

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02899

研究課題名（和文）細胞間コミュニケーション分子の生合成と代謝から迫る青枯病菌クオラムセンシング機構

研究課題名（英文）Biosynthesis and Metabolism of Cell-Cell Communication Molecules for the Quorum Sensing Mechanism of *Ralstonia solanacearum*

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・准教授

研究者番号：40508404

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：ナス科作物を中心とした農作物に被害を及ぼす青枯病菌は、その病原力発現をクオラムセンシング（QS）機構によって調節している。本研究では、QS機構の細胞間コミュニケーション分子として機能する3-OH MAMEの生合成と代謝について研究を進めた。3-OH MAMEが立体・鎖長特異的に産生される生化学的な機構として、原料となる3-OH MAがそのACP結合体から立体特異的にチオエステラーゼによって切り出され、メチル基転移酵素であるPhcBによって鎖長特異的にメチル化されて3-OH MAMEへと変換されることを見出した。3-OH MAMEの分解に関わる可能性のあるエステラーゼの候補遺伝子を獲得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重要植物病原細菌である青枯病菌のQSシグナル分子の生合成・代謝という動態を明らかにすることは、病原力発現機構の巧妙さを学術的に明らかにすることに直結する。特に、QSのスイッチオン・スイッチオフの両機構におけるこれまでの知見は極めて曖昧なものであった。本研究を通して、その生化学的な側面の一端を明らかにできたと考えられる。さらに、このような知見は、QS制御による青枯病防除法の開発にも貢献する。特に、脂肪酸合成系・分解系をターゲットにする薬剤はこれまでに多く開発されてきたことから、そのような化合物群の中に有望なQS分子合成あるいは代謝の制御剤が含まれている可能性がある。

研究成果の概要（英文）：*Ralstonia solanacearum*, a devastating disease of eggplant and other crops, regulates the expression of its virulence by a quorum sensing (QS) system. In this study, we investigated the biosynthesis and metabolism of 3-OH MAME, which functions as a cell-cell communication molecule in the *R. solanacearum* QS system. 3-OH MAME is produced in a stereo- and chain length-specific manner by a biochemical mechanism in which 3-OH MA is stereospecifically excised from its ACP-bound form by a thioesterase, and then methyl esterified by the methyltransferase PhcB. We also obtained candidate genes for esterases that may be involved in the degradation of 3-OH MAME.

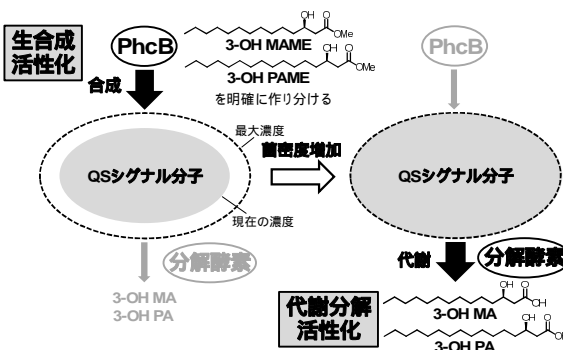
研究分野：天然物化学・生物有機化学

キーワード：青枯病菌 クオラムセンシング 生合成 代謝

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

他の細菌同様、QS シグナル分子合成能を欠損した青枯病菌は、宿主への病原性を消失する。このように重要な QS シグナル分子は、脂肪酸合成が起源である。そのため、細菌は一般に鎖長の異なる複数種の QS シグナル分子を作っている(作ってしまっている)が、大部分の細菌では問題になっていない。この生合成の曖昧さは、合成酵素の鎖長認識特性に起因する。一方、申請者らはこれまでの研究から、青枯病菌では、厳密に 3-OH MAME (C14 型) を作る株と 3-OH PAME (C16 型) を作る株に分かれていることを見出している。これまでのところ、そこに潜むメカニ



ズムは不明である。どうして、青枯病菌にだけそのような厳密さが必要なのであろうか。

細菌の密度上昇に伴い、QS シグナル分子の濃度が増加し、それが閾値に達するとレセプターに受容され、QS 制御下にある遺伝子群が発現誘導される。よく使われる QS の定型説明文である。しかし、この文では本機構の主役である QS シグナル分子の動態を正確に説明できていない。不要になった QS シグナル分子をどうにかしないと、QS がオンのままでは莫大なコストがかさみ細菌は死んでしまうだろう。つまり、QS シグナル分子の生合成と代謝分解が機能するタイミングが重要なはずである(右上図)。しかし、そのメカニズムに迫った研究は皆無である。これまでの QS 機構研究に、このような概念・着眼点が存在しなかった。

2. 研究の目的

世界規模で農作物と経済に甚大な損失を引き起こしている青枯病菌、その病原性を制御している QS 機構を明らかにし、本病害を化学制御することが究極的な研究目標である。近年、アフリカなどの途上国において、ジャガイモ・バナナなどの主要作物で被害が拡大中であり、対策が国際的に急務である。申請者らがこれまでの研究から得た「謎(問い)」を解き明かし、青枯病菌 QS 機構を体系的に理解し、他の細菌種での QS 機構研究にまで及ぶ広範囲なインパクトを与えること(基礎研究への波及効果)と、申請者が開発した QS 阻害剤を使った革新的な防除法開発に直結する知見(応用研究への契機)を得ることを目指す。

