

Pseudomonas protegens における クオラムセンシング機構の化学的解明

Chemical Characterization of the Quorum Sensing System In *Pseudomonas protegens*

大阪公立大学大学院農学研究科 甲斐 建次



グラム陰性細菌の大きな 1 群である *Pseudomonas* 属細菌は、Gac/Rsm と呼ばれる独自の細胞間コミュニケーション機構を持ち、いわゆるクオラムセンシング (QS) 様の挙動を示す。2001 年に本機構で機能する二成分情報伝達系 GacS/GacA とシグナル伝達因子 Rsm が発見されて以来、世界中の研究者が GacS リガンド同定に取り組んできた。Gac/Rsm 型 QS システムは、土壌に生息する *Pseudomonas* 属細菌からヒトに日和見感染症を引き起こす *Pseudomonas aeruginosa* まですべて保存されており、*Pseudomonas* 属細菌の特性を最上位で制御している。しかし、GacS リガンドの正体解明の研究は、22 年間ほとんど進展がなかった。そこで、微生物学的に大きなインパクトを持ち、かつ難攻不落の化合物の正体を明らかにすることを目指した。

Pseudomonas 属細菌の中で、比較的 Gac/Rsm 型 QS システムの研究が進んでおり、かつ実験遂行上の制約が少ない、環境から植物保護細菌として分離された *Pseudomonas protegens* Cab57 株を使って実験を進めることにした。GacS リガンドを単離するには、その生合成遺伝子候補を見つけ、リガンド生合成能欠損株を使うのが最も良い方法であると考えた。そこで、Cab57 株に対してトランスポゾン Tn5 を用いたランダム変異を導入し、その中から GacS 合成酵素変異株を選抜することにした。Tn5 導入により、約 2000 株のランダム変異株を得た。その中から、QS に負に制御されるシデロフォアの産生が増加した株を 1 次スクリーニングで選抜した。なお、このシデロフォアはピオベルジンと呼ばれる化合物であり、UV 照射により緑色蛍光を示すため、UV ライト照射下、目視で候補菌株を選抜できた。続いて、選抜した菌株を培養し、2 次スクリーニングで QS 制御下の二次代謝生産が消失する株を LC/MS を用いて選抜した。その結果、1 株の Tn5 変異体を選抜された。詳細な解析により、PPC5492 遺伝子に Tn5 変異が導入されている、つまり、この遺伝子を QS シグナル分子の生合成遺伝子の候補として得た。さらに、PPC5492 遺伝子の完全な欠損株を作製し、 Δ PPC5492 において本菌の QS が欠損することを確認した。また、野生株の培養物を添加すると、やや効率が悪いものの QS が再起動することも確認された。 Δ PPC5492 に対して野生株培養物のメタノール抽出物を処理すると、二次代謝物の産生が回復した。この株を使い、Cab57 株培養物から GacS リガンドの精製にトライし続けた。

しかし問題が生じ、突如として上記の実験が再現できなくなった。欠損株を再度、デザインを変えて作製しなおしても同じ結果であったことから、PPC5492 遺伝子が GacS リガンド合成酵素遺伝子ではない可能性が高くなった。この結果は、研究遂行上の大きな痛手ではあったが、間違った方法では GacS リガンドを得ることはできないので、バイオアッセイ法の再検討を進めることにした。講演では、その後何とか盛り返しを試みた結果を全て報告させて頂く。

【キーワード】 *Pseudomonas*、クオラムセンシング、Gac/Rsm

【参考文献】

- Latour, X. The Evanescent GacS Signal. *Microorganisms* **2020**, 8, 1746.