

令和元年6月5日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07656

研究課題名(和文)植物保護細菌の抗菌物質生産を制御する複雑な細胞間コミュニケーション機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of antibiotic production regulated by multiple cell-cell communication system in bacterial biocontrol agent

研究代表者

諸星 知広 (Morohoshi, Tomohiro)

宇都宮大学・工学部・准教授

研究者番号：90361360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca StFRB508株の抗菌物質フェナジン誘導体生産はクオラムセンシングに制御される。StFRB508株の全ゲノム配列を決定したところ、3組のAHL合成及びレセプター遺伝子のセット(phzI/R、aurI/R、csaI/R)が存在していた。これらの遺伝子を全ての組み合わせで多重破壊したところ、phzI/Rを破壊するとフェナジン生産が大幅に減少した。LC-MS/MS解析によりPhzIは複数の3-OH体AHLを生産するが、3-OH-C6-HSLが最も低濃度でフェナジン誘導体生産を活性化することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、化学農薬の使用に対する食の安全性や、持続可能な農業の観点から、微生物が持つ機能を病害防除に応用する微生物農薬が注目を集めている。ある種の細菌は、他の病原菌に対する抗菌物質を生産するが、安定性に欠ける面があり、詳細なメカニズムの解明が求められている。抗菌物質生産の多くは、細菌同士のコミュニケーションにより制御されていることが近年明らかになっており、本研究では、この複雑なコミュニケーション機構の解明を目指した。将来的に、病害防除効果が安定して持続する微生物農薬の開発に繋がる可能性があり、社会的にも意義の高い研究内容と言える。

研究成果の概要(英文)：Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca StFRB508 regulates phenazine production by AHL-mediated quorum sensing. The complete genome sequence revealed the presence of triplicate quorum-sensing gene sets, designated as phzI/R, aurI/R, and csaI/R. LC-MS/MS analysis revealed that StFRB508 produces six types of AHLs and the most important AHL is 3-OH-C6-HSL. PhzI mainly catalyzes the biosynthesis of 3-OH-C6-HSL. A mutation in phzI decreased phenazine production, but that in aurI or csaI did not affect phenazine production. Phenazine production by AHL synthase gene mutant was stimulated by exogenous AHLs and 3-OH-C6-HSL showed the highest effect on phenazine production at the lowest concentration tested. These results demonstrated that the triplicate quorum-sensing system plays an important role in phenazine production in StFRB508.

研究分野：微生物学

キーワード：クオラムセンシング 抗菌物質 アシル化ホモセリンラクトン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの細菌は、これまで単独で生命活動を行っていると考えられてきたが、近年、細菌も周囲の仲間と互いにコミュニケーションを取り合い、集団で連携して生命活動を行うことが明らかになってきた。さらに、細菌細胞間コミュニケーションを人為的にコントロールすることにより、感染症の防止や環境浄化機能の活性化など、諸問題の解決に繋がる可能性があり、近年注目を集める研究分野の一つとなっている。植物病原菌に対する増殖阻害効果を有する抗菌物質生産菌は、優れた植物保護効果を示すことから、微生物農薬としての実用化が期待されている。一方で、多くの抗菌物質生産菌は、実験室レベルでは安定した抗菌物質生産を示すが、実際の現場で散布しても思うような防除効果が得られないケースが多い。本研究では、植物保護細菌による安定した防除効果を得るためには、細菌細胞間コミュニケーション機構による複雑な抗菌物質生産制御機構の解明が不可欠であると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、病原性真菌の増殖阻害効果を有するフェナジン誘導体を生産する *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508 株をモデル細菌として使用した。本研究に先駆けて、StFRB508 株は細菌細胞間コミュニケーションの一つであるクオラムセンシングによりフェナジン誘導体の生産を制御しており、クオラムセンシングのシグナル物質であるアシル化ホモセリンラクトン (AHL) を複数種生産する事を明らかにしている。その一方で、複数種の AHL の生産に関わる遺伝子群の詳細は明らかになっておらず、複数種の AHL によるフェナジン生産制御機構も明らかになっていない。本研究では、StFRB508 株の全ゲノム配列を決定し、フェナジン生産及びクオラムセンシングに関わる遺伝子群を特定するとともに、遺伝子多重破壊株を作成することで、フェナジン誘導体生産制御にかかわる複雑なクオラムセンシングシグナルネットワークを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) StFRB508 株の全ゲノム解析

