

機関番号：24403

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780114

研究課題名（和文） 植物根から分泌されるアシルホモセリンラクトンミミックの解明

研究課題名（英文） Elucidation of AHL mimics secreted from plant roots

研究代表者

甲斐 建次 (KAI KENJI)

大阪府立大・生命環境科学研究科・助教

研究者番号：40508404

研究成果の概要（和文）：アルファルファの根から分泌される細菌クオラムセンシングシグナル様物質（AHL ミミック）を構造決定に足る量得る方法を検討した。根を有機溶媒で抽出するよりも、水耕栽培して得た根分泌物を活性炭カードリッジで連続的に回収する方がより多くの活性物質を得ることができた。細菌クオラムセンシング応答性遺伝子の活性化を指標として、根分泌物からの活性物質の精製を進め、活性物質を単離した。各種スペクトル解析の結果、本物質は AHL そのものであることを明らかにした。得られた物質が AHL であったことから、AHL ミミックの正体は植物由来の代謝物ではなく、共生細菌が産生・分泌する AHL である可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：I optimized the method to obtain active compound that mimics bacterial quorum sensing signal from root exudates of alfalfa plant. Activated charcoal effectively recovered the compounds from hydroponic culture of alfalfa. Finally, the compound could be purified by several chromatographic separation, and the structure was elucidated based on the spectroscopic and chemical methods.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

キーワード：アシルホモセリンラクトンミミック、アルファルファ、グラム陰性細菌、クオラムセンシング

1. 研究開始当初の背景

細菌は同種の菌密度をフェロモン様物質の濃度として感知し、協調的に振る舞う。この機構はクオラムセンシング (QS) と呼ばれている。本機構を制御する分子は、グラム陰性菌ではアシルホモセリンラクトン (AHL) である。本機構を遺伝学的に攪乱すると病原菌と共生菌のいずれも感染率の低下や感染形態の異常を示すことから、細菌の宿主植物への感染には同種菌間での QS シグナルの交換が重要であると考えられている。

近年、高等植物は根から AHL 様物質 (AHL ミミック) を根圏に分泌し、自分自身の周りの菌叢に影響を与えていることを示唆するデータが相次いで報告された。これまでにエンドウ、タルウマゴヤシ、トマトやイネでの生産・分泌が認められている。現時点で、AHL ミミックが共生菌と病原菌のどちらに作用しているのかは不明であるものの、新たな植物-微生物間相互作用として非常に注目され、その化学構造の解明が熱望されている。

AHL ミミックはラクトナーゼ処理により不活化することから AHL と同じようにラクトン環を有する物質であると予想されていた。また、有機溶媒に可溶性脂溶性物質であることも報告されていた。しかし、性状の違いから、植物種によっては産生している AHL の構造が異なることが推測されていた。しかし、これまでにその化学構造は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

植物は自ら動くことができないため、自然界では植物を中心に生物 (微生物、植物、動物) のコミュニティが形成されていると見ることができる。このような生態系の中で、植物根の周りの環境は特に根圏と呼ばれ、物質循環や植物への共生・寄生など種々の働きを持った微生物が生育し、植物との間で化学シグナルを介した情報のやり取りが行われている。このような生物間の相互作用は、高等植物が陸上に生活圏を拡大した約 4 億年前から始まったと予想される。このような長い時間をかけて確立されてきた植物-微生物間相互作用を 1 つずつ明らかにしていくことは、植物科学・微生物学・農芸化学分野の発展、しいては作物生産の飛躍的向上への基礎技術を与えうることが期待される。

本研究の最終目標は、細菌の QS を介した植物-細菌間相互作用の解明である。植物が分泌する AHL ミミックが細菌の QS システムに作用していることは明らかであるものの、その生態学的な意義は良く分かっていない。本物質は、根圏に存在する根粒菌の QS を促進して植物への共生を手助けしている可能性と、病原菌の QS システムを攪乱する防御手段である可能性が考えられている。これらをきちんと検証するためには、まず植物の生産する AHL ミミックを単離し構造決定をしなければならない。さらに、AHL ミミックの生合成経路・分泌機構が明らかになれば、AHL ミミックを起点として、膨大な根圏細菌群と高等植物との生物間相互作用が語れるようになることが期待される。

