

短 報

糸状菌が生産するイタコン酸の細菌生育抑制効果

横前滉太¹⁾, 川尻康平¹⁾, 柿崎徹也²⁾, 浜田勇和²⁾, 陳雨²⁾, 金政 真¹⁾¹⁾中部大学応用生物学部環境生物科学科, ²⁾中部大学大学院応用生物学研究科

要 旨

イタコン酸は工業原料として広く利用されている重要な有機酸であり, その製造には糸状菌(カビ)の一種である *Aspergillus terreus* が用いられている. 微生物におけるイタコン酸の機能は不明であるが, イタコン酸は一部の代謝酵素の活性を阻害することから, 周囲の微生物の生育を阻害して自身の生存を有利にする役割があると考えられる. 本菌は酸性条件で培養した場合に旺盛にイタコン酸を生産分泌するが, pH がイタコン酸の細菌生育抑制効果に与える影響は報告されていない. 本研究ではイタコン酸を添加した培地で複数の pH 条件で培養し, 細菌の生育を測定した. その結果, イタコン酸は低 pH 条件において細菌の生育を強く抑制することが分かった.

1. はじめに

イタコン酸(メチレンコハク酸)はその化学構造から, 合成樹脂や接着剤, コート紙, 印刷インキなど工業製品の原料として幅広く利用されている有機酸である(図1). 数種の糸状菌や酵母がイタコン酸を生産することが知られているが, 工業的には生産速度の観点からもっぱら糸状菌 *Aspergillus terreus* が使用されている(Kinoshita, 1932, Okabe *et al.*, 1993). これまで我々は本菌のイタコン酸生合成経路やその制御について研究してきた. イタコン酸は, クエン酸回路にて生成するシス・アコニッ酸から, シス・アコニッ酸デカルボキシラーゼ(CAD)により合成されることを本酵素の遺伝子の解析により明らかにした(Dwiarthi *et al.*, 2002, Kanamasa, *et al.*, 2008). 本菌を用いたイタコン酸生産については2011年発行の本紀要にて解説した(金政, 2011). また, 液体培養と固体培養の両方の利点を有する膜面液体培養法による効率的なイタコン酸生産法の開発についても本紀要にて報告した(小田ら, 2017). さらに, 清酒などの醸造に用いられてきたことから安全性の懸念がなく, 二次代謝物質の生産分泌能にも優れている麹菌 *Aspergillus oryzae* に CAD の遺伝子を導入してイタコン酸を生産させることに成功し, 本紀要にて報告した(山田ら, 2018).

イタコン酸は米国エネルギー省によって, バイオマス

からの生産が期待される基幹化合物のひとつとして公表されたこともあり, 生産効率化や低コスト原料からの生産に関する研究が世界的に盛んである. 一方, 微生物におけるイタコン酸の生物学的意義は未だに不明である. イタコン酸はグリオキシル酸回路のイソクエン酸リアーゼなどの代謝酵素の活性を阻害することが報告されている(McFadden *et al.*, 1977, 総説 Cordes *et al.*, 2015). このことから, イタコン酸は周囲の微生物の生育を阻害して自身の生存を有利にするために生産分泌されることが考えられるが系統だった研究は行われていない. また, 本菌は酸性条件で培養した場合に旺盛にイタコン酸を生産分泌するが, pH がイタコン酸の細菌生育抑制効果に与える影響は報告されていない. そこで, 本研究では細菌をイタコン酸存在下で複数の pH 条件で培養し, pH がイタコン酸の細菌生育抑制効果に与える影響を評価することを目指した.

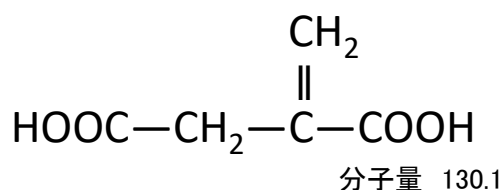


図1. イタコン酸の構造

2. 材料と方法

2. 1. 菌株および培地

イタコン酸生産糸状菌は *A. terreus* IFO6365 株を使用した。イタコン酸の生産性評価には Potato dextrose (PD) 培地に 4%(w/v)グルコース, 0.1%(w/v)酵母エキス, 0.1%(w/v)ハイポリペプトンを含み, pH2 または pH6.5 に調整した改変 PD 液体培地を用いた。本研究で用いる細菌は, (独法)製品評価技術基盤機構から枯草菌 *Bacillus subtilis* NBRC12210 株を入手した。枯草菌は富栄養培地である NB 培地にイタコン酸を添加し, pH4 から pH8 に調整した液体培地にて本培養した。本菌のイタコン酸生産能が 40~60g/L であることを考慮し, NB 培地に添加するイタコン酸の終濃度は最大 3%(w/v)とした。何れの培養においても初発 pH を調整し, 培養中の pH 調整は行わなかった。