青枯病菌の QS シグナル分子である C14 型の 3-OH MAME は、申請者らが発見・報告したものである。研究コミュニティにおける本発見の評価は高く、一昨年に開催された The 6th International Bacterial Wilt Symposium 2016 (フランス)では、甲斐の講演(3-OH MAME の発見について)が口頭発表の最終演題に選ばれた。オーガナイザーであったフランス INRA の Genin 博士が本講演の座長を務め、我々の成果の重要性を聴衆に向けて説明してくれた。さらに、3-OH MAME の論文は、QS 研究の第一人者であるプリンストン大学の Bassler 教授らが発表した Nature Reviews Microbiology 誌の最新総説にも取り上げられている。加えて、QS 機構を特異的に阻害する化合物を 4 種開発することに成功しており、QS を化学制御できる準備は整いつつある(論文未発表)。つまり、申請者らが青枯病菌 QS 機構研究のフロントライナーであり、本研究自体に高い学術独自性がある。さらに、これまでの研究成果から得た独自の仮説、特にこれまでに検証されてこなかったメカニズムの解明、さらにその化学制御に直結するものであることから、本研究は高い創造性を有している。

本研究で得られる成果は、青枯病菌 QS 機構研究の新たな研究起点になり、今後、申請者らが本研究分野をさらに牽引していくことを可能にすると考えている。細菌学、植物病理学、生物有機化学への貢献は言うまでもない。青枯病菌 QS 機構制御法の開発による農業科学などの応用分野への波及効果も期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、青枯病菌 QS シグナル分子の生合成と代謝を化学・生化学・分子生物学的に精査し、本機構で鍵となる QS シグナル分子の細胞内外における動態と、関与する生化学因子を解明する。さらに、これらの知見を基に、開発済み QS 阻害剤に代謝抵抗性を付与する。

QS シグナル分子の生合成機構の解析:これまでの研究から PhcB 酵素を大腸菌で発現すると、組換え株が 3-OH MAME/3-OH PAME の生合成能を獲得することを確認済みである。E. coli BL21(DE3)株と pET ベクター系を用いて、His タグ融合タンパク質として PhcB 酵素を発現する。はじめに、真の基質の同定を行う。PhcB は、そのアミノ酸配列から、S-adenosylmethionine 依存のメチル基転移酵素であることに間違いはない。一方、基質はフリー脂肪酸、脂肪酸-ACP、脂肪酸

-CoA のいずれであるかは不明であった。そこで、3-hydroxymyristic acid/3-hydroxypalmitic acid、3-hydroxymyristoyl-ACP/3-hydroxypalmitoyl-ACP、3-hydroxymyristoyl-CoA/3-hydroxypalmitoyl-CoA を準備した。3-ヒドロキシ脂肪酸は試薬会社から購入でき、それらの ACP・CoA エステル体は酵素合成により調製した。これらの合成は、当研究室で確立済みの手法のため問題なく進めることが可能であった。これらの基質を用いて、脂肪酸部の鎖長に対する基質特異性、立体選択性、基質の細胞内動態を調べ、in vivo/in vitro の両面から生合成機構の解析を行った。

3-OH MAME 生産株である OE1-1 株、3-OH PAME 生産株である 8107 株と K60 株について、*phcB* 遺伝子を欠損した $\Delta phcB$ 株を作製し、3-OH MAME/3-OH PAME に対する応答性の比較に必要な菌株を用意した。欠損株作製法は、*phcB* 遺伝子上流・下流 1 kb ほどをクローニングして、遺伝子破壊カセットベクターを作製し、エレクトロポレーションにて青枯病菌に導入、分子内相同組換えによる遺伝子欠損によって行った。

作製した $\Delta phcB$ 株を用いて、3-OH MAME/3-OH PAME に対する応答性の違いを、各種病原因子(細胞外多糖、バイオフィルム、二次代謝産物)の産生エネルギーを調べることで精査した。また、RNA-Seq を用いた発現解析を行い、3-OH MAME/3-OH PAME に対する応答性を発現プロファイルとしても評価した。

QS シグナル分子の代謝機構の解析：3-OH MAME の菌体外における動態を予備的に調べたところ、3-OH MAME のメチルエステル部分が分解され、3-hydroxymyristic acid (3-OH MA) に変換された。つまり、代謝分解酵素の有力な候補はエステラーゼとなる。LC/MS/MS を用いて分泌タンパク質のプロテオーム解析を行い、候補エステラーゼを絞り込んだ。ゲノム情報から該当酵素の遺伝子を特定し、それらの欠損株を作製した。作製した欠損株が産生する 3-OH MAME/3-OH PAME の培養経時プロファイルを GC/MS で精査し、QS シグナル分子分解酵素の候補を同定した。QS シグナル分子の代謝酵素であるエステラーゼの欠損株作製とその解析を進めた。組換え酵素を用いて、本酵素の基質特異性を含めた生化学的解析を進めた。