StFRB508 株の染色体は市販キットを用いて抽出し、Roche Genome Sequencer FLX Titanium シーケンサーを用いてシーケンシングを取得した。得られたリードデータはアセンブルを行い、最終的に得た単一のコンティグは、国立遺伝学研究所のオンラインプログラムである Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP) を使用してアノテーション作業を行った。最終的に得られたアノテーション済みゲノムデータは、国際塩基配列データベース (DDBJ/ENA/GenBank) に登録し、アクセッション番号 (AP014623) を取得した。

(2) 遺伝子破壊株の作成

破壊対象遺伝子をクローニングするため、StFRB508 株から染色体 DNA を抽出し、目的遺伝子を PCR により増幅した。PCR 産物は、pGEM-T easy ベクターにクローニングした。目的遺伝子の内部配列を欠損させた破壊遺伝子を増幅するため、欠損領域の外側に向かうように設計したプライマーを用いたインバース PCR を行った。増幅した PCR 断片は、制限酵素処理を行った後にセルフライゲーションし、内部配列欠損遺伝子を有するプラスミドを作成した。内部配列欠損遺伝子は、制限酵素処理により切り出し、遺伝子破壊用自殺ベクターである pK18mobsacB にサブクローニングした。

遺伝子破壊用プラスミドは、*E. coli* S17-1 λ pir を用いた接合伝達により StFRB508 株に導入した。染色体にプラスミドを巻き込んだ 1 回組み換え体を選択するため、100 μ g/mL カルベニシリンと 50 μ g/mL カナマイシンを混合した LB 培地上でコロニーを形成させた。プラスミドが染色体から欠落し、内部配列欠損遺伝子のみ残存した 2 回組み換え体を選択するため、10% スクロースを含む LB 寒天プレート上でシングルコロニーを形成させた。最終的な遺伝子内部配列欠損は PCR により確認し、この操作を繰り返すことで遺伝子多重破壊株を作成した。

(3) フェナジン誘導体生産の確認

各変異株によるフェナジン誘導体の生産は、LB 寒天培地プレート上におけるオレンジ色素の生産として評価した。フェナジン誘導体の生産を活性化するため、LB 寒天培地には 1% グルコースを添加した。フェナジン誘導体生産の強度は、(i) 特にオレンジ色素生産が強く、色素がコロニー周辺まで拡散しているもの、(ii) コロニーがオレンジ色に呈色しているものの、色素の拡散は見られないもの、(iii) コロニー及び周辺でオレンジ色の呈色が確認できないものの 3 段階で評価した。

(4) StFRB508 培養上清からの AHL 抽出及び構造解析

StFRB508 株及び遺伝子破壊株は、1% グルコースを含む 50 mL の LB 培地に接種し、30°C で 24 時間インキュベートした。遠心分離により細胞を除去し、ロータリーエバポレーターを用いて培養上清を濃縮した。上清濃縮物を 3 倍量の酢酸エチルを用いて抽出し、再度ロータリーエバポレーターを用いて抽出物を蒸発乾固させ、最終的に 500 μ L のジメチルスルホキシドに溶解した。抽出した AHL は、液体クロマトグラフィーとエレクトロスプレーイオン化法を用いた質量分析装置を組み合わせた LC-MS/MS を使用し、化学構造の解析及び定量を行った。

