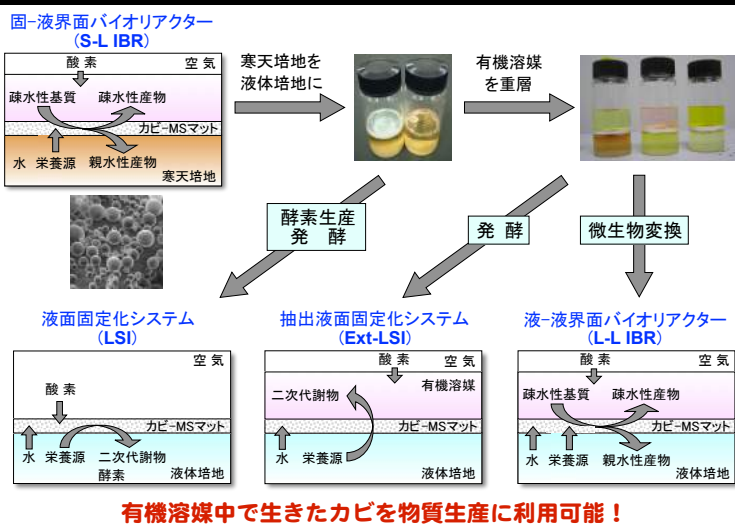


近年、多くの抗菌剤に抵抗性を示す(超)多剤耐性菌が地球規模で拡大してきているが、新薬の開発は世界的に停滞している。その原因として、「新薬の開発と利益とのバランス(費用対効果)」の問題以外に、「もはや新規な分子構造を有した新規物質は発見できない」という諦めムードがある。

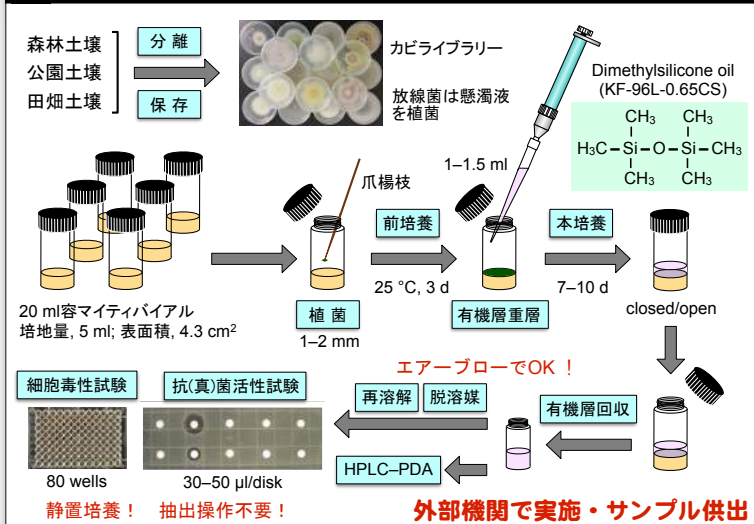
これに対して我々は、有機溶媒/水(液/液)、有機溶媒/寒天ゲル(液/固)界面における抗生物質生産菌の新規な**界面スクリーニングシステム(IFS)**を開発した。このIFSの長所としては、静置培養でOK、抽出・脱溶媒操作不要(ハイスループット)、高生産性(高感度)、液体培養法とは異なる二次代謝物プロファイル(新規物質発見の可能性)がある。すなわち、これまでの液体培養法ではできなかった抗生物質が見出される可能性が高い。当研究室における探索研究以外にも、学外へのサンプル供出や学外研究機関で実施がなされている。

なお当研究室では、医工連携(天然物創薬)プロジェクトメンバーとして1~3年生の希望者を各学年とも若干名受け入れており、菌株スクリーニングやバイオアッセイ、バイオプロセスの開発等の最先端の研究に教育的に取り組ませている。

