

# 同種・異種微生物間の化学コミュニケーションに関する生物有機化学的研究

甲斐 建次 (大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科)

kai@biochem.osakafu-u.ac.jp

微生物は、同種・異種間で低分子/中分子化合物を介した化学コミュニケーションを行う。例えば、グラム陰性細菌は、同種の菌密度の増加をフェロモン様分子の濃度上昇としてモニターし、多くの遺伝子の発現を調節する。本機構はクオラムセンシング (QS) と呼ばれ、宿主への寄生・共生現象に極めて重要な役割を担う。また、QS 機構に制御された二次代謝産物は、細菌自身の活動制御を行うだけでなく、宿主への病原性や周囲の異種微生物への拮抗作用などの異種微生物間の化学コミュニケーションでも重要な役割を担う。本研究では、植物病原細菌の QS 機構、細菌の真菌内への寄生・共生、真菌拮抗性細菌の菌食性に関わる化学コミュニケーション分子を解明し、それらの機能解析や生合成研究を進めた。

## 1. 植物病原細菌 *Ralstonia solanacearum* における細胞間化学コミュニケーション機構の解明

青枯病菌 *R. solanacearum* はナス科を中心に 250 以上の植物種に感染し、萎凋・枯死を引き起こす病原細菌である。その被害は世界各地で発生しており、経済的損失は数千億円と言われている。本菌の防除法を開発するには、感染・病原性発現機構の解明が必須となる。青枯病菌は、他のグラム陰性細菌とは異なる独自の QS 機構を有し、病原性を完全にこの機構に依存している (図 1)。しかし、重要な QS シグナル分子

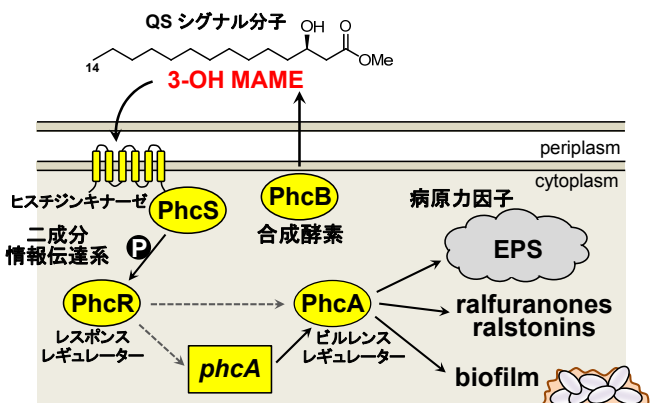


図1. 青枯病菌の QS 機構

が未解明なままであった。QS シグナル分子合成酵素 PhcB の遺伝子を欠損させた  $\Delta phcB$  株を用い、細胞外多糖 (EPS) 産生を指標としたバイオアッセイ法を確立した。野生株培養物を酢酸エチルで抽出し、得られた抽出物からバイオアッセイを指標に精製を進め QS シグナル分子を単離した。各種機器分析と合成標品との比較により、その構造を (R)-methyl 3-hydroxymyristate (3-OH MAME) と同定した (図 1)。

青枯病菌には特性の異なった多様な菌株が存在し、それらの菌株が利用している QS シグナル分子は 1 種類ではないことが示唆されていた。我々は、青枯病菌には 3-OH MAME 型の菌株と (R)-methyl 3-hydroxypalmitate (3-OH PAME) の菌株が存在することを明らかにした。さらに、生合成と受容の特異性に関する研究を詳細に進めた結果、3-OH MAME/3-OH PAME の生合成における鎖長・立体選択性を解明した。また、QS シグナル分子の受容においても、それらのアシル鎖長と 3 位の立体配置が重要であることを、QS シグナル分子合成欠損株と 3-OH MAME/3-OH PAME を使った実験により明らかにした。

$\Delta phcA$  ( $phcA$  欠損株、PhcA は QS シグナル伝達系の中心転写調節因子) と野生株との二次代謝プロファイルと比較すると、QS 欠損により消失する HPLC ピークが存在した。それらを単離・

