

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19081

研究課題名（和文）植物ホルモンによる微生物休眠二次代謝の打破と新たな化学コミュニケーションの解明

研究課題名（英文）Activation of microbial dormant secondary metabolism by plant hormones

研究代表者

木谷 茂（Kitani, Shigeru）

青山学院大学・理工学部・教授

研究者番号：10379117

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：化学シグナルによるコミュニケーションが植物と微生物の間に予想されている。本研究では、植物ホルモンに代謝応答する微生物を特定し、新たな植物-微生物間化学コミュニケーションを発掘することを目的とした。本研究により、植物ホルモンであるインドール-3-酢酸（IAA）が生理活性物質の代表的生産微生物である放線菌の特定菌株に対して、その形態分化や代謝物生産を調節することが分かった。したがって、IAAが放線菌の形態分化を制御し、休眠二次代謝を覚醒させる因子であり、IAAを介した化学コミュニケーションが放線菌-植物間に存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、インドール-3-酢酸（IAA）が放線菌に休眠する二次代謝を打破（覚醒）する化学ツールとして有効である可能性を示した。このIAAを活用すれば、構造多様性に富んだ新規天然物を発掘できる確率が向上すると期待される。また、IAAにより調節される形態分化経路が示されたことから、放線菌の新たな形態分化調節系に加え、新たな微生物-植物間化学コミュニケーションの存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Chemical communication between microorganisms and plants has been predicted to control the phenotype of each of them. This study aimed to find microorganisms, whose production of secondary metabolites is regulated by phytohormones and to discover a new type of the chemical communication. Here, we showed that indole-3-acetic acid (IAA), a phytohormone, regulates morphological differentiation and secondary metabolite production in some strains of streptomycetes, which are representative microorganisms that produce useful bioactive compounds. These results suggested that IAA is an important factor regulating morphological differentiation and/or cryptic secondary metabolism in streptomycetes, and that there is an IAA-mediated chemical communication between streptomycetes and plants.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放線菌 植物ホルモン インドール-3-酢酸 化学コミュニケーション

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物と微生物は、自然環境中では密接に接することから、化学シグナルを介した多様な相利共生関係(化学コミュニケーション)があると考えられる。この化学シグナル伝達系を同定・解明・活用できれば、植物または微生物の潜在能力を顕在化でき、植物の生長制御や新たな微生物物質/遺伝子資源にアクセスできることが期待される。しかし、同定されたシグナル分子は極僅かであり、植物-微生物間の化学コミュニケーションには、謎な点が未だ多い。

放線菌は、多彩な生理活性物質(抗生物質や抗ガン剤など)を二次代謝産物とする土壌微生物であり、私たちの生活維持に不可欠な有用微生物である。ある種の放線菌は様々な植物ホルモンを産生し、植物の生長に影響を及ぼすことから、今後の農業応用に期待が持たれている。研究代表者は、自己の二次代謝を調節するブテノライド型シグナル分子(図1A)を放線菌より見出していた(引用文献)。このシグナル物質の化学構造がラクトン環含有植物ホルモン(ジャスモン酸など)と類似していたことから、本物質の植物生理活性に着目したところ、本シグナル分子が根寄生植物の種子発芽を抑制する、つまり微生物の二次代謝シグナルが植物生長に関与するという予期せぬ発見に至った(引用文献)。そこで、放線菌シグナル分子が植物ホルモン様活性を示すならば、植物ホルモンも放線菌シグナル様活性を示し、放線菌の休眠二次代謝を覚醒でき、また、植物ホルモンに接触する植物内生放線菌を対象にすれば、放線菌-植物間に横たわる化学コミュニケーションを明示できる、のではないかと考えた。