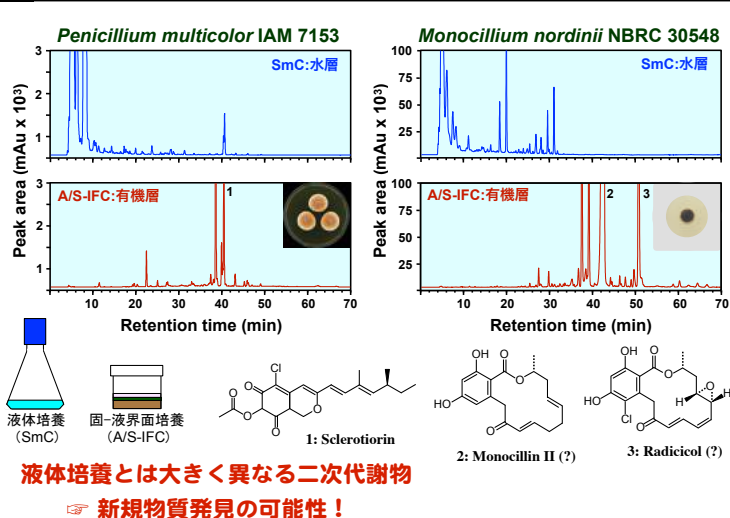
界面バイオプロセス群 (LSI, Ext-LSI, L-L IBR) の登場



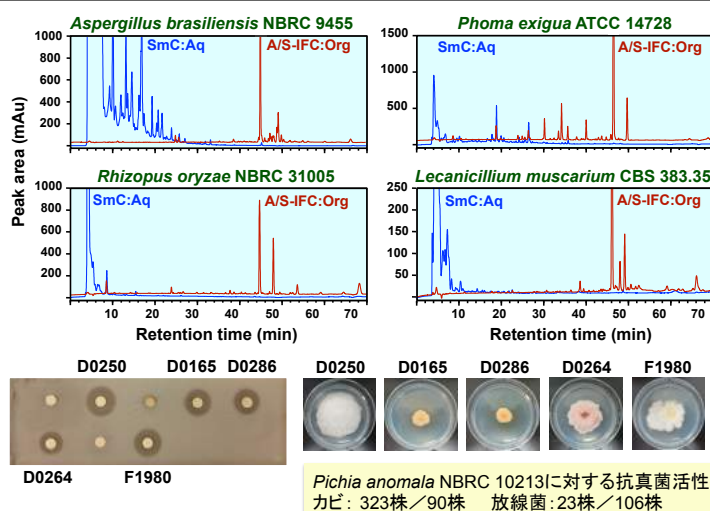
固/液界面スクリーニング法のプロトコル



固/液界面における特異な代謝物プロファイル



固/液界面における特異な代謝物プロファイル (2)



【関連文献】

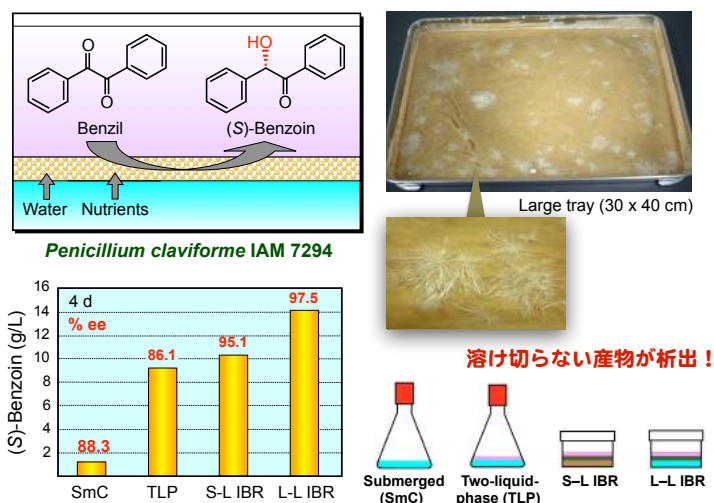
1. 小田 忍, 日本菌学会会報, **53**, 47-57 (2012).
2. Oda S, Kameda A, Okanan M, Sakakibara Y, Ohashi S, J. Antibiot., **68**, 691-697 (2015).
3. 小田 忍, 化学経済, **2016(4)**, 72-77 (2016).
4. Oda S, Nomura S, Nakagawa M, Shin-ya K, Kagaya N, Kawahara T, Biocontrol Sci., **24**, 47-56 (2019).