2. 2. 分析方法

A. terreus によるイタコン酸生産のために次のように培養した。前述の改変 PD 培地 (pH6) にて前培養し, 菌体を回収して一定の湿重量の菌体を本培養用の組成の改変 PD 培地 (pH2 および pH6) にて本培養し, 培養液をサンプリングした。イタコン酸濃度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した (Okabe, et al., 1993)。

枯草菌の生育評価は次のように行った。平板培地のコロニーを前培養のための NB 培地に植えて一晚培養し, 細胞数を統一して本培養用の組成の NB 培地に植菌した。37°C, 140 spm の条件で振とう培養し, 1 時間ごとに菌体濃度を測定した。菌体濃度は, 培養液の濁度を波長 660 nm の吸光度を測定することにより評価した。

3. 結果と考察

3. 1. 培養 pH が *A. terreus* のイタコン生産に与える影響

A. terreus のイタコン酸生産性は培養 pH の影響を受けることが分かっており, 最適 pH は pH2 付近である。およそ pH4 よりも高い pH 条件では生産性が

低下する。本菌の生育最適 pH が pH6 付近であることを考慮すると注目すべきことである。本研究でイタコン酸と pH の関係が細菌の生育に与える影響を調べるにあたり, 培養 pH が本菌のイタコン酸生産性に与える影響をあらためて評価した。その結果, 培養 pH2 では最大 0.35 mg/mL に達したのに対し, 培養 pH6.5 では最大でも 0.14mg/mL, すなわち pH2 条件の約 40%であった (図 2)。このことから, イタコン酸は pH2 のような低 pH 条件で何らかの機能を発揮すると考えられた。

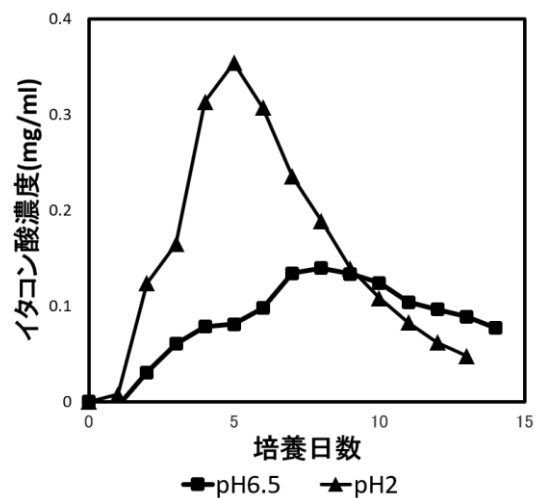
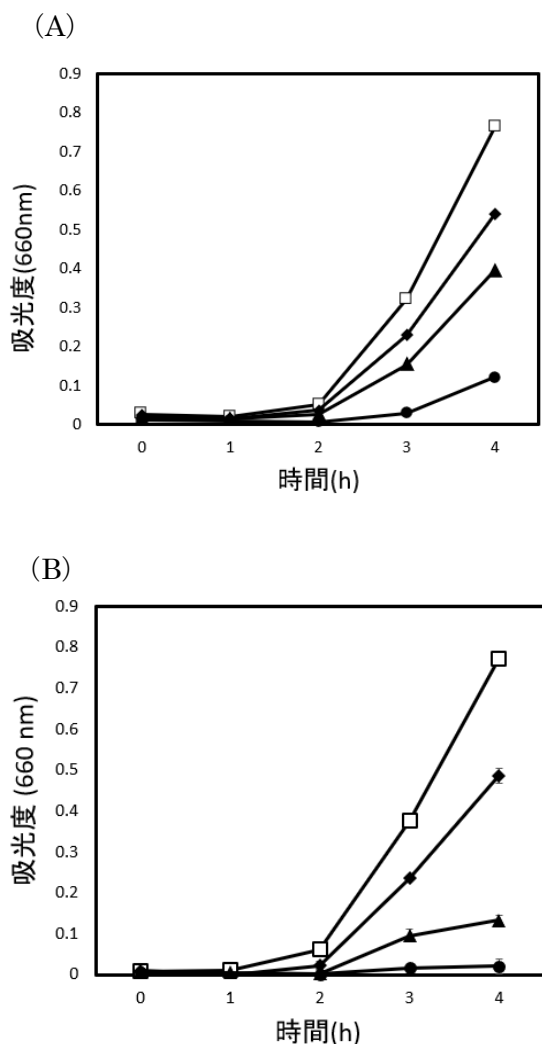


