

第40回（平成24年度）研究奨励金受領者研究報告

植物病原細菌においてクオラムセンシングで制御される二次代謝の解明

大阪府立大学生命環境科学研究科応用生命科学専攻
助教 甲斐建次

研究目的

青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) はナス科を中心とした農作物の多くに感染し枯死を引き起す重要病害菌である。本菌は根の傷などから宿主に侵入し、維管束内で爆発的に増殖する。この際、大量の細胞外多糖を産生することから、維管束の通水が阻害され、植物は青々したまま枯れる。本菌の病原性はグローバルレギュレータータンパク質 PhcA によって制御され、その発現はクオラムセンシング (QS) によって調節されている。細胞外多糖をはじめとした病原力因子の多くは、この *phc*-QS 系で制御される。本菌の QS シグナル物質として methyl 3-hydroxypalmitate が報告されているが、その構造は、粗精製活性画分の GC/MS 分析においてメインピークとして検出された化合物の EI-MS データのみに基づいて推定されたものであり、構造決定における化学的根拠は曖昧かつ不十分である¹⁾。*phcA* 遺伝子を欠損させると、青枯病菌は二次代謝産物のいくつかが産生されなくなることが報告されている²⁾。野生株 (OE1-1) とその *phcA* 欠損株を植物水耕栽培用培地 (植物スクロース培地、PS 培地) で培養し、それらの二次代謝プロファイルを比較したところ、これまでに報告されている二次代謝産物に加えて、未同定の化合物が検出された。これらの二次代謝産物は真の QS シグナル物質同定のための良い指標となることが期待される。そこで本研究では、それらの単離・構造決定を行った。

方法・結果

1. OE1-1 株と *phcA* 欠損株の二次代謝プロファイル比較

OE1-1 株と *phcA* 欠損株を PS 培地で 4 日間、30°C で旋回培養し、培養物を EtOAc で抽出し、得られた脂溶性画分を HPLC 分析に供した。その結果、*phcA* 欠損により大きく減少する 4 つのピークが検出された (Fig. 1)。これらのピークの UV スペクトルデータはいずれも 260–270 nm 附近に極大吸収を示したことから、芳香環を有する類縁体である可能性が強く示唆された。

2. *phc*-QS 系制御下にある二次代謝産物の構造決定

OE1-1 株を 20 L の PS 培地で大量培養し、EtOAc 抽出物からピーク 1–4 の単離を進めた。抽出物を ODS カラムクロマトグラフィー (水-MeOH ステップワイズ溶出) に供したところ、これらの化合物は 40% と 60% MeOH 画分に溶出された。合一した画分から HPLC を用いて、ピーク 1 を 0.6 mg、2 を 2.3 mg、3 を 0.9 mg、4 を 1.2 mg 単離した。

化合物 1 の ¹H NMR を測定したところ、一置換ベンゼンとフラン環に由来するシグナルが検出された。このスペクトルデータは本菌から既に報告のある ralfuranone A のものと一致した²⁾。同様に 4 も既知の ralfuranone B であることが分かった³⁾。

化合物 2 は ¹H NMR において 4 と良く似たスペクトルを与えた。しかし、面不齊に由来する 5 位のジェミナルカップリングが消失した。さらに、その 5 位水素シグナルの積分値減少とケミカルシフトの低磁場シフトから、2 は 4 の 5 位酸化物であることが考えられた。¹³C NMR において 5 位のメチル炭素はヘミアセタール炭素のケミカルシフト値を与え、この予想を支持した。最終的には HMBC の相関を組み合わせることで、2 の構造を明らかにし、新規物質であったため ralfuranone C と名付けた。

化合物 3 の ¹H NMR では、2 で見られた 5 位ヘミアセタール炭素に結合した水素シグナルは観測されたものの、10 位のオキシメチル水素シグナルが消失した。さらに、¹³C NMR において 10 位オキシメチル炭素がカルボニル領域にシフトしていた。以上のことから 3 は 2 の 10 位が酸化されてケトンになった化合物であることが明らかになり、新規物質であったので ralfuranone D と名付けた。

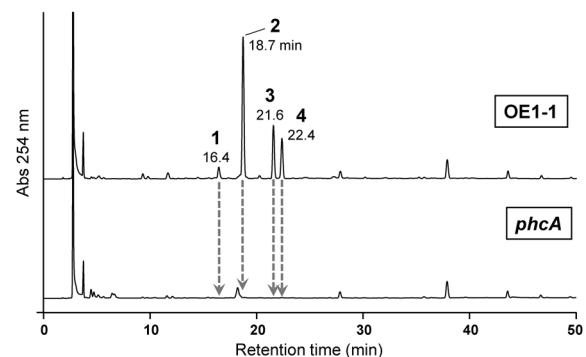
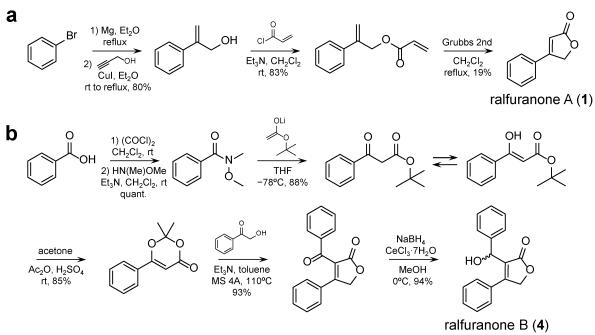