微生物のもつ1つあるいは少数の酵素を用いて安価な化合物から高価な精密化学品を合成する微生物変換法は、特に医薬中間体等の精密化学品の調製に威力を発揮する。しかし多くの場合、基質の水不溶性と微生物毒性が大きな障壁となる。

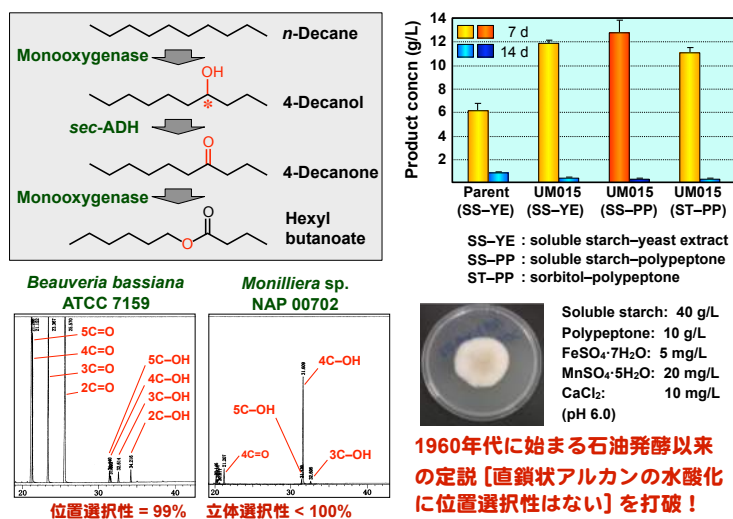
これらの障壁を一挙に克服し得るシステムとして誕生した**界面バイオリクター (IBR)**は、圧倒的に高い基質／生成物濃度、位置・立体選択性、低い産物回収コスト、広い汎用性等の長所を有している。

当研究室では、医薬中間体や高級香料原料等の精密化学品の合成への本システムの適用を図っている。さらに、実生産プロセス構築のためのプロトタイプとなる高層型バイオリクターの構築や、細菌、酵母、放線菌にも適用可能な**IBR_{tac}**の構築にも取り組んでいる。

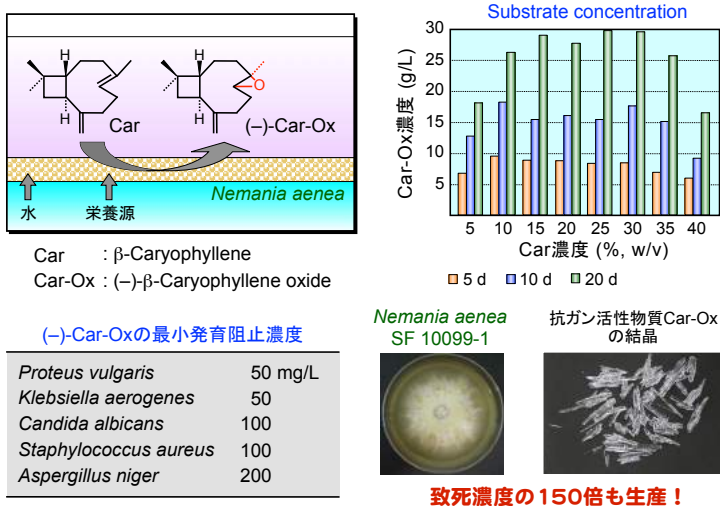
有機溶媒／水界面 (L-L IBR) における不斉還元反応



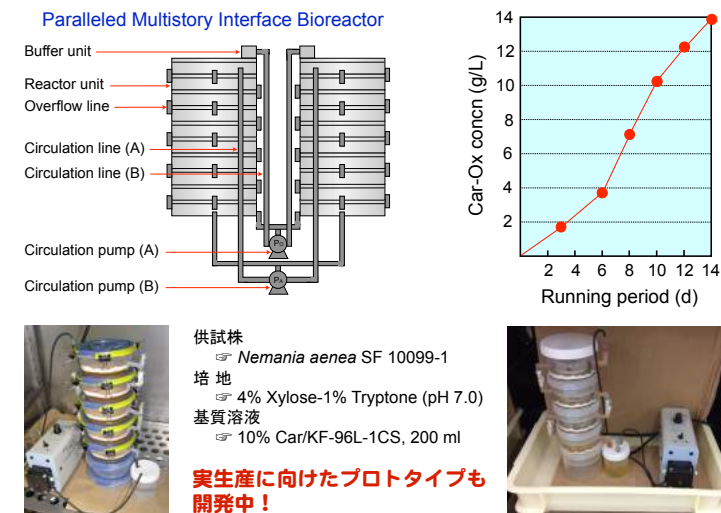
有機溶媒／水界面 (L-L IBR) における立体選択的水酸化反応



有機溶媒／水界面 (L-L IBR) におけるエポキシ化反応 (1)