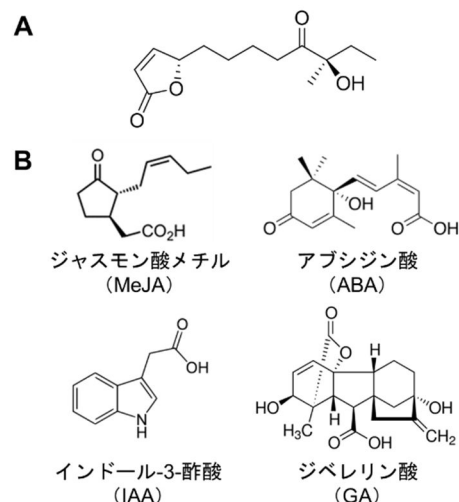


図1 A. ブテノライド型二次代謝自己調節因子
B. 本研究で使用した植物ホルモン

2. 研究の目的

本研究では、植物ホルモンにより休眠二次代謝が打破される放線菌種とその覚醒物質を同定し、微生物-植物間の新たな相互作用を明示する、植物ホルモンを活用した有用物質探索技術を確立する、ことを主目的とした。これらの成果により、生物間、特に微生物と植物の間にある、化学コミュニケーションを新たに提案し、その応用により、放線菌の魅力的な物質生産能を覚醒させることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、研究代表者が独自単離した植物内生放線菌や根圏放線菌に対して、植物ホルモン添加実験を実施した。使用した植物ホルモンは、比較的low価格にて入手可能なジャスモン酸メチル(MeJA)とアブシジン酸(ABA)、インドール-3-酢酸(IAA)、ジベレリン酸(GA)の計4種である(図1B)。

(1) 植物内生放線菌における植物ホルモン影響解析

伊豆半島に生息する植物から内生放線菌(HN株)を単離しており、植物ホルモンの各種表現型への影響を解析することにした。HN株の内訳は、*Pseudonocardia*属放線菌が2株であり、*Streptomyces*属放線菌が104株である。

代謝物解析

植物内生放線菌を放線菌の二次代謝が盛んに観察されるA-11M培地またはA-16培地各5 mLに植菌し、28°Cにて振盪培養した。この培養時に、4種類の植物ホルモンを含む溶液(終濃度0.1 μM IAA, 1 mM MeJA, 0.5 mM GA, 0.5 mM ABA)を添加した。各培養液を半等量のn-ブタノールにて抽出、濃縮乾固した後、ジメチルスルホキシド(DMSO)に再溶解した。このサンプルをCadenza C₁₈カラム(Imtakt社製)を用いた逆相HPLCにより解析した。

代謝物の抗菌活性解析

で調製した培養液の抗菌活性を、ペニシリンカップを用いたバイオアッセイにて解析した。被検菌として、グラム陰性細菌*Escherichia coli* ATCC 25922株とグラム陽性細菌*Bacillus subtilis* PCI 219株、真菌*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9804株を使用した。培養液を被検菌を含む培地上のペニシリンカップに投与し、培地を30°Cで一晩、培養した後、ペニシリンカップ周辺に出現した生育阻止円を観察した。有機溶媒にて抽出した代謝物の抗菌活性を解析する際には、エタノールに溶解させたn-ブタノール抽出物をペーパーディスクに負荷し、このペーパーディスクを被検菌を含む培地上に静置した。

植物ホルモン応答性化合物の精製と物性解析

植物内生放線菌*Streptomyces* sp. HN11株を植物ホルモン混合液を含むA-11M培地100 mLに

植菌し、28°C にて培養した。培養液 1 L を等量の酢酸エチルにて抽出し、濃縮乾固した。メタノールに溶解したサンプルをシリカゲルクロマトグラフィーに供し、ヘキサン-酢酸エチル混合溶媒にて標的化合物を溶出させた。標的化合物を精製するため、Capcell-Pak C₁₈ カラム（資生堂社製）を用いた逆相 HPLC を使用した。また、精製化合物の質量を FAB-MS により分析した。

