

混合培養系の有用物質生産への応用



研究ノート

小林 昭 雄*

Production of useful compounds by mixed culture methods

Key Words : Cyanobacteria, *Nostoc commune*, Co-culture, mixed culture

医薬や食品添加剤として重用されている、いわゆる二次代謝産物は、我々の生活に欠かすことの出来ない有用物質群であり、多くの生薬や食品色素、香りの成分は、植物の二次代謝産物である。また、微生物起源の抗生物質ペニシリンやマイトマイシンも重要な二次代謝産物である。これらの物質の性状を明らかにするためには純粋な目的化合物をある程度の量得ることが求められる。そのためには、菌を純粋に分離して、厳密な培養条件下で純粋培養を行って目的化合物を単離することが必要である。したがって、この目的のためには純粋培養をいかに効率よくスケールアップするかが大きな課題である。

いずれにしても生物が作り出す物質に抗ガン活性や血糖抑制活性などの今日的な活性を見出すには、新しいサンプル源を開発して、そこから新規物質を発見することが必要である。新しい薬剤の開発にあたっては、従来通りの微生物の代謝産物中にそれを求める方法が優位を占めており、新しい菌のソースを土壌由来の稀な菌や海洋微生物に求めているのが現状である。しかし、自然界では多くの生物が共存によって生活圏を構成しており、このような複合の場で初めて作り出される物質は、微量であるがために未開発であり未知の可能性を秘めた有用物質で

ありうる。

当研究室では植物と微生物の相互作用の結果、新たに産み出される物質に注目し、それらの構造解析を行い、化学合成および酵素合成による生産を指向している。

古生物との共生

筆者らは、グランドの隅でジェリー状の緑塊を見出し、周辺に双子葉植物が生育していないこと、また、ジェリー塊にカビの着生が認められないことから、その生体成分に興味をもった。野外で採取した試料をメタノール抽出して抗菌性試験や細胞毒性試験に供したところ、いずれにも強い阻害活性が認められた。このジェリー塊は、*Nostoc commune*なるラン藻であることが明らかとなった。本ラン藻の形態は、生育場所に関わらず酷似しており区別は出来ないが、その抽出物の活性に明瞭な違いが認められた。ラン藻も植物と同様、炭酸ガスと水、さらに光によってエネルギーを有機物として蓄積することができるし、その二次代謝産物は、化学的に放線菌の代謝産物と同様、大変複雑である(図1)。そこで本ラン藻がつくり出すジェリー塊に生息する微生物について検討した。その結果、バクテリアや放線菌が多数分離でき、それらは多分に異なった種であることがわかった。この事実、共存する微生物が二次代謝産物の蓄積と大きな関わりを持つことを示唆している。

*Nostoc commune*由来の生理活性物質とその純粋培養の確立

本ラン藻が生育場所でその生体成分が異なることからジェリー塊中に住む微生物が重要な意

* Akio KOBAYASHI
1945年5月4日生
京都大学大学院農学研究科農芸化学専攻
現在、大阪大学工学部応用生物工学科、教授、京大(農博)、植物細胞工学
TEL 06-879-7423 / 7424
FAX 06-879-7426
E-Mail j61237a@center.osaka-u.ac.jp



