

新規酵母生育阻害物質の生産と分離・精製に関する研究

－酵母生育阻害物質の生産条件の検討－

食品工業部
江口 良寿
窓乃梅酒造株式会社
永原 辰哉

多くの酵母及びカビに対して生育阻害を引き起こす *Bacillus* 属細菌の生産する物質（酵母生育阻害物質；YGI）はポテトデキストロース培地で速やかに生産され、培養後24時間以降で64～80units/mlに達した。生産されたYGIは分子量5,000以下の熱に対して安定な物質であることがわかった。しかしながら、YGIの分離にはSephadex LH-20が有効なことがわかったが、有機溶媒のような極性のない溶媒での抽出ができないこと、及びイオン交換樹脂への吸着が認められなかったことから、その分離・精製は困難であると予測された。

1. はじめに

真菌（酵母やカビ類）の大多数はヒトや動物に対して無害であるが、一部の菌種は真菌症やアレルギーまたは毒素性中毒の原因菌として医学上重要視されている。真菌症の原因となる病原真菌は接合菌類、子囊菌類、担子菌類、不完全菌類のいずれかに分類されるが、臨床的には感染部位によって表在性真菌症と深在性真菌症に分けられている。表在性真菌症は表皮や毛髪、爪などに感染する真菌症であり、白癬菌によって引き起こされる代表的な表在性真菌症である。これらは感染力が強いものの、死に至るような重篤な感染症ではないためにこれまで大きな関心が払われてこなかった。皮膚糸状菌の分類学および疫学的研究は皮膚科領域でかなり詳しく行われており、有効な外用・内用抗真菌薬があるものの、完全に除菌するまで根気よく治療を続けなければならない。

一方、深在性真菌症は内臓真菌症ともいわれ、全身の臓器や組織が真菌で侵される感染症のことである。その多くは癌や骨髄・臓器移植に伴う処置によって、あるいはAIDSなど感染防御能の低下した患者を中心に多発している日和見感染症である。そのため、高度医療の普及と人口の高齢化に伴い今後ますます増えることが予測されている。この日和見感染型の深在性真菌症は临床上重要な問題となっており、高頻度に見られるカンジダ症、アスペルギルス症、クリプトコッカス症の他に、接合菌症やトリコスポロン症などによる真菌症が発生している¹⁾。

深在性真菌症に対する有効な抗真菌剤の種類は極めて少なく、現在わが国で認可されている深在性真菌症の治療薬はアムホテリシンB、フルシトシン、フルコナゾール、イトラコナゾール、ミコナゾールの5種類のみである。しかしながら、現在頻用されているアン

ホテリシンBあるいはフルコナゾールなどのアゾール系抗真菌剤は安全性や有効性の点で限界がある。また、耐性菌の出現によって真菌感染症の治療が将来一層困難になることが危惧されていることから、新たな抗真菌剤の開発が望まれている。

工業技術センターでは窓乃梅酒造株式会社と共同して酵母に対して生育阻害を引き起こす物質を生産する微生物の検索を行い、その分離に成功した。この分離した微生物は *Bacillus* 属に分類され、生産される抗真菌性物質は種々の酵母菌株やカビに対して生育阻害活性を有することから、深在性真菌症の治療薬として利用できるならばその有用性は大きいと考えられる。そこで、今年度は分離したYGI生産菌株の生産する酵母生育阻害物質（YGI）の生産及び精製条件について検討を行った。

2. 実験方法

2.1. 使用菌株及び培地

YGI生産菌は昨年度分離したNo.4株を用いた。

指示感受性菌として酵母菌株は窓乃梅酒造株式会社で製造した山廃酒母より分離した分離清酒酵母及びそのYGI耐性変異株を用いた。

液体培養はポテトデキストロース（PD）寒天培地を水に溶解後、No.5A濾紙にて寒天を除いて調製したPD液体培地及びYPD培地（1.0%酵母エキス、2.0%ペプトン、2.0%グルコース）、ブイヨン培地（0.3%肉エキス、0.5%ペプトン）、MY培地（0.3%酵母エキス、0.3%麦芽エキス、0.5%ペプトン、1.0%グルコース）、サブロー培地（1.0%ペプトン、4.0%グルコース）を用いた。また、固体培養はポテトデキストロース寒天培地をそのまま用いた。