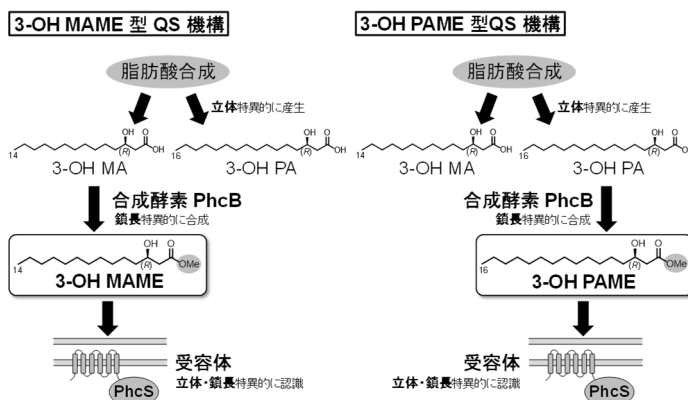
4. 研究成果

PhcB は、3-OH MAME 産生型と 3-OH PAME 産生型の株由来の酵素を大腸菌で His タグ融合タンパクとして発現・精製した。基質として C12-C18 の 3-hydroxy fatty acid を用意し、PhcB 酵素アッセイに供した。その結果、3-OH MAME 型は C14 の 3-OH MA に、3-OH PAME 型は C16 の 3-OH PA に対して高い活性を示すことが判明した。一方、各 PhcB 酵素の基質の立体化学認識は曖昧であることが判明した。

この結果は、青枯病菌が R 体の QS シグナル分子しか産生していない事実と矛盾していた。青枯病菌が産生する 3-OH MA と 3-OH PA の立体を調べたところ、ほぼ R 体であることが分かった。つまり、厳密な立体特異性が PhcB 酵素には必要でないことが明らかになった。次に、3-OH MAME を QS シグナル分子として利用する OE1-1 株の $\Delta phcB$ に対して、3-OH MAME あるいは 3-OH PAME を処理し、各種 QS 制御下にある病原因子の誘導能を比較したところ、自身の QS シグナル分子である 3-OH MAME には強く応答するものの、3-OH PAME への応答能は明らかに弱いことが分かった。これは 3-OH PAME 株を産生する K60 株においても同様で、自身の QS シグナル分子に特異的に応答して、QS 機構を活性化した。RNA-Seq を用いた発現解析もこれらの結果を支持した。以上の結果から、青枯病菌は基質供給と PhcB 酵素の特性を組み合わせることで QS シグナル分子を特異的に合成し、自身の QS シグナル分子に対し特異的に応答していることが判明した。本研究は、QS シグナル分子の立体特異的な生合成の詳細を明らかにした初めての例でもある。

QS 制御下にある 3-OH MAME 分解酵素の候補として、プロテオーム解析データと RNA-Seq データから 3 種のエステラーゼを見出した。これらの機能を推定するために、遺伝子欠損株を作製した。作製した株における 3-OH MAME と 3-OH MA 量を LC/MS を用いて定量した。その結果、寄与の大小はあるものの、3 種とも分解に関与する可能性が考えられた。そこで、*E. coli* BL21(DE3)と pET 発現系を用いて、酵素の異種発現系を構築した。現在、詳細な生化学的解析を実行中である。

さらに少し計画外の項目として、3-OH MAME の代謝抵抗性に関わる因子の探索も行った。青枯病菌は、菌体外に様々な高分子マトリクスを放出しているが、それらが代謝酵素の活性に大きく影響を与えている可能性があった。そこで、EPS とそれを束ねる役割を持つレクチンをそれぞれ過剰発現することで、青枯病菌の細胞外マトリクスをさらに増加させて 3-OH MAME 量がどのような影響を受けるのかを精査した。現在、結果が安定していないため、その原因を探索しているところである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Ujita Yumeto, Sakata Megumi, Yoshihara Ayaka, Hikichi Yasufumi, Kai Kenji	4. 巻 14
2. 論文標題 Signal Production and Response Specificity in the phc Quorum Sensing Systems of <i>Ralstonia solanacearum</i> Species Complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 2243-2251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acscchembio.9b00553	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 -

1. 著者名 Hayashi Kazusa, Senuma Wakana, Kai Kenji, Kiba Akinori, Ohnishi Kouhei, Hikichi Yasufumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Major exopolysaccharide, EPS I, is associated with the feedback loop in the quorum sensing of <i>Ralstonia solanacearum</i> strain OE1 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1740 ~ 1747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mpp.12870	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 -

1. 著者名 Kai Kenji	4. 巻 44
2. 論文標題 Bioorganic chemistry of signaling molecules in microbial communication	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 200 ~ 207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.J19-02	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 甲斐建次
2. 発表標題 植物と真菌に寄生する青枯病菌の化学コミュニケーション .
3. 学会等名 糸状菌相互応答学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究 分担者	大西 浩平 (Ohnishi Kouhei) (50211800)	高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・教授 (16401)	
研究 分担者	三浦 夏子 (Miura Natsuko) (80724559)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・助教 (24403)	

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