4. 研究成果

(1) StFRB508 株の全ゲノム解析

次世代シーケンサーを用いて StFRB508 株の全ゲノムを決定したところ、塩基数 6,997,933 bp の環状染色体のみで構成されていることが明らかになった。GC 含量は 62.82% であり、タンパク質をコードすると考えられる配列は 6,309 個、rRNA と tRNA はそれぞれ 16 個、67 個と推定された。StFRB508 株完全ゲノムから、クオラムセンシング関連遺伝子の探索を行ったところ、AHL 合成遺伝子及び AHL レセプター遺伝子のセットとして、*phzI/phzR*、*csaI/csaR*、*aurI/aurR* の 3 種類のクオラムセンシング制御系が存在することが明らかとなった。さらに、*Pseudomonas fluorescens* F113 株において第 3 の AHL 合成遺伝子として報告されている *hdtS* 遺伝子の相同配列が、StFRB508 株染色体中にも存在することが明らかとなった。

(2) StFRB508 遺伝子破壊株によるフェナジン誘導体の生産

クオラムセンシングとフェナジン誘導体生産との関連性を調査するため、StFRB508 株において、AHL 合成遺伝子 *phzI*、*aurI*、*csaI*、AHL レセプター遺伝子 *phzR*、*aurR*、*csaR*、フェナジン合成遺伝子 *phzCD* のノンマーカージン破壊を行った。AHL 合成遺伝子、AHL レセプター遺伝子においては、すべての組み合わせで遺伝子を破壊した多重破壊株の作製も行った。作製した全ての破壊株は、1% グルコースを添加した LB 寒天培地上にストリークし、視覚的にフェナジン誘導体生産を確認した。その結果を Fig. 1 に示す。まず、StFRB508 親株は高いフェナジン誘導体生産を示すが、フェナジン誘導体合成遺伝子クラスター自体を破壊した 508 Δ PZ 株はフェナジン誘導体生産を示さなかった。AHL 合成遺伝子破壊株に関しては、*aurI* 破壊株 (508 Δ AI) 、*csaI* 破壊株 (508 Δ CI) 、*csaIaurI* 破壊株 (508 Δ ACI) は StFRB508 親株と同程度の高いフェナジン誘導体生産を示したが、*phzI* 破壊株 (508 Δ PI) 、*phzIaurI* 破壊株 (508 Δ PAI) 、*phzIcsaI* 破壊株 (508 Δ PCI) は StFRB508 親株よりもフェナジン誘導体生産が減少した。また、*phzIaurIcsaI* 破壊株 (508 Δ PACI) はフェナジン誘導体生産が確認できなかった。以上より、StFRB508 株におけるフェナジン誘導体生産には 3 つの AHL 合成遺伝子から生産される AHL が関係しており、中でも PhzI により生産される AHL に強く応答する可能性が示唆された。

次に、各 AHL 合成遺伝子により生産される AHL が、どの AHL レセプターにより制御されるか明らかにするために、AHL レセプター遺伝子多重破壊株によるフェナジン誘導体生産を観察した。*aurR* 破壊株 (508 Δ AR) 、*csaR* 破壊株 (508 Δ CR) 、*csaRaurR* 破壊株 (508 Δ ACR) は StFRB508 親株と同程度の高いフェナジン誘導体生産を示したが、*phzR* 破壊株 (508 Δ PR) 、*phzRaurR* 破壊株 (508 Δ PAR) 、*phzRcsaR* 破壊株 (508 Δ PCR) 、*phzRaurRcsaR* 破壊株 (508 Δ PACR) はフェナジン誘導体生産が確認できなかった。以上より、AHL 合成遺伝子によって生産される AHL は、PhzR レセプタータンパク質と複合体を形成した場合にのみ、フェナジン誘導体合成遺伝子の発現を活性化する可能性が示唆された。