2.2. YGI生産条件

液体培地10mlにYGI生産菌0.1mlをシードし、12、24、36、48、72時間30℃及び37℃で振とう培養後、遠心除菌してその上清をスポットテストしてYGIの生産を確認した。また、PD液体培地の濃度をそれぞれ2倍、1倍、1/2、1/4に調製し、YGI生産性の違いについて検討した。

ジャーファーマンター（5l容）での培養は1.6lのポテトデキストロース液体培地を調製・オートクレーブ殺菌し、これに同培地で1晩培養したYGI生産菌20mlを添加後、30℃、攪拌速度250rpm、通気量2.0l/分で36時間培養した。

2.3. YGIの抽出分離

YGI生産菌を36時間振とう培養後、遠心除菌し、これを分画分子量5,000及び10,000の限外ろ過膜で処理し、濾液及び残液の活性をスポットテストで確認した。また、遠心除菌した培養液にDEAE-セルロース及びCM-セルロースを添加後、30分間攪拌した後、その上清の残存活性をスポットテストで確認した。有機溶媒による抽出は酢酸エチル、酢酸イソアミル、ブタノール、イソアミルアルコール、シクロヘキサン、クロロホルムを用いた。培養上清と有機溶媒とを1:1に添加し、30分間攪拌後、有機溶媒層を回収した後、有機溶媒を除去し、これに生理食塩水を加えもとの容量に戻した後に、その活性を測定した。

2.4. YGIの熱安定性

培養上清をそれぞれ60℃、80℃、90℃に30分間保温し、室温に冷却後、残存活性をスポットテストにて測定した。

2.5. クロマトグラフィーによるYGIの分離

培養上清をロータリーエバポレータを用いて42℃、1hpで約100倍に濃縮した。この濃縮液1.0ml及び0.4mlを16mmφ×600mmのSephadex LH-20及びSephadex G-50、Sephadex G-25、Superdex 30 pgカラムクロマトグラフィーに供し、水を溶媒として分画した。分画フラクションは256nmの吸光度をモニターし、活性は各フラクションを20mlスポットし、その生育阻止斑の直径から活性の強弱を測定した。

3. 実験結果および考察

3.1. YGI生産培地

各種培地の培養上清のYGI活性を表1及び2に示した。YGIは培養後速やかに生産され、YGI活性はポテトデキストロース液体培地を用いたときが最も高く、培養後24時間以降で64units/mlに達した。*Bacillus*属のような細菌培養に用いられるブイヨン培地や栄養リッチなYPD培地やMY培地でYGI活性が低くなっていたが、YPD培地での生育阻止斑はPD液体培

地と比較して生育阻止斑の境界部分がより明瞭になっており、生産しているYGIの種類（成分）が異なることが示唆された。また、いずれの培地を用いた場合でも培養温度30℃と37℃ではMY培地を除いて同一であったが、30℃で培養した方が高い活性を示す傾向にあった。これは、YGIの生産と分解（不活化）が関与している可能性がある。

培養上清（30℃培養）を限外ろ過膜で処理したときの残存活性を表3に示した。PD液体培地及びMY培地、ブイヨン培地、サブロー培地ではいずれの分子量膜を用いても濾液と残液の活性に違いは認められず、活性成分は分子量5,000以下の物質であることがわかったが、YPD培地では濾液にYGI活性は認められず、YPD培地で生産される活性成分は分子量10,000以上であることがわかった。生育阻止斑の周辺部の様子及び限外ろ過膜処理の結果から、YPD培地で生

表1 各種培地によるYGI活性（30℃培養）

培地 \ 培養時間	12	24	36	48	72
PD	32	64	64	64	64
MY	4	8	16	16	16
YPD	2	4	8	8	8
ブイヨン	1	2	2	2	2
サブロー	2	4	4	4	4

PD：ポテトデキストロース液体培地

表2 各種培地によるYGI活性（37℃培養）

培地 \ 培養時間	12	24	36	48	72
PD	64	64	64	64	64
MY	4	4	2	2	1
YPD	2	4	8	8	4
ブイヨン	1	2	2	2	1
サブロー	2	4	4	4	2

PD：ポテトデキストロース液体培地

表3 限外ろ過処理におけるYGI活性の変化

培地 \ 処理	5,000		10,000	
	濾液	残液	濾液	残液
PD	80	80	80	80
MY	8	8	8	8
YPD	0	4	0	4
ブイヨン	2	2	2	2
サブロー	4	4	4	4

