

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24780115

研究課題名(和文) 接合菌 - エンドバクテリア共生系における細菌クオラムセンシングの解析

研究課題名(英文) Study of zygomycete fungus-endobacterium symbiosis

## 研究代表者

甲斐 建次 (KAI, Kenji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：40508404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：接合菌 *Mortierella alpina* の細胞中にはエンドバクテリアが存在する。本研究では、接合菌と細菌の相互関係(共生)確立にはアシルホモセリンラクトン(AHL)を介したクオラムセンシング(QS)が重要な役割を担っていることを示唆した。このユニークな共生を成立・維持する上でのQSの機能と、その分子メカニズムの解明への基盤構築を目指し、AHLアンタゴニストを *M. alpina* に処理し、AHL産生量や菌の形態の変化を精査した。その結果、アンタゴニスト処理により目立った変化は起こらないことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Increasing evidence indicates that certain bacteria, namely endobacteria, inhabit fungal cells and establish symbiotic relationships with hosts. However, it has not been clear whether bacterial QS acts in developing the relationships. We isolated and identified C7-HSL and C8-HSL from the culture broth of *Mortierella alpina* A-178. This suggested the presence of endobacteria in the fungus, which was confirmed by PCR, FISH, and TEM. Two major bands detected by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis showed sequence identity with *Castellaniella defragrans* and *Cryobacterium* sp. The production of AHLs depended on the presence of endobacteria and was induced in response to the increase in the concentration of AHLs, suggesting that the bacterium conducts AHL-mediated QS in the fungus. This research is the first to report the production of AHLs by endofungal bacteria and raises the possibility that QS plays roles in the development of fungus-endobacterium symbiosis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物有機化学

キーワード：エンドバクテリア 接合菌 *Mortierella alpina* クオラムセンシング 共生

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らは、糸状菌代謝産物中に細菌クオラムセンシング制御物質を求めスクリーニングを行った。その結果、*M. alpina* A-178 が QS 応答性遺伝子レポーター系を活性化する物質を生産していることを見出した。活性物質を PDB 培養液から単離・構造決定し、それらが N-heptanoylhomoserine lactone (C7-HSL) と N-octanoylhomoserine lactone (C8-HSL) であることを明らかにした。さらに、PCR と fluorescence in situ hybridization (FISH) から、*M. alpina* 細胞中にバクテリア(エンドバクテリア)が存在し、エンドバクテリアフリー株では AHL が産生されないことが分かった。これらの結果から、糸状菌細胞中に存在するエンドバクテリアが AHL 依存の QS を行っていることを世界で初めて明らかにすることができた。

細菌には植物や動物などの高等生物の組織・細胞中に侵入して生育するものが多い。病原菌や共生菌などである。一方近年、真菌細胞中からバクテリアを発見した報告が相次いでいる。パイオニア研究者らはエンドバクテリアが真菌の生長、胞子形成、代謝プロファイルに係わっていることを報告している。最近になって、エンドバクテリアのタイプ分泌系が真菌-エンドバクテリアの共生関係成立に必須であることを示す論文が微生物学の一流ジャーナル誌に報告された。バクテリアのタイプ分泌系は宿主の組織・細胞への侵入で必須の機構であり、QS で制御されている例が多い。しかし、既報では QS との関係についてはディスカッションですら触れられていなかった。

## 2. 研究の目的

このユニークな共生は、真核細胞の共進化の途中、あるいは未知の共進化の結果の1つであるのかもしれない。もちろん、この推測はやや飛躍的ではあるが否定するのに十分な根拠もない。この共生系における細菌 QS の役割や分子メカニズムの解明は、異種微生物間相互作用というものを超えて、生物学のパラダイム変換を引き起こしうると考えている。さらに研究が進めば、欲しい形質を持った、あるいは人為的に形質を組み込んだ細菌を真核細胞にオルガネラとして導入するという新しい細胞工学技術の確立に繋がるかもしれない。本研究の成果・知見が、基礎から応用を含めた広いバイオサイエンスの発展にもたらす影響は計り知れない。

QS の機能を明らかにするには、エンドバクテリアの AHL 産生あるいはシグナリングを欠損させたときの共生系の変化を精査しなければならない。バクテリアの 16S rRNA をターゲットとした PCR-DGGE とシーケンス解析により、*M. alpina* にはグラム陰性菌 *Castellaniella defragrans* とグラム陽性菌

