

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32702

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19056

研究課題名（和文）微生物が生産する新規ペプチド型フェロモンの探索

研究課題名（英文）Screening of novel peptide pheromones produced by microorganisms

研究代表者

岡田 正弘（Okada, Masahiro）

神奈川大学・化学生命学部・教授

研究者番号：40377792

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ロドコッカス・エリスロポリスにおいて、非リボソームペプチド合成酵素によって生合成される形態変化誘導物質があると仮定して、遺伝子破壊株を用いた生物検定法の確立、および、形態変化誘導物質の探索を行った結果、塊状のコロニーを形成して沈殿する遺伝子破壊株の形状を、野生株と同様の浮遊して培養液が濁る形状へと変化させる形態変化誘導物質が野生株培養液中に含まれることを明らかにした。しかしながら、形態変化誘導物質は不安定で精製、構造決定には至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ロドコッカス・エリスロポリスには全く新しいタイプの微生物フェロモンが存在することになり、卓越した成果が期待できる。ただし、生合成遺伝子が判明したからといって、簡単に遺伝子産物が特定できるわけではなく、極めて困難である。また、近縁の放線菌にも同様の遺伝子が存在することから多くの有用二次代謝産物を生産する放線菌への応用という研究の発展、応用が期待でき、困難ではあるものの、挑戦する意義の極めて大きい研究課題である。

研究成果の概要（英文）：Based on the genetic analysis of *Rhodococcus erythropolis*, there seems to be a novel pheromone-like biologically active compound in *Rhodococcus erythropolis*. We first established a bioassay system using gene disruption strains and searched for the pheromone-like biologically active compound. The morphological change inducers were found in the culture medium of the wild strain, which changed the shape of the disrupted strain from clumped colonies to a floating and turbid form, similar to the wild strain. However, the morphology change inducer was unstable and could not be purified or structurally determined.

研究分野：天然物化学

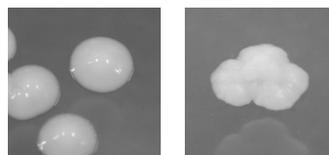
キーワード：ペプチド 微生物 フェロモン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ロドコッカス属細菌の一種、*Rhodococcus erythropolis* (以下、エリスロポリス株) において、ある遺伝子の破壊株の形状が大きく変化した (図 1)。その遺伝子を解析したところ、二次代謝産物であるペプチド様物質の生合成酵素である非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) であると考えられた。従って、その NRPS によって生合成されたペプチド様物質がコロニーの形状を変化させることになる。このような同種他者に対して作用する微量成分はフェロモンと呼ばれているが、ロドコッカス属細菌と近縁の放線菌などでは主に低分子化合物がフェロモンとして作用しており、その他の細菌では (リボソーム) ペプチドがフェロモンとして作用していることが明らかとなっている。しかし、非リボソームペプチド合成酵素によって生合成されるペプチド様物質がフェロモンとして働いているという例は全細菌において全く報告されていない。

図 1. ロドコッカス属細菌 *Rhodococcus erythropolis* の野生株と遺伝子破壊株の形状。
通常、*Rhodococcus erythropolis* はフィルム状のコロニーを形成するが (左)、ある遺伝子を破壊すると粒状となる (右)。



2. 研究の目的

もし本当ならば全く新しいタイプの微生物フェロモンが存在することになる。そもそも、生産菌にとって生物学的役割のある二次代謝産物の例自体が大変珍しい。そこで、このペプチド様フェロモンを発見、解明することにした。以前は、まずフェロモンが発見された後に、フェロモンの生合成遺伝子が解明されてきたが、近年は、分子生物学の発展に伴い、生合成遺伝子からのフェロモンの発見が我々を含め、いくつか報告されつつある。ただし、生合成遺伝子が判明したからといって、簡単に遺伝子産物が特定できるわけではなく、特に、非リボソームペプチドの化学構造の決定は今でも極めて困難である。また、近縁の放線菌にも同様の遺伝子が存在することが遺伝子解析から容易に見て取れるため、放線菌由来の新規フェロモンの発見、およびそれらを介した新規制御機構の発見へと発展する可能性が高い。すなわち、多くの有用二次代謝産物を生産する放線菌への応用という卓越した成果が期待でき、困難ではあるものの、挑戦する意義の極めて大きい研究課題であると言える。

