

グラム陰性細菌の寄生・共生現象を制御するクオラムセンシング機構に関する 生物有機化学的研究



大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 甲 斐 建 次

はじめに

細菌はフェロモン様の低分子化合物を細胞間コミュニケーション分子として利用し、菌密度に応じて遺伝子発現を調節する機構を有する。この機構は、議会の定足数を意味するクオラム (quorum) という単語を用いて、クオラムセンシング (quorum sensing, QS) 機構と呼ばれている。フェロモン様分子には様々な呼び名があるが、本講演要旨では「QS シグナル分子」を使うことにする。QS 機構は、細菌の運動性、バイオフィルム形成能、二次代謝産物 (抗生物質、毒素)・細胞外多糖・細胞外酵素の産生などを制御している。これらのプロセスは、細菌が宿主との寄生 (病原性)・共生といった密接な相互関係を築く上で必須である。つまり、より生物学的に高等な宿主へ挑むには、QS 機構を介した集団同調的な挙動が細菌にとって不可欠なのである。したがって、細菌の QS 機構を解明し、それを制御できるようになれば、細菌の寄生・共生現象を人為的に調節するという大きなブレイクスルーの達成が見えてくる。そこで、グラム陰性細菌の QS 機構の解明と制御、ユニークな細胞内共生への関与という 3 つの項目について、以下のような生物有機化学的研究を進めた。

1. 糸状菌の菌糸内に共生する内生細菌とその QS 機構の発見

アシルホモセリンラクトン (AHL) を QS シグナル分子とした QS 機構は、グラム陰性細菌で最も一般的なものである。AHL-QS 機構を特異的に阻害する化合物は、新しい細菌病制御剤へと発展する可能性がある。そこで、土壌分離糸状菌の二次代謝物を探索源とし、AHL 受容体を介した AHL レポーター系の活性化を指標に、アゴニスト・アンタゴニストを探索した。土壌分離菌 2000 株のスクリーニングの結果、*Mortierella alpina* A-178 株として同定された菌株の培養物に強いアゴニスト活性が見出された。活性物質の単離・構造決定を行ったところ、C6 から C9 までのアシル鎖を有する AHL 類と新規類縁体 (*Z*)-*N*-(4-decenoyl)homoserine lactone が活性物質であることが分かった (図 1A)。この結果は、当初の研究目的とは合致しなかったが、*M. alpina* A-178 株の細胞内に内生細菌が共生している可能性が示唆された。それを検証するために、分子生物学的・組織学的な解析を行ったところ、*M. alpina* 細胞内に細菌が共生していることが示された (図 1B)。さらに、詳細に AHL

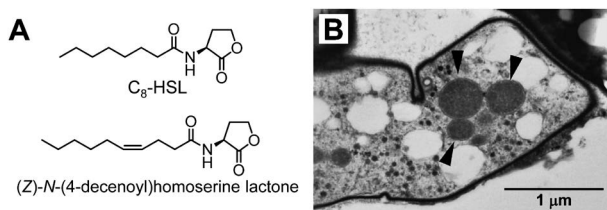


図 1. *M. alpina* 内生細菌が産生する AHL 類の代表的なもの (A) と *M. alpina* 菌糸中の内生細菌の TEM 観察 (B)。

類を定量したところ、AHL 類の合成が自己誘導され、培養後期に急激に増加する QS 特有の現象が確認された。これらの結果は、糸状菌と共生関係を確立する上で細菌の QS 機構が重要であることを示唆する世界初の知見である。内生細菌を除去した *M. alpina* では生育遅延が認められたことから、内生細菌は宿主にプラスの作用を及ぼしていることが強く示唆された。他の *Mortierella* 属糸状菌を中心とした接合菌類に広く内生細菌の存在が明らかになり、このような共生系は接合菌類では一般的なものである可能性が示唆された。

2. AHL 合成酵素のアフィニティー精製法の開発

AHL-QS 機構の研究を進める上で、AHL 合成酵素とその遺伝子の同定は重要である。酵素遺伝子が同定されれば AHL 合成系の欠損株が作製可能となるため、AHL-QS 機構の機能解析へと移ることができる。AHL 生合成反応の中間体である acyl-SAM (図 2A) を模倣した化合物をデザイン・化学合成した。その中から、AHL 合成酵素の競合阻害剤 ASI-1 を選抜し、それをリガンドとしたアフィニティー磁気ビーズを作製して、AHL 合成酵素のブルダウン精製法を確立した (図 2B)。いくつかの AHL 合成酵素に対して本法が有効であることを示し、AHL 合成酵素のリガンドベースのアフィニティー精製法を世界で初めて確立した。本法は、項目 1 の場合のように、宿主から細菌を取り出して培養することが難しい系に対しても適用できると予想された。

