様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　4 年　5 月 31 日現在

機関番号：３２６２１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ０５８５０

研究課題名（和文）細胞性粘菌の子実体が生産する有機ハロゲン化合物の生合成と生態学的意義の解明

研究課題名（英文）Biosynthetic and ecological analysis of organohalogen compounds produced in the cellular slime mold fruiting bodies.

研究代表者
齊藤　玉緒（Saito, Tamao）

上智大学・理工学部・教授

研究者番号：３０２８１８４３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞性粘菌の Steely酵素は、I型ポリケタイド合成素（PKS）とIII型PKSが融合するという構造を持つ唯一のPKSである。SteelyB酵素は発生の中期に予定胞子細胞で分化誘導分子を合成し、子実体期では柄細胞でIII型PKSを分離して塩化ジベンゾフランを合成する。本研究では、SteelyB酵素が子実体期に酵素を分離させることの意義、第２の産物である塩化ジベンゾフランの生態学的な意義を解析した。その結果、異なる産物合成へのスイッチは酵素の分離よりも発現場所の変化が重要であること、また、LCC-1は強い抗菌活性を示し、欠損株は細菌を捕食した場合、胞子塊形成にも影響が出ることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では細胞性粘菌にのみ見られるSteely酵素を構成するI型とIII型PKSの融合と分離の意義を考えた。融合はIII型PKSの基質特異性の低さを補い単一の産物の合成に寄与し、分離は特異性の低さと酵素活性の高さを利用して複数の産物を合成することにつながることがわかった。この成果は生体内でのIII型PKSの機能制御の仕組みを理解するもので、生物を利用した有用物質創出に波及効果を持つ。また、本研究は有機塩化化合物の生態学的な意義の理解も目指したもので、その結果はAmpicillinと同等の最小生育阻止濃度を持つ抗菌物質を見つけ出すことにつながった。

研究成果の概要（英文）：Dictyostelium has novel polyketide synthase (PKS), that is a fusion of type-I and type-III PKSs. SteelyB is one of these fusion type PKSs that are conserved across slime mould species but have not been reported from other organisms. SteelyB makes differentiation signaling molecule in early developmental stage. In the fruiting body stage, that is the final stage of development, SteelyB changes its products and makes Chlorinated dibenzofurans including LCC-1. To do this, SteelyB switches its expression from prespore to stalk cells and is cleaved off the type-III PKS domain. This change of expression locus seemed to be the key for the products change.

LCC-1 showed strong antibacterial activity, and this suggested that it may protect the fruiting body from bacterial infection. In the soil condition, stlB null strain made tiny fruiting bodies with small spore head. This indicates that Chlorinated dibenzofurans are ecological compounds and are also involved in the fruiting body formation.

研究分野：生物有機化学

キーワード：有機ハロゲン化合物　生合成　ポリケタイド合成酵素

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

⑴ 細胞性粘菌のハイブリッド型ポリケタイド合成酵素 Steely の構造の理解

土壌微生物である細胞性粘菌は 2005 年のゲノム解析終了により、多くのポリケタイド合成酵素（PKS）遺伝子を持つことが明らかになった(Eichinger *et al.*, 2005 *Nature*)。さらにこれまで別個の酵素と考えられてきた I 型 PKS の C 末端に III 型 PKS が融合するという特異な構造を持つハイブリッド型 PKS である Steely 酵素が発見された。これまで Steely 酵素を持つ例は他になく、なぜ融合する必要があるのかについての理解を得たいと考えた。

⑵ 子実体に蓄積する塩化ジベンゾフラン

天然由来の有機ハロゲン化合物は海洋生物に多く存在し、自己防衛に関わるなど生物活性を持つものが多い。細胞性粘菌は古くから有機ハロゲン化合物を持つことが知られている(Morris *et al.,* 1987 *Nature*)。1980 年代に同定された分化誘導分子 DIF-1 は塩化アルキルフェノンでありまた、天然由来の塩化ジベンゾフランの最初の報告例は細胞性粘菌で発見された AB0022A である（Sawada *et al.*, 2000 *J. Antibiot.*）。特に塩化ジベンゾフランは細胞性粘菌の種を超えて保存されているが、その生態学的な意味は理解されていなかった。

⑶ 細菌と細胞性粘菌の生存戦略

細胞性粘菌は生活史の中に単細胞と多細胞の時期を持ち独自の生存戦略を展開している。近年、細胞性粘菌と細菌の間の複雑な生態学的な関わりが分かってきた。細胞性粘菌は単細胞期には特定の細菌を捕食するが、多細胞期（slug 期）には細菌の感染や寄生を防ぐため Sentinel cell と呼ばれる始原的な免疫細胞を分化させる(Chen *et al.*, 2007 *Science*)。一方、最終形態の子実体では胞子にある種の細菌が共生することが報告されている。

