

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*

(日本農芸化学会推薦)

代表研究者 大阪公立大学 甲斐 建次 Osaka Metropolitan University Kenji Kai

The genus *Pseudomonas*, a large group of Gram-negative bacteria, possesses a unique intercellular communication system called the Gac/Rsm system and exhibits behavior similar to quorum sensing (QS). Since the discovery of the two-component signal transduction system GacS/GacA and the signal transduction factor Rsm, which function in this system, in 2001, researchers worldwide have been working to identify GacS ligand. However, the natural ligands for this system remain unknown. Here we try to identify the GacS ligand from *Pseudomonas protegens* Cab57. We proceeded to identify biosynthetic gene for GacS ligand from random mutant library and planned to conduct bioassays using a GacS ligand-mutant and efficient production using a gene-overexpressed strain. However, we were unable to discover the GacS biosynthetic enzyme gene, and the experimental plan encountered difficulties. Nevertheless, we established an assay method using secondary metabolites as indicators and made progress in partial purification of the GacS ligand. Additionally, the new regulatory system involving secondary metabolite discovered during this study may propose a novel mechanism for intercellular communication in bacteria

研究目的

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 (図 1)。しかし、本機構の天然リガンドは未だ謎のままである。Gac/Rsm 型 QS システムは、土壤に生息する *Pseudomonas* 属細菌からヒトに日和見感染症を引き起こす *P. aeruginosa* まで保存されており、*Pseudomonas* 属細菌の特性を最上位で制御している。

Gac/Rsm 型 QS システムに関する総説は、毎年のように更新されてきた。この状況が物語るように、本テーマは微生物学で重要かつトピックな研究分野である。世界には、*Pseudomonas* 属細菌を専門として扱う多数の研究グループが存在している。しかし、いずれの研究グループも、チーム内に物取りを専門

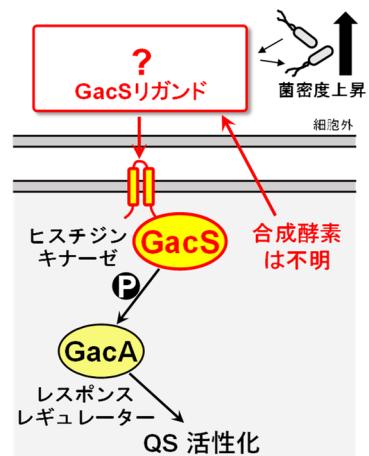


図1. GacSリガンドが制御するGac/Rsm型QS機構

とする天然物化学者が含まれておらず、肝心の GacS リガンドの解明へは程遠いと傍観してきた。実際、22 年間も進展がない。しかし物取り屋の血が騒ぎ、この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したいと考え、本研究構想を提案することにした。

私はこれまでに、同種・異種微生物間で機能する多くの化学コミュニケーション分子を解明してきた。実績と研究環境は十分であると考えている。そこで本研究では、同種微生物間コミュニケーションの enigma とも呼ばれる *Pseudomonas* 属細菌の QS シグナル分子 (GacS リガンドと呼ぶことにする) を解明し、受容体との結合を解析し、さらにその下層で機能する新しい QS 機構の解明も進める。この研究を通して、微生物学・天然物化学分野におけるブレークスルーを達成することを目指した。

研究経過

GacS リガンド合成欠損株の作製: GacS リガンド合成酵素遺伝子の候補を見出せば、欠損株はバイオアッセイに、過剰発現株はリガンドの効率的生産に使用することが可能である。*P. protegens* Cab57 株にトランスポゾン 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を計画した (図 2)。

はじめに、野生株である Cab57 株に対し Tn5 変異導入を実施して、約 2000 株のランダム変異株を得た。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る (図 2)。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 変異体が選抜された。