(2) 植物関連放線菌における植物ホルモン影響解析

伊豆大島に自生する植物とその根圏土壌から、植物内生放線菌（YO 株）と根圏放線菌（同）を単離しており、計 28 株を本実験にて使用した。全ての菌株が *Streptomyces* 属放線菌である。

固体培養における植物ホルモン添加解析

植物関連放線菌の胞子を塗布した固体培地の中心に、植物ホルモンを負荷したペーパーディスクを静置し、28°C にて培養した。植物ホルモンは、(1)の解析と同様の 4 種類を使用し、ペーパーディスクへの負荷量は各 7.7 mol とした。また、植物関連放線菌の抗菌活性を検定するため、植物関連放線菌の培養寒天片を(1)- と同様に、被検菌を含んだ培地に静置し、一晚培養した後、培養寒天片の周囲に現れる生育阻止円を観察した。

液体培養における植物ホルモン添加解析

Streptomyces sp. YO38 株または *Streptomyces* sp. YO68 株を V-22 培地 70 mL を含むバツフルガラスコにて培養し、28°C、160 rpm にて 2 日間、培養した。この前培養液を A-3M 培地または A-11M 培地、A-16 培地 3 mL を含むディープウェルプレートに植菌し、28°C、1,000 rpm にて 3 日間、培養した。この培養液を半等量の *n*-ブタノールにて抽出し、濃縮乾固した後、DMSO に再溶解、(1)- と同様に逆相 HPLC にて解析した。

(3) 各種放線菌における L-トリプトファン添加解析

本実験では、植物内生放線菌 HN 株計 40 菌株と研究代表者が独自単離した海綿共生放線菌 ST 株計 57 菌株を使用した。海綿共生放線菌は、*Streptomyces* 属放線菌に加え、*Blastococcus* 属放線菌や *Micromonospora* 属放線菌や *Verrucosipora* 属放線菌などを含んでいる。

代謝物解析

各放線菌を 5 mM トリプトファンを含む TSB 培地 3 mL に植菌し、28°C、120 rpm にて 7 日間、培養した。培養液に等量のメタノールを添加し、菌体を破碎した後、その遠心上清を(1)- と同様に逆相 HPLC にて解析した。

L-トリプトファン応答性化合物の精製と物性解析

対象放線菌を 10 mM トリプトファンを含む TSB 培地 100 mL に植菌し、28°C、160 rpm にて 7 日間、培養した。培養上清を等量の酢酸エチルにて抽出し、濃縮乾固した後、シリカゲルクロマトグラフィーに供した。標的化合物を逆相 HPLC にて精製し、質量分析と NMR 解析に供した。

4. 研究成果

(1) 植物ホルモンが植物内生放線菌の代謝物生産に与える影響

植物ホルモンが植物内生放線菌の代謝物生産、すなわち二次代謝に与える影響を解析するため、4 種の植物ホルモン（MeJA, ABA, GA, ABA）を植物内生放線菌の培養液に添加し、その代謝物生産プロファイルを解析した。その結果、数菌株の植物内生放線菌が植物ホルモン混合液の添加にตอบสนองして、代謝物生産を変化させることが分かった。次に、放線菌代謝物に含まれる抗菌活性を検討するため、培養液を各種被検菌を用いたバイオアッセイに供し、被検菌の生育阻害度合いを観察した。その結果、*Streptomyces* sp. HN56 株などでは、その抗大腸菌活性が植物ホルモン添加に依存して新たに誘導される一方、*Streptomyces* sp. HN19 株などでは、抗酵母活性が植物ホルモン添加により増大することが分かった（図 2）。以上より、植物ホルモン添加による代謝物生産プロファイルの変動や抗菌活性の誘導・増大の現象が、複数種の植物内生放線菌にて観察されたことから、植物内生放線菌の二次代謝が植物ホルモンの影響を受ける可能性が示唆された。

