

# 放線菌・糸状菌に生理活性物質を作らせるには

木下 浩

本誌の読者でいままで一度も「抗生物質」を処方されたことがない人はまずいないであろう。抗生物質は風邪をはじめとしてさまざまな感染症の治療、予防薬一般を指す言葉として用いられるが、もともとの定義は「微生物が産生し、ほかの微生物の増殖を抑制する物質の総称」とされていた。しかし、年月が経つにつれ微生物が生産する化合物を酵素的、化学的に修飾した薬剤も抗生物質と呼ぶようになり、現在では微生物の産生物由来する抗菌剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、そして抗腫瘍剤も広義には抗生物質とみなされている。では、抗生物質を生産する「微生物」とはどのような菌か？

抗生物質の主要な生産菌としては、これまで見いだされた生理活性物質の5割の化合物の源となっている放線菌、世界最初の抗生物質ペニシリンが発見された糸状菌(カビ)が挙げられる(表1)<sup>1)</sup>。放線菌という名前は専門の研究者以外にはなじみが少ないが、土壌菌の一つであり、いわゆる土臭さは放線菌の臭いに由来するものである。糸状菌は湿度の高いところではどこでも生育することができ、胞子を飛ばしてアレルギーの原因になるので一般家庭では“カビ”として嫌われる菌群である。しかしながら糸状菌は古くから、日本ではお酒、醤油など、西欧ではチーズといった発酵食品生産において欠かせない役割を果たしてきただけでなく、発酵過程に分泌するさまざまな酵素が現在では多くの産業用途に利用されている。これら放線菌、糸状菌は土壌から比較的簡単に多種類単離でき、様々な活性物質を生産することから、これまでの化合物スクリーニングの主要な被検菌となってきた。しかしながら、両菌群は以前のトピックで述べられたように大腸菌、酵母と比べて培養には困難な点も多

い。本稿では有用な生理活性物質の探索研究を行うことを前提に、培養方法のポイントに関して触れてみたい。

## 形態分化と二次代謝

放線菌と糸状菌は分類学上、それぞれ原核生物と真核生物に属するため、遺伝学的にはかなり離れた菌群であるが、共に他の菌ではあまり見られない性質を示すことから同じテーマを持つ研究者の注目を集めてきた。この二つの菌群の大きな特徴の一つとして、単細胞生物に属しながら、固体培養時に胞子→基底菌糸→気中菌糸→胞子という異なる状態を取り得ることが挙げられる(図1)。形態分化の分子機構を解明するために、これまでさまざまな変異株が構築され、関与する因子が同定されてきた。近年はトランスクリプトーム解析による、網羅的な研究が行われ、分化の各段階において特異的に発現している遺伝子が同定され、詳細な機構が提案されている。

このような分化は劣悪な生育環境を乗り越え次代に遺伝子を伝える対応策と考えられるが、多くの場合、それと時を同じくして二次代謝を開始し、さまざまな生理活性物質の生産を行う。二次代謝物質生産に関する生物学的意義は不明な点も多いが、菌にとっては生育に必要なエネルギーや化合物を、生育には必須でない生理活性物質の生産に振り分ける訳であるので、周辺に存在する他の菌群の生育へ影響を与え、生産菌にとって有利な環境を整えることを目的としていると考えられる。人類はこ

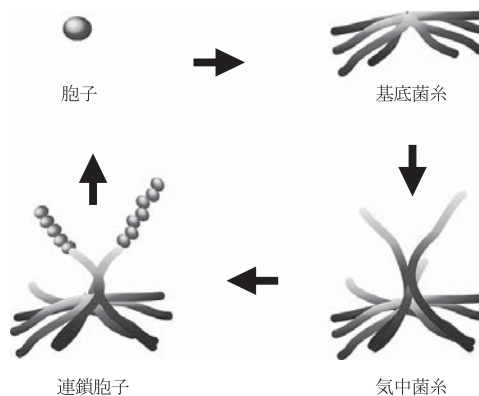


図1. 放線菌の形態分化

表1. 生産菌群ごとの生理活性物質総数

生物種	抗生物質	他の生理活性物質	全生理活性物質
バクテリア	2900	900	3800
放線菌	8700	1400	10100
糸状菌	4900	3700	8600
計	16500	6000	22500

文献1より一部抜粋

のような菌群が骨身を削って生み出した化合物の恩恵にあずかり、感染症をはじめとするさまざまな疾病の治療薬の開発を行ってきた。しかし、現代においても多剤耐性菌、新型インフルエンザの出現やいまだ治療法の確立していない難病の治療のために、新たな生理活性を持った化合物の発見が求められている。