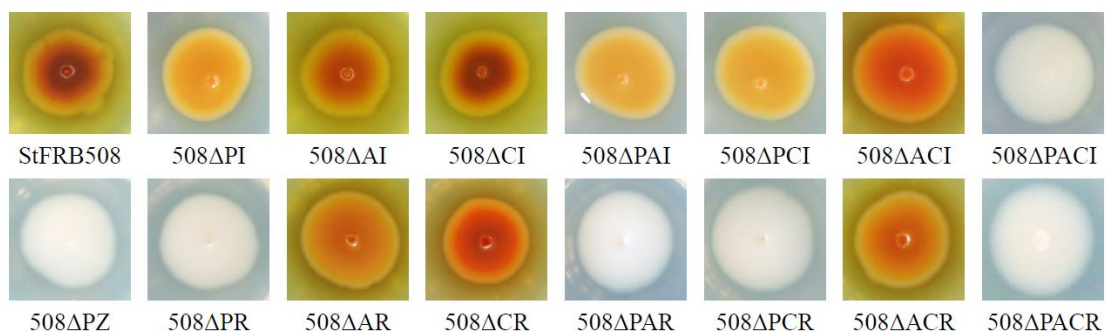


Fig. 1. StFRB508 株及びクオラムセンシング関連遺伝子破壊株によるフェナジン誘導体生産

(3) 各種 AHL 合成遺伝子により生産される AHL の構造解析及び定量

StFRB508 株の AHL 合成遺伝子多重破壊株を用い、LC-MS/MS を使用して生産する AHL の化学構造を解析した。AHL 合成標品の MS/MS フラグメントパターンと比較を行った結果、PhzI のみを発現する 508 Δ ACI 株の抽出サンプルからは 3-OH-C6-HSL、3-OH-C8-HSL、3-OH-C10-HSL、3-OH-C12-HSL が、CsaI のみを発現する 508 Δ PAI 株、AurI のみを発現する 508 Δ PCI 株の抽出サンプルからは、C6-HSL と 3-oxo-C6-HSL が検出された。次に、LC-MS/MS システムを用いて AHL の定量を行った結果を Table 1 に示す。StFRB508 株は主に 3-ヒドロキシ置換 AHL を生産するが、3-OH-C6-HSL が 6 つの AHL の中で最も高い濃度 (約 6 μ M) であった。PhzI のみを発現する 508 Δ ACI 株では、3-ヒドロキシ置換 AHL の濃度及び組成比は、StFRB508 野生株とほぼ同様であった。対照的に、AurI のみを発現する 508 Δ PCI 株、CsaI のみを発現する 508 Δ PAI 株については、StFRB508 野生株によって生産されるものよりも高い C6-HSL 及び 3-oxo-C6-HSL の濃度を示した。また、すべての AHL 合成遺伝子を破壊した 508 Δ PACI 株においても、ごく微量の 3-OH-C10-HSL が検出された。

Table 1. StFRB508 株及び遺伝子多重破壊株が生産する AHL の定量

Strains	StFRB508	508ΔACI	508ΔPCI	508ΔPAI	508ΔPACI
Functional AHL synthase	PhzI, AurI, CsaI	PhzI	AurI	CsaI	None
C6-HSL	218 ± 43 ^a	N.D. ^b	371 ± 86	4177 ± 28	N.D.
3-oxo-C6-HSL	159 ± 67	N.D.	3205 ± 692	426 ± 235	N.D.
3-OH-C6-HSL	6006 ± 713	6653 ± 2506	N.D.	N.D.	N.D.
3-OH-C8-HSL	1282 ± 412	1946 ± 874	N.D.	N.D.	N.D.
3-OH-C10-HSL	768 ± 210	809 ± 413	N.D.	N.D.	8 ± 12
3-OH-C12-HSL	2 ± 0	3 ± 1	N.D.	N.D.	N.D.

^a AHL concentrations are expressed in nM. ^b N.D., not detected.

(4) 508ΔPACI 株のフェナジン誘導体生産に対する AHL 化学構造の影響

自身が生産する AHL の影響をほとんど受けない 508ΔPACI 株を用い、外部から様々な構造や濃度の AHL を添加し、フェナジン誘導体生産量の比較を行った。結果を Fig. 2 に示す。3-OH-C6-HSL が全ての AHL の中で最も高いフェナジン誘導体生産の応答を示し、試験した最低濃度 (0.1 μM) でもフェナジン誘導体生産は誘導された。一方で、C6-HSL は 1 μM である程度のフェナジン誘導体生成を誘導したが、この誘導レベルは 3-OH-C6-HSL の約 6 分の 1 であった。3-oxo-C6-HSL 及び 3-OH-C8-HSL は、10 μM の濃度でフェナジン誘導体生産をわずかに誘導したが、3-OH-C10-HSL 及び 3-OH-C12-HSL は、試験した濃度でフェナジン生成を刺激しなかった。