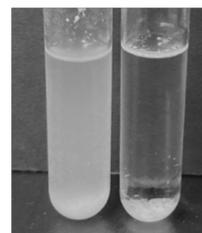
3. 研究の方法

まずはペプチド様フェロモンが実際に存在することを明らかにしなくてはならない。また、ペプチド様フェロモンが実際にエリスロポリス株の形状を変化させることを示さなくてはならない。そこで、エリスロポリス株の培養物を用いた、エリスロポリス株の遺伝子破壊株に対する生物検定を行い、培養物の添加により遺伝子破壊株の形態が破壊株特有の粒状から野生株と同様のフィルム状に変化するかどうかを調べることにした。さらに、培養物に含まれる形態変化誘導物質を HPLC を用いて分画して精製することにした。精製した誘導物質を各種分析を行うことで化学構造の決定を試みることにした。

4. 研究成果

エリスロポリス野生株から目的のペプチド様物質が分泌されていると想定して、該当するエリスロポリス遺伝子破壊株に対してエリスロポリス野生株の抽出液を加えることで野生型への形態変化を誘導する生物検定法の確立を試みた。エリスロポリス株の液体培養において、野生株の細胞は浮遊するのに対し、遺伝子破壊株は塊状のコロニーを形成するため、遺伝子破壊株培養液を静置した場合は細胞が沈殿して培養液が透明となる (図 2)。そこで、エリスロポリス遺伝子破壊株を野生株の抽出液を加えた培地を用いて液体培養を行い、見た目の変化とともに、静置後の培養液上清の濁度を測定することで活性を評価した。

図 2. ロドコッカス属細菌 *Rhodococcus erythropolis* の野生株と遺伝子破壊株の形状。
通常、*Rhodococcus erythropolis* は液体培養においては野生株の培養液 (左) は細胞は浮遊して培養液が濁る。それに対して、遺伝子破壊株の培養液 (右) は塊状のコロニーを形成するため、培養液を静置した場合は細胞が沈殿して培養液が透明となる。



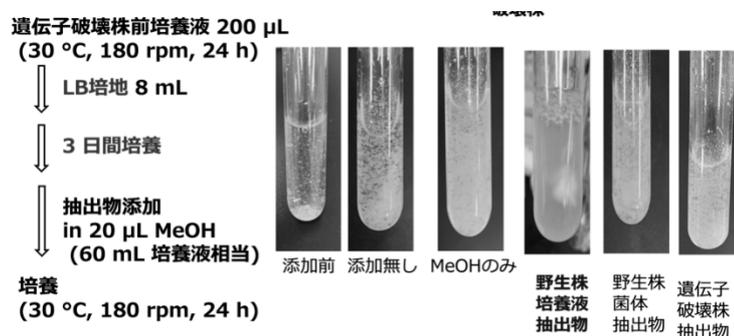
まず、購入したロドコッカス・エリスロポリス JCM 2895 株を改良最小培地¹⁾にて 30℃、24 時間、180 rpm にて振盪培養した。得られた培養液を遠心分離により上清と菌体に分離した。回収した菌体にエタノールを加えて浸透抽出を行い、遠心分離により上清と菌体に分離した。それぞれの上清をろ過した後減圧濃縮して、培養液抽出物と菌体抽出物を得た。続いて、共同研究者によって作製されたロドコッカス・エリスロポリス遺伝子破壊株をあらかじめ改良最小培地¹⁾

にて 30 °C、24 時間、180 rpm にて振盪培養させた前培養液 200 μL と、メタノール 20 μL に溶解させた抽出物を改良最小培地 3 mL に加えて、30 °C、36 時間、180 rpm にて振盪培養させた。その結果、遺伝子破壊株の濁度はほとんど変化しないのに対して、菌体抽出物を加えた上清の濁度は野生株と同様に上昇した。また、見た目にも遺伝子破壊株に野生株の抽出液を加えることで遺伝子破壊株の一部の細胞が野生株のように浮遊することが確認できた。

次に、再現性の確認とともに最適条件の検討を行った。しかしながら、本生物検定には、わずかな添加量の違いによって培養液の見た目、濁度が変化してしまうこと、培養時間が長くなると添加していない培養液においても見た目、濁度が変化してしまうこと、そもそも再現性を得ることが困難であることなど、いくつかの問題点が見られたため詳細な条件検討を行うこととした。

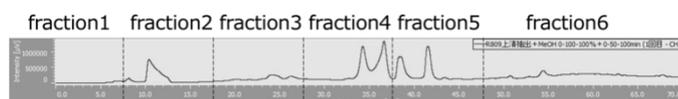
そこで、まずコンタミネーションの可能性を排除するために、濾過滅菌をおこなった。次に、富栄養培地で予め培養して菌体量を増加させた遺伝子破壊株を用いることにした。すなわち、富栄養培地である LB 培地を用いて 30 度、72 時間、180 rpm にて振盪培養した後に、野生株の培養抽出液を加えて再び、30 度、24 時間、180 rpm にて振盪培養した。その結果、遺伝子破壊株の細胞が野生株と同様の形状に変化することが確認できた。遺伝子破壊株の培養抽出液を用いて同様の操作を行なった場合では形状は変化しなかった。再現性も得られた。したがって、ロドコッカス・エリスロポリス JCM 2895 野生株の培養液には形態変化物質が含まれていることが明らかとなった。したがって、野生株の菌体抽出物にロドコッカスの形態変化を引き起こす形態変化誘導物質が含まれていることが明らかとなった (図 3)。