### 菌株の単離

新規化合物の探索源として、土壌はもちろん、現在では海洋、植物・動物・昆虫内などさまざまな環境中から新たな菌の単離が行われている。その際、環境中には数万、数十万種の菌が存在するため、生理活性物質生産能の解析を始める前に混ざり合った状態からの菌の純化が重要なステップとなる。標的化合物の資化性を指標とするのでなければ、特定の菌群を単離するときには通常、目的菌群以外の雑菌に効果を示す各種抗生物質を培地に添加し、対象外の菌が育ちにくい環境を作る。糸状菌を単離するにはバクテリアに対してスペクトルの広いクロラムフェニコール、ストレプトマイシンが有効であり、放線菌を単離するためには糸状菌の生育を抑制するためにアンフォテリシンB、ベノミル、シクロヘキシミドが併用される。しかしながら、糸状菌は菌糸が広がりやすく、さらにお互いに胞子を飛ばし合うために純化するのに時間がかかる。そこで、培地中にデオキシコール酸ナトリウム、食用色素としても用いられるローズベンガル、ソルボースなどの生育阻害剤を添加する。これらの薬剤はカビの菌糸生育の阻害効果があるため、培地中に添加すると、糸状菌のコロニーが広がるのを抑え、コロニー同士が重なるのを防ぐことができる。また、放線菌の単離を目指すときには、上記抗真菌剤を添加していても糸状菌のコタミが問題となってくるが、そのまま植え継ぎを繰り返すだけでは混在している糸状菌を除けないことが多い。この際にはお互いの菌糸の太さの差（放線菌：0.5～1.0 μm、糸状菌：2～10 μm）を利用した純化が有効である。孔径 0.2 μmのフィルター（Mixed cellulose ester, Advantec）を培地上に置きその上で混合菌群を一定時間培養した後、フィルターをはがす。孔を通してプレート上に菌糸を伸ばすのは放線菌だけであるため、簡単に純化を行うことができる。

### 培 養

さて、首尾良く菌株の純化に成功できたら、次はそれぞれの菌の化合物生産の検討を行う。その際は、放線菌、糸状菌の二菌群が有する類似の性質について注意を払いながら進める必要がある。放線菌、糸状菌ともにゲノム

上に数多くの二次代謝物質合成遺伝子をもち、さまざまな生理活性物質を作り得ると考えられるが、その生産プロファイルは培養条件に強く依存することから、新規化合物を発見するためにはこれらの菌群の（さらにいうならば化合物ごとの）生産至適培養条件を見つけなければならない。では、どのような点について検討する必要があるだろうか？

まずは培養のスタート方法である。どのような状態（孢子？菌糸？）の菌を植菌するのか？ それに用いる菌体はどのようにして調製するのか？ 調製した菌をどれだけの量、どの培地に植菌するのか？ 培養は液体？固体？ 組み合わせを考えると無限ともいえる条件を検討する必要が出てきてしまう。大腸菌、酵母の培養においては菌体密度に由来する濁度（O.D.）が、測定が容易な割に再現性が良いため、植菌量の決定に一般的に用いられる。しかし、放線菌・糸状菌においては液体培養時に菌糸が大きな粒状となり、均一な状態とならないことが多いため濁度を用いることができる機会は限定される。通常は固体培地で得られた胞子を回収し、顕微鏡下でカウントした後、既定の個数植菌することが標準的な方法といえる。しかしながら、糸状菌の場合、孢子数が十分確保できなかつたり、培養の再現性が取れなかつたりする場合などは、十分生育したプレートから1 cm四方を切り取り培地ごと液体培地に植菌することも行われる。この場合、生育をコントロールするのは難しくなるが、そもそも糸状菌の場合、壁面増殖が起こりやすいため、再現性良く生育をコントロールできる培養条件は限定される。

次に二次代謝物質の生産至適培養条件を決定する。もちろん上述の植菌方法も生産培地が決定されれば再検討の余地が出てくることもある。培地条件は各因子の濃度を考えれば無限にあるため、まずはテキスト、論文に出てくる培地や各研究室の秘伝のレシピに従うことになるであろう。それでもうまくいかなかった場合には個々の菌株、目的とする化合物について網羅的に検討していくことになる。その際には、yeast extractのようにメーカーにより組成に差がある物質は、生産性に与える影響も異なることがあるので注意を払うことが大事である。時には製造のロットごとで生産性が変わることもあるので、苦労してよい条件を見つけたときには実験が一段落つくくらいまで培地を購入しなくてもよいくらい用意しておく方が安全である。また、いずれの菌群も固体培養時では液体培養時とは異なる物質生産性を示すことがよくあるので固体培養についても検討を行うべきである。特に固体培養は初期のスクリーニングにおいては場所もとら

ず数を増やすことも容易であるので有効な手法である。しかし、物質の精製の段階に入ると多量に培養したり、化合物を抽出したりすることが難しくなるため、よりスケールアップに向けた液体静置培養を用いることで固体培養の代用とすることもある。