構造決定し、新規フラノン化合物である ralfuranone 類を同定した (図 2)。構造確定と生理機能を調べるため、ralfuranone 類の全合成法を完成させた。Ralfuranone 合成酵素遺伝子を欠損させた  $\Delta ralA$  株は、トマトに対する病原力が大きく低下した。しかし、ralfuranone 類自体には植物毒素としての活性はなかった。さらに、 $\Delta ralA$  株はバイオフィーム形成能などの病原性に直接関わる特性が大きく低下し、ralfuranone 処理で回復した。Ralfuranone 類の産生は、前述の 3-OH MAME をシグナル分子とした *phc* QS 機構の制御下にある。したがって、ralfuranone 類は下層の細胞間コミュニケーション分子として機能している可能性が示唆された。また、ralfuranone 類の生合成が酵素反応と非酵素反応の組合せから成ることを、変異株を用いた前駆体の取込み実験から明らかにした (図 2)。コミュニケーション分子のように重要な生理活性物質において、非酵素反応がキーステップであることは興味深いものである。また、天然フラノン類が非酵素的な retro-aldole 反応で生じることは世界初の発見であった。

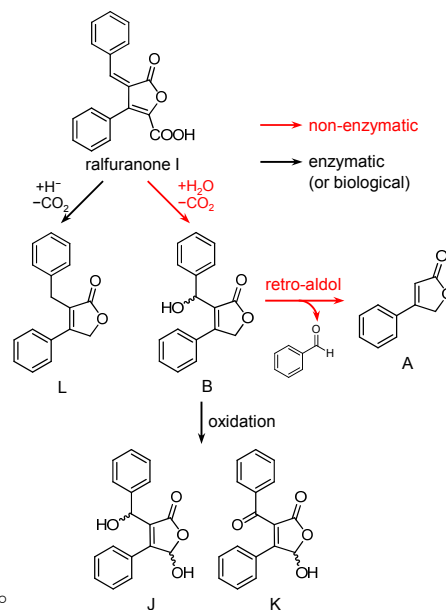


図2. Ralfuranone 類の生合成

## 2. 細菌の真菌内への寄生・共生で機能する異種微生物間化学コミュニケーション分子

面白いことに、青枯病菌は真菌の厚壁胞子を誘導し、この器官を通して真菌にも寄生できる (図 3)。この現象に青枯病菌が産生する未知リポペプチドが関与することが、アメリカの研究グループから報告された。そこで、本菌培養物から、リポペプチド ralstonin A と B を単離した。それらの構造決定は、NMR と MS に加

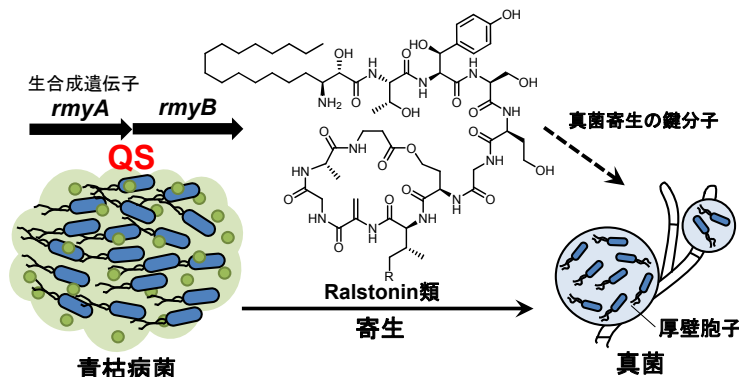


図3. 青枯病菌の真菌寄生

え、分解反応や部分構造の化学合成を駆使して達成した。Ralstonin 類は、新規脂肪酸 3-amino-2-hydroxyoctadecanoic acid、 $\beta$ -hydroxytyrosine、dehydroalanine などのユニークな部分構造を含み、ペプチド鎖に見られる環構造も非常に珍しいものであった (図 3)。Ralstonin 類は *Fusarium oxysporum* の厚壁胞子を低濃度で誘導し、植物毒素活性も有していた。さらに、ralstonin 産生が QS に制御されていることも見出した。後に、植物糖により QS 機構を活性化することで、新規類縁体である ralstonin C の単離・構造決定も達成した。

