

機関番号：12605

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580109

研究課題名 (和文) 放線菌の自己孢子発芽抑制物質から探る

微生物に共通な孢子発芽の制御メカニズム

研究課題名 (英文) Elucidation of control mechanism of spore germination in microorganisms by self-germination inhibitors of actinomycetes.

研究代表者

夏目 雅裕 (NATSUME MASAHIRO)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：10201683

研究成果の概要 (和文) : *Streptomyces coelicolor* から4種の germicidin 類を単離し、その孢子発芽抑制活性と孢子内在量を調べた結果、germicidin 類は本菌の自己孢子発芽抑制物質として機能していることを明らかにした。しかし、germicidin が最初に単離された *S. viridochromogenes* の自己孢子発芽抑制物質を再検討したところ、主要な活性物質は germicidin ではない酢酸エチル可溶性の中性物質であることを発見した。また、*S. griseus* も類似の阻害物質を生産していることを見いだした。

研究成果の概要 (英文) : Four germicidins were isolated from *Streptomyces coelicolor*. Their germination inhibitory activity and contents in spores revealed that germicidins function as self-germination inhibitors. Reexamination in *S. viridochromogenes* indicated that the major self-germination inhibitor was found to be an EtOAc-soluble neutral substance. The similar inhibitor was also produced by *S. griseus*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：天然物有機化学

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：*Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces viridochromogenes*, germicidin, hypnosin, 放線菌, 発芽抑制物質

## 1. 研究開始当初の背景

微生物が、いつどのような状況で孢子を発芽させるかは、その生き残りに関わる重要な問題である。我々は植物病原性放線菌の一種メロンがんしゅ（癌腫）病菌が、そのままでは培地上で発芽しない孢子を約2割含み、SDS 溶液処理や加熱処理で発芽率が上昇するという論文（吉田ら、日植病報、1994）を読み、孢子発芽抑制物質の存在を予想して研究を進めた結果、その単離（Aoki ら、Biosci.

Biotechnol. Biochem., 2007）、構造決定（Aoki ら、J. Agric. Food Chem., 2007）に成功し、hypnosin と命名した。さらに、hypnosin は次に述べる発芽抑制物質 germicidin の生産菌 *S. viridochromogenes* やゲノムが明らかになっている *S. coelicolor* と *S. griseus* を含む数種の *Streptomyces* 属菌の孢子発芽も抑制する、*S. coelicolor* の孢子にも hypnosin が含まれている、といった予備的知見を得ている。

放線菌の孢子発芽抑制物質としては germicidin が *S. viridochromogenes* から単離構造決定されており、Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 阻害作用が報告されている (Petersen ら、*J. Antibiotics*, 1993) が、germicidin が真に自己発芽抑制物質といえるのか (孢子に存在すること、発芽抑制作用が可逆的であること、菌糸の生育には影響しないこと) や Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 阻害作用と発芽抑制との関連を説明する報告はない。最近、germicidin の生合成遺伝子・酵素が *S. coelicolor* で明らかにされ、数種の germicidin 関連化合物が単離された (Song ら、*J. Am. Chem. Soc.*, 2006) が、研究の関心はその遺伝子・酵素が従来植物にしか存在しないとされていた III 型ポリケタイド合成酵素であったことに集中しており、それらの化合物が生産菌の孢子発芽を制御しているかは不明である。

文献を精査したところ、hypnosin や germicidin と類似の構造を持ち、微生物の孢子発芽を抑制するとの報告がある物質として、dipicolinic acid (*Bacillus* 属細菌の自己孢子発芽抑制)、picolinic acid (糸状菌 *Piricularia oryzae* の自己孢子発芽抑制)、fistupyronone (*Streptomyces* 属放線菌が生産し糸状菌 *Alternaria brassicicola* の孢子発芽を抑制) など多くの物質があることに気がついた。

以上の知見に基づき、1) 放線菌の孢子には発芽抑制物質として hypnosin and/or germicidin が存在し、発芽の時期を調節している、2) 細菌や糸状菌の孢子の発芽調節メカニズムにも、放線菌と同様のステップが存在する、と考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、*Streptomyces* 属放線菌に共通の孢子発芽抑制物質の探索・解明と、細菌や糸状菌といった他種の微生物に対する活性の調査を目的として開始した。