多段高層型界面バイオリクターの構築



【関連文献】

- Oda S, Isshiki K, Process Biochem., **42**, 1553–1560 (2007).
- Oda S, Isshiki K, Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 1364–1367 (2008).
- Oda S, Isshiki K, Ohashi S, Bull. Chem. Soc. Jpn., **82**, 105–109 (2009).
- 小田 忍, バイオサイエンスとインダストリー, **70**, 124–127 (2010).
- 小田 忍, 化学工業, **2010**, 409–416 (2010).
- Oda S, Wakui H, Ohashi S, J. Biosci. Biochem., **112**, 151–153 (2011).
- Oda S, Fujinuma K, Inoue A, Ohashi S, J. Biosci. Biochem., **112**, 561–565 (2011).
- Oda S, Sakamoto N, Horibe H, Kono A, Ohashi S, Process Biochem., **47**, 2494–2499 (2012).
- Oda S, Sakamoto N, Horibe H, Kono A, Ohashi, J. Biosci. Biochem., **115**, 544–546 (2013).
- Oda S, Ferment. Technol., **4**, 1000e122 (2015).
- Oda S, J. Oleo Sci., **66**, 815–831 (2017).
- Oda S, Nakanishi M, Ishikawa A, Baba T, Process Biochem., **80**, 1–8 (2019).

カビは様々な二次代謝物(医薬品原料・香料原料・化粧品原料)を発酵生産することができるが、液体培養では形態制御やカタボライト抑制の発現等の深刻な問題が生じる。また、疎水性の二次代謝物の生産は、親水性／疎水性の非溶解性から非常に困難である。

これに対し当研究室で開発した**抽出液面固定化システム(Ext-LSI)**では、カビは常時疎水性の有機溶媒に接しているために生産される疎水性二次代謝物は*in situ*に菌体中から抽出されることになるため、生成物阻害やフィードバック阻害が生じない。そのために、カビが生合成する疎水性二次代謝物は有機溶媒中に著量蓄積してくる。さらには、放線菌にも適用可能な新規システム(**Ext-LSI_{tac}**)の構築にも成功した。

Ext-LSI並びにExt-LSI_{tac}を用いることにより、高級香料原料、医薬候補物質(抗菌、抗真菌、抗ガン、抗アルツハイマー、抗肥満、抗高脂血症、免疫抑制、抗炎症活性物質等)の超高濃度生産プロセスの開発に取り組んでいる。

有機溶媒／水界面(Ext-LSI)における抗カビ物質の生産

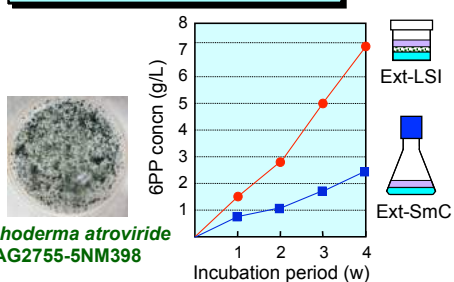
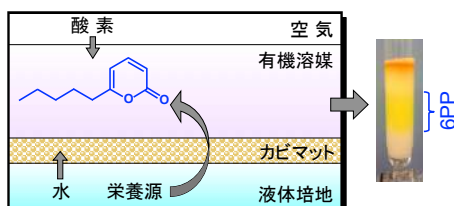
6PP: 6-pentyl- α -pyrone

6PPの最小発育阻止濃度

<i>Trichoderma harzianum</i>	100 mg/L
<i>Botrytis cinerea</i>	200–500 mg/L
<i>Sclerotinia</i> sp.	250 mg/L