Ralstonin 類の機能を詳細に調べるために、その生合成遺伝子 *rmyA/rmyB* のうち *rmyA* の遺伝子配列の一部を欠損させた変異株を作製し、ralstonin 合成能を欠損させた。*rmyA* 変異株は、*F. oxysporum* に対する厚壁胞子誘導と寄生のいずれの活性も示さなくなった。つまり、ralstonin 類が唯一の厚壁胞子誘導因子であり、ralstonin 産生が真菌寄生に必須であることが証明された。また、*rmyA* 変異株は、トマトとタバコに対する病原力が著しく減少しており、ralstonin 類が植物感染時にも重要な病原力を担うことが分かった。つまり、ralstonin 類は、二機能性の化学コミュニケーション分子であることが明らかになった。

このような真菌内への細菌の寄生・共生は、青枯病菌に限られた現象ではない。我々は、真菌からアシルホモセリン (AHL) 型の QS 機構に対してアゴニスト・アンタゴニストとして作用する天然物を探索する過程で、真菌 *Mortierella alpina* A-178 株が多様な AHL 類を産生することを見出した。種々の分子生物学・組織学的解析の結果、*M. alpina* A-178 菌糸中にグラム陰性細菌が共生していることが判明した。また、AHL 合成は自己誘導性の挙動を示したことから、真菌内でも QS 機構が働いており、それが共生関係維持に重要な役割を担う可能性が考えられた。

### 3. 真菌拮抗性細菌の菌食性に関わる化学コミュニケーション分子

近年、微生物二次代謝産物の本来の機能、つまり生態学的な役割に注目が集まっている。*Collimonas fungivorans* Ter331 株は、*Aspergillus niger* などの真菌を資化するグラム陰性細菌として発見された (図 4)。この特性には、*C. fungivorans* が産生する抗真菌化合物とキチナーゼが関与することが示唆されていた。前者の産生に関わる *col* 遺伝子

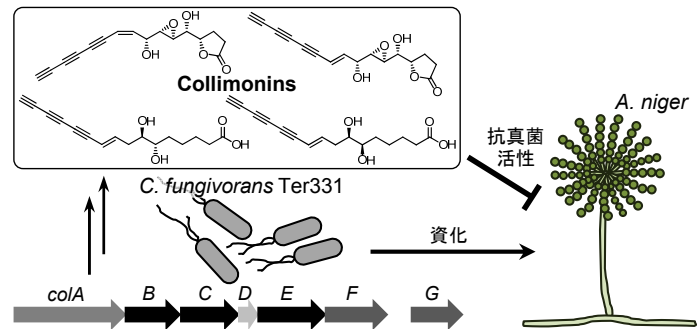


図4. *C. fungivorans* Ter331 株と真菌類の相互作用

子クラスターが見出され、それらが連続した炭素-炭素三重結合を有するポリイン類を産生することが予想されていた。このユニークな細菌-真菌相互作用を探る上でポリイン類 (collimonin 類と名付けた) は重要な化合物群であるが、それらの化学構造は明らかにされていなかった。末端アルキンから始まる共役ポリイン化合物は極めて不安定であるため、単離・構造決定されたのは数例のみで、いずれも 30 年以上前の報告であった。そこで、本菌が産生する collimonin 類の単離・構造決定と生物活性評価を進めた。

Ter331 株の培養物を酢酸エチルで抽出し、それを *A. niger* に処理すると顕著な生育阻害が認められた。抽出物を ODS カラムクロマトグラフィーで分画したところ、1つの画分に強い抗真菌活性が観察された。本画分には collimonin A-D と名付けたポリイン類が含まれており、これらが本菌の抗真菌性に寄与することが予想された。光と室温以上の高温、エバポレーターによる乾固を避け、構造決定に足る量の collimonin 類を単離した。各種 NMR と MS により、これらの平面構造を決定したところ、いずれも ene-triyne 構造と複数のオキシメチンを有することが分かった。

末端アルキンから始まるポリイン構造をもつ細菌ポリイン類は、生合成過程で酸化反応を受けるため、複数の不斉炭素原子をもつ化合物が多い。しかし、不安定性が原因で、これまでに立体配置が完全に解明された化合物はなかった。Collimonin 類の絶対立体配置は、末端アルキンのクリック反応による安定化と、続く誘導体の NMR 解析あるいは結晶スポンジ法を組合せることで達成した (図 4)。単離した collimonin 類は、*A. niger* に対して抗真菌活性を示した。興味深いことに、collimonin B は *A. niger* 菌糸内に黄色色素の蓄積を顕著に誘導した。本真菌色素の機能は不明であるが、もしかするとポリイン類に対する真菌側の防御反応であるかもしれない。