## 3. 研究の方法

### (1) Hypnosin と germicidin の調製

発芽抑制活性の試験と定量の標品となる hypnosin は市販の 2-aminopyrazinecarboxylic acid をアセチル化して調製した。また germicidin は *S. coelicolor* から単離調製した。

### (2) 孢子発芽抑制活性試験

96 穴マイクロプレートを用いた吸光度法 [Aoki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 986 (2007)] により行った。

### (3) LC-MS 分析

Agilent 1100 LC system を接続した JEOL JMS-T100LC AccuTOF を用いた。カラム: Develosil ODS-UG 5,40-100% aq. MeOH + 0.1% トリフルオロ酢酸, 0.2 ml/min。

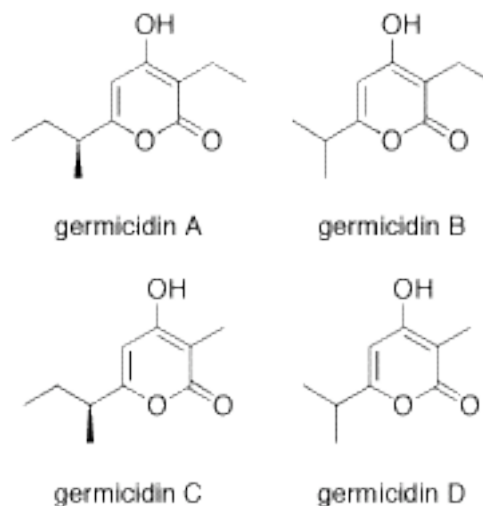
### (4) 発芽抑制物質の作用の可逆性と菌糸伸長に対する効果試験

先に報告した方法 [Aoki *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71, 986 (2007)] により行った。

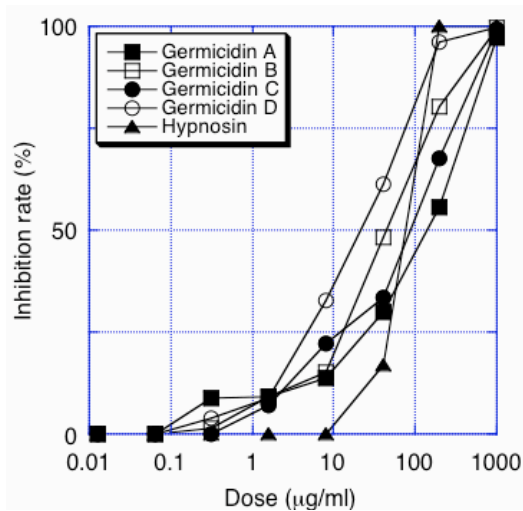
## 4. 研究成果

### (1) *Streptomyces coelicolor* の孢子発芽における germicidin 類の働きの解明

*S. coelicolor* が germicidin 類を生産するとの報告は既にあるが、その生理機能については知られていなかった、そこで、*S. coelicolor* の孢子から germicidin 類を単離し、それらの孢子発芽抑制活性を調査するとともに、孢子中の含量を測定した。その結果、4 種の germicidin を単離同定した。これらのうち germicidin A, B, C は先に Song らによって *S. coelicolor* から単離が報告されていたが、彼らが報告した isogermicidin 類は生産されていなかった。Germicidin D は Sugiyama らが *Streptomyces coeliflavus* から単離した surugapyrone A と同じ構造であったが、同一系統化合物であるため、germicidin D と呼称することにした。Germicidin A および C の絶対立体配置は、それらの比旋光度を、類似の構造を有する myxopyronin A および B のそれと比較し、計算化学により求めた安定コンフォメーションを比較することにより、図に示す通り決定した。Germicidin C は糸状菌の代謝産物 phomapyrone C と鏡像体の関係であることが明らかになり、生合成酵素の構造に興味を持たれる。