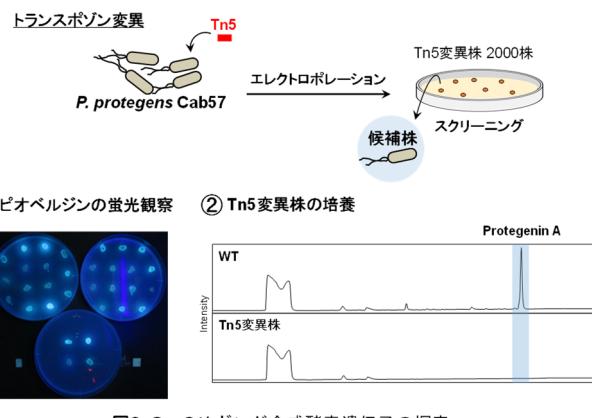


図2. GacS リガンド合成酵素遺伝子の探索

シーケンシングと BLAST の解析により、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ることに成功した。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 (図 3A)。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 (図 3B)。

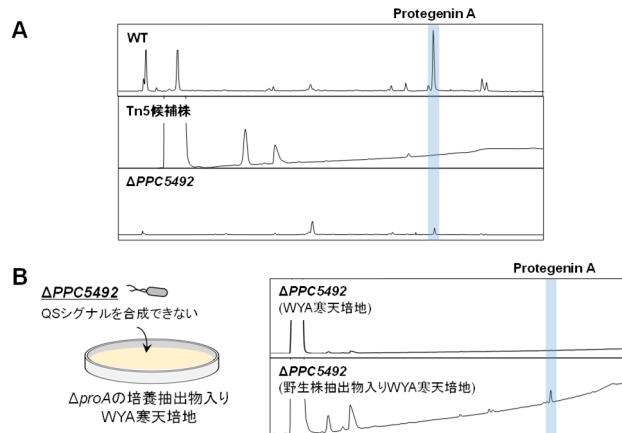


図3. (A) 野生株、Tn5変異株、 Δ PPC5492株のプロファイル比較
(B) 野生株培養抽出物による Δ PPC5492株における二次代謝の回復

PPC5492 過剰発現株の作製: GacS リガンドの単離・構造決定を進める場合、過剰発現株から進める方が効率的にターゲット分子を集めることができる。そこで、*psbA* プロモーター制御下で pDSK519 改変ベクターを用いて *PPC5492* 遺伝子を過剰発現した組換え株を作製した。

この過剰発現株において、QS が顕著に活性化しているのかを調べるために二次代謝産物プロファイルを調べたが、野生株に比べて劇的に変化はなかった。そのため、この過剰発現株は、GacS リガンドの単離に向けて良い材料にはならない可能性が高いことが分かった。

PPC5492 遺伝子は GacS リガンド合成酵素ではない: 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 (図 3B) しかし、担当学生が交代すると再現できなくなった。その後、私自身も何度もトライしてみたが、前任者のような結果が得られなかった。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かった。

配列の詳細を解析した結果、一部伏せさせて頂く部分はあるが、シデロフォアの産生に関与する遺伝子である可能性が高く、PPC5492 遺伝子は偽陽性として選抜された可能性が高いと推測した。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。

二次代謝の活性化を指標としたバイオアッセイ法の検討: *Tn* 変異を導入したランダムスクリーニングの再トライも考慮に入れたが、同じようにシデロフォア産生や QS 調節に関わる因子を見出してしまう可能性があった。そのため、*GacS* リガンド合成遺伝子の同定を起点としたアプローチを見直し、時間がかかることが予想されたが正攻法である野生株からの活性ガイドのリガンド精製を検討することにした。

前述したように、*P. protegens* Cab57 株の二次代謝物の産生は QS 制御下にあり、QS 欠損株では産生が消失する。そこで、野生株の培養物抽出物を、これから野生株を培養する培地に添加して、二次代謝がより早く活性化しないかを検討することにした。しかし、この方法では添加する抽出物中にも、野生株産生した二次代謝産物が含まれるためアッセイ結果を間違って解釈してしまう可能性がある。それを防ぐために、培養中物を ODS カラムで分画した後に、その画分を添加誘導実験を行うことにした。この方法であれば、QS 誘導活性が特定の画分に見られ、元々含まれていた二次代謝産物との区別が容易になることが期待された。