Fig. 1



Scheme 1

3. Ralfuranone類の化学合成

構造確定と生理活性試験を行うためにralfuranone類の全合成を進めた。Ralfuranone Aはフラノン環を有する化合物を構築する論文で合成品として既に報告があったので⁴⁾、その方法に従って合成した(Scheme 1a)。Ralfuranone Bの全合成は未報告であったが、1つ前の10位ケトン体の合成法が報告されていたので⁵⁾、既報に従ってその化合物までの合成を行い、ルーシェ還元を行うことでBの全合成を達成した(Scheme 1b)。AとBの天然物と合成品は同一のNMRデータとHPLC保持時間をそれぞれ与えた。CとDの合成法については検討中である。

4. Ralfuranone類の立体構造

Ralfuranone Bは10位に不斉炭素があるものの、その立体配置については不明であった。上記合成法に従って合成したラセミBをキラルHPLCカラムで分析し、各エナンチオマーが良好に分離する条件を見出した。同一の条件で天然Bを分析したところ、同様なクロマトグラムを与えたことから、天然物もラセミ体であることが明らかになった。したがって、ralfuranone類の10位は生合成過程で立体制御を受けていないことが明らかになった。

5. 植物体におけるralfuranone類生産性の確認

青枯病菌が宿主植物の維管束内で増殖し病気を引き起こす過程で、実際にralfuranone類が産生されるかどうかを調べた。宿主であるトマトに青枯病菌を接種して感染させ、激しい萎凋が現れたころに維管束から菌泥をMilliQ水中に回収した。それをEtOAcで抽出し、得られた濃縮物をHPLCで分析した。Fig. 2に示すように、ralfuranone類の保持時間と一致するピークが検出された。PS培地で生育させたときと同様、ralfuranone Cが最も多く産生されていた。したがって、ralfuranone類は青枯病菌が植物に病気を引き起こす過程で実際に産生されている二次代謝産物であることが確認された。

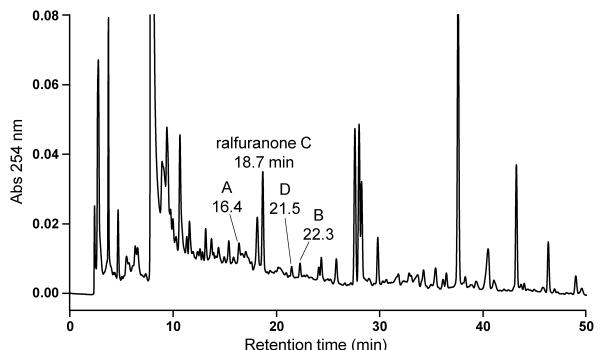


Fig. 2

6. OE1-1株と対峙培養時にphcB欠損株で誘導される未知二次代謝産物

青枯病菌の真のQSシグナル物質は揮発性物質であり、PhcBタンパク質によって生合成されることが報告されている⁶⁾。そこで、OE1-1株とphcB欠損株を対峙培養したときに、OE1-1株から放出される揮発性シグナルをphcB欠損株が受容してralfuranone類の生合成が誘導されるかどうかを調べた。中央に仕切りのあるプラスチックシャーレを用いてOE1-1株と対峙させたphcB欠損株をアガードとEtOAcで抽出した。対峙していないものと対峙したもののクロマトグラムを比較すると、ralfuranone類の産生誘導が後者においてのみ見られた。このことから、揮発性シグナルによって、確かにralfuranone類の生合成が誘導されることが確認された。また、新たにピーク5と6が検出された。揮発性シグナルを受容したときに特異的に産生誘導がかかる物質であると思われ、その化学構造に大きな興味がもたれる。現在、これらの単離・構造決定を進めている。

ま と め

phc-QS系に係わる遺伝子の欠損株の解析から、青枯病菌においてphc-QSで制御されている二次代謝産物として新規ralfuranone類を見出した。Ralfuranone類は実験室での純粋培養といった限られた条件ではなく、実際に植物に病気を引き起こす過程でも産生され、HPLCで検出可能な程度蓄積していることが明らかとなった。感染・発病過程におけるralfuranone類の機能に興味がもたれる。その解明に向けてralfuranone生合成酵素遺伝子の欠損株を現在作製中である。Ralfuranone類の産生を指標とした真のQSシグナル物質の解明も進めている。

謝 詞

本研究を遂行するにあたり、ご支援を賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Flavier AB, Clough SJ, Schell MA, Denny TP. *Mol. Microbiol.*, **1997**, 26, 251.
- 2) Schneider P, Jacobs JM, Neres J, Aldrich CC, Allen C, Nett M, Hoffmeister D. *ChemBioChem.*, **2009**, 10, 2730.
- 3) Wackler B, Schneider P, Jacobs JM, Pauly J, Allen C, Nett M, Hoffmeister D. *Chem. Biol.*, **2011**, 18, 354.