図 3 遺伝子破壊株を用いた生物検定法。
LB 培地を用いて 30 度、72 時間、180 rpm にて振盪培養した後に、濾過滅菌したサンプルを加えて再び 30 度、24 時間、180 rpm にて振盪培養した。
その結果、野生株培養液抽出物を加えた場合のみ細胞が浮遊して培養液が濁った。



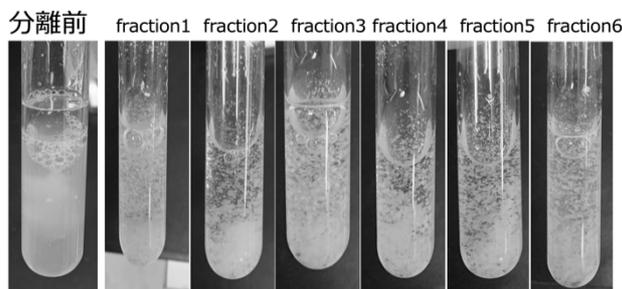
続いて、野生株を最小培地 10 L で 30 度、24 時間、180 rpm にて振盪培養させた培養液を、遠心分離により上清と菌体に分離した。上清を逆相 ODS カラムを用いた水-メタノールによる段階抽出を行い、各画分を得た。同様にして各画分を最少培地に加えて遺伝子破壊株を培養し、培養液上清の濁度を計測した結果、100%メタノール画分に濁度上昇活性が観測されたものの、想定されたよりも大幅に活性値が低下した。また、遺伝子破壊株の浮遊を観測することができなかった。さらに、100%メタノール画分を用いて HPLC を用いた水-メタノールによるグラジエント精製を行い、合計で 6 つの画分を得た (図 4)。

図 4 HPLC にて精製した各分画。



構築した生物検定法を用いて各画分を最小培地に加えて遺伝子破壊株を培養し、培養液上清の濁度を計測した結果、すべての画分に濁度上昇活性が観測されなかった。以上の結果から、ロドコッカスの形態変化を引き起こす形態変化誘導物質は不安定で精製過程で分解してしまったと考えられた (図 5)。

図 5 HPLC にて精製した各分画の生物検定。
HPLC にて精製した 6 画分について生物検定を行った結果、全ての画分ともに塊状のコロニーを形成して細胞が沈殿して培養液が透明となった。



以上をまとめると、ロドコッカス・エリスロポリスにおいて、NRPS によって生合成される形態変化誘導物質があると仮定して、遺伝子破壊株を用いた生物検定法の確立、および、形態変化誘導物質の探索を行った結果、塊状のコロニーを形成して沈殿する遺伝子破壊株の形状を、野生株と同様の浮遊して培養液が濁る形状へと変化させる形態変化誘導物質が野生株培養液中に含まれることを明らかにした。しかしながら、形態変化誘導物質は不安定で HPLC を用いた精製過程で分解してしまうと考えられ、精製、構造決定には至らなかった。

参考文献

1) M. P. McLeod, et. al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103, 15582-15587.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Zhang Yuchen, Hamada Keisuke, Nguyen Dinh Thanh, Inoue Sumika, Satake Masayuki, Kobayashi Shunsuke, Okada Chikako, Ogata Kazuhiro, Okada Masahiro, Sengoku Toru, Goto Yuki, Suga Hiroaki	4. 巻 5
2. 論文標題 LimF is a versatile prenyltransferase for histidine-C-geranylation on diverse non-natural substrates	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Catalysis	6. 最初と最後の頁 682 ~ 693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41929-022-00822-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田正弘
2. 発表標題 シアノバクテリア由来のプレニル化酵素に関する研究.
3. 学会等名 第34回海洋生物活性談話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澄本 慎平
2. 発表標題 液相ペプチド合成を指向した疎水性アンカー分子の開発
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田 涼生
2. 発表標題 グラニルトリプトファン残基を有するペプチド型フェロモンの構造活性相関研究
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 香月
2. 発表標題 枯草菌由来のファルネシルトリプトファン残基を有するペプチドフェロモンの合成研究
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 澄本 慎平
2. 発表標題 シアノバクテリア由来の環状修飾ペプチドOscillatorinの合成研究
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会(2023)
4. 発表年 2023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