AHL 合成酵素の発現量が非常に少ないグラム陰性細菌から AHL 合成酵素をアフィニティー精製するには、さらなるビーズの性能向上が必要であった。そこで、ASI-1 と磁気ビーズとの間にポリエチレングリコール (PEG) をスペーサーとして導入して、AHL 合成酵素に対する収量と特異性をさらに向上さ

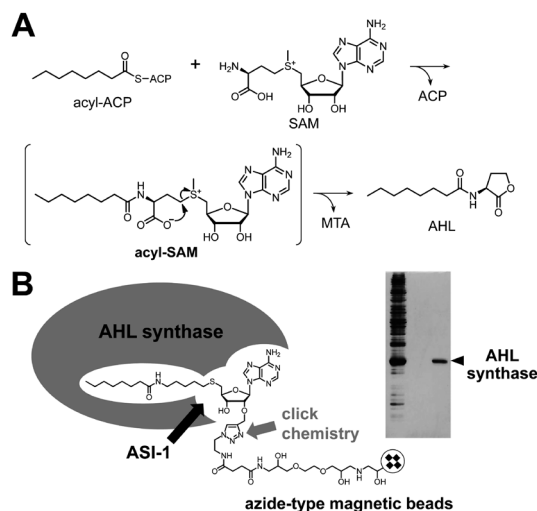


図 2. AHL 生合成の反応機構 (A) と阻害剤 ASI-1 を結合した AHL 合成酵素精製のアフィニティービーズ (B)。

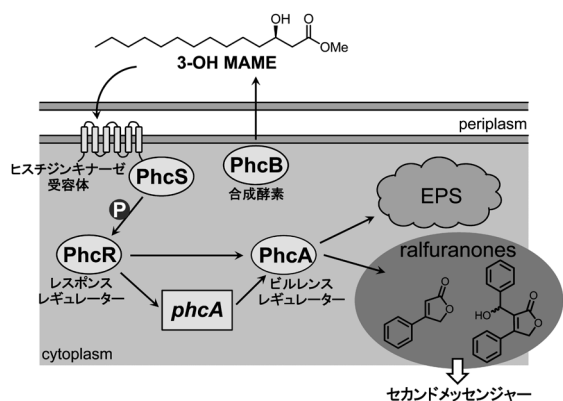


図3. 青枯病菌における階層的な細胞間コミュニケーション機構。3-OH MAME をシグナル分子とする QS 機構と、ralfuranone 類をセカンドメッセンジャーとする機構の協調により、病原性が精巧に制御されている。

せた改良型アフィニティー磁気ビーズを作製した。現在、糸状菌内生細菌の QS 機構解明に向けて、本アフィニティービーズを使い、AHL 合成酵素の同定を進めている。

3. 植物病原細菌 *Ralstonia solanacearum* における階層的な細胞間コミュニケーション機構の解明

青枯病菌 *R. solanacearum* はナス科を中心に 200 以上の植物種に感染し、萎凋・枯死を引き起こす病原細菌である。その被害は世界各地で発生しており、経済的損失は数千億円と言われている。また恐ろしいことに、毎年新しい宿主特性を持つ菌株が報告されている。本菌の防除法を開発するには、感染・病原性発現機構の解明が必須となる。青枯病菌は、他のグラム陰性細菌とは異なる独自の QS 機構を有し、病原性を完全にその機構に依存している。しかし、重要な QS シグナル分子が未解明なままであった。QS シグナル推定合成酵素 PhcB の遺伝子を欠損させた $\Delta phcB$ 株を用い、細胞外多糖 (EPS) 産生を指標としたバイオアッセイ法を確立した。野生株培養物を酢酸エチルで抽出し、得られた抽出物からバイオアッセイを指標に精製を進め QS シグナル分子を単離した。各種分析により、その構造を (*R*)-methyl 3-hydroxymyristate (3-OH MAME) と同定した (図3)。各種欠損株を用いた解析により、3-OH MAME の生合成・受容に関わる生化学因子 (PhcB と PhcS) の推定も達成した。