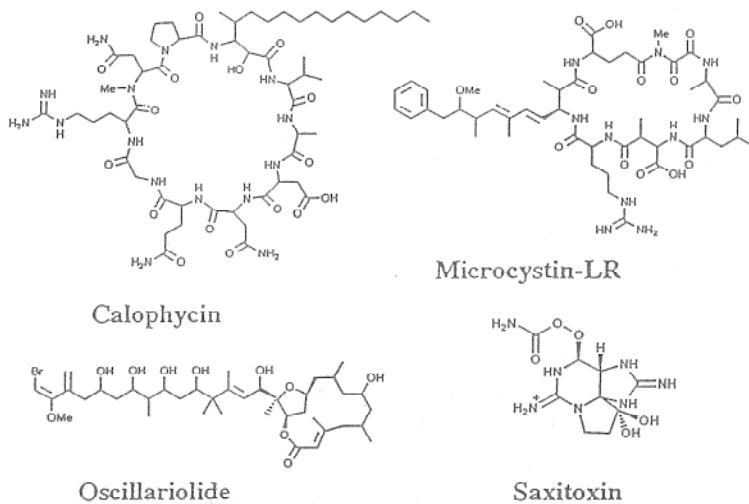
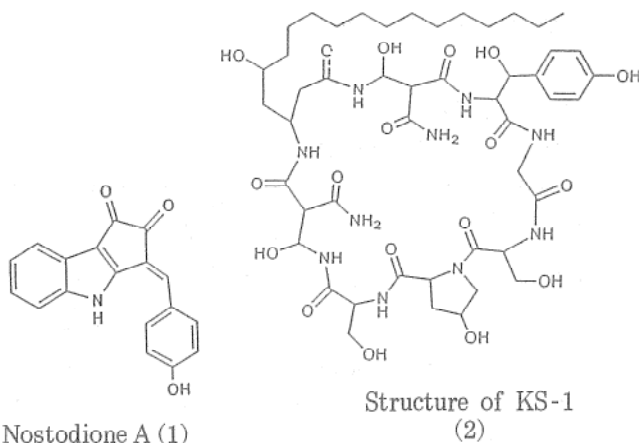


図1 生理活性を有するラン藻二次代謝産物

図2 *Nostoc commune* の生産する細胞分裂阻害物質と抗カビ性物質

味をもつと考えた。そこでまず、抗菌性物質と細胞分裂阻害活性をもつ物質を明らかにしようとした。野外で採取した本ラン藻数十キログラムをメタノール抽出し、幾つかの精製過程を経て、細胞分裂阻害剤として図2に示す Nostodione A(1)を、また、強い抗菌活性をもつKS-1(2)を単離し、その構造を明らかにすることができた。これらの物質を培養生産するために本ラン藻の純粋培養系の確立を試みた。

幸いのこと無菌操作を繰り返すことによって完全無菌化に成功した。無菌株を純粋培養し、上記活性物質の生産の有無を調べた。しかしながら、培養液中にその痕跡も認められなかった。しかも無菌ラン藻の生育は、野外での生育速度に比べ著しく遅い。そこで分離した菌を培養液に加えた場合、生育速度が上昇した。また、純

粋培養では認められなかった新たな代謝産物が検出された。この事実は、混合培養によってラン藻にとって好ましい条件が産み出されたことが予想された。

実際、海産スポンジからも興味深い生理活性物質が得られ、医薬品のリード化合物として注目されているが、やはりその収穫場所によって活性成分が大きく異なることが報告されている。これは、自然界においてある一定のエコシステムにおいてのみ産生される化合物があることを示しており、一定の共存状態を人工的に設けることができれば、未知の可能性を秘めた新規物質が産み出されることを示唆するものである。現在、完全無菌化ラン藻と共存微生物との組み合わせによって混合培養系を設定し、新規活性物質の生産を検討している。

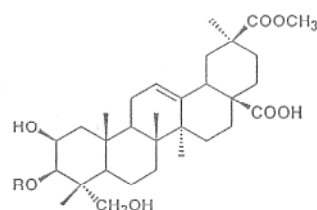
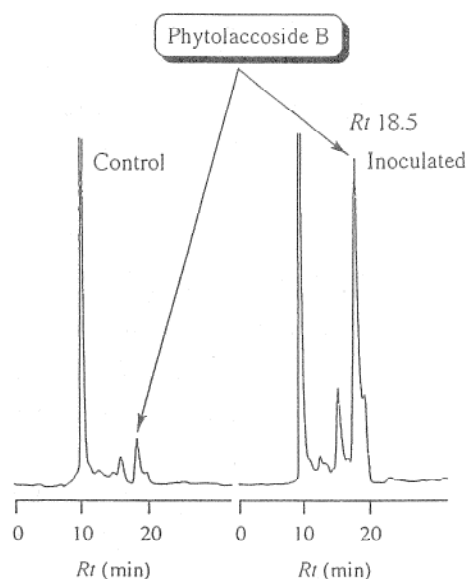
植物のもつ潜在能力の開発