3. 研究の方法

Vittorio Venturi 博士より分譲してもらった AHL 活性検出用のレポーター系

Agrobacterium tumefaciens NTL4 を用いて AHL ミミックの活性を評価した。本株は AHL 応答性遺伝子 *traG* のプロモーターの下流にガラクトシダーゼ遺伝子 *lacZ* を連結したコンストラクトと AHL 受容体遺伝子 *traR* を恒常的に発現させるようにしたベクターを有し、AHL を極めて好感度で検出することが可能である。

具体的には、X-Gal とレポーター菌株を含む寒天培地をシャーレに入れてプレートを作製し、そこにサンプルを染み込ませたペーパーディスクを置き 24 時間後に周辺の培地の色 (X-Gal が加水分解されて青色になる) を観察した。

アルファルファの種子は種苗会社より安価で大量に購入した。自作の水耕栽培用プラスチックバスケットにプラスチックネットを張り、その上にパーミキュライトを 1~2 cm くらいの厚さで入れた。そこに滅菌・吸水処理した種子を蒔き 1 週間ほど育てる。その後、バスケットを 70 L 容の水耕容器の上にセットし、さらに 2 週間生育させた。その頃には大量の根が水耕液に浸り始めるので根分泌物の回収を開始した。根からの分泌物は、ポンプを用いて水耕液を活性炭に通して循環させることにより回収した。1 週間毎に水耕液と活性炭を交換し、活性炭からアセトンで脂溶性成分を回収した。アセトンを留去して得られる水性濃縮物から酢酸エチルによって活性成分を抽出し活性粗画分とした。

5000 L 分の水耕液から活性物質を集め、各

種クロマトグラフィーにより活性物質を単離した。はじめにヘキサン-酢酸エチル系を溶媒としたシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供した。その結果、80%酢酸エチル溶出画分に強い活性が認められた。ODS カラムを用いた HPLC で本画分の精製をさらに 3 回繰り返して行い活性物質を単離した。

単離できた活性物質は極めて微量であったため、十分な NMR スペクトルデータが得られなかったため LC/MS/MS に供して構造を推定した。その構造の物質を化学合成し、LC/MS/MS データが天然物と一致することを確認した。

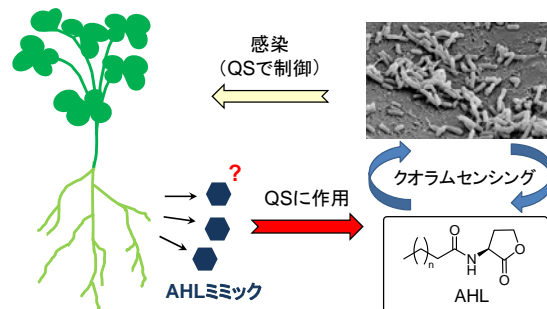


図1. QSを介した植物-細菌間相互作用

4. 研究成果

水耕液 5000 L 分の根分泌物から、各種クロマトグラフィーにより活性物質を単離した。しかし、それは極めて微量であったため、NMR では何ら有用な構造情報は得られなかった。そこでより感度よく構造情報を得るために、本化合物を LC/MS/MS に供した。その結果、炭素数 8 つのアシル鎖、アミド結合、ホモセリンラクトン環に由来すると予想されるプロダクトイオンが検出された。これは活性物質が *N*-octanoylhomoserine lactone (C₈-HSL) であることを示唆した。そこで、octanoyl chloride と homoserine lactone

hydrochloride から C₈-HSL を化学合成し、天然物の LC/MS/MS データと比較したところ、完全に一致した。したがって、アルファルファが産生する AHL ミミックを C₈-HSL と同定した。

この結果は、植物由来の AHL ミミックの正体は植物表層あるいは内生するグラム陰性菌が起源である可能性を提唱した。植物自身が積極的に共生菌に作用して AHL ミミックの産生・分泌を促進するメカニズムを有し、根圏の細菌叢を積極的に制御していることが示唆された。

アルファルファに共生する細菌を同定し、植物由来の代謝物などがシグナルとなって AHL 産生を制御しているのではないかと予想される。このような細菌は単独培養できずに、宿主の表層や組織内であるといった環境に生育が制限されることが多い。しかし、そういったタイトな共生関係であればこそ、化学物質を通した未知の化学相互作用が存在するかもしれない。実際、根粒菌と宿主植物との間では化学物質を介した情報のやり取りが盛んである。

アルファルファの他にも AHL ミミックを産生することが報告されている植物がいくつかある。これらの植物種からも AHL ミミックとして AHL 自身が単離されるかどうか今後の検討課題であろう。

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)

なし。

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・助教

研究者番号：40508404

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：