

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21286

研究課題名（和文）低菌密度時にのみ産生される細菌二次代謝産物の生物学的重要性に迫る

研究課題名（英文）Importance of Bacterial Secondary Metabolites Produced Only at Low Bacterial Density

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：低菌密度時は、異種微生物との戦いにおいて不利な状況である。このような時に産生される物質には、重要な機能があるはずである。本研究では、QS欠損株を用いて疑似的に低菌密度状態を作り出し、その時に産生される二次代謝産物とその生物学的功能を解明することを目指した。青枯病菌のQS欠損株において顕著に蓄積し、真菌類に対して二次代謝産物抑制効果を示す物質が存在した。これらは別グループによる研究で既知化合物とされていたが、化学的な証明は曖昧で確認を得られなかった。そこでこれらの化合物を完全に単離し、NMRを用いて構造の検証を進めた。生合成と機能解析も進め、低菌密度時のみに機能する分子の生物学的重要性に迫った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム情報を有効活用することで、新しい天然物とその生合成遺伝子クラスターに効率良くアプローチする「ゲノム駆動型天然物化学」が原動力である。一方、ゲノム駆動型天然物化学が苦手とするのが、天然物がコミュニケーション分子として機能する化学生態学研究である。応募者は細菌の分子生物学・遺伝子工学的アプローチも得意とするところであり、ゲノム情報と各種欠損株を活用することで未知の化学コミュニケーション分子に積極的にアプローチする、「ゲノム駆動型化学生態学」を発展させていく。本研究構想は、微生物の化学生態学分野の研究を「質と量」の両方で向上するとともに、研究に要する「時間」を飛躍的に短縮することができる。

研究成果の概要（英文）：At low bacterial density, the situation is unfavorable in the fight against different microorganisms. The substances produced at such times should have important functions. In this study, we aimed to elucidate the secondary metabolites produced and their biological functions by creating a pseudo-low-density situation using a QS-deficient strain. Some substances were found to accumulate significantly in QS-deficient strains of *Ralstonia solanacearum* and to have inhibitory effects on secondary metabolites produced by the fungus. These were considered as known compounds in a study by another group, but the actual chemical proof was ambiguous and could not be confirmed. Therefore, we isolated these compounds in their entirety and proceeded to verify their structures using NMR. Biosynthesis and functional analysis were also carried out, and the biological significance of molecules that function only at low bacterial density was approached.

研究分野：天然物化学・生物有機化学

キーワード：低菌密度 クオラムセンシング 異種微生物間相互作用 二次代謝産物

## 1. 研究開始当初の背景

一昔前、二次代謝産物は生産者にとって「無駄な物」と見なされていた。現在、二次代謝産物が重要な生理機能を有するケースがあることに、異議を唱える天然物化学者はいないであろう。また一般的に、二次代謝は微生物の増殖が落ち着く培養中・後期に活性化すると言われてきた。実際、多くの二次代謝制御はこの概念に当てはまる。しかし、QS 欠損株の解析から、極めて低菌密度においてのみ、発現する二次代謝遺伝子群が存在することが分かってきた。しかし、その化学的な正体と機能は、ほとんどが不明である。本研究は既存の概念を拡張し、微生物は低菌密度で特定の二次代謝産物を積極的に産生する仕組みを持ち、それらが重要な生物機能を有することを証明する、挑戦的研究(萌芽)に相応しい課題である。

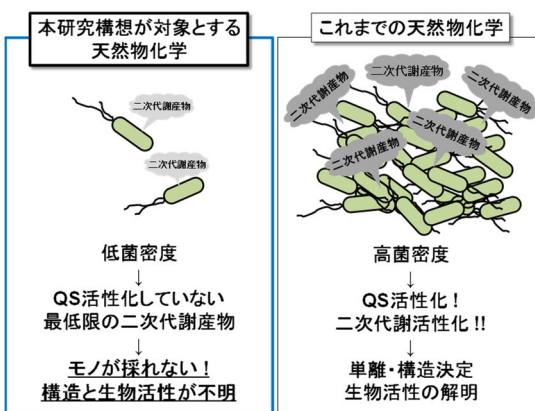
いくつかの先駆的研究において(例えば、Mao et al. (2017) PNAS など)、QS 欠損株で蓄積する新規二次代謝産物の報告がなされている。しかしこれらの研究では、通常サイレントな二次代謝生成遺伝子クラスターの活性化に主眼が置かれており、それらの系統的な単離・構造決定や生物活性の解析は試みられていない。新しい二次代謝産物やその生成遺伝子クラスターを見出す研究の重要性を否定する気はないが、時間をかけて現象解明してきた生物種(応募者の場合は青枯病菌)と向き合う研究者だけにしか、新しい生命現象とそこに関わるコミュニケーション分子の存在は見出せないと考える。驚くべきことに、青枯病菌は真菌類にも寄生する。真菌寄生における QS の寄与を調べる過程で、偶然、QS 欠損株と *F. oxysporum* を共培養すると、*F. oxysporum* の二次代謝が抑制される機構を見出した。この現象は、QS が正常に機能する野生株などでは再現できない。RNA-Seq による発現解析の結果、QS 欠損株においてのみ高発現する遺伝子群が存在することは分かっていた。つまり、低菌密度時においてのみ産生される二次代謝産物に真菌二次代謝抑制能を持つものが存在する。