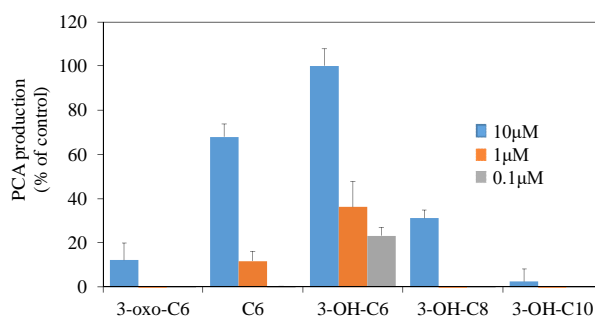


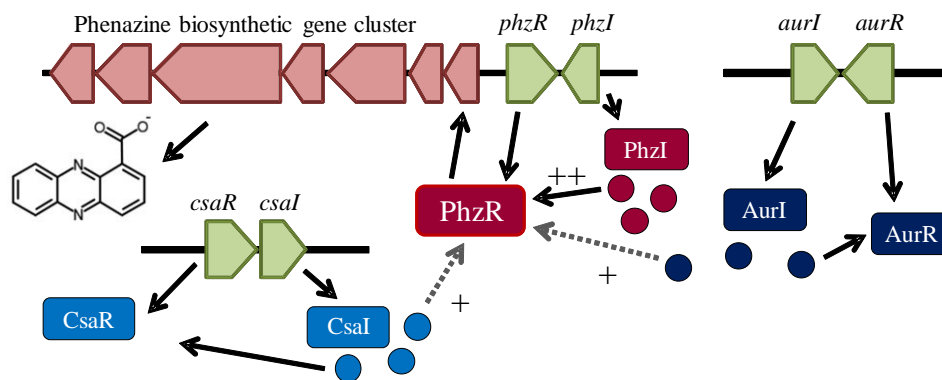
Fig. 2. フェナジン誘導体生産に対する各種 AHL の影響

(5) 本研究のまとめ

本研究では、StFRB508 株の各 AHL 合成遺伝子によって生産される AHL の化学構造の決定と定量を行い、フェナジン誘導体生産に対する AHL 化学構造の影響を調査した。その結果、PhzI は、AurI、CsaI とは異なり、3-OH-C6-HSL、3-OH-C8-HSL、3-OH-C10-HSL、3-OH-C12-HSL を生産していた。また、3-OH-C6-HSL は生産される量が他の AHL よりも多く、低濃度でもフェナジン誘導体の生成を誘導していた。また、AurI 及び CsaI の両方が C6-HSL 及び 3-oxo-C6-HSL を StFRB508 親株より高濃度で生産するが、2 つの AHL の組成比は AurI 及び CsaI の生成物において正反対であった。これらの原因として、AHL は S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) 及びアシルキャリアタンパク質から AHL 合成酵素によって生産されるため、それぞれの遺伝子の変異は SAM の過剰供給を引き起こすため、親株と破壊株で濃度が大きく異なるとも考えられる。また興味深いことに、3 種類の AHL 合成遺伝子すべてを欠損させた 508ΔPACI 株でも、少量の 3-OH-C10-HSL が生産された。StFRB508 株の完全ゲノム解析により、新たに AHL シンターゼをコードする *hdtS* 遺伝子相同体の存在が明らかになっている。Pseudomonas fluorescens F113 由来の *hdtS* を保有する大腸菌は、3 種類の AHL を合成することが報告されており、508ΔPACI 株の AHL 抽出物中に検出された少量の 3-OH-C10-HSL が HdtS によって生成されたと推定される。しかしながら、この濃度の 3-OH-C10-HSL ではフェナジン生成は誘導されないため、フェナジン合成遺伝子クラスターの発現は、3-OH-C10-HSL によって影響されないものと推察される。