⑷ 着想に至った経緯

申請者は細胞性粘菌の SteelyB 酵素が I 型 PKS と III 型 PKS が融合した構造を持ち、発生中期には融合型酵素として単一の産物を合成し、発生後期に分離して III 型が単独で働くときには複数の産物を同時に合成することを明らかにした。そこで、なぜ融合型酵素である必要があるのかという疑問が生じた。III 型 PKS は広い基質特異性を持つことが知られ、*in vitro* では基質アナログと酵素の組み合わせによって多様な化合物が作り出されている。しかし、同様のことが生体内で起こることは不都合であり、そこには厳密な基質供給の制御があるはずである。申請者は Steely 酵素の構造は I 型 PKS による III 型 PKS 基質制限の一つの方法なのではないかという仮説を導き出した。さらに、遊離型 III 型 PKS の産物と考えられる塩化ジベンゾフランを含む塩化化合物は細胞性粘菌の子実体に広く保存され抗菌活性を持つことから、細胞性粘菌の生き残り戦略に関与していると考え生態学的意義を問うという発想に至った。

２．研究の目的

　申請者はこれまでの研究によって、SteelyB 酵素が LCC-1 という塩化ジベンゾフランを合成

すること、さらに合成にあたって SteelyB 酵素が I 型 PKS と III 型 PKS を切り離して機能していることを発見した。この研究成果に基づき本研究では以下の２点を解明することを目的とした 。①SteelyB 酵素の構造変化、つまり二つの PKS の融合と切り離しの意義は何か。②酵素の構造変化というコストをかけてまで作られる塩化ジベンゾフランなどの有機塩化化合物は次世代に命をつなぐ子実体にとってどのような働きがあるのか、その生態学的な意義を問うことを目的とした。

３．研究の方法

(1) 酵素の構造変化の意義についての仮説の検証

stlB-株にそれぞれタグをつけた I 型 PKS、III 型 PKS を過剰発現させ、これを精製し再構成実験に用いる予定であったが、研究室の使用時間に制限があったため時間のかかる *in vitro* 再構成実験ではなく、比較的時間をあけても観察ができる *in vivo* の再構成実験を行うことにした。即ち、SteelyB 酵素の III 型 PKS を SteelyB 酵素欠損株に強制発現させ、LCCs の合成を回復するかどうかの確認を行った。また LCCs の合成は SteelyB の III 型酵素部分が作り出す化合物が骨格となるはずなのでこれを合成して、*stlB*-株に与える Feeding 実験を行った。

(2) **LCC-1 以外の有機塩化化合物（LCC）の構造解析と抗菌活性**

Feeding 実験では微量成分について十分な量が得られなかったので、III 型 PKS の過剰発現株を作成し、これを用いて微量成分の精製を試みた。

(3) **有機塩化化合物（LCC）と子実体の生き残り戦略の理解**

抗菌活性の測定を行い最小阻止濃度（MIC）の検証をした。また、子実体形成に関連する遺伝子の破壊株では土壌中で形態形成をさせると３次元運動に関わる細胞間情報伝達等の欠損が強く現れ、子実体形成不全が見られる場合がある。*stlB*-株についても同様の結果を予想して、*Bacillus subtilis* を餌とした場合に土壌中での形態形成を観察した。

４．研究成果

(1) 酵素の構造変化の意義についての仮説の検証

① *in vivo* 再構成による検証：SteelyB 酵素の働き

SteelyB 酵素が slug 期には融合型酵素として機能して単一産物の DIF-1 を合成し、発生の最終段階では I 型、III 型 PKS が切り離され塩化ジベンゾフランを含む複数の塩化化合物（LCC）を合成することから、以下のような構造の変化に関する仮説を導いた。すなわち、slug 期には緩やかな基質特異性を持ち複数の産物を作る III 型 PKS が I 型 PKS の C 末端に融合し、I 型 PKS の産物を基質として使うことによって単一の産物を合成すると考えた。一方、子実体期では III 型 PKS が切り離されることにより、その低い特異性に基づいて、複数の化合物を同時に合成するのではないかと考えた。この仮説を検証するため融合型と分離型の SteelyB 酵素を用いて *in vitro* で酵素反応の再構成実験を行い、基質と産物を調べることにより酵素の構造変化と産物の関係を検証することを考えたが、研究室の使用時間に制限があったため、*in vitro* で酵素反応の再構成実験のような新規の実験を行うことが難しいと判断した。そこで、これまでの結果の検証を行った。まず以前行なった予備実験では *stlB* 欠損株に SteelyB 酵素の III 型 PKS 部分を柄細胞のみで特異的に発現させた株で LCCs の合成を検証したが、予想に反して全く合成できてい