*Cryobacterium* sp. がいることが分かっている。AHL を産生しているであろう前者を *M. alpina* 細胞中から単離することを種々の条件で試みたが、これまでのところ達成できていない。前述したようにエンドバクテリアの場合、単離・培養できないことが多い。幸いにも、土壌から単離・培養された *C. defragrans* の数株が入手可能であったので、それらをドイツの研究機関から分譲してもらっている。これらの AHL 生合成遺伝子を同定し、続いて AHL 合成能欠損株を作製する。また、AHL はこれまでに様々な合成アンタゴニストが報告されている。申請者は、これまでの研究でこれらのアンタゴニストを既に合成しており、すぐに利用できる状態である。AHL 生合成能欠損と AHL アンタゴニストによる共生系の変化、例えば菌糸生長、胞子形成などの形態や代謝物プロファイル、を精査して、本研究の最終目標である接合菌-エンドバクテリア共生系の分子メカニズムの解明に繋がる知見を得る。

## 3. 研究の方法

平成 24 年度：初年度は AHL 生合成遺伝子の同定(項目 ) 合成アンタゴニストを用いた共生系の解析( ) と感染法確立( ) を進める。特に に注力する。

### C. defragrans における AHL 合成酵素遺伝子の同定

*C. defragrans* は、16S rRNA 系統樹解析の結果から *Burkholderia* 属の細菌と近縁であることが分かっている。*Burkholderia* 属の AHL 合成酵素遺伝子はこれまでに十数株において明らかにされており、高度に保存された領域が存在する。その領域に対して縮重プライマーをデザインし PCR により AHL 合成酵素遺伝子を見出す方法を考えている。予備的な実験の結果、何らかの PCR 増幅産物が得られることまで確認している。これらの産物の配列情報から既報の AHL 合成酵素遺伝子と高い類似性が認められれば、遺伝子全長をクローニングして合成酵素遺伝子の取得する。

取得した遺伝子を大腸菌を用いた発現系できちんと AHL 合成酵素として機能するかどうかを調べる。AHL 合成酵素遺伝子の大腸菌発現についてはすでに方法を確立させており、候補遺伝子さえ取得できれば問題なく活性の有無を判断できる状態にしている。

また、もし縮重プライマーを用いた合成酵素遺伝子の同定が上手くいかないときは、ショットガンシーケンス法で *C. defragrans* のゲノム DNA 配列を読破し、アノテーションを行って AHL 合成酵素遺伝子の候補を絞り込む。後者を行う場合は、専門業者にゲノム解析とアノテーションは外注し、得られた候補遺伝子をクローニングしてターゲットであるかどうかを精査する。

本項目は、研究を成功させるため必ず達成

しなければならない。しかしながら、申請者にとって専門領域外の部分がある。そのため、申請者と同一専攻内の微生物分子生物学を専門とする研究者にアドバイスをもらいながら進めることで、未経験の実験手法の取得にも努める。

#### 合成アンタゴニストを用いた共生系の解析

既に合成済みの AHL アンタゴニストをエンドバクテリアをもつ *M. alpina* に処理して、*M. alpina* コロニーの形態、生長、胞子形成への影響を調べる。同時に、HPLC と GC/MS による代謝レベルでの変化も追跡する。顕著に内生量が増減する代謝物はキー物質である可能性があるため、きちんと同定していく。あくまで、共生系解明への手がかりを取得することが目的なので、メタボローム解析ほどの高度な分析は本研究では行わない予定である。

#### *C. defragrans* の感染方法の確立

エンドバクテリアフリー *M. alpina* への *C. defragrans* の感染方法を確立する。現在、GFP 発現ベクター (Burkholderia 属細菌で機能したものをカナダの Calgary 大学の Ceri 教授に頂いた) を組込んだ *C. defragrans* の作製に取り組んでいる。これが成功すれば、蛍光顕微鏡観察で確実に宿主細胞内に感染したかどうか判断できるようになる。本組換え菌と *M. alpina* を共培養して、GFP 組込み細菌を直接観察して感染の成否を判断する。また、共培養で感染が達成できないときは、マイクロインジェクション法で直接宿主細胞内に *C. defragrans* を導入することを計画している。しかし後者は他機関に依頼しなくてはならないし、費用が多くかかることが予想されるので、共培養法での感染方法の確立をぜひとも成功させたい。

平成 25 年度：前年度の達成項目である を完成できていない場合は、 に研究のウェイトを置いて必ず達成させる。それが完了してから、次の 2 項目を進める。すなわち、AHL 生合成欠損体を作製し、*M. alpina* へ感染できるかどうかを調べる。

#### AHL 生合成欠損 *C. defragrans* の作製

前年度の項目 で明らかになった生合成遺伝子に対する遺伝子破壊カセット (オリゴ DNA 合成で外注) をデザインし、*C. defragrans* に導入して相同組換えを起こさせて AHL 欠損株を作る。欠損株は PCR、AHL 検出用バイオアッセイ、GC/MS による AHL 検出のうち最も適当な方法で選抜する。