以上の結果より、StFRB508 株でのフェナジン誘導体生産機構におけるクオラムセンシングの制御機構を Fig. 3 に示すように推察した。StFRB508 株のフェナジン誘導体生産は、PhzR をレセプターとしたクオラムセンシングにより制御されており、PhzI により生産される 3-OH-C6-HSL により主に制御されている。また、この系統とは別のクオラムセンシング系である AurI や CsaI から生産される AHL に対しても、わずかに PhzR が応答し、フェナジン誘導体生産を示す。以上から、StFRB508 株のフェナジン誘導体生産は、3 系統のクオラムセンシングによる多重制御を受けていることが示唆された。なお、現段階では *aurI/aurR* 及び *csaI/csaR* の 2 種類のクオラムセンシング系統がどのような性質を制御しているかについては明らかにな

ていないため、今後のさらなる解析が必要であると考えられる。



- ・ PhzIが主に生産するAHL
3-OH-C6-HSL, 3-OH-C8-HSL, 3-OH-C10-HSL
- ・ AurIが生産するAHL
3-oxo-C6-HSL, C6-HSL
- ・ CsaIが生産するAHL
3-oxo-C6-HSL, C6-HSL

Fig. 3. StFRB508 株において予想されるフェナジン誘導体生産制御機構

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. R. Sakuraoaka, T. Suzuki, and T. Morohoshi, Distribution and genetic diversity of genes involved in quorum sensing and prodigiosin biosynthesis in the complete genome sequences of *Serratia marcescens*, Genome Biol. Evol. 11, 931-936, 2019, <https://doi.org/10.1093/gbe/evz046> (査読有)
2. T. Morohoshi, T. Yamaguchi, X. Xie, W. Z. Wang, K. Takeuchi, and N. Someya, Complete genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* reveals a triplicate quorum-sensing mechanism for regulation of phenazine production, Microb. Environ., 32, 47-53, 2017, <https://dx.doi.org/10.1264/jsme2.ME16162> (査読有)

〔学会発表〕(計6件)

1. 伊藤雄大, 小笠原祐斗, 謝肖男, 染谷信孝, 諸星知広, 日本産野菜類病原性 *Pseudomonas* 属細菌における Quorum Sensing シグナリングの解析, 日本微生物生態学会第 32 回大会, 2018 年 7 月 11 ~ 13 日 (沖縄コンベンションセンター)
2. 小笠原祐斗, 伊藤雄大, 謝肖男, 染谷信孝, 諸星知広, 植物根から分離された蛍光性 *Pseudomonas* 属細菌株における Quorum Sensing シグナリングの解析, 日本微生物生態学会第 32 回大会, 2018 年 7 月 11 ~ 13 日 (沖縄コンベンションセンター)
3. 久勝順平, 染谷信孝, 竹内香純, 諸星知広, 植物保護効果を有する *Pseudomonas* 属細菌による抗菌物質生産制御機構の解析, 第 69 回日本生物工学会大会, 2017 年 9 月 11 ~ 14 日 (早稲田大学)
4. J. Hisakatsu, X. Xie, K. Takeuchi, N. Someya, T. Morohoshi, Complete genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* and the triplicate quorum-sensing mechanism for regulation of phenazine antibiotic production, International Unions of Microbiological Societies (IUMS) 2017, July 17-21, 2017 (Singapore)
5. 諸星知広, 山口貴人, 謝肖男, 竹内香純, 染谷信孝, 植物由来 *Pseudomonas chlororaphis* の抗菌物質フェナジン生産における Quorum Sensing 多重制御機構の解析, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 17 ~ 20 日 (京都女子大学)
6. T. Morohoshi, T. Yamaguchi, T. Ikeda, N. Someya, Multiple quorum-sensing systems in phenazine-producing *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* StFRB508, 2016 IS-MPMI XVII Congress, July 17-21, 2016 (Portland)