- 4) Verendel JJ, Li JQ, Quan X, Peters B, Zhou T, Gautun OR, Govender T, Andersson PG. *Chem. Eur. J.*, **2012**, 18, 6507.
- 5) Peixoto PA, Boulangé A, Leleu S, Franck X. *Eur. J. Org. Chem.*, **2013**, 3316.
- 6) Clough J, Schell MA, Denny TP. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1994**, 7, 621.

転写共役因子による骨格筋アミノ酸代謝制御機構の解明

京都府立大学生命環境科学研究所 亀井康富

背景

骨格筋は人体最大の組織であり、タンパク質（アミノ酸）の形でエネルギー貯蔵を行なっている。エネルギー欠乏時、骨格筋はアクチンやミオシンといった構成タンパク質を分解し、生成したアミノ酸は他臓器にてエネルギー源として利用される。骨格筋は環境の変化に順応する可塑性があり、例えば、適切な運動トレーニングと十分な栄養により肥大する。一方、寝たきりやギブス固定、飢餓や加齢などによって、骨格筋の萎縮が生じる。その結果、エネルギー消費減少（肥満）や、糖取り込み能の低下・血糖値上昇（糖尿病）へと向かう。高齢化社会を迎えていた我が国において、生活習慣病の予防や生活の質の維持に大きな役割を果たす骨格筋の機能の変化、特に代謝変化の分子機序を理解することは、国民の健康の維持・増進を目指した筋萎縮・筋機能不全の予防法の開発のために重要である。

PGC1 α は様々な核内受容体そして他の転写因子の転写共役因子である。PGC1 α は、骨格筋等において運動により発現増加し、ミトコンドリアの生合成、筋繊維タイプの変化、脂肪酸酸化促進など、エネルギー代謝や運動に関連する遺伝子発現を活性化することが知られている。最近、PGC1 α mRNAにはいくつかのアイソフォームがあることが示されている。我々は以前、PGC1 α mRNAのアイソフォームのうち、PGC1 α -bが運動に応答して顕著に発現増加することを報告した。PGC1 α -bはPGC1 α -1（全長のPGC1 α ）と機能的に類似していると考えられており、アミノ末端の16アミノ酸のみが構造的に異なっている。我々は以前、骨格筋におけるPGC1 α -bの過剰発現が骨格筋においてミトコンドリア生合成、毛細血管の密度を増加させ、運動能力を改善させることに寄与していることを示した。

哺乳動物細胞は分岐鎖アミノ酸（branched-chain amino acids; BCAA）代謝のための高い能力を有している。BCAAは骨格筋のタンパク質を構成する必須アミノ酸の35%を占めており、ヒトは大量のBCAAを体内に貯蔵し

ている。ほとんどの必須アミノ酸は肝臓において主に代謝されているが、BCAAは主に骨格筋で代謝される。BCAAの分解系はすべてミトコンドリアに存在する。BCAAはまず、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素(branched-chain aminotransferase; BCAT)により、分岐鎖 α ケト酸となる。この分岐鎖 α ケト酸は、分岐鎖 α ケト酸脱水素酵素(branched-chain α -keto acid dehydrogenase; BCKDH)による酸化的脱炭酸を起こしCoA化合物となる。それらのふたつの反応を触媒する酵素は3つのBCAAに共通している。2つめのステップの酵素であるBCKDHは非可逆的反応を触媒するので、BCAAの異化経路における最も重要な調節酵素であると考えられている。BCKDHの活性は分岐鎖 α ケト酸脱水素酵素キナーゼ(branched-chain α -keto acid dehydrogenase kinase; BCK-DK)というキナーゼによって調節され、BCKDHはリン酸化されることによってその活性は低下する。

BCAA代謝は運動により活性化することが知られている。骨格筋でエネルギー源として利用されるBCAAは、運動中に利用されるエネルギー代謝に占める割合が高くなると考えられ、それに伴い必要量が増加すると考えられている。

本研究において我々はアレイ解析を行なったところ、PGC1 α Tgマウスの骨格筋においてBCAA代謝経路が活性化していることが示唆された。そこで、PGC1 α がBCATそしてBCKDHのようなBCAA代謝に関与している酵素の発現を増加させ、BCAA代謝を促進するかどうか、PGC1 α を過剰発現させた培養細胞とマウスの骨格筋を用いて検討した。

結果

1. PGC1 α Tgマウスの骨格筋におけるマイクロアレイ解析；BCAA代謝経路の活性化

PGC1 α Tgマウスの骨格筋の表現型の特徴を理解するために、遺伝子発現のアレイ解析を行なった。そして、どういった遺伝子群が変化しているかバイオインフォマティクス解析を行なった。アレイ解析においてWTマウスに比べてPGC1 α Tgマウスで多数の遺伝子発現が変化してい