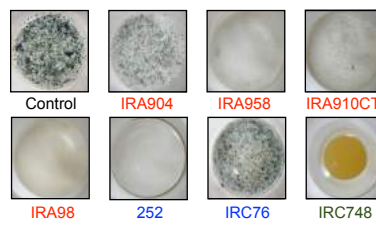
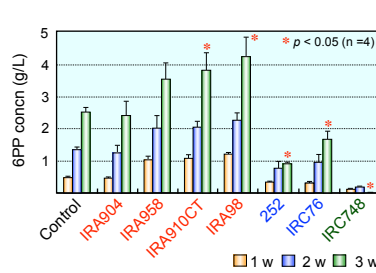
6PPの微生物生産の実績

<i>Trichoderma harzianum</i>	173 mg/L
<i>Trichoderma viride</i>	248 mg/L
<i>Trichoderma harzianum</i>	474 mg/L
<i>Trichoderma</i> sp.	455 mg/L

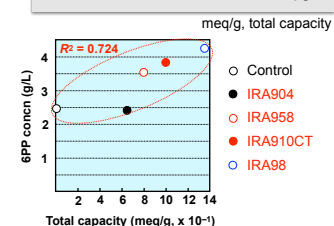


世界記録の15倍の蓄積濃度を達成!

二次代謝に対する有機溶媒／水界面の荷電状態の影響



Anion-exchange resin	
IRA98 (strongest)	≥ 1.35 meq/g
IRA910CT (strong)	≥ 1.00 meq/g
IRA958 (middle)	≥ 0.80 meq/g
IRA904 (weak)	≥ 0.65 meq/g
Cation-exchange resin	
IRC76 (strong)	≥ 3.90 meq/g
252 (weak)	≥ 1.80 meq/g
Chelating resin	
IRA748	≥ 1.35 meq/g



有機溶媒／水界面における *Monascus* 色素の選択的生産

抗アルツハイマー

免疫抑制

抗肥満

抗炎症

抗高脂血症

抗ガン

抗高血圧

Monascin

Ankaflavin

Glucose

Peptide

Monascorubrin

Monascorubramine

Monascus purpureus B-3-1-1

生物活性黄色色素を優先的高生産!

(琉球大・橋研より分譲)

液面固定化放線菌による抗生物質の生産

LSI_{tac}: Tacky liquid-liquid interface bioreactor

Natamycin

Erythromycin

Glucose 20.0 g
NH₄Cl 2.0
Asparagine 0.5
KH₂PO₄ 0.05
H₂O 1.0 L
(pH) (7.0)

Microsphere: Advantcell HB-2051
Binder micro-piece: Sunrose SLD-FM (<25 μ m)

放線菌もOK!

【関連文献】

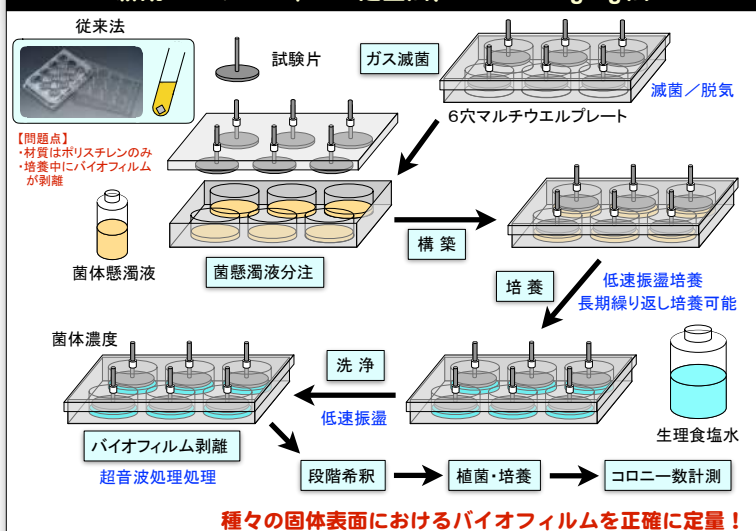
- Oda S, Isshiki K, Ohashi S, Process Biochem., **44**, 625–630 (2009).
- Oda S, Araki H, Ohashi S, J. Biosci. Biochem., **113**, 742–745 (2012).
- Oda S, Michihata S, Sakamoto N, Horibe H, Kono A, Ohashi S, J. Biosci. Bioeng., **114**, 596–599 (2012).