#### AHL 生合成欠損株の感染と共生系における解析

前年度の項目 で確立した感染方法を使い、得られた AHL 欠損株が宿主に感染できる

かどうかを調べる。このとき、欠損株に と同様 GFP 発現ベクターを組込むと感染、宿主細胞内での生育が可能かどうかを蛍光顕微鏡で容易に観察できると思われる。宿主に対する感染能がなくなった場合は、感染段階における QS の重要性を検証する実験へとシフトする。AHL を外部から与えたときに感染能が回復するか否かを調べる。

#### 4. 研究成果

##### *M. alpina* 培養物からの AHL 類の単離・構造決定

QS は細菌が宿主へと侵入・感染する過程で必須な因子の発現調節に係わっていることから、AHL アゴニスト・アンタゴニストは新しい薬剤のリードになることが期待されている。そこで本研究では、糸状菌二次代謝産物中にグラム陰性細菌の AHL 依存 QS シグナリングを制御する物質を求めスクリーニングを行った。土壌より分離した約 3000 株の糸状菌を PDB 培地で培養して酢酸エチル抽出物を得、それらを AHL 応答性レポーター遺伝子を組込んだ *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 を用いたアッセイに供した<sup>3)</sup>。その結果、接合菌 *Mortierella alpina* と同定された A-178 株に強いアゴニスト活性が見出された。そこで本菌の産生する活性物質の単離・構造決定を進めた。約 140 L の菌培養物から、シリカゲルカラムクロマトグラフィーと HPLC により 2 種の活性物質を単離した。得られた物質が微量であったため、<sup>1</sup>H-NMR、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY と EI-MS のスペクトル情報が得られなかったが、AHL 類に特徴的な <sup>1</sup>H シグナルと EI フラグメンテーションが認められた (Fig. 1 に EI-MS データを示す)。合成標品と各種スペクトルデータの比較を行うことで、活性物質を既知の AHL である N-octanoylhomoserine lactone (C8-HSL) および N-heptanoylhomoserine lactone (C7-HSL) と同定した。この結果から精製過程で認められたマイナーな活性成分も AHL 類であることが予想されたので、AHL 類が EI-MS で特徴的に与える m/z 143 のフラグメントイオンを生ずる物質を GC/MS を用いて探索した。その結果、C6-, C9-および C10-HSL の 3 種の既知 AHL を同定した。一方、C10-HSL よりも分子量が 2 小さく、アシル鎖部分に二重結合を 1 つ有すると予想される新規な AHL (Fig. 2A) が検出されたので、その構造決定を進めた。

精製した新規 AHL のフラグメンテーションを詳しく解析したところ、アシル鎖の 4 位に二重結合があることが予想された (Fig. 2B)。さらに、ジメチルジスルフィド誘導体化<sup>4)</sup>を行って再度 EI-MS を測定したところ、Fig. 2C に示すように、二重結合はアシル鎖の 4 位にあることが明らかになった。以上のことから、本物質を N-(4Z-decenoyl)homoserine lactone (C10en-HSL) であると推定した。構

造を確定するために、推定化合物を化学合成した。出発原料 4-pentyn-1-ol のヒドロキシ基を THP 基で保護した後、n-BuLi を作用させて bromopentane とカップリングした。続いて、Jones 試薬を処理することで、THP 基の脱保護と続くカルボン酸までの酸化を行った。得られたカルボン酸に Lindler 触媒存在下で水素添加することでアシル鎖部分を構築した。最後に EDC で L-homoserine lactone とカップリングして目的物の合成を達成した。得られた合成標品と天然物との GC/MS データを比較したところ、それぞれの保持時間と MS が完全に一致した。よって、*M. alpina* A-178 株が産生する新規 AHL は C10en-HSL であることを決定した。また、キラル GC 分析により、天然 C10en-HSL は L:D = 9:1 の比であることが分かった。なお、D-C10en-HSL は D-homoserine lactone を用いて合成した。

#### *M. alpina* 細胞内に共生するエンドバクテリアの検出

*M. alpina* 培養物に含まれる活性本体が AHL 類であったことは、本研究の当初の目的であった新規な QS 制御物質の発見を達成するものではなかったが、本接合菌には細菌が内部共生しているという興味深い可能性が考えられた。そこで、*M. alpina* 菌系体からゲノム DNA を抽出し、細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅できるユニバーサルプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物をアガロース電気泳動に供したところ、ターゲットの増幅産物が検出された。増幅産物のシーケンス解析を試みたが、配列を決定することができず、増幅産物は複数種からなる可能性が示唆された。そこで変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を行ったところ、2 つの明瞭なバンドが検出された。それぞれをゲルから切り出してシーケンス解析したところ、 $\square$ -プロテオバクテリア *Castellaniella defragrans* と 100%、グラム陽性細菌 *Cryobacterium* sp. と 99.8% の相同性を示す細菌であることが分かった。細菌の 16S rRNA の保存性の高い領域にデザインされた Cy3 標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた蛍光 in situ ハイブリダイゼーションを行ったところ、*M. alpina* 細胞内に赤色蛍光を示す細菌様の構造物が認められた。加えて、菌系体切片を透過型電子顕微鏡で観察したところ、細胞内に細菌様の構造物が確認された。これらの結果から、本接合菌にはエンドバクテリアが共生していることが明らかになった。