PD：ポテトデキストロース液体培地

処理原液のYGI活性：PD: 80 units/ml, MY: 8 units/ml, YPD: 4 units/ml, ブイヨン: 4 units/ml, サブロー: 4 units/ml

産される活性成分が YGI とは異なる物質であることが示唆されたことから、YGI 耐性菌を指示菌としてスポットテストを行った。その結果、YPD 培地及び MY 培地では生育阻止斑が認められたものの、PD 液体培地及びブイヨン培地、サブロー培地では生育阻止斑が認めなかったことから、YPD 培地で生産される活性成分は YGI ではないことがわかった。そのため、YGI 生産菌は培地成分により異なる抗真菌性活性成分を生産することが示唆された。Bacillus 属細菌の中にはペプチド系の抗真菌性物質である Iturin A などイットリン系抗真菌性物質を生産する菌種が多数報告されており^{2,3)}、構成するアミノ酸の組成や結合順、アルキル基の種類によって抗菌スペクトルに違いがある。そのため、YGI もその中の 1 種である可能

表 4 培地濃度における YGI 活性の変化

PD 培地濃度	YGI 活性
2 倍	80
1 倍	80
1/2 倍	80
1/4 倍	40

培養時間：36時間

表 5 有機溶媒抽出における YGI 活性の変化

有機溶媒	残存活性	
	溶媒層	水 層
酢酸エチル	0	80
酢酸イソアミル	0	80
1-ブタノール	10	80
イソアミルアルコール	2	80
シクロヘキサン	0	60
クロロホルム	0	60

ポテトデキストロース液体培地：80 units/ml

表 6 イオン交換体処理における YGI 活性の変化

イオン交換体	残存活性	
	処理前	処理後
DEAE-セルロース	80	80
CNM-セルロース	80	80

表 7 加熱処理における YGI 活性の変化

処理温度 (°C)	残存活性		
	処理前	15分処理	30分処理
60	80	80	80
80	80	80	80
90	80	80	80

性も否定できない。培養上清中より活性成分を分離抽出する場合には含有する成分が少なく、活性は高い方が有利となるため、PD 液体培地を用いることが好ましいことがわかった。また、PD 液体培地の濃度を変化させた場合は 1/2 以上では活性に影響がなかったものの、1/4 では YGI 活性が約 1/2 となった（表 4）ことから、培地濃度は 1/2 が適していると考えられた。

3.2. YGI の有機溶媒による抽出

培養上清を有機溶媒で処理したときの残存活性を表 5 に示した。活性成分はわずかに 1-ブタノールとイソアミルアルコールで抽出されているものの、いずれの有機溶媒を用いても YGI 活性の大部分は水層側にあることから YGI は極性が高く、有機溶媒によって抽出されないことがわかった。また、これらの有機溶媒処理によって水層側の YGI 活性には変化がなく、YGI は有機溶媒によって失活することがないことがわかった。

3.3. YGI のイオン交換体への吸着

培養上清を DEAE-セルロース及び CM-セルロースで処理したときの残存活性を表 6 に示した。陰イオン交換体の DEAE-セルロース及び陽イオン交換体の CM-セルロースのいずれで処理しても、処理液の YGI 活性に変化はなく、YGI が電氣的に中性であることが示唆された。そのため、YGI の分離・精製にはイオン交換クロマトグラフィーが利用できないことがわかった。

3.4. YGI の熱安定性

培養上清を熱処理したときの残存活性を表 7 に示した。いずれの処理温度においても YGI 活性の低下は認められず、YGI は熱に対して安定であることが示唆された。そのため、YGI の精製の際の試料調製における濃縮にはロータリーエバポレータを用いても、活性が低下することはないと考えられた。

3.5. クロマトグラフィーによる YGI の分離

Sephadex G-50 及び Sephadex G-25 では分離が不十分であり、ブロードな溶出パターンを示した。また、活性成分の溶出も同様であり、これらのゲルは YGI の分離・精製には使用できないと判断された。一方、Sephadex LH-20 及び Superdex 30 pg では活性成分と夾雑成分とが分画されて、いくつかのピークが存在した（図 1 及び 2）。しかしながら、Superdex 30 pg では試料をロードできる量が Sephadex LH-20 よりも少なかったこと及び活性溶出位置付近の分離能が低いことから、Sephadex LH-20 の方が適していると判断された。しかしながら、YGI 活性成分は有機溶媒等により抽出されないこと、及びイオン交換体吸着分離が