固体表面へ付着した微生物が形成するバイオフィルムは、単なる水回りの“ぬめり”の問題ではなく、(超)多剤耐性菌症やインプラント感染症等の医療関連分野、水処理や家電関連分野において極めて深刻な問題となっている。バイオフィルム菌体は自身を厚い親水性バリアで覆っているために、各種薬剤や免疫系に対する抵抗性が非常に強く、その駆除は一般に困難である。

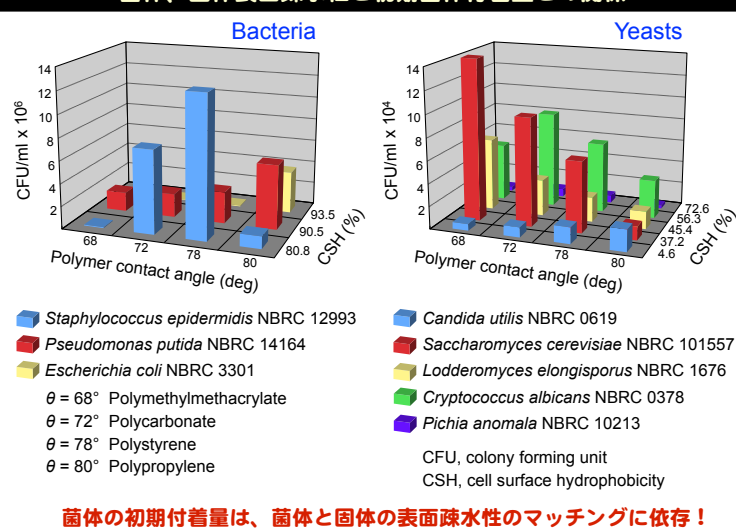
当研究室では、新規なバイオフィルム駆除技術の開発を目指す研究・開発を推進しているが、その前提となるバイオフィルム並びにバイオフィルム破壊量の新規なバイオアッセイ法を開発中である。前者については **Plate-hanging法** というアッセイ系を構築し、その有効性を確認している。後者についても完成間近な段階にある。**バイオフィルム駆除技術** についても検討を続行中である。

さらに、塗板等の固体表面の防カビ・防藻性能を正確かつ簡便に定量可能なバイオアッセイ法として、菌糸侵入距離測定法並びに逆拡散ペーパーディスク法を開発し、塗料会社と共同で特許化した。これらアッセイ系については、受託研究の実施も可能である。