図2. 培養 pH がイタコン酸生産に与える影響

3. 2. イタコン酸の細菌生育抑制効果と pH の影響

イタコン酸が細菌の生育に与える影響を pH 毎に調べた。本研究では, 物質の安全性評価試験で一般的に用いられるグラム陽性細菌である枯草菌をモデル細菌として用いた。枯草菌は我が国では身近な環境の土壌に広く生息し, 糸引納豆の生産に用いられる納豆菌も枯草菌に含まれる。培養 pH はアルカリ性を好む細菌である。本研究では, pH4~pH8 の富栄養培地に終濃度 0%~3%(w/v)のイタコン酸を添加し, これらの培地にて枯草菌を培養して生育を測定した。その結果, pH4 ではイタコン酸の有無に関わらず生育が見られなかった (データは示さず)。pH5~pH8 のイタコン酸を添加しない条件では生育が確認された。これらの pH 条件では, イタコン酸濃度を高くするにつれて生育が抑制された。また, 同じイタコン酸濃

度でも生育抑制効果はpHが低くなるほど顕著であった。これらの結果を図3に示す。尚、イタコン酸の添加により溶質の濃度が増加して浸透圧による生育抑制が起こる可能性が考えられるが、本論文では代謝阻害等による影響とあわせて細菌生育抑制と評価した。これらの結果より、イタコン酸は枯草菌に対し生育抑制効果を有し、すなわち *A. terreus* によるイタコン酸生産分泌が旺盛になる低pH域で特に抑制効果が大きいことが分かった。また、当研究室の研究により、グラム陰性細菌である大腸菌においても同様の生育抑制効果が認められた(データは示さず)。以上の結果から、イタコン酸の細菌生育抑制効果(静菌作用)は広いスペクトルを有し、糸状菌において細菌に対する生体防御物質として重要な役割を担っている可能性があると考えられた。



(C)

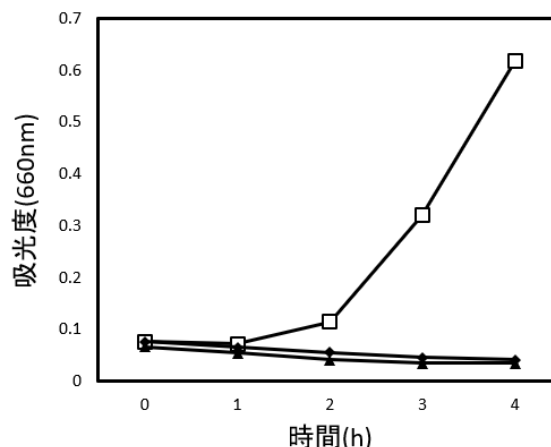


図3. イタコン酸が枯草菌の増殖に与える影響

それぞれ枯草菌をイタコン酸存在下で (A) pH8, (B) pH6, (C) pH5 にて培養した試料の吸光度を測定した。イタコン酸は終濃度 0%(□), 1%(◆), 2%(▲), 3%(●)となるように培地に添加した。

引用文献

- Cordes T, Michelucci A, Hiller K. (2015) Itaconic acid: the surprising role of an industrial compound as a mammalian antimicrobial metabolite. *Annu. Rev. Nutr.* 35, 451-73.
- Dwiarti L, Yamane K, Yamatani H, Kahar P, Okabe M. (2002) Purification and characterization of *cis*-aconitic acid decarboxylase from *Aspergillus terreus* TN484-M1. *J. Biosci. Bioeng.* 94, 29-33.
- Kanamasa S, Dwiarti L, Okabe M, Park EY. (2008) Cloning and functional characterization of the *cis*-aconitic acid decarboxylase (CAD) gene from *Aspergillus terreus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 223-229.
- Kinoshita K. (1932) Über die produktion von itaconsäure und mannit durch einen neuen schimmelpilz *Aspergillus itaenicus*. *Acta Phytochim.* 5, 271-287.

McFadden BA and Purohit S. (1977) Itaconate, an isocitrate lyase-directed inhibitor in *Pseudomonas indigofera*. *J. Bacteriol.* 131, 136–144.

Okabe M, Ohta N, Park Y. (1993) Itaconic acid production in an air-lift bioreactor using a modified draft tube. *J. Ferment. Bioeng.* 76, 117–122.

小田美穂, 小栗 萌, 金政 真 (2017) 糸状菌の膜面液体培養法による高効率イタコン酸生産法の研究. 中部大学生物機能開発研究所紀要 17, 90-93.

金政 真 (2011) 糸状菌を用いたイタコン酸の生産. 中部大学生物機能開発研究所紀要 11, 38-42.

山田智士, 倉地裕子, 金政 真 (2018) 組換え麹菌 *Aspergillus oryzae* によるイタコン酸生産. 中部大学生物機能開発研究所紀要 18, 79-82.

Title : Antibacterial effect of itaconic acid produced by filamentous fungi

Authors : Kota Yokomae, Kohei Kawajiri, Tetsuya Kakizaki, Hayato Hamada, Yu Chen, Shin Kanamasa

Address : Department of Environmental Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University

Keywords : *Aspergillus terreus*, itaconic acid, antibacterial effect