なかった。この変異株の表現型を詳細に観察したところ、子実体期で SteelyB が本来発現する柄細胞と basal disc の部分が、発生中期に SteelyB 酵素が欠損しているため分化誘導が不十分であることから、細胞数を通常よりも多く用意しなければ検出ができないと判断した。そこで、細胞数を通常の３倍用意して解析を行ったところ、LCCs を検出することができ、当初の仮説通りに、子実体期には単独型の III 型 PKS が主にアルキル鎖の鎖長が異なる多様な産物を合成していることが示された。表１に LCC-1 と検出した２つのマイナーな成分の MS 解析の結果を示す。

表１　SteelyB 欠損株に SteelyB 酵素の III 型 PKS 部分を柄細胞で発現させた株から検出したピークの MS 解析の結果

	Calculated mass	**Estimated composition formula**
Peak 1	445.00126	$C_{19}H_{16}Cl_3O_6$ (LCC-1)
Peak 2	430.98560	$C_{18}H_{14}Cl_3O_6$
Peak 3	416.96995	$C_{17}H_{12}Cl_3O_6$

②前駆物質の feeding による検証：塩素付加のタイミングの推定

引き続き実験室の使用時間制限があったため、生合成経路の推定の方法を feeding 実験で行うことにした。PKS である SteelyB の産物の THPH と THPH に塩素が付加した Cl-THPH, Cl2-THPH を *stlB* 欠損株に feeding することによって LCC-1 などの化合物の合成が回復するかを調べた。その結果、THPH、Cl-THPH については *stlB* 欠損株で LCC の回復が見られた。一方 Cl2-THPH では LCC 合成は見られたが、その量が他に比べて極端に少ないことがわかった(図１)。このことから THPH は塩素付加によって Cl-THPH になり、その後ジベンゾフランになる経路が主ではないかと推定した。以上の結果を検証するためにはカップリング反応を司る酵素の同定が不可欠になると考えられ、新たに見えてきた問題点としていかにしてジベンゾフラン骨格が合成されるのかを解明する必要性が見えてきた。

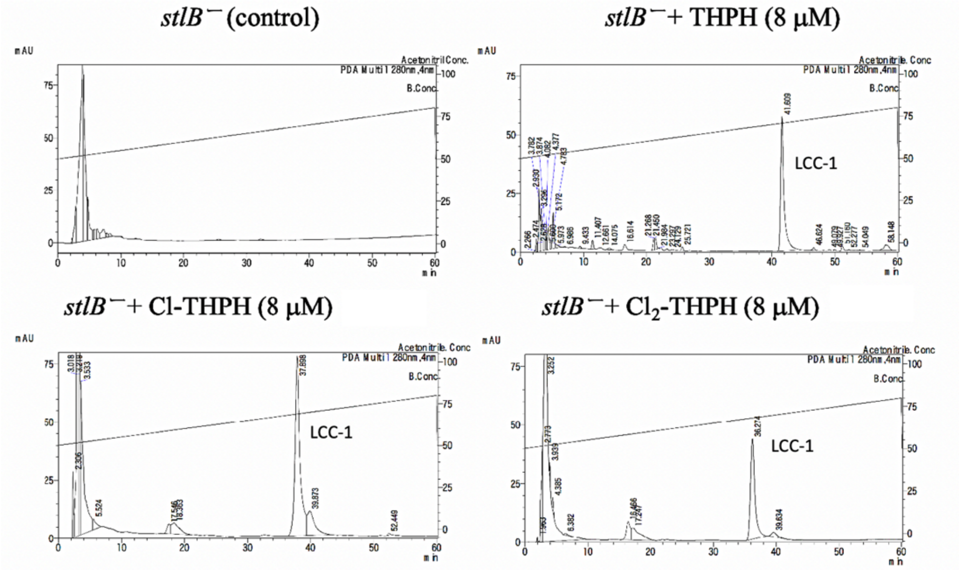

図１　*stlB* 欠損株に DIF-1 生合成の前駆物質 THPH、Cl-THPH, Cl2-THPH を feeding したときの LCCs の合成

(2) **有機塩化化合物（LCC）の構造解析と抗菌活性**

抗菌活性については、再現性を確認した。その結果、予備的な実験の結果と同様で、グラム陽性菌の *Bacillus subtilis* に対しては Ampicillin よりも強い抗菌活性があることが確定した。またマイナーな LCCs については、その希少性から精製が困難で、以前 NMR 解析したものについても、単一の化合物ではないことが示唆された。これまでの研究で SteelyB 酵素の発現量が低いことがわかっていたので、野生型株の柄細胞で III 型 PKS を過剰発現させる株を作成することによって、出発物質を補いマイナーな LCCs の量が増やせるのではないかと考え、過剰発現株を作成した。しかし、予想に反して微量成分はほぼ変わらず、十分な量を合成するには至らなかった。この過剰発現株でマイナーな LCC 合成が変化しなかったという結果から、これまで SteelyB 酵素の融合と分離に着目していたが、SteelyB 酵素の産物スイッチは酵素の発現場所の変化が引き金となり、それに続く修飾酵素の組み合わせの変化が重要であることがわかった。また、過剰発現株の作成から、発現量は変わらないが I 型 PKS から切り離されると III 型 PKS の触媒効率が上がることを示唆する結果も得られ、生合成に関する新しい課題が見えてきた。