植物は動物と違って、環境変動に対して速やかに代謝を調節し、その場に適応する。したがって、現存する植物は病原菌の侵入に対して相応する防御系を確立して生き延びてきたと言える。事実、ある病原菌があらゆる植物に非選択的に感染できるわけではなく、感染が成立するためには菌と植物の間にある親和的要素(親和性)が必要である。

一般に植物が感染すると病斑が形成され、病斑域やその周辺では、異常な代謝産物が見出される。これは、植物が作り出す防御物質であったり、あるいは、病原菌の作り出す毒素であったりする。ストレス下での異常代謝物質は感染が成立した場合にのみ見出されうる場合が多く、まさに2者の共存によって初めて産み出される産物といえる。したがって、特定の病原菌を任意の植物に感染させることが可能であれば、その際生じる代謝産物中に、求める活性をもった有用物質を探し得る可能性が生まれる。

活物寄生主としての植物培養細胞

植物病原菌が植物に感染する場合、非選択的



R = H : Phytolaccagenin

R = β -D-xylose : Phytolaccoside B

図3 ヨウシュヤマゴボウと灰色カビ病菌との2者培養による新規抗カビ性物質の生産

に感染出来るわけではなく双方に親和性が存在する場合に初めて感染が成立する。

この親和性には、病原菌の栄養要求性や植物の持つ防御システムの弱さに負うところが大きい。上述のラン藻の場合と同様、生きた生物との共存状態でのみ物質生産が可能の例がある。植物病原菌の純粋培養基から生理活性物質を得ようとする企ては、すでに、広く試みられている。しかし任意に選んだ菌を任意の植物に感染させて、その感染部位周辺から新規物質を発掘する試みは植物のもつ植物-微生物間非親和性バリアーが存在する限り不可能である。しかしながら、カルス細胞のような脱分化細胞では組織への分化が停止しているために容易に感染を成立させることができる。そこで以下の実験を設定することにした。

灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* とヨウシュヤマゴボウとの混合培養による抗菌性物質の生産

まず、手持ちの培養細胞と植物病原菌との掛け合わせで混合培養系を確立した。その結果、幾つかの組み合わせで単独の培養では見い出せなかった新しい代謝産物の誘導生産が認められた。

その中で、幅広い感染力をもつ灰色かび病菌 (*Botrytis cinerea*) とヨウシュヤマゴボウカルス

との組み合わせの場合、強い抗菌性物質が誘導されることが明らかとなった。

図3から明らかなように、菌を植え付けた後7日頃から、新しいピークの出現が見られたが、単独培養では全くこれらに相当する化合物は誘導されなかった。カルス培養では生産が難しいテルペンの蓄積が確認できたことは、微生物と植物の両者が共存する場において、新たな代謝系が活性化され新規物質が誘導された可能性が示唆された。本化合物はカビ細胞壁由来の二次代謝産物活性化因子(エリシター)によりその前駆体であるトリテルペンが誘導され、それが配糖体化されて新たに生じたものと推定される。このトリテルペン配糖体は母植物であるヨウシュヤマゴボウ中では4糖からなる配糖体として存在する。ここでは感染によって誘導されるグリコシデーション酵素によってモノ配糖体化されて抗菌性物質に変換されたと推論される。

このように野外では感染成立が不可能であった病原菌を無菌カルスを用いた培養系では人工的に感染させることができる。いずれにしても植物の進化の過程で脱落していった遺伝子や発現が抑制されている遺伝子、さらに胚からの発生の極く限られた状況でのみ僅かに発現していた遺伝子を効率よく機能させ遺伝子産物を得て工業生産に向けるかが今後の課題である。