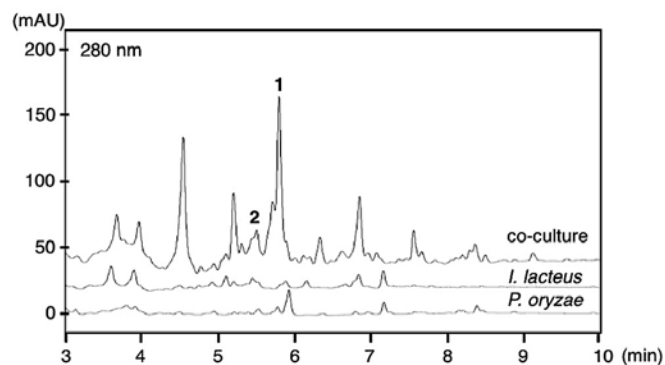


図 2. 2 種の真菌 (*P. oryzae*, *I. lacteus*) を単独培養あるいは混合培養した後、HPLC (280 nm) 分析した.

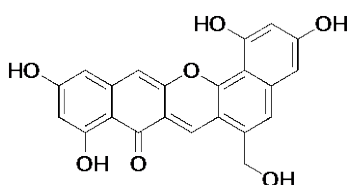


図 3. Hypoxyxylone の構造.

結論

近年、製薬会社が、新薬開発の対象を慢性病治療薬へと移行させるとともに、天然資源からの新規医薬シーズ探索から撤退した。そのため、抗菌薬の開発が世界中で急激に減速し、新規感染症治療薬の上市が伸び悩んでいる。これまで抗生物質を開発する研究が世界中で活発に行われていたので、今後、新規抗生物質を取得するためには、未開拓の環境から新規微生物を取得することに加えて、既に取得した微生物の休眠遺伝子から新規代謝産物を取得することが必要であると考えられる。これまでに真菌をバクテリアあるいは放線菌と共培養させることにより休眠遺伝子を活性化させる試みは数多く行われているが、複数の真菌を共培養し新規物質を取得する研究はあまり行われていない。本研究により、固体培地上で真菌同士を共培養させることにより新規物質を取得できることが明らかとなった。休眠遺伝子から新規代謝産物を取得することは、新規抗生物質の開発だけでなく、食品産業を含む広範な発酵化学産業分野の活性化に結びつくと考えられる。

文献

- 1) Edwards, R. L., Fawcett, V., Maitland, D. J., Nettleton, R., Shields, L., and Whalley, A. J. S. (1991) Hypoxyxylone. A novel green pigment from the fungus *Hypoxyylon fragiforme* (Pers.: Fries) Kickx. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1009-1010.
- 2) Sadahiro, Y., Kato, H., Tsukamoto, S. (2018) A new metabolite produced by co-culture of fungi, *Phaeosphaeria oryzae* and *Irpex lacteus*. In preparation.