次に、植物ホルモン依存的に生産誘導される *Streptomyces* sp. HN19 株の化合物を構造同定することを目指した。同菌株の培養液 1 L を有機溶媒抽出した後、シリカゲルクロマトグラフィーと逆相 HPLC により、植物ホルモン添加により生産誘導される 2 つの化合物を精製した。両化合物の質量を分析したところ、*m/z* 225.1490 と *m/z* 227.1655 のピークが観測された。一方、これら化合物からは明瞭な抗酵母活性は検出されなかった。NMR による構造解析のため、標的化合物の物質量をさらに得ようと試みたが、その生産性が著しく低下したため、生産性改善に向けた培養条件の検討を継続している。

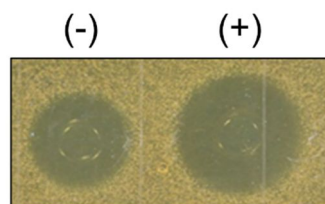


図2 *Streptomyces* sp. HN19株が示す酵母生育阻害活性
(-) 植物ホルモン非添加、(+) 植物ホルモン添加

(2) 植物ホルモンが植物関連放線菌の形態分化や代謝物生産に与える影響

根圏放線菌も植物ホルモンの影響を受ける可能性を考え、(1)と並行して、植物ホルモンが植物内生放線菌と根圏放線菌の形態分化や代謝物生産に与える影響を解析することにした。その結果、*Streptomyces* sp. YO4 株や *Streptomyces* sp. YO68 株を固体培養した場合、IAA と GA を含むペーパーディスク周辺では生育阻害を受けるが、そのさらなる周囲では放線菌の孢子形成や気菌糸形成などの形態が濃度依存的に不連続で分化する、もしくは色素生産が誘導されるなどの興味深い現象を見出した(図3)。このような類似の現象を複数の菌株において見出したことから、植物ホルモンが植物関連放線菌の固体培養における表現型に影響を与えることが分かった。また、抗菌活性成分の植物ホルモン依存性を検討した結果、*Streptomyces* sp. YO48 株の抗大腸菌活性は IAA もしくは GA、また両方の植物ホルモンにより誘導されることが分かった。

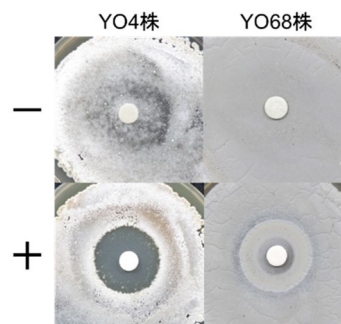


図3 *Streptomyces* sp. YO4株と *Streptomyces* sp. YO68株の形態分化に対する植物ホルモンの影響
-, 植物ホルモン非添加;+, 植物ホルモン添加

次に、液体培養における植物ホルモンの植物関連放線菌への影響を解析することにした。*Streptomyces* sp. YO38 株または *Streptomyces* sp. YO68 株を IAA を添加した液体培地にて培養し、培養液の *n*-ブタノール抽出物を逆相 HPLC にて解析した。その結果、複数種の化合物の生産性が IAA の添加により顕著に上昇することが分かった。これら化合物の一部は、IAA 類縁体の可能性が UV スペクトル解析より推察される一方、IAA のものとは異なる UV スペクトルを示す化合物も含まれていた。したがって、IAA シグナルに生産応答する放線菌化合物の存在が示唆された。以上より、植物関連放線菌の表現型は、固体培養や液体培養に関わらず、植物ホルモン、特に IAA の影響を受ける可能性が強く示唆された。