エンドバクテリアによる AHL 産生の確認  
接合菌からエンドバクテリアを単離・培養することには成功しなかった。そこで、*M. alpina* 胞子を抗生物質 ciprofloxacin と spectinomycin を含む培地にスプレッドし、得られたコロニー株を培養したところ、ほとんどの株において *A. tumefaciens* NTL4 の AHL 応答性レポーター遺伝子を活性化しなかつ

た。また、連続的に抗生物質を処理して得られたエンドバクテリアフリー株では AHL 産生は全く検出されず、PCR においても 16S rRNA 遺伝子由来の増幅産物は検出されなかった。これらの結果から、エンドバクテリアが AHL 類を産生していることを確認した。

#### AHL 類の動態解析

エンドバクテリアが産生する AHL 類がオートインデューサーとして機能しているのであれば、環境中の AHL 濃度の上昇に伴ってそれらの産生量が増えるはずである。そこで、本共生系における AHL 類の動態を調べるために定量分析を行った。重水素標識した AHL を合成し、それを内部標準物質として本共生系で産生される AHL 類を GC/MS で定量した。なお、C10en-HSL は他の AHL 類と比べるとさらに微量であったため、今回は定量しなかった。その結果、培養液中ではより短鎖の C6-, C7-, C8-HSLs が多く検出され、より長鎖の C9-, C10-HSLs は主に菌系体中に存在していることが分かった。また、C8-HSL が主要な AHL として産生されており、培養開始後 2 から 3 週に濃度が急激に上昇することが分かった。そのような傾向は C6-, C7- および C9-HSLs でも認められた。さらに、菌系体中と培養液中のいずれにおいても、AHL 類は細菌の QS シグナリングを活性化するのに十分な濃度で存在していた。以上の結果から、今回見出された AHL 類はエンドバクテリアのオートインデューサーとして機能していることが強く示唆された。

#### アンタゴニスト処理の影響

エンドバクテリアがレセプターを介した QS を行っていることをさらに検証するために、同様の定量法を用いて合成アンタゴニストを添加した培地で培養した A-178 株が産生する AHL 類の定量分析を行った。まず、5 種の合成アンタゴニストを処理した PDB 培地で培養した A-178 株の菌体量と内生菌量を測定し、A-178 菌体の生育やエンドバクテリアの生存率に影響を与えないことを確認した。続いて、用いた合成アンタゴニストのうちの 2 種を用いて、AHL 産生量が変化するかどうかを調べた。合成アンタゴニストを 10  $\mu$ M、50 mM になるように添加した PDB 培地で A-178 株を培養後、AHL 類の定量分析を行った。その結果、いくつかの AHL 類においては産生量の減少が見られた。これは異なる AHL レセプターに対して、合成アンタゴニストが選択的に機能している可能性を示唆した。したがって、AHL 類の生合成がレセプターを介して調節され、本共生系においても AHL 類がオートインデューサーとして機能していることが推察された。

エンドバクテリアの単離・培養と再感染  
同じ *Mortierella* 属の接合菌である *M. elongata* のエンドバクテリアの単離・培養に

国内のある研究者が成功したという情報を得た。協力を仰ぎ、現在、*M. elongata* から単離・純粋培養されたエンドバクテリアを用いた再感染実験を進めている。また、*M. elongata* から単離したエンドバクテリアの培養条件を参考にして *M. alpina* からエンドバクテリアを単離・純粋培養を試みたが、現在のところ成功していない。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Kenji Kai, Kana Furuyabu, Ayaka Tani, Hideo Hayashi.

Production of the quorum-sensing molecules *N*-acylhomoserine lactones by endobacteria associated with *Mortierella alpina* A-178.

ChemBioChem, 13, 1776-1784, 2012. 査読有.

2. Kenji Kai, Koji Kasamatsu, Hideo Hayashi.

(*Z*)-*N*-(4-Decenoyl)homoserine lactone, a new quorum-sensing molecule, produced by endobacteria associated with *Mortierella alpina* A-178.

Tetrahedron Letters, 53, 5441-5444, 2012. 査読有.

〔学会発表〕(計1件)

1. 甲斐建次、古藪佳奈、笠松幸司、林英雄。接合菌内に共生したエンドバクテリアが産生するアシルホモセリンラクトン類。

天然物有機化合物討論会、2012年09月18日～2012年09月20日、東京農業大学。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

甲斐 建次 (KAI, Kenji)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・助教

研究者番号：40508404