## 2. 研究の目的

微生物由来の二次代謝産物を単離・構造決定する天然物化学研究では、微生物の培養が進むにつれて蓄積する化合物群が主役を担ってきた。二次代謝産物の産生能を上げるために培養法の最適化が行われ、我々天然物化学者は合目的(あるいは盲目的)にそれらの手法を取り入れて研究を進めてきた。しかし、菌密度の増加に伴って、強力に生成遺伝子の発現が抑制される化合物群が存在する(右図)。それらの化学構造と生物学的意義は、非常に限られた例しか報告されていない。低菌密度時とは、「異種微生物との戦い」において極めて不利な状況下である。このような時に産生・分泌する物質には重要な生物学的意義があるはずである。グラム陰性細菌は、菌密度の増加に伴って遺伝子発現を制御するクオラムセンシング(QS)機構が存在する。本研究では、青枯病菌 QS 機構欠損株を用いて解析することで、疑似的に低菌密度状態を作り出し、その時に産生される二次代謝産物の解明とそれらの化学生態学的機能を解析する。

青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* はナス科を中心とした農作物に萎凋病を引き起こすグラム陰性細菌であり、病原性発現を QS に依存している。応募者はこれまで、QS によってポジティブに制御される二次代謝産物を同定し、それらが植物に対する病原力発現に重要であることを明らかにしてきた。さらに近年、青枯病菌が真菌 *Fusarium oxysporum* の厚壁胞子内に寄生する現象を発見し、ここにも二次代謝産物が鍵分子として関与することを報告している。真菌寄生における QS の寄与を調べる過程で、偶然、QS 欠損株と *F. oxysporum* を共培養すると、*F. oxysporum* の二次代謝が強く抑制される現象を見出した。この現象は、QS が正常に機能する野生株などでは再現できない。RNA-Seq による発現解析の結果、QS 欠損株においてのみ高発現する遺伝子群が存在することは分かっていた。つまり、低菌密度時においてのみ産生される二次代謝産物に、真菌の二次代謝抑制能を持つ化合物が存在する。予備検討の結果、青枯病菌 QS 欠損株生育させた培地に合成吸着剤を処理すると、抑制活性の大部分がキャンセルされるため、抑制因子は脂溶性の低分子化合物であることまで掴んでいる。

本物質の同定と生物活性の解明は、これまでの天然物化学研究とは異なるインパクトを与える。意外なこともかもしれないが、異種微生物の二次代謝を抑制する活性をもつ天然物は、応募者の知る限り、報告されていない。また微生物生態学分野では、そのようなコンセプトのもとに研究は全く進められていない。真菌二次代謝抑制機構の発見と続く機能解析が進めば、将来的に植物病原真菌類が作る植物毒素を効果的に抑制する手法開発にも繋がる。本研究構想から得られ



る成果は、植物保護を中心とした応用分野への波及効果も高いと言える。

### 3. 研究の方法

本研究構想で重要な技術は、天然物の単離・構造決定、細菌の遺伝子工学、二次代謝メタボローム解析、真菌の発現解析の4つである。前者2つは研究代表者の甲斐が専門とする技術であり、メタボローム解析は分担者の岡澤、真菌の発現解析は谷がそれぞれ得意とする。さらに院生2名を加えた5名で、本研究構想の研究目的の達成を目指した。