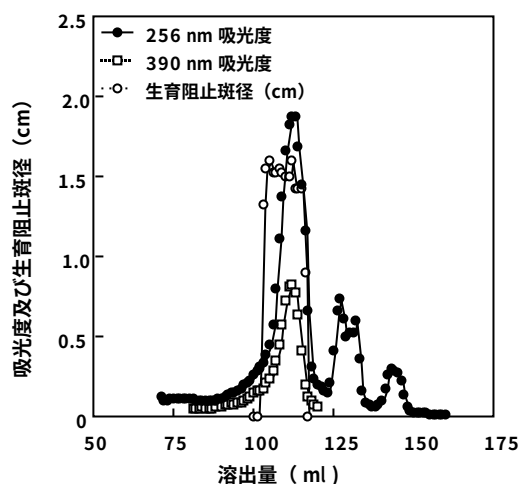


図1 Superdex 30 pgカラムクロマトグラフィーによる培養液の溶出パターン

カラムサイズ：16mmφ×600mm，溶出溶媒：H₂O
サンプル量：培養上清100倍濃縮液0.4ml

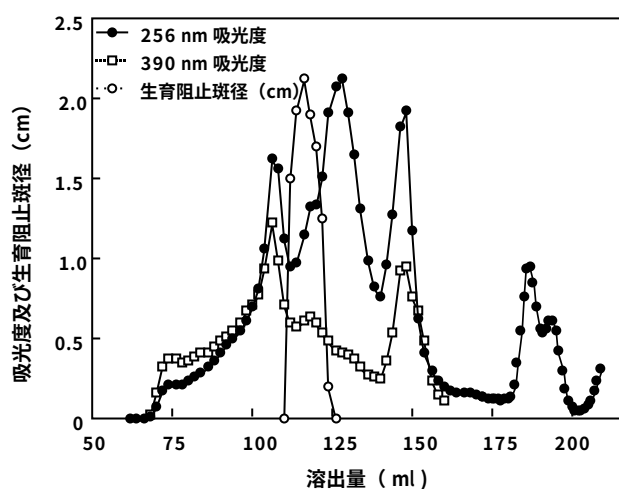


図2 Sephadex LH-20カラムクロマトグラフィーによる培養液の溶出パターン

カラムサイズ：16mmφ×600mm，溶出溶媒：H₂O
サンプル量：培養上清100倍濃縮液1.0ml

できないことから，培養液中の夾雑成分を除去する有効な手段を検討する必要があると考えられた。

4. おわりに

YGI 生産菌の生産する抗真菌性物質は栄養リッチな培地よりもポテトデキストロース培地で最もよく生産され，培養24時間以降で最高の64～80 units/ml に達することがわかった。また，YGIは有機溶媒のような無極性溶媒には溶解しない分子量5,000以下の比較的 low molecular weight であり，熱に対して安定であることがわかった。さらに，YGI の分離にはSephadex LH-20 によるゲルろ過が有効であることがわかった。しかしながら，有機溶媒等による抽出やイオン交換体による分離ができないことから，培養液中の夾雑成分を除去する必要がある，現在のところ，YGI活性成分の分離・精製は困難である。そのため，培養液中の夾雑

成分を除去する有効な手段の開発及び YGI生産菌の改良によるYGI生産性の向上がYGIの精製には不可欠になるものと考えられる。

参考文献

- 1) 新見昌一, 上原至雅 "輸入真菌症ならびに深在性真菌症(真菌症研究班の活動)" IASR Vol.23 No.3, 57 (2002)
- 2) ISOGAI, A, TAKAYAMA, S, MURAKOSHI, S, SUZUKI, A. "STRUCTURES OF BETA-AMINO ACIDS IN ANTIBIOTICS ITURIN-A." Tetrahedron Lett. **23**, 3065 (1982)
- 3) A.-L. Moyne, R. Shelby, T. E. Cleveland and S. Tuzun "Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*" Journal of Applied Microbiology **90**, 622-629(2001)