$\Delta phcA$ (*phcA* 欠損株) と野生株との二次代謝プロファイルと比較すると、QS 欠損により消失する HPLC ピークが存在した。それらを単離・構造決定し、新規フラノン化合物である ralfuranone 類を同定した (図3)。構造確定と生理機能を調べる実験のため、ralfuranone 類の全合成法を完成させた。Ralfuranone 合成酵素遺伝子を欠損させた $\Delta ralA$ 株は、トマトに対する病原力が大きく低下した。しかし、ralfuranone 類自体には植物毒素としての活性はなかった。さらに、 $\Delta ralA$ 株はバイオフィーム形成能などの病原性に直接関わる特性が大きく低下し、ralfuranone 処理で回復した。Ralfuranone 類の産生は、前述の 3-OH MAME をシグナル分子とした QS 機構の制御下にある。したがって、ralfuranone 類は QS 機構のセカンドメッセンジャーとして機能している可能性が示唆された。二次代謝産物がセカンドメッセンジャーとして機能するという例は稀であり、その受容・シグナル伝達機構に興味が持たれる。

さらに、ralfuranone 類の生合成が酵素反応と非酵素反応の組み合わせで成り立っていることを、変異株を用いた前駆体の

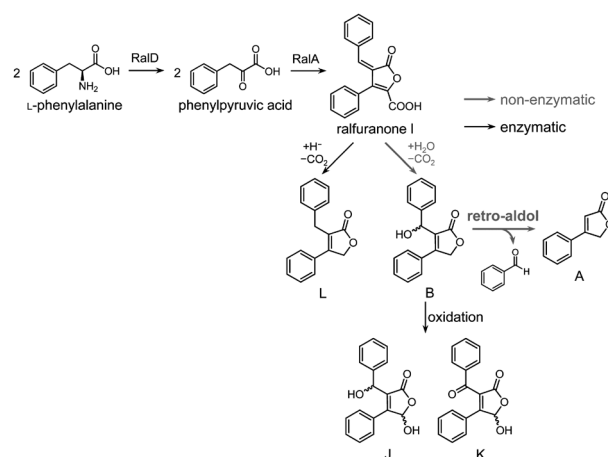


図4. Ralfuranone 類の生合成経路。酵素と非酵素反応が関与する。

取込み実験から明らかにした (図4)。細胞間シグナル分子のように重要な生理活性物質において、非酵素反応がキーステップであることは大変興味深いものである。また、天然フラノン類が非酵素的な retro-aldol 反応で生じることは世界初の発見であった。

おわりに

細菌は互いに QS シグナル分子という「声」を掛け合っており、宿主という「強敵」に挑んでいるように見えてくる (共生宿主の場合でも、強敵だと思う)。その後の細やかな指令は、ralfuranone 類のようなものが担っているであろう。ご存知の方も多いと思われるが、細菌は多数の二成分情報伝達系を持っている。しかしながら、多くの場合、それらのナチュラルリガンドは不明である。環境因子を認識するものが大半であると予想されているが、未知の細胞間シグナル分子の受容システムがまだ多く存在しているはずである。そのような分子に出会えるような研究を、今後も進めていきたい。また、そのような研究を通して得た知見を基に、病原細菌の新しい防除技術の開発に繋がるような展開も取り組みたいと考えている。

謝 辞 本研究は、大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻生理活性物質化学研究グループで行われたものです。自由に研究を進める機会を与えて頂き、終始ご指導ご鞭撻を賜りました大阪府立大学名誉教授林 英雄先生に深く感謝いたします。私が研究者人生をスタートした時の指導教員であり、同研究グループの主宰教授である秋山康紀先生に厚く御礼を申し上げます。高知大学農林海洋科学部教授の曳地康史先生には、青枯病菌の研究で多大なるご助力を頂きました。また、ここに示した成果は、生理活性物質化学研究グループの学生達との共同研究であります。同じ目標に向かって、日々の研究に取り組んでくれた彼ら・彼女らに感謝いたします。府立大学着任後も、色々な面で支えて頂いた京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生物調節化学研究室の宮川 恒教授、中川 好秋准教授、宮下正弘准教授には感謝の念でいっぱいです。静岡大学名誉教授の渡辺修治先生には、学位取得後に研究する場を与えて頂いたこと大変感謝しております。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関西支部長の安達修二先生ならびにご支援を賜りました関西支部の先生方に厚く御礼を申し上げます。