Cab57 株を 1/10 TSB 培地 (2.4 L) に植菌し、20°C で旋回培養した。得られた培養上清から合成吸着剤を用いて活性成分を回収した。そのアセトン溶出物を ODS カラムに供し、水-メタノールの混合溶媒系で 20%毎にメタノールの含量を増加させ、0~100% メタノールで溶出を行った。その濃縮物をそれぞれ培地に添加して *Cab57* 株を培養し、生産された二次代謝産物を LC/MS で分析した。その結果、80%メタノール画分は、調べた二次代謝産物 (ジアセチルフルロログルシノール、プロテジエニン、ピオールテオリン、オルファミド) の産生を共通して誘導することが分かった (図 4)。つまり、この画分に *GacS* リ

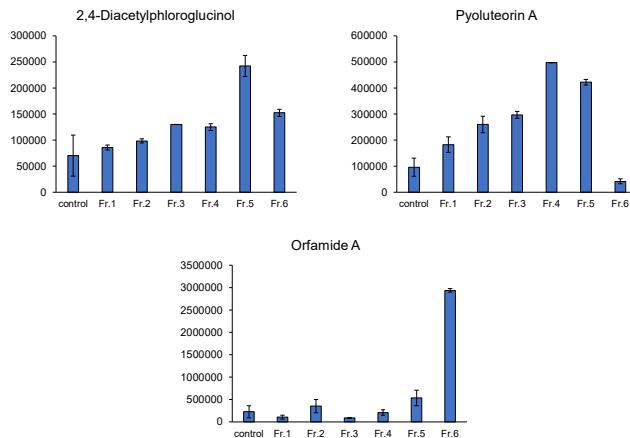


図4. 野生株抽出物のODSカラム後Frの二次代謝誘導能の比較

ガンドが溶出されていることが分かった。現在、本アッセイ法のスループット性を向上させる工夫を模索しつつ、活性物質の単離を進めている。

オルファミドによる QS 制御現象の発見: *GasS* リガンドの実験を進めている際に、思いもかけず、オルファミド (図 5) というリポペプチド性の二次代謝産物が QS 制御に関与する可能性を見出したので、その点についても報告を行う。

前述のように、オルファミドの生合成は *Gac/Rsm* 型の QS システムによって制御されている。それは、その生合成遺伝子である *orfABC* の発現が、QS 制御下にあるためであるとされている。オルファミドの生産量は、他の二次代謝産物に比べて多いため、この生産をストップさせれば、*GacS* リガンドの精製が進めやすくなると考えて、*orfA* 欠損株を作製した。

その結果、*orfA* 欠損株は期待通りオルファミドの生産はストップしたものの、他の二次代謝産物の生合成もストップすることが分かった (図 5)。QS 制御下にあるリポペプチドがフィードバック的に、QS 機構を制御するという例は、私の知る限り一般的ではないため、新しい制御機構の発見に繋がると期待している。