(3) L-トリプトファン添加により生産誘導される放線菌代謝物の解析

(1)(2)より IAA が放線菌の形態分化や二次代謝を調節する可能性が示唆された。しかし、IAA の化学構造がトリプトファンと類似することから、IAA 添加が放線菌のトリプトファン代謝経路を攪乱または改変しているのではないかと考えた。そこで、L-トリプトファンを植物内生放線菌または海綿共生放線菌の培養液に添加した結果、植物内生放線菌の 95%において、また海綿共生放線菌の 21%において、トリプトファン応答性物質が生産されることが分かった。これらのトリプトファン応答性物質の構造を解析したところ、アントラニル酸やインドール環を有する 3-(ヒドロキシアセチル)-インドールやインドール-3-カルボン酸、インドール-3-カルボキシアルデヒドなどであることが判明した(図4)。一方、海綿共生放線菌 *Kocuria* sp. ST21 株は IAA 生産能を有することも分かった。海洋放線菌が植物ホルモンを生産することは興味深く、IAA が放線菌にとり何かしらの普遍的シグナル分子として機能する可能性が示唆された。また、IAA または L-トリプトファンの添加における放線菌代謝物の HPLC プロファイルと比較解析すると、IAA 添加により生産誘導された化合物の一部は、トリプトファン代謝系物質である可能性が示唆された。しかし、トリプトファン代謝系物質「ではない」化合物も IAA 添加誘導物質に含まれていることも UV スペクトルや HPLC カラム保持時間の解析より分かった。

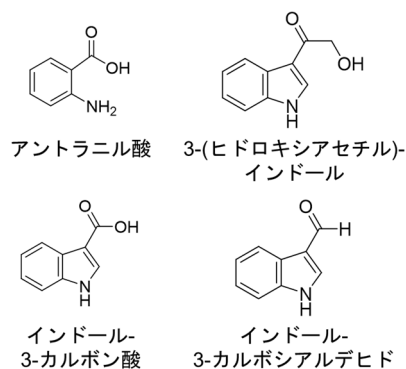


図4 L-トリプトファン添加により生産誘導される放線菌代謝物

(1)(2)(3)により、植物ホルモンである IAA が鍵分子となり、放線菌の休眠二次代謝を覚醒する、また形態分化を調節する可能性が示唆された。したがって、IAA を介した化学コミュニケーションが放線菌と植物の間に介在することが予想された。この IAA 化学コミュニケーションを活用すれば、新規有用物質を発見できるのではないかと考えられる。

< 引用文献 >

- Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, Herawati E, Iguchi H, Nishitomi K, Uchida M, Nagamitsu T, Omura S, Ikeda H, and Nihira T. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:16410-5. 2011.
- Okazawa A, Samejima H, Kitani S, Sugimoto Y, and Ohta D. Germination stimulatory activity of bacterial butenolide hormones from *Streptomyces albus* J1074 on seeds of the root parasitic weed *Orobancha minor*. *J Pestic Sci*. 46:242-7. 2021.

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 大塚 遼、佐藤 悠、宮崎 健太郎、本田 孝祐、木谷 茂
2. 発表標題 翻訳制御部位の選択的変異導入による放線菌二次代謝の包括的影響
3. 学会等名 日本生物工学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚遼、佐藤悠、宮崎健太郎、本田孝祐、木谷茂
2. 発表標題 リボソームRNA遺伝子の部位選択的改変が放線菌二次代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本放線菌学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤克哉、本田孝祐、木谷 茂
2. 発表標題 放線菌由来 -カルボリン合成酵素KsIBの機能解析
3. 学会等名 日本放線菌学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚遼、佐藤悠、岡野 恵司、本田 孝祐、木谷 茂
2. 発表標題 Streptomyces属放線菌における休眠遺伝子発現活性化を指向した塩基編集システムの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 木谷茂 (分担、青柳秀紀監修)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 264
3. 書名 未培養微生物研究の最新動向	

〔産業財産権〕

〔その他〕

青山学院大学 理工学部 化学・生命科学科 微生物化学研究室 https://www.agnes.aoyama.ac.jp/chem/kitani/ 大阪大学生物工学国際交流センター・分子微生物学研究室 https://hondalab.sakura.ne.jp/Molecular-M/

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
---------	---------