### おわりに

細菌は互いに QS シグナル分子を使った「化学コミュニケーション」を駆使することで、宿主という「強敵」に挑んでいる。その後の細やかな指令は、ralfuranone 類のような二次代謝産物が

担っている例が多いのかもしれない。よく知られているように、細菌は多数の二成分情報伝達系を持っている。しかしながら、多くの場合、それらのナチュラルリガンドは不明である。環境因子を認識するものが大半であると予想されているが、同種・異種微生物間で機能する未知の化学コミュニケーション分子を受容するシステムも多くあるのではないかと期待してしまう。特に、細菌の真菌寄生のような新しい生命現象に関わる化学因子に心を躍らせられる。そのような鍵分子に出会える研究を、今後も進めていきたい。さらに、研究を通して得た知見をもとに、病原細菌・真菌の新しい防除技術の開発に繋がる研究を進め、農学分野における化学コミュニケーション研究の応用展開も目指していきたい。

## 謝辞

本研究は、大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 生理活性物質化学研究室で行われたものです。自由に研究を進める機会を与えて頂きました大阪府立大学名誉教授 林 英雄 先生に深く感謝いたします。高知大学農林海洋科学部教授 曳地 康史 先生をはじめ、多くの共同研究者の皆様にご多大なるご助力を頂きましたこと、心より感謝申し上げます。また、ここに示した成果は、研究室の学生さんとの共同研究であり、彼らの努力になしにここまで発展させることはできませんでした。最後になりましたが、本賞にご推薦下さいました日本農薬学会会長 夏目 雅裕 先生と学会関係の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Ujita Y, (...), Kai K\* (2019): Signal production and response specificity in the *phc* quorum sensing systems of *Ralstonia solanacearum* species complex. *ACS Chemical Biology*, 14, 2243.
- 2) Kai K\* (2019): Bioorganic chemistry of signaling molecules in microbial communication. *Journal of Pesticide Science*, 44, 200.
- 3) Ishikawa Y, (...), Kai K\* (2019): Activation of ralfuranone/ralstonin production by plant sugars functions in the virulence of *Ralstonia solanacearum*. *ACS Chemical Biology*, 14, 1546.
- 4) Hayashi K<sup>†</sup>, Kai K\*<sup>†</sup>, (...), Hikichi Y\* (<sup>†</sup>Co-first) (2019): Contribution of a lectin, LecM, to the quorum sensing signalling pathway of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Molecular Plant Pathology*, 20, 334.
- 5) Kai K\*, (...), Fujita M (2018): Collimonins A–D, unstable polyynes with antifungal or pigmentation activities from the fungus-feeding bacterium *Collimonas fungivorans* Ter331. *Organic Letters*, 20, 3536.
- 6) Kai K\* (2018): Bacterial quorum sensing in symbiotic and pathogenic relationships with hosts. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82, 363.
- 7) Murai Y, (...), Kai K\* (2017): Ralstonins A and B, lipopeptides with chlamydospore-inducing and phytotoxic activities from the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Organic Letters*, 19, 4175.
- 8) Kai K\*, (...), Hikichi Y (2015): Methyl 3-hydroxymyristate, a diffusible signal mediating *phc* quorum sensing in *Ralstonia solanacearum*. *ChemBioChem*, 16, 2309.
- 9) Kai K\*, (...), Hikichi Y (2014): Involvement of ralfuranone production in the virulence of *Ralstonia solanacearum* OE1-1. *ChemBioChem*, 15, 2590.
- 10) Kai K\*, (...), Hayashi H (2014): An acyl-SAM analog as an affinity ligand for identifying quorum sensing signal synthases. *Chemical Communications*, 50, 8586.
- 11) Kai K\*, (...), Hayashi H (2012): Production of the quorum-sensing molecules *N*-acylhomoserine lactones by endobacteria associated with *Mortierella alpina* A-178. *ChemBioChem*, 13, 1776.