新規なバイオフィルム定量法、Plate-hanging法

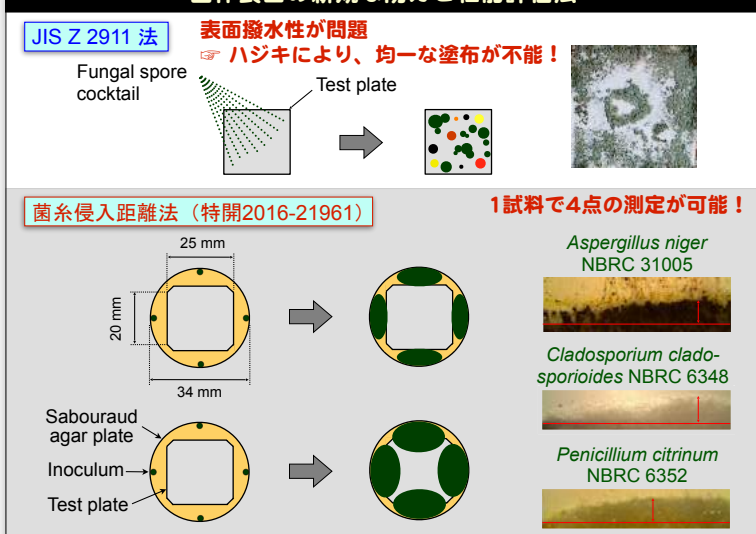


菌体、固体表面疎水性と初期菌体付着量との関係

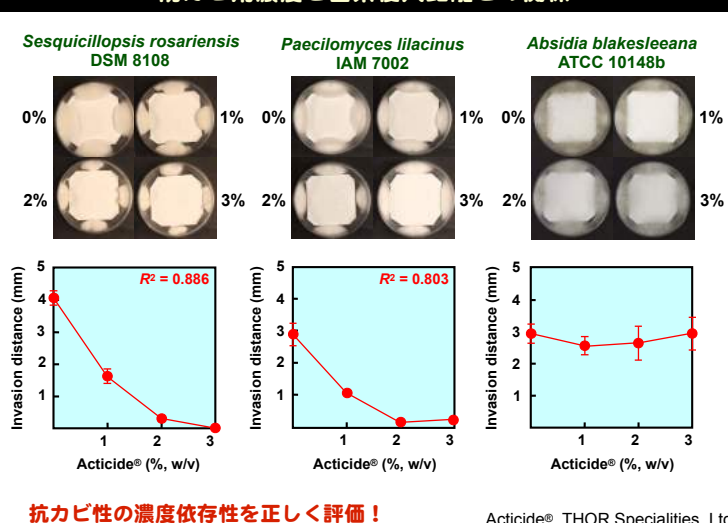


菌体の初期付着量は、菌体と固体の表面疎水性のマッチングに依存!

固体表面の新規な防カビ性能評価法



防カビ剤濃度と菌糸侵入距離との関係



抗カビ性の濃度依存性を正しく評価!

Acticide®, THOR Specialties, Ltd.

【関連文献】

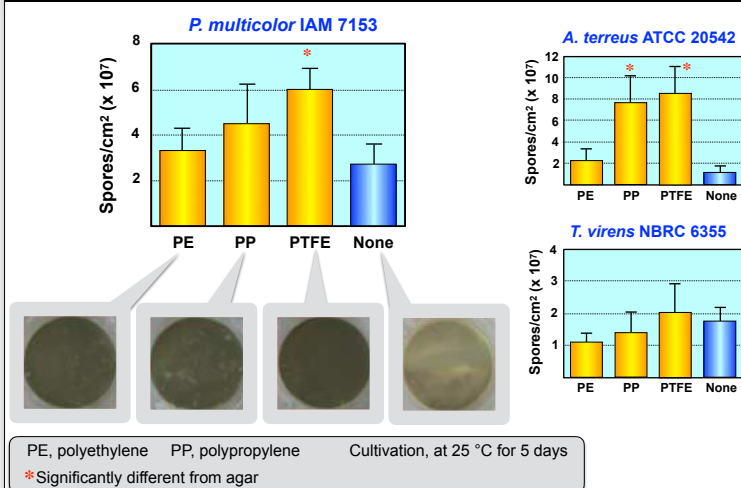
- 小田 忍, 水谷 勉, 今井俊夫, 特許6411803(2018/10/05).
- 小田 忍, 水谷 勉, 今井俊夫, 特許6411804(2018/10/05).

カビの胞子は発酵や微生物変換におけるシードとして、さらには微生物農薬としての用途があるため、その効率的な量産技術の開発は工業的に重要である。当研究室においては、カビの増殖場に疎水性樹脂を存在させることにより、カビの胞子生産が大幅に向上する現象を発見した。現在、この**カビ胞子量産システム**のプロトコル化のための研究を推進している。

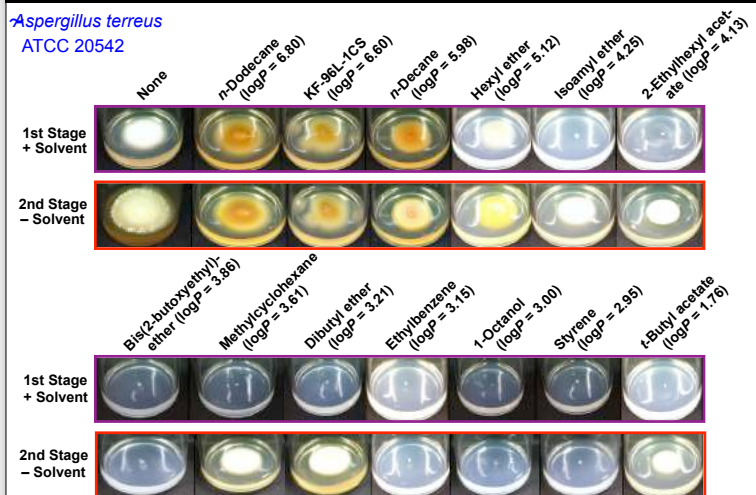
一方、カビの胞子は高いストレス耐性を有していることが知られているが、その菌糸や細菌、酵母等の他の微生物では生存不能な有機溶媒中でもカビの胞子が死滅しない現象を発見した。さらに、カビの胞子は決して休眠状態にあるのではなく、栄養細胞が有している多数の酵素をフル装備している活性型の細胞でもある。