適当な条件が見いだされたとしてもまだまだ油断はできない。特に気をつけるべきところは再現性である。うまく“はまった”ときに最大生産量に達したとしても安定してその量が得られないのであれば、最大量が劣っていても再現性が得られる条件で研究を続ける方がよほど効率的である。何らかの理由で実験を中断すると、菌がご機嫌を損ねることもあるため、再開したときにも慎重な確認が必要である。また、いったん培養条件が決まると速く化合物を得たいがために培養期間を短くしようとして、最初の植菌量を上げたくなるが、これにも注意が必要である。菌体内物質の持ち込みによる影響か、初期菌体濃度が高いせいなのかは不明であるが、生産量が激減するときがある。また、同様に培養時のスケールアップを図った際でも、植菌量、エアレーションが異なるためか思ったように生産性が上がらないこともある。培養条件を少しでも変えたときは(培養に使うシェーカーを変えたときでも)面倒でも確認作業は行うべきである。二次代謝物質の生産プロファイルとしては、放線菌・糸状菌共に生育が定常期に達するまでは生産量が増加する傾向が高いが、化合物によっては増殖期に最大量となり、その後減少に転じる物もあるので、可能であれば生育を観察しながら目的化合物の生産状況を追い、最適な培養時期を決定することが望ましい。ただ、いずれの菌群においても固形成分(オートミール、ふすま)を含むような培地が高い物質生産性を示すことも多いが、その際は、生育の測定には工夫が必要になる。濁度はもちろん、菌体重量の測定も困難であるため、培養液中のタンパク質もしくはDNAの定量を追うことにより生育状況の推測が行われる<sup>2-4)</sup>。

### 形質転換系の構築

最後に通常の培養とは異なるが、形質転換の際に直面する菌の調製方法についても少し述べておく。近年の遺伝子工学の発達の結果、従来は困難であると考えられてきた放線菌、糸状菌の形質転換の例も数多く報告されるようになってきている。生理活性物質スクリーニングの結果、有望な化合物が得られれば、遺伝学的手法による生合成機構の解明を行い、さらに遺伝子改変による新規誘導体の生産も行われている。そのためには形質転換系を構築する必要があるが、そこにも培養上注意を払うべ

き点がさまざまな段階において存在している。近年、放線菌においては放線菌とのコンジュゲーション、糸状菌ではアグロバクテリウムを用いる方法も行われているが、古くからおこなわれているプロトプラスト-PEG法が現在でも主要な方法である。この場合、プロトプラストを作る条件、および再生の条件の検討が必須である。プロトプラストの作製を胞子から行うのか、胞子を発芽させるのか、それとも菌糸でやるのかが最初の大きな選択肢となる。その検討の際、胞子、菌糸をどのような培地で形成させるかによっても形質転換効率が大きく変動することから、検討の際にはさまざまな培地で形成した胞子・菌糸を試すべきである。また、遺伝子導入操作の終了後、プロトプラストから形質転換体を再生させるときに用いる培地が形質転換効率に影響を及ぼすことも多い。その際、形質転換体の選択圧として抗生物質がおもに用いられるが、その使用法を決定するに当たっても注意が必要である。有効な抗生物質濃度を定めるため、感受性試験を行うが、通常の胞子、菌糸の培養時と比べて、プロトプラストからの再生の際には有効濃度が異なることがあるため、おおよその有効濃度が判明したら、プロトプラスト化した胞子・菌糸に対する有効濃度の検討を行うことが望ましい。また、プロトプラストからの再生時の抗生物質の添加方法も再生培地に入れておく方法や重層する軟寒天培地だけに加えたりすることも試みられる。形質転換体を得られにくい場合は、いったん抗生物質を含まない培地上に置いたフィルター上で培養した後、抗生物質入りのプレートに移すことにより効率が向上することも見られる。

### おわりに

放線菌、糸状菌の二次代謝を研究するに当たって残念ながらこの培地、培養方法が汎用であると言い切れるものはない。培養方法が不明な菌を取り扱うことになったときには面倒くさがらずに最初にさまざまな培養方法を検討しておくことが、結果的に早道になると考えられる。本稿がこれから放線菌、糸状菌の世界に入る人たちにあって少しでも助けになることを願う。

### 文 献

- 1) Bérdy, J.: *J. Antibiot.*, **58**, 1 (2005).
- 2) Hamdalia, H. *et al.*: *Appl. Soil Ecol.*, **44**, 24 (2010).
- 3) Ozcengiz, G. *et al.*: *Bioeng. Bugs.*, **1**, 191 (2010).
- 4) Tamburini, E. *et al.*: *FEMS Microbiol. Lett.*, **237**, 267 (2004).