(3) **有機塩化化合物がない *stlB* 欠損株の子実体を用いた生態学的な機能**

StlB 欠損株は子実体期の抗菌活性物質がないことから、感染などの危険性が上がるのではないかと予想した。通常の培養に用いているグラム陰性菌の *Klebsiella* を餌にしたところ、あまり大きな変化は見られなかった。一方、餌として LCC-1 に強い抗菌活性を示した *Bacillus subtilis* を与え、土壌環境で形態形成をさせたところ、野生型株に比べて非常に小さな子実体を形成した。また、寒天上ではそれほどはっきりしなかったが、土壌中でははっきりと胞子塊が小さくなっていた。一方 slug 期の免疫細胞等についての変化は見られなかった。この結果から、柄細胞での抗菌物質の欠損が、子実体の胞子塊形成にも影響を与えることがわかり、抗菌物質が生き残り戦略の一つであることが推定された。

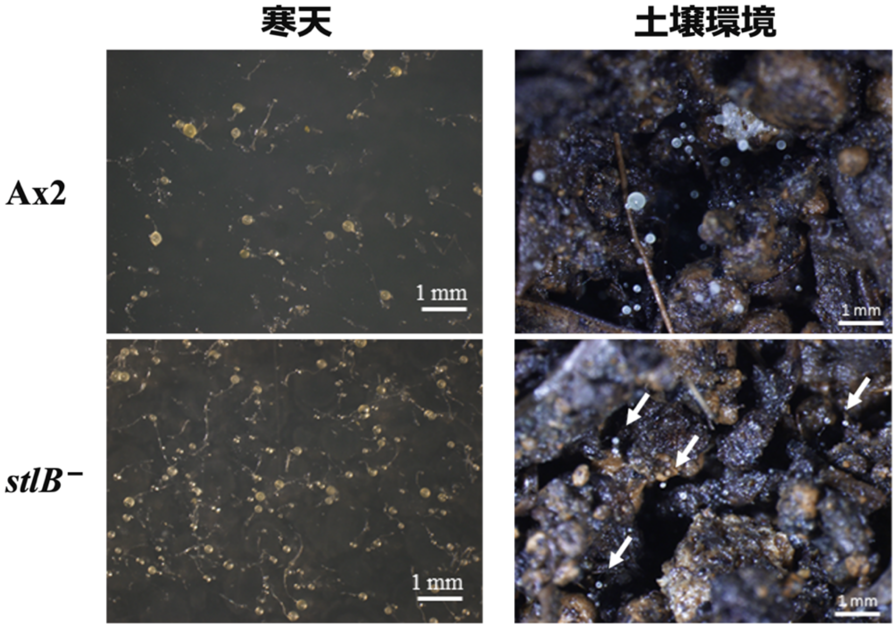

図２ *Bacillus subtilis* を餌にした場合の子実体形成。野生型株 Ax2 では寒天上でも、土壌中でも同じ大きさの胞子塊を持つ。*stlB* 欠損株は土壌中での胞子塊(矢印)が小さくなっている。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 中原優弥、飯島知之、今井令、齊藤玉緒
２．発表標題 細胞性粘菌が生産する有機ハロゲン化合物の構造多様性と生合成機構の解析
３．学会等名 日本細胞性粘菌学会第１１回例会
４．発表年 2021年

１．発表者名 小山 航平，飯島 知之，桑葉 達広，山中 彩夏，村本 哲哉，R.R.Kay，齊藤 玉緒
２．発表標題 細胞性粘菌が生産するハロゲン化 有機化合物 LCCs の生合成経路の解析
３．学会等名 日本細胞性粘菌学会第１０回例会
４．発表年 2020年

１．発表者名 小山航平、飯島知之、深澤汐香、Kay R Robert、齊藤玉緒
２．発表標題 細胞性粘菌の柄細胞に見られるハロゲン有機化合物
３．学会等名 第９２回日本生化学会大会
４．発表年 2019年

１．発表者名 小山航平、飯島知之、深澤汐香、RR Kay、齊藤玉緒
２．発表標題 細胞性粘菌Dictyostelium discoideumが生産するハロゲン化有機化合物
３．学会等名 日本細胞性粘菌学会第９回例会
４．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

6．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関