当研究室においては、このような活性型細胞である**カビ胞子を生体触媒とした、全く新規な非水系バイオプロセス**の構築に取り組んでいる。カビや細菌、酵母等の栄養細胞が死滅してしまうような中極性有機溶媒（水にも疎水性有機溶媒にも難溶な基質を高濃度で溶解可能）を反応溶媒とし得るバイオプロセスを用いて、各種ステロイド系医薬中間体の超高濃度生産プロセスの開発に取り組んでいる。

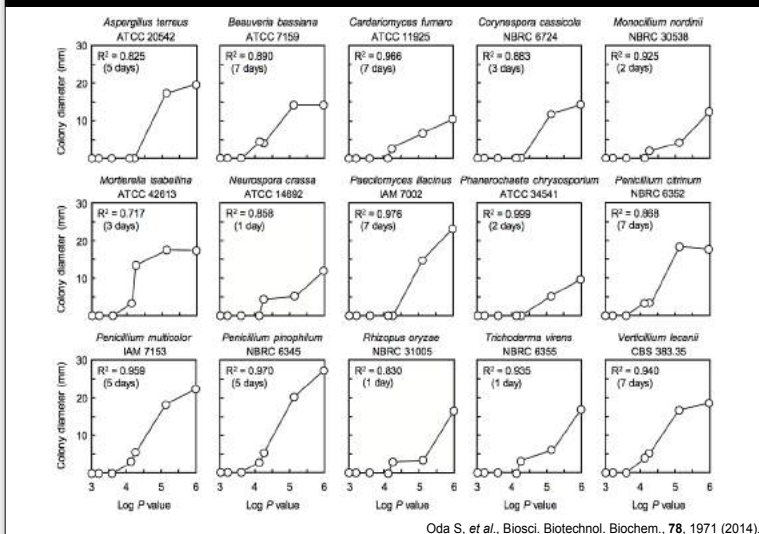
胞子生産に対する疎水性樹脂ネットの影響（寒天平板培養）



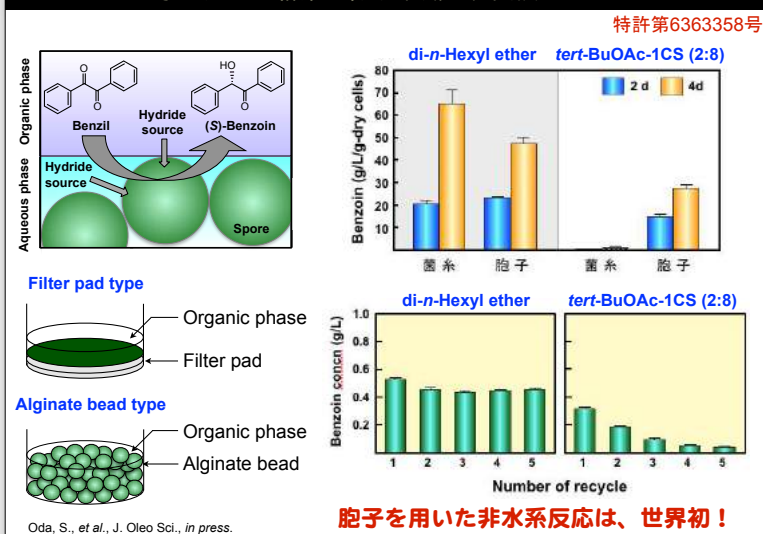
固／液界面におけるカビ胞子の有機溶媒耐性 (1)



固／液界面におけるカビ胞子の有機溶媒耐性 (2)



胞子を用いた新規な非水系微生物変換システム



【関連文献】

- Oda S, Sugitani, A, Ohashi S, Biosci. Biotechnol. Biochem., **78**, 1971–1974 (2014).
- Oda S, Hayashi Y, Kido R, J. Oleo Sci., **67**, 1123–1129 (2018).
- Oda S, Kido R, Fungal Biol., **123**, 103–108 (2019).
- 小田 忍, 特許6363358 (2018/07/06).