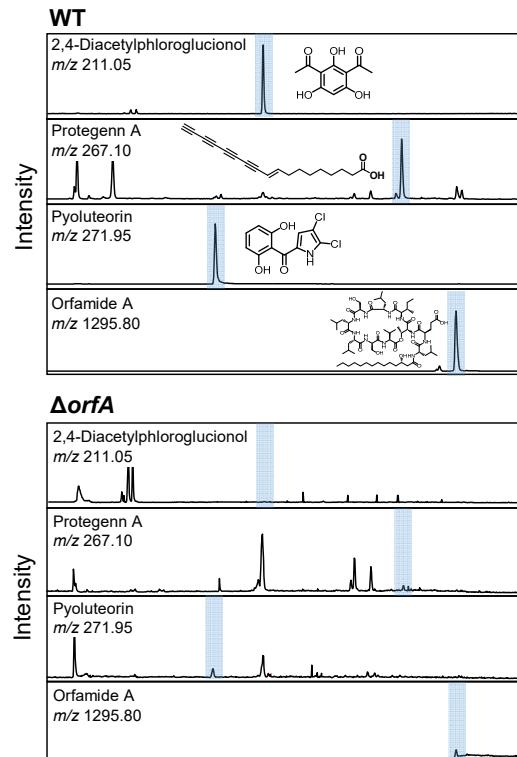


図5. 野生株と Δ orfA株の二次代謝誘導能の比較

考察

グラム陰性細菌で用いられるトランスポゾン Tn5 を用いたランダム変異導入で候補遺伝子 *PPC5492* を見出した。欠損株と過剰発現株を作製し、GacS リガンド単離に向けて実験を計画的に進めたが、見出した遺伝子がシデロフォアの部分構造の生合成に関与する酵素遺伝子である可能性が高いことが判明し、スクリーニング選抜が上手く機能しなかった可能性が高いことが分かった。恐らく、*PPC5492* が関与するシデロフォアの產生が消失するため、シデロフォア不足を補うために、蛍光性シデロフォアであるピオベルジンの生合成が活性化してしまい、1 次スクリーニングで選抜されたと予想された。

GacS リガンドを検出するためのアッセイ法を再検討するにあたり重視したことは、ある程度のサンプル数の評価を再現性よく実施できるということである。結果部には触れていないが、レポーターージーンアッセイ系の構築も試みたが、ベースが GacS リガンド合成酵素欠損株になつてないため、レポーター遺伝子の発現を誘導できる培養抽出物を見出すことすらできなかつた。

GacS リガンド合成酵素遺伝子を欠損していないくとも、GacS リガンドを含む粗抽出液が添加されれば、QS の活性化あるいは活性早期化が達成できると予想し、野生株の培養抽出物を野生株に添加する実験を進めたところ、安定的に特定のカラム溶出画分に GacS リガンド活性が確認された。溶出位置から推定すると、やや脂溶性を有する低分子化合物ではないかと予想できている。今後は、大量培養物から構築した二次代謝誘導を指標としたアッセイ法をベースとした分画操作を進め、最終的に GacS リガンドを単離し、構造決定を達成する予定である。期間中に、この最大目標を達成できなかつたのは反省ではあるが、確実にリガンド解明に向けて研究が進展したと考えている。

オルファミドの QS への関与は予想外の結果であった。

実際、二次代謝産物を介した QS チェック機構があれば、QS が正常に駆動するために有益なシステムとして機能することが予想される。そのような発見に繋がるように、オルファミドの生理活性についても詳細に調べていきたい。

本研究では、他のシグナル因子の単離・構造決定の例のようにシグナル合成酵素遺伝子の欠損株を作製することで、効率的に GacS リガンドの正体へと迫ることを計画して進めた。しかし、今回採用したスクリーニング方法では、それを達成することができず、研究計画のスピードを大きく損なう結果となってしまった。今後は、野生株を試験菌として、野生株培養物から GacS リガンドを二次代謝産生誘導を指標として精製を進める。そして、その化学的な正体解明に挑んでいきたい。また、それが達成されたならば、計画していたように、生合成経路、受容機構の解明へと進めていくことで、*Pseudomonas* 属に共通する未解明 QS 機構のメカニズム解明に大きく貢献したいと考えている。難攻不落な分子に挑戦したため、思ったような結果を出すことはできなかつたが、本研究で得られた知見や経験をもとに、この分野の金字塔を達成したいと考えている。

謝辞

本研究を遂行するにあたりご支援を賜りました山田科学振興財団に厚くお礼を申し上げます。また、本助成金に推薦して頂きました日本農芸化学に深く感謝致します。

研究の発表

口頭発表

なし

誌上発表

なし