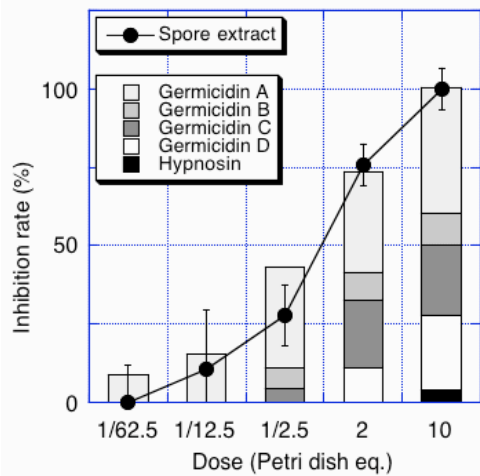


単離した 4 種の germicidin は *S. coelicolor* の孢子発芽を IC<sub>50</sub> 20-90 μg/ml で阻害し、我々が先に単離構造決定したメロンがんしゅ病菌の自己孢子発芽抑制物質 hypnosin も IC<sub>50</sub> 100 μg/ml であり、活性の強さに明らかな違いは認められなかった。



*S. coelicolor* 胞子に含まれる germicidin 類および hypnosin の量を LC-MS により分析したところ、germicidin A: 2.7, B: 0.4, C: 0.1, D: 0.1, hypnosin:  $0.2 \times 10^{-14}$  g/spore であった。

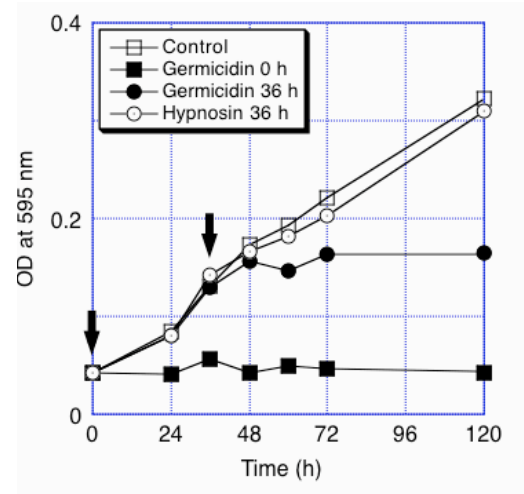
*S. coelicolor* 胞子抽出物の発芽抑制活性を調べて、その抽出物に含まれる量の発芽抑制物質が示す阻害率を上記の投与量-阻害率曲線から推定し、合計の推定阻害率を求めると下図のような結果が得られた。



この結果は、胞子抽出物の発芽抑制活性（折れ線グラフ）はその抽出物に含まれる量の発芽抑制物質が示すと推定される阻害率の合計（積み上げ棒グラフ）と良く一致していることを示しており、germicidin 類が *S. coelicolor* の自己胞子発芽抑制物質であることを示している。Hypnosin は本菌の発芽抑制にはほとんど関与していないことも明らかになった。

また、胞子を germicidin A 1,000 µg/ml で 3 時間処理し、その後遠心分離と再懸濁を 2 回行って germicidin を除くと、発芽阻害が回復することから、germicidin の作用は可逆的であることを明らかにした。

さらに、胞子を 36 時間インキュベートして発芽がほぼ完了した時点で germicidin A を作用させたところ、以後の吸光度の上昇が停止したことから、germicidin A は、胞子発芽だけでなく、菌糸の伸長も抑制することを明らかにした。Hypnosin は、同様の実験の結果、*S. coelicolor* の菌糸伸長を阻害しなかったことから、両者は異なる作用機構で胞子発芽を抑制していることが明らかになった。



## (2) Germicidin 類の *Streptomyces viridochromogenes* 胞子発芽に対する作用

上述の germicidin の *S. coelicolor* の胞子発芽に対する抑制活性は以前に論文に発表されていた *S. viridochromogenes* に対する活性 (IC<sub>50</sub> 5 ng/ml) に比べると非常に弱いものであった。そこで、*S. viridochromogenes* 胞子に対する germicidin の発芽抑制活性を我々のアッセイ方法で調べた。その結果、germicidin 類は *S. viridochromogenes* に対しても *S. coelicolor* と同程度かやや弱い活性であることを明らかにした。また、論文には germicidin A は活性を示すが、B は不活性であると報告されていたが、我々のアッセイ方法では 4 種の germicidin は同程度の活性を示した。この結果から、以前の論文の結果は発芽のごく初期の胞子の反応についてのものであり、発芽過程全体に対する作用を観察するには我々のアッセイ系の方が適当であることが明らかになった。