小課題 真菌二次代謝抑制因子の単離・構造決定(担当 甲斐、院生A): 青枯病菌 QS 機構のマスター調節因子 PhcA の欠損株である  $\Delta phcA$  を、疑似的な低菌密度の維持菌株として利用する。これまでの予備検討で、真菌二次代謝抑制因子は合成吸着剤 HP-20 で吸着可能であることが分かっている。そこで、 $\Delta phcA$  株を大量培養して HP-20 吸着物を大量に集める。そして、真菌二次代謝抑制能を指標に、活性物質を各種クロマトグラフィーで精製する。アッセイは、小スケールの真菌培養→アセトン抽出→固相前処理→LC/MS 分析という流れでスループットに行うことが可能である。単離に成功したら、各種機器分析により目的物質の構造解明を達成する。

小課題 *F. oxysporum* 二次代謝産物の定量メタボローム(担当 岡澤、甲斐、院生B): 小課題では主要ピークの増減を指標に、活性物質を単離・構造決定するが、各成分によって応答が異なることが予備検討で分かっている。そこで、定量二次代謝メタボロームにより本現象を細分化して解析できるシステムを作る。これまでに構造決定された *F. oxysporum* の二次代謝産物の情報を収集し、LC/MS あるいは LC/MS/MS の検出メソッドを作成する。主要代謝物はフナコシの天然物ライブラリーから購入、構造決定を達成したグループに分譲依頼、あるいは単離・構造決定する。本分析システムを使い、*F. oxysporum* 二次代謝プロファイル調べ、どのような代謝物群に効果がある、また効果がないのかを明らかにする。

小課題 RNA-Seq による二次代謝抑制因子に対する *F. oxysporum* の応答解析(担当 谷、院生A): 小課題で明らかにした二次代謝抑制因子の効果を、RNA-Seq を用いて発現解析を行う。本研究構想では、明確な作用機構の解明は目標とせず、次回の科研費申請課題へと繋がる鍵遺伝子を発見することを目標とする。

小課題 二次代謝抑制因子の他の糸状菌における効果(担当 甲斐、岡澤、院生B): 小課題で明らかにした二次代謝抑制因子の効果を、他の糸状菌株を用いて検証する。応募者の研究室でストックしている20種ほどの主要二次代謝プロファイルが明らかなる菌株を用いる。当然、効果がない場合もある。その場合は、本抑制因子が青枯病菌と *F. oxysporum* 間という限定的な生物間相互作用で機能している、特異的な例の発見という結論になる。

### 4. 研究成果

青枯病菌の QS 欠損株において顕著に蓄積し、しかも真菌類に対して二次代謝産物抑制効果を示す物質の解明を進めた。そのような作用を示す物質は2種類存在し、いずれも既知化合物とされていたが、実際の化学的な証明は曖昧で確証を得られていなかった。そこで高極性物質を A、低極性物質を B と名付け、これらの効率的な単離・構造決定法の確立を目指した。

物質 A は極めて高極性であったため、ODS や種々の合成吸着剤ではまったく保持できなかった。陰イオン交換樹脂などには吸着したものの、水溶性物質の精製法を駆使しても完全に単離することはできなかった。やはり ODS のような分離能の優れたカラムで精製する必要があると判断し、種々の誘導体化を検討したところ、エチル化を行うと化合物が安定化され、ODS への保持が劇的に向上した。さらに予備精製にイオン交換樹脂を使うと、エチル化の効率が高くなることも見出した。これらの方法を組み合わせることで、培養液 2 L だけから物質 A を構造決定に足る量を得ることができた。各種 NMR 解析の結果、物質 A はシデロフォアとして知られる staphyloferrin B であることが分かった。導入したエチル基を安定的に除去することさえできれば、今後種々の生物検定に使用できるだけの量の staphyloferrin B が簡便に調製できる。

一方、物質 B は疎水性が高く抗真菌活性を示した。物質 B は培養液 2 L 分の酢酸エチル抽出物から ODS カラムと HPLC を用いて単離した。各種 NMR 解析の結果、物質 B は同じくシデロフォアとして知られる micacocidin A であることが分かった。ただし、立体配置まで一致しているのかどうかは現在、検証を進めている最中である。

これらの化合物の機能についてより詳細に解析するために、生合成酵素遺伝子の候補を RNA-Seq データから探索した。QS 欠損条件と鉄欠乏状態で発現量が上昇する遺伝子として5種の遺伝子がピックアップされた。それらは、PKS や NRPS などのシデロフォア生合成に関与することが示唆される遺伝子群である。それらの遺伝子の欠損株を作製し、staphyloferrin B と micacocidin A の生産量がどのようになるのかを現在調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	岡澤 敦司  (Okazawa Atsushi)  (10294042)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授   (24403)	
研究分担者	谷 修治  (Tani Shuji)  (80405357)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授   (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