## (3) Germicidin および hypnosin の構造活性相関

上述のように、*S. viridochromogenes* の胞子発芽に対しては、germicidin 類の活性に差異は見られなかった。また、より構造の簡単な 3,6-dimethyl-4-hydroxy-2-pyrone も同程度の活性を示した。Hypnosin (3-acetylaminopyrazine-2-carboxylic acid) の類縁化合物である pyridine-2-carboxylic acid, 3-aminopyrazine-2-carboxylic acid および

dipicolic acid は germicidin 類と同程度の発芽抑制活性を示したが、pyrazinecarboxylic acid は不活性であった。

(4) 各種 *Streptomyces* 属菌の孢子中の hypnosin と germicidin の存在量の定量

*S. viridochromogenes* と *S. griseus* の寒天培養物から孢子をガラスビーズ法により集めて、抽出物を得た。LC-MS 分析の結果、*S. viridochromogenes* 抽出物からは germicidin A, B および germicidin D が検出されたが、その量はこれまでに調べたメロンがんしゅ病菌や *S. coelicolor* における含量と比べてかなり少なかった。また、*S. griseus* の孢子抽出物からは既知の発芽抑制物質は検出できなかった。

(5) *S. viridochromogenes* および *S. griseus* の発芽抑制物質の解明

これまでの結果から、germicidin は *S. viridochromogenes* の孢子発芽抑制活性が弱く、またその内在量も少ないことから、真の発芽抑制物質ではない可能性が高くなった。そこで、本菌の孢子を大量に集め、その抽出物を発芽抑制活性を指標に精製した。その結果、酢酸エチル可溶中性画分と酸性画分に発芽抑制活性が認められ、主要な活性物質は中性物質であることが明らかになった。

同様に *S. griseus* の発芽抑制物質を探索したところ、酢酸エチル可溶中性画分のみが発芽抑制活性を示した。既知の発芽抑制物質 hypnosin と germicidin はいずれも酸性物質であることから、中性の新規発芽抑制物質の存在を2種類の菌で確認できたことは新しい発見である。

両菌の酢酸エチル可溶中性画分の精製を進めた結果、発芽抑制物質はクロマトグラフィーで同じ画分に溶出されることが明らかになり、同一の発芽抑制物質が作用している可能性が示唆された。また、*S. viridochromogenes* 抽出物の部分精製画分は germicidin より低濃度で発芽抑制活性を示した。

一方、*S. viridochromogenes* の酸性画分に含まれる活性物質は germicidin とは異なるクロマト挙動を示し、germicidin より極性の高い化合物であった。

研究開始時には hypnosin と germicidin が *Streptomyces* 属放線菌の主要な自己孢子発芽抑制物質であると考えられる予備的な知見を得ていたが、本研究により *S. coelicolor* の孢子発芽は germicidin 類により制御されていることは明らかになったものの、germicidin が最初に単離された *S. viridochromogenes* では germicidin 以外の物質が真の孢子発芽抑制物質であることが明らか

になった。この物質は *S. griseus* の発芽抑制物質と良く似た物性であり、今後単離構造決定を進める予定である。*S. griseus* はゲノム解読が終了しており、発芽抑制物質の生合成遺伝子の解明、発現時期や調節機構の研究を通して孢子発芽の制御メカニズムを明らかにしていきたい。

## 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1件)

① Yuu Aoki, Daisuke Matsumoto, Hiroshi Kawaide and Masahiro Natsume, Physiological role of germicidins in spore germination and hyphal elongation in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *The Journal of Antibiotics*, 査読あり、掲載決定

[学会発表] (計2件)

① 夏目雅裕ら、放線菌 *Streptomyces coelicolor* の自己孢子発芽抑制物質、日本農薬学会第35回大会、2010年5月29日、札幌市

② 青木 友ら、放線菌の自己孢子発芽抑制物質(第5報) -Germicidin の働き-、2008年度日本放線菌学会大会、2008年7月10日、山梨市

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~chemreg/research/spore.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏目 雅裕 (NATSUME MASAHIRO)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：10201683

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし