

粘液細菌 *Stigmatella aurantiaca* の
子実体形成に関する研究

森川 雪香

目次

要旨	1
序論	3
第一章 子実体形成誘導因子の単離と構造解析	19
第二章 子実体形成の生理学的解析	
第1節 Stigmoloneと環境要因の関係	40
第2節 子実体形成と活性酸素種の関係	52
第3節 子実体形成誘導機構の解析	59
第三章 子実体形成の分子生物学的解析	
第1節 子実体形成における <i>relA</i> 遺伝子の解析	73
第2節 子実体形成における <i>csgA</i> 遺伝子の解析	84
総括	104
謝辞	107
参考文献	108

所 属 (主指導教官)	細胞間情報学講座 (磯貝 彰 教授)		
氏 名	森川 雪香	提 出	平成 13 年 1 月 9 日
題 目	粘液細菌 <i>Stigmatella aurantiaca</i> の子実体形成に関する研究		

粘液細菌は原核生物でありながら、栄養飢餓に応答して多細胞性の形態形成を行う。粘液細菌の一種*Stigmatella aurantiaca*では、光照射下において栄養飢餓状態になると細胞が集合し、集合した細胞塊が子実体へと分化する。子実体の内部の細胞は、熱・乾燥に強い胞子に分化する。暗黒下では栄養飢餓状態になっても集合・子実体の形成は誘導されない。この暗黒下の培養に、子実体形成を引き起こした本菌の培養液の有機溶媒抽出画分を添加すると子実体形成が誘導されることから、何らかの脂溶性分子が子実体形成に関与していることが示唆されてきた。しかし、この子実体形成誘導因子の実体や、子実体形成を誘導する情報伝達経路に関しては殆ど明らかにされていない。一方、近縁の粘液細菌*Myxococcus xanthus*では、変異体を用いた解析により子実体形成に関与する遺伝子が多数見いだされてきているが、*S. aurantiaca*の様な拡散性の子実体形成誘導因子は見いだされておらず、またそれら遺伝子産物の機能も殆ど明らかにされていない。本研究では、まず*S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子の実体を明らかにすること、さらにその分子と環境要因あるいは*M. xanthus*で見出されている子実体形成遺伝子類との関係を解析することより、粘液細菌の形態形成経路を明らかにすることを目的とした。

第1章では、子実体形成誘導因子の構造決定を行った。まず、暗黒下での子実体形成を指標に子実体形成誘導因子の単離・精製を行った。培養液100 L分の栄養増殖細胞を10 Lの液体飢餓培地に接種して3日間振盪培養したものより、各種クロマトグラフィーを用いて約1.2 µgの子実体形成誘導因子を得た。本研究遂行中に、*S. aurantiaca*の集合を促進する物質として8-hydroxy-2,5,8-trimethyl-4-nonaoneが報告され、stigmoloneと名付けられた(Hull et al., 1997)。今回得られた子実体形成誘導因子のUVおよびMSスペクトルデータは、stigmoloneの構造から予想されるスペクトルパターンと矛盾せず、両者は同一であることが推定された。実際、合成stigmoloneを入手し両者をGC-MSを用いて比較することにより、得られた子実体形成誘導因子がstigmoloneであると結論づけた。次に、多くの生理活性物質では片方の光学異性体のみが生産され、そののみが活性をもつことから、未解明であったstigmoloneの5位の不斉中心の絶対配置の決定を行った。ラセミ化の起こらない条件下で解析したが、本菌によって生産されたstigmoloneは培養液中に分泌された段階で、既にラセミ体として存在することが明らかとなった。さらに、合成stigmoloneの、*R*体、*S*体、*RS*体が、いずれも同一の活性を示すことを見いだした。以上の結果より、培養液中の*S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子は、5-(*R,S*)-8-hydroxy-2,5,8-trimethyl-4-nonaoneであると決定した。

第2章では、stigmoloneと栄養飢餓や光との関係、及びstigmoloneの機能を解析した。Stigmoloneは、栄養増殖細胞からは回収されなかったため、栄養飢餓によって誘導されることが示された。栄養飢餓後、子実体形成の認められない暗黒

下においても、栄養飢餓8-10時間後よりstigmoloneが検出され、18-20時間後に最大量に達した。光照射下では、暗黒下の約8倍のstigmoloneが回収された。よって、stigmoloneは栄養飢餓によって誘導され、光照射下において生産が促進されることが示された。また、子実体形成が誘導される、細胞が光に感受性を示す時間帯は栄養飢餓後14-20時間後であり、このとき同様に、stigmoloneの生産が促進されていた。このことから、子実体形成に光照射が必要なのは、stigmoloneの生産を促進するためであることが示唆された。

*M. xanthus*では、カロテノイド合成は光によって誘導されるが、この際光シグナルは活性酸素を介して伝達されることが示唆されている。そこで、*S. aurantiaca*の子実体形成における活性酸素の関与を解析した。活性酸素の消去剤*n*-propyl gallateを飢餓培地に添加し光照射下で培養すると子実体形成が阻害され、stigmoloneの生産量も暗黒下レベルであった。このとき、同時にstigmoloneを添加することによって子実体形成が回復した。また、過酸化水素を培地に添加すると、暗黒下においても子実体形成とstigmoloneの生産が促進された。よって、光照射の下流に位置する活性酸素種が、stigmolone生産を促進することが示された。

低細胞密度の培養では光照射下においても子実体は形成されないが、stigmoloneの添加によって子実体形成が誘導された。また、stigmoloneの生産量は、細胞数に依存することが示された。これらのことより、stigmoloneが他の原核生物の細胞間シグナルのように、細胞密度を測定する(quorum-sensing)シグナルであることが示唆された。Stigmoloneは集合を促進することが知られているが、集合が形成された後にstigmoloneを除去すると一度形成された集合が消失したため、stigmoloneは集合の促進と保持に関与することが示唆された。

第3章では、子実体形成に関与する遺伝子とstigmoloneとの関係の解析を行った。*M. xanthus*においては、栄養飢餓の認識は、(p)ppGpp合成酵素であるRelA依存的であることが知られている。Stigmoloneの生産は栄養飢餓によって誘導されることから、*S. aurantiaca*における*relA*とstigmoloneとの関係の解析を行った。*M. xanthus*の*relA*遺伝子との相同性をもとに*S. aurantiaca*の*relA*遺伝子を単離し、相同組み換えによりその欠損株を作製したところ、*relA*欠損株では子実体形成条件下においても、stigmoloneの生産、及び集合、子実体・胞子形成が認められなかった。また、本系にstigmoloneを添加しても、*relA*欠損株の集合、子実体・胞子形成は回復しなかった。従って、stigmoloneの生産、及びstigmolone受容能の獲得は、*relA*依存的であることが示された。

*M. xanthus*の*csgA*変異株は、集合、子実体形成、及び胞子形成能が欠損していることが知られている。*S. aurantiaca*においては、*csgA*を不活性化すると子実体形成に影響を与えることは知られているが、環境因子やstigmoloneとの関係は明らかではない。そこで、*S. aurantiaca*において*csgA*変異株を作製し、その解析を行った。*csgA*欠損株は、光照射下においても子実体を形成せず、一方分泌されるstigmolone量は光照射下においても野生株の1/10以下であった。*csgA*欠損株にstigmoloneを添加したところ、子実体形成の回復がみられた。*csgA*を恒常発現させた株についての解析を行ったところ、本来子実体形成の見られない暗黒下においても子実体を形成し、暗黒下においても野生株の光照射下と同程度の量のstigmoloneが認められた。これらことから、*csgA*はstigmoloneの生産を促進することが示唆された。Stigmoloneは栄養飢餓と光によってその生産が促進されるが、*csgA*遺伝子の発現はこれらのうち栄養飢餓により誘導されることが判明した。また、*csgA*の発現量と子実体形成を誘導する時期の光照射との間には相関が見られなかったため、光によるstigmoloneの生産誘導は*csgA*の発現誘導とは別の経路により行われていることが示唆された。

序論

長い間、単細胞生物である原核生物は単独で生活するものと考えられてきたが、近年多くの細菌において、接合、分化、共生、形態形成など、細胞同士が会話を交わし、行動を共にする細胞間情報交換系が明らかになってきている (Dunny and Winans, 1999)。このような細胞間情報交換を行う原核生物のうち、最も複雑で、かつ多細胞的な挙動を示すもののひとつに、粘液細菌 (myxobacteria) が挙げられる (Fig. 1)。粘液細菌は、細胞が栄養飢餓状態 (starvation) となると多数の細胞が集合し (aggregation)、子実体 (fruiting body) を形成する (Fig. 2) (Dworkin, 1962)。子実体の内部の細胞は、熱や乾燥などに強い粘液胞子 (myxospore) へ分化する (Sudo and Dworkin, 1969)。粘液胞子は適当な環境条件になると発芽し (germination)、ふたたび栄養細胞 (vegetative cell) として増殖する (Ramsey and Dworkin, 1968)。このような生活環は、真核生物である細胞性粘菌と一見類似しているが、粘液細菌はプロテオバクテリアの δ サブグループに属する真正細菌である (Fig. 3) (Reichenbach and Dworkin, 1992)。粘液細菌は8-20億年前に、形態形成能のない*Desulfovibrio*属や*Bdellovibrio*属より分岐したと計算されている (Kaiser, 1986, Shimkets and Woese, 1992)。最も古い多細胞性の真核生物の化石は7-11億年前のものであり (Glaessner, 1976, Seilacher et al., 1998)、粘液細菌は、真核生物よりも先に多細胞性を獲得した可能性が考えられるため、多細胞化の鍵となりうる興味深い生物である。また、粘液細菌は、セリン・スレオニンキナーゼ系や (Zhang, 1996, Hartzell, 1997) ホスホリパーゼ系 (Benaissa et al., 1994)、さらにはプログラム細胞死様の現象など (Wireman and Dworkin, 1975, Muller and Dworkin, 1991)、真核生物と類似した独自の側面を持つことが明らかになってきている。粘液細菌は2種類の亜目、5つの科、及び12の属に分けられ (Table 1)、それぞれ特徴的な子実体を形成することが観察されているが、現在、粘液細菌についての研究は主に*Myxococcus xanthus*、及び*Stigmatella aurantiaca*を中心に行われている。

*M. xanthus*では、他の原核生物と同様に、グアノシン5'-二(三)リン酸3'-二リン酸 ([p]ppGpp) の蓄積によって栄養飢餓が認識されることが知られている (Singer and Kaiser, 1995)。*M. xanthus*において、(p)ppGppによる栄養飢餓認識以降の形態形成の解析は、主に突然変異体を用いて行われている。子実体形成能を欠損した複数の変異株が単離されており、これらのうち2つの変異株同士を混合したときに子実体形成が相補される株が、細胞間シグナル欠損株として同定されている (Hagen et al., 1978)。現在までに、細胞間シグナル欠損株としてA-E、及びSの6つの相補グループが確認されているが、B及びDグループについての知見は殆ど得られていない (Table 2)。細胞間シグナル (A-E, S-シグナル) の候補の解明は、これらの細胞間シグナル欠損株の変異遺伝子座の解析、並びに、欠損株の子実体形成を回復させる物質を野生株の菌体や培養液より単離することにより行われている。また、*M. xanthus*のプロモーター下流に*lacZ*レポーター遺伝子が挿入された一連の変異株が得られており (Kuspa et al.,

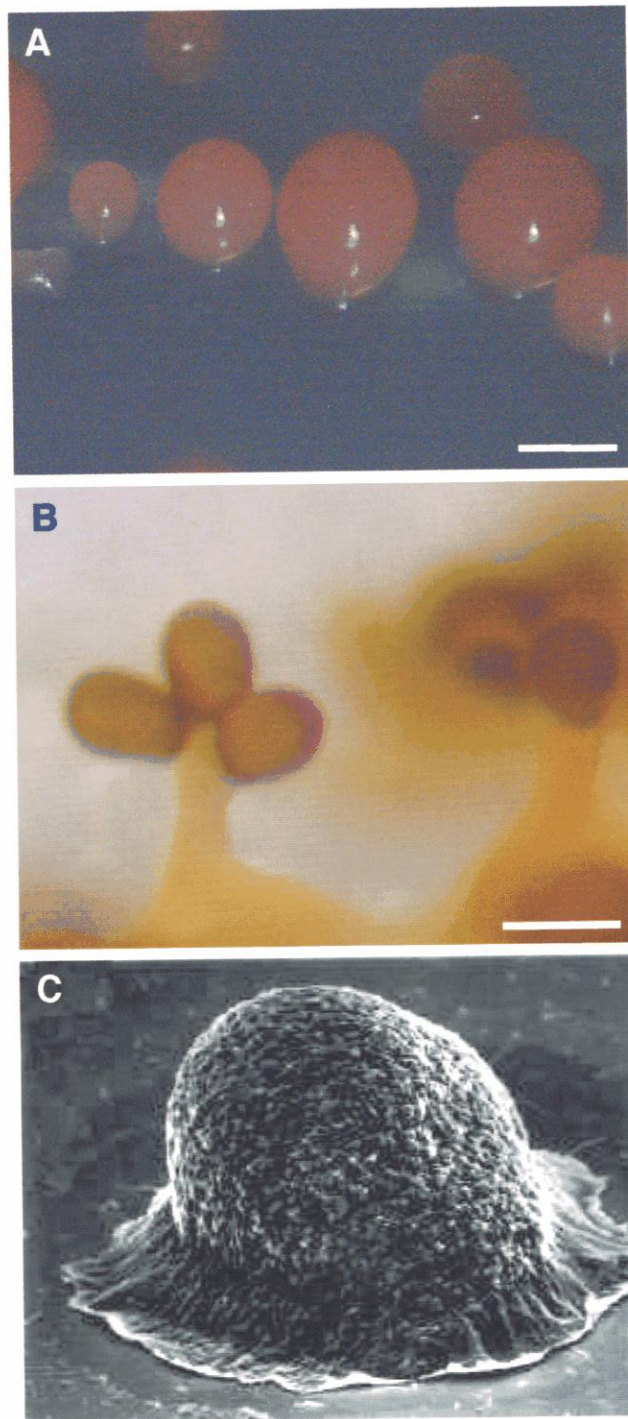


Fig. 1 粘液細菌の子実体

粘液細菌 *M. fulvus* (A)、及び *S. aurantiaca* (B) の子実体の実体顕微鏡写真。バーは100 μm の長さを示す。*M. xanthus*の子実体の走査型電子顕微鏡写真 (C)。Kuner and Kaiser (1982) より著者の許可を得て転載。

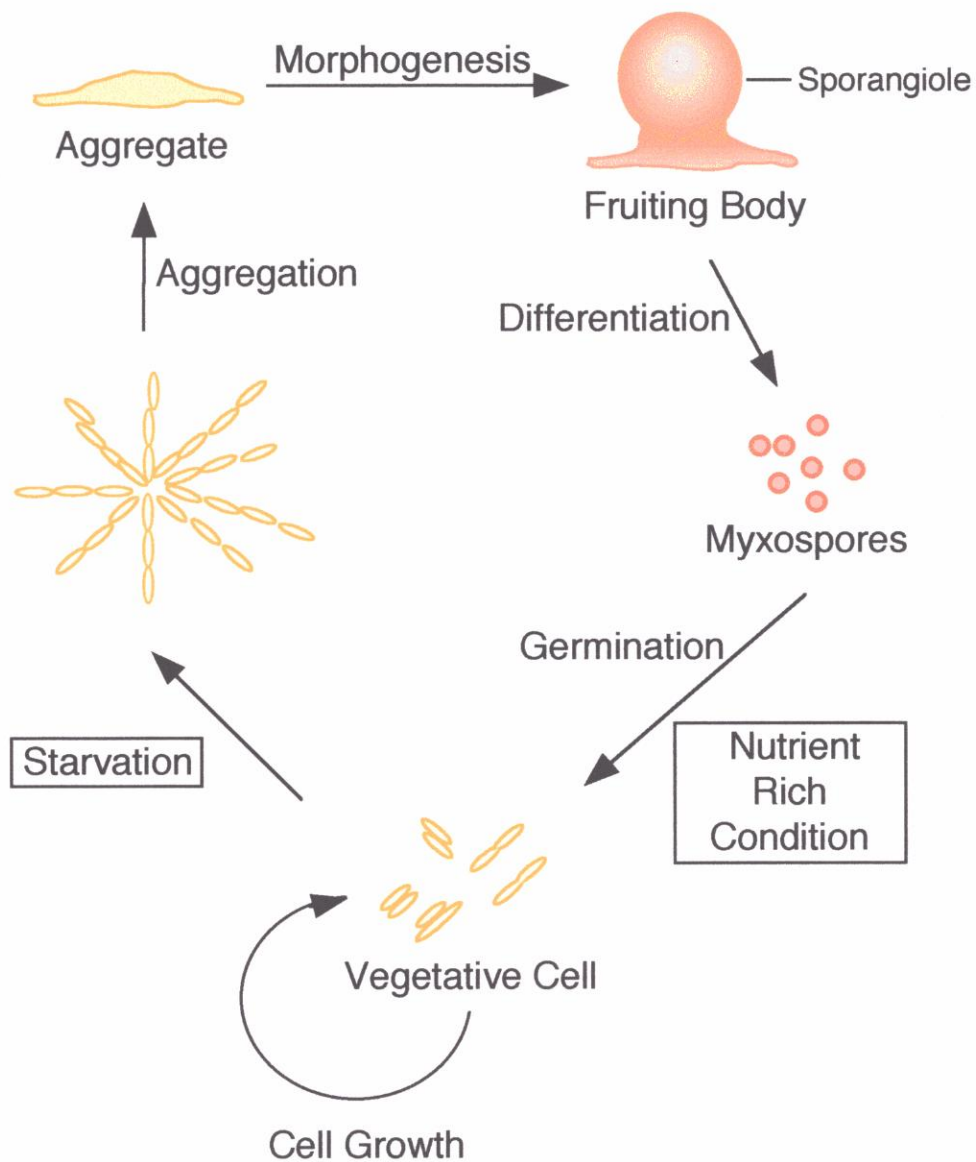


Fig. 2 粘液細菌 *M. xanthus* の生活環 (Dworkin, 2000)

粘液細菌は、細胞が飢餓状態になると aggregation (集合) を経て fruiting body (子実体) を形成する。子実体内部の細胞は、myxospore (粘液孢子) に分化する。

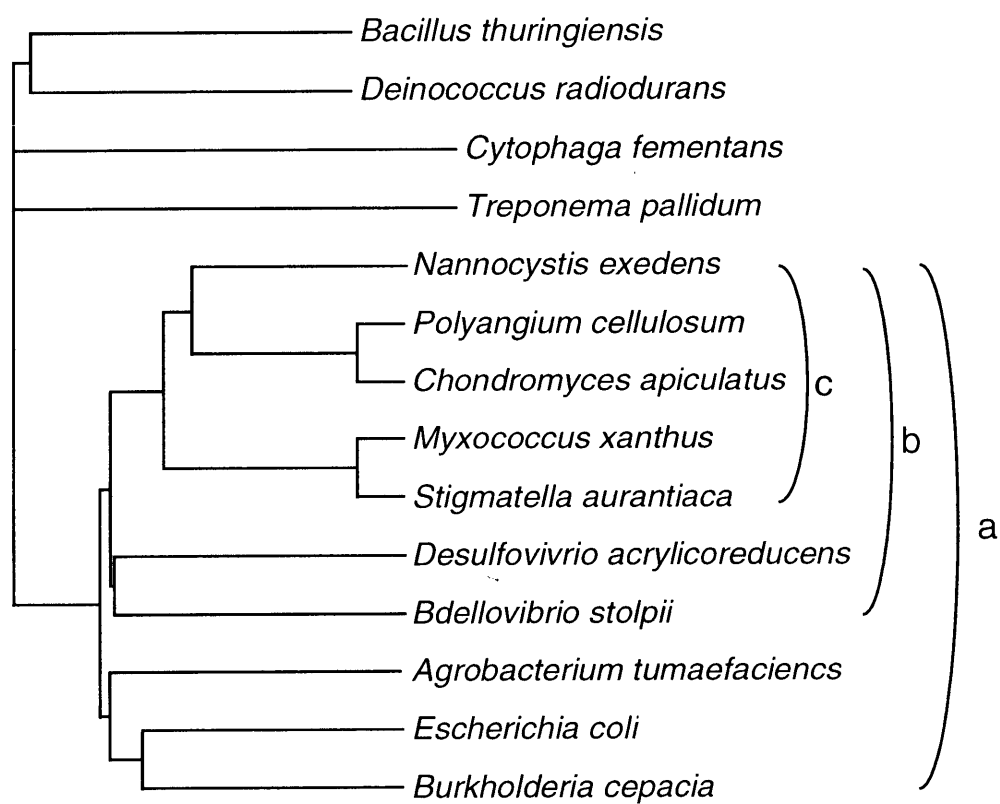


Fig. 3 粘液細菌と主な真正細菌の系統樹 (Dworkin, 2000)

プロテオバクテリア群 (a)、 δ サブグループ (b)、粘液細菌 (c) を示す。

Table 1 粘液細菌の分類

Order: Myxobacterales	
Suborder:	Cystobacterinaea
Families and genera:	Myxococcaceae
	<i>Myxococcus</i>
	<i>Corallococcus</i>
	<i>Angiococcus</i>
	Archangiaceae
	<i>Archangium</i>
	Cystobacteraceae
	<i>Cystobacter</i>
	<i>Melittangium</i>
	<i>Stigmatella</i>
Suborder:	Soranginae
Families and genera:	Sorangiaceae
	<i>Sorangium</i>
	<i>Polyangium</i>
	<i>Haploangium</i>
	<i>Chondromyces</i>
	<i>Nannocystis</i>

Table 2 *M. xanthus*の細胞外相補グループ

Group	Gene Symbol	Function of Gene Product	Complementing Cellular Fraction
A	<i>asgA</i>	Protein Kinase/Response Regulator	amino acid mixture
	<i>asgB</i>	Transcription Factor	
	<i>asgC</i>	Sigma Factor	
B	<i>bsgA</i>	ATP-Dependent Protease	unknown
C	<i>csgA</i>	Short-Chain Alcohol Dehydrogenase	CsgA
D	<i>dsgA</i>	Translational Initiation Factor TF-3	unknown
E	<i>esg</i>	Branched-Chain Keto Acid Dehydrogenase	isovaleric acid
S	<i>difA-E</i>	Fibril Production	fibrils
	<i>dsp</i>	S-Motility	

1986)、それぞれの株の発現時期やA-Eシグナルとの関係を調べることにより、これらシグナルが関与する情報伝達系の解析が行われている。

A相補グループに所属する *asg* 変異株は、(p)ppGppの蓄積は認められるが子実体形成の初期に誘導される遺伝子群の発現が起こらないため (Kuspa *et al.*, 1986)、A-シグナルは栄養飢餓の認識後から子実体形成初期段階を制御していると考えられている。A-シグナル依存遺伝子 Ω 4521の発現には高い細胞密度が必要であることから、A-シグナルは細胞密度を測定する因子であると考えられている (Kuspa *et al.*, 1992a)。*asg*株の子実体形成を相補する活性を指標に、8種類のアミノ酸混合物とこれらのアミノ酸を含むポリペプチド (Kuspa *et al.*, 1992b)、及び2種類のプロテアーゼ (Plamann *et al.*, 1992) が単離された。これらA-シグナルの候補のうち、2種類のプロテアーゼの間には共通の基質特異性は認められず、*M. xanthus*由来ではないプロテアーゼにもA-シグナル活性が見出されたことから (Plamann *et al.*, 1992)、プロテアーゼによって生産されるアミノ酸がA-シグナルであると考えられている。また、個々のアミノ酸に弱い活性が認められるが、アミノ酸混合物が高いA-シグナル活性を持つことから (Kuspa *et al.*, 1992b)、A-シグナルはアミノ酸混合物と考えられている。

A-シグナルを欠損する *asg* 変異株の解析より、*asgA*, *B*, *C*の3つの独立した遺伝子座が見出された (Kuspa and Kaiser, 1989)。*asgA*は、2成分制御系のセンサーキナーゼのヒスチジンキナーゼ部位と応答レギュレーターのリセーバー領域に相同性のある2つのドメインを持ち (Plamann *et al.*, 1995)、また、AsgAタンパク質は自己リン酸化能をもつことが示されている (Li and Plamann, 1996)。しかし、*asgA*には通常の2成分制御系に見られるインプット領域である環境センサー部位、もしくはアウトプット領域であるDNA結合部位が含まれていないため、AsgAは、他のタンパク質のリン酸化を介して栄養飢餓のシグナルを受容し、さらに他のタンパク質をリン酸化することにより、A-シグナルの生産・分泌を誘導すると考えられている。また、*asgB*より予想されるアミノ酸配列にはDNA結合タンパク質のモチーフが見出されたため (Plamann *et al.*, 1994)、AsgBは転写因子である可能性が示唆されている。一方、*asgC*より予想されるアミノ酸配列は、SigAとして知られている主要シグマ因子と同じであった (Davis *et al.*, 1995)。*asgC*変異株の*sigA*には、SigAと転写因子との結合部位と考えられている部位に変異が導入されていたため、SigAは何らかの転写因子と相互作用することによってA-シグナルの生産・分泌を誘導することが示唆された。以上のことより、A-シグナルの生産経路について、AsgAは他のタンパク質のリン酸化を介してAsgBをリン酸化し、リン酸化されたAsgBは転写因子としてSigAと相互作用することで、何らかの遺伝子発現を介してA-シグナルの生産・分泌が誘導される、というモデルが考えられている (Fig. 4)。*asg*変異株は細胞外タンパク質が野生株と比較して少ないことから、Asgはタンパク質分泌に関与する遺伝子群の発現を誘導すると考えられているが (Kuspa and Kaiser, 1989)、AsgBや転写因子と相互作用したSigAによって誘導される遺伝子は未同定であり、また、AsgAの上流や下流は全く明らかにされていない。よって、*asg*遺伝子群がA-シグナル生産に果たす役割は明らか

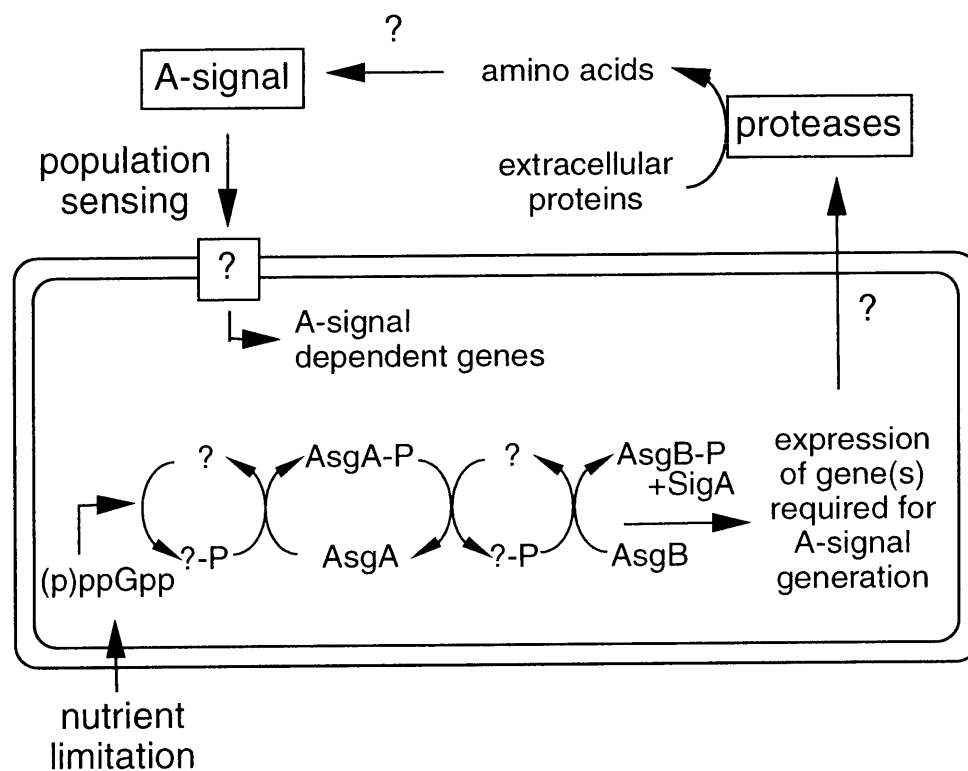


Fig. 4 A-シグナルを介したシグナル伝達のモデル (Plamann and Kaplan, 1999)

栄養飢餓になると、(p)ppGppが蓄積し、AsgAのリン酸化カスケードが活性化される。最終的にAsgBがリン酸化され、SigAとともにA-シグナルの生産に必要な遺伝子の発現が誘導される。A-シグナルは細胞外に放出されたプロテアーゼによって生じ、それによって細胞密度が認識され、A-シグナルに依存的な遺伝子群の発現が誘導される。

ではない。

C-シグナルの候補として、*csg*変異株の子実体形成と胞子形成の回復を指標に、野生株の子実体より17 kDaのペプチドが単離された (Kim and Kaiser, 1990a, b)。すべての*csg*変異は*csgA*にマッピングされ (Shimkets and Asher, 1988)、その推定されるアミノ酸配列と、単離された17kDaのペプチドのアミノ酸配列の一部が一致した (Hagen and Shimkets, 1990、Kim and Kaiser, 1990a)。野生株由来のCsgAや発現CsgA (Lee *et al.*, 1995) を外部から添加することによって変異株の子実体形成が回復すること、また、抗CsgA抗体の添加により野生株の子実体形成が阻害されることより (Shimkets and Rafiee, 1990)、CsgAタンパク質は細胞外で機能していると考えられている。実際に、免疫染色法によって、CsgAが細胞外マトリックスに存在していることが示されている (Shimkets and Rafiee, 1990)。また、CsgAは、短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ (short chain alcohol dehydrogenase, SCAD) との相同性が指摘されており (Lee and Shimkets, 1994)、*csg*変異株のサプレッサー変異がSCAD相同遺伝子の過剰発現であったこと (Lee and Shimkets, 1994)、また、CsgA発現タンパク質の活性にはSCADの補酵素であるNAD(P)⁺が必要であることなどから、CsgAの子実体形成誘導活性にはSCADとしての酵素活性が必要であることが示唆されている (Lee *et al.*, 1995)。しかし、一般にSCADは広い範囲の化合物を基質とするためCsgAの基質は特定されておらず、CsgAがシグナルとして働いているのか、C-シグナルの合成を触媒しているのかは未解決である。

CsgAタンパク質の濃度は集合の後期に最大となるが (Kim and Kaiser, 1990a)、*csgA*遺伝子の発現も栄養飢餓によって増加し、胞子形成の前に最大に達する (Hagen and Shimkets, 1990)。*csgA*遺伝子上流には発現を制御する領域が存在しその長さによって発現レベルの違いが見られることから、複数のアクティベーターがこの領域に作用することが示唆されている (Li *et al.*, 1992)。また、子実体形成の初期反応である"rippling" (さざ波が立つ、縮れができるの意) は最大レベルの20%の*csgA*の発現により誘導され、集合は30%の*csgA*発現レベルにより促進されるが、胞子形成は80%以上の*csgA*発現に達しないと誘導されない。このような*csgA*の発現の調節は、CsgAによるフィードバック制御以外知られておらず (Kim and Kaiser, 1991)、子実体形成の各ステージに適切な濃度のCsgAを供給する仕組みは不明である。

C-シグナル欠損株である*csg*変異株では、子実体形成、及び胞子形成が起こらず、細胞は規則的な半球状の集合ではなく不規則に分岐した"ridge" (峰、うねの意) を形成する。*M. xanthus*の集合は走化性などの細胞の運動によって制御されていると考えられており、*csg*変異株によるridgeの形成は運動性の欠損による結果であると考えられている。C-シグナルの下流の伝達経路の検索のため、*csgA*変異株と同様にridgeを形成する変異株が選別され、*fruA*遺伝子と*frz*遺伝子群が明らかとなった。*fruA*変異株はridgeを形成し、さらに胞子形成を欠損しているのに対し (Søgaard-Andersen *et al.*, 1996)、*frz* (fizzy、縮れ) 変異株はridgeを形成するが、胞子形成は誘導されていた (Sager and Kaiser, 1994)。このことより、C-シグナルの下流は胞子形成と運動性の

制御の2つの経路に分岐していることが示された (Fig. 5)。C-シグナルの下流で運動性と孢子形成両方を制御するFruAはDNA結合タンパク質と推定されており、その発現は*asgA*と*asgB*に依存している (Ogawa *et al.*, 1996)。FruAは応答レギュレーターであり、リン酸化を受けることにより孢子形成が誘導されることが示唆されている (Ellehauge *et al.*, 1998)。また、*fruA*依存的に誘導される遺伝子として、*devTRS*オペロンが同定されている (Søgaard-Andersen *et al.*, 1997)。*devR*変異株では集合は起こるが孢子形成は起こらず (Thony-Meyer and Kaiser, 1993)、また、*devR*は将来孢子へ分化する集合の中心の細胞のみで発現しており、孢子形成を行わない周囲の細胞では発現が見られなかった (Julien and Kaiser, 1998)。よって、*dev*オペロンは孢子形成を制御していると考えられている。

C-シグナルの下流に位置し運動性に関与すると考えられている *frz* 遺伝子群は、*Escherichia coli* や *Salmonella* sp. の走化性を制御する *che* 遺伝子群と相同性を持っていた (McBride and Zusman, 1989)。*E. coli* のCheシステムは、膜貫通型レセプターであるMCP (methyl-accepting chemotaxis protein) が誘因物質や忌避物質のセンサーとして働き、Cheシステムの他のタンパク質のリン酸化を介して鞭毛の回転の方向を制御することによって (Blair, 1995)、細胞の走化性を制御する。*M. xanthus* のFrzシステムも、Cheシステムと類似した情報伝達システムを持つことが示されており (Ward and Zusman, 2000)、細胞の反転頻度 (reversal frequency) を制御していることが観察されている (Blackhart and Zusman, 1985)。*M. xanthus* のFrzシステムのうちMCPにあたるFrzCDは、大腸菌のMCPとは異なり細胞外ドメインを持っておらず、情報のインプットは細胞外の刺激ではなく細胞内のシグナルによって行われていると考えられている。*E. coli* のMCPは、グルタミン酸残基がメチル化を受けることによって、高濃度の誘因・忌避物質に対して順応することが知られているが、*M. xanthus* においても、FrzCDがメチル化を受けることが知られている。*M. xanthus* では、FrzCDのメチル化により細胞の反転頻度が減少することから (Shi *et al.*, 1996)、Frzシステムはメチル化により走化性が制御されていると考えられている。栄養増殖下では、FrzCDのメチル化、脱メチル化の割合は半々であるが、栄養飢餓1-6時間後には脱メチル化され、9-12時間後に完全にメチル化を受ける (McBride *et al.*, 1992, Søgaard-Anderson and Kaiser, 1996)。よって *M. xanthus* では、FrzCDのメチル化パターンの変化によって走化性が促進され、集合、子実体形成が誘導されと考えられている。このメチル化パターンは *csgA* 変異株では異なっており、1-6時間後の脱メチル化は認められるが、栄養飢餓後9時間を経てもメチル化は見られず、12時間後においても半数のメチル化しかみられない (Søgaard-Anderson and Kaiser, 1996)。CsgAによるFrzCDのメチル化が直接細胞の反転頻度を制御しているという実験的証拠はないが、野生株に発現CsgAを添加することによって細胞の滑走運動が早くなることが観察されていることから (Jelsback and Søgaard-Andersen, 1999)、CsgAはFrzシステムを介して細胞の運動を調節し、走化性により集合を促進していると考えられている。

E-シグナル欠損株である *esg* 変異株は、*csg* 変異株よりも早い時期で形態形成が止ま

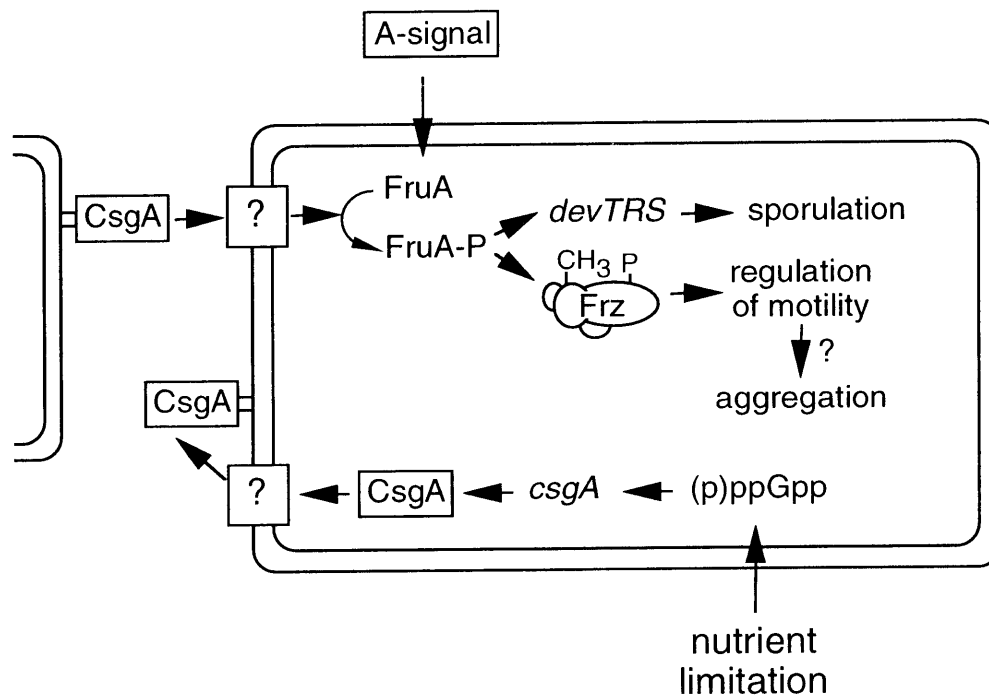


Fig. 5 C-シグナルを介したシグナル伝達のモデル (Shimkets and Kaiser, 1999)

栄養が制限されると、ppGppの蓄積により *csgA* の発現が誘導され、CsgA が生産される。CsgA は細胞外に輸送され、CsgA そのものが C-シグナルとして機能するか、CsgA によって C-シグナルが生産される。C-シグナルが受容されると A-シグナルによって発現する FruA のリン酸化を介して Frz システムの活性化と *devTRS* の誘導が起こり、運動性及び胞子形成が誘導される。

り、子実体と孢子形成が起こらない (Downard *et al.*, 1993)。遺伝子座の解析により、*esg* 遺伝子は分枝ケト酸デヒドロゲナーゼ (branched-chain keto-acid dehydrogenase, BCKAD) をコードしていることが示された (Toal *et al.*, 1995)。*esg* 変異株の細胞内の長鎖脂肪酸の量は野生株と比較して減少しており (Downard and Toal, 1995)、*esg* 変異株に BCKAD 産物であるイソ吉草酸を添加したところ子実体形成は回復した (Toal *et al.*, 1995) ことから、E-シグナルはイソ吉草酸であると考えられている。

もうひとつの相補グループ S は、*M. xanthus* の運動性の研究より明らかとなったグループである。粘液細菌は、細胞が単一で運動するときの運動システムである A (adventurous) -motility と、グループとして運動するときの運動システム S (social) -motility の2つの運動性を持つが (Harzell and Youderian, 1995)、S-motility の欠損株は、子実体形成が誘導されないことが知られている (Hodgkin and Kaiser, 1979)。S-motility の変異の代表的なものに、タイプ IV 繊毛、リポ多糖の O 抗原、もしくは fibril (Arnold and Shimkets, 1988) という3種類の細胞表層分子の生産の欠損があげられるが、そのうちの fibril が欠損している株である *dsp* 及び *dif* 変異株では、野生株より精製した fibril を添加することによって子実体形成の回復が認められる (Chang and Dworkin, 1994, Yang *et al.*, 1998)。Fibril は細胞同士を接着させる繊維状の分子であり、fibril タンパク質の変異によって3次元的な細胞の結合パターンが1次元的な極のみでの結合に変化する (Smith and Dworkin, 1997)。よって、fibril は、適切な細胞間情報伝達に必要な細胞並置パターンの構築を行っていると考えられている。また、fibril は多くの情報伝達タンパク質に見られる ADP-リボシル化を受けていることが示されている (Hildebrandt *et al.*, 1997)。*M. xanthus* の子実体形成時には ADP-リボシル化パターンの変化が見られるため (Eastman and Dworkin, 1991)、fibril は単に接着を仲介するのみではなく、シグナルの伝達にも関与しているとも考えられている。

粘液細菌の子実体形成には、栄養飢餓、高い細胞密度、細胞が固体の表面に存在していることが必須条件であるが (Wireman and Dworkin, 1975)、*S. aurantiaca* (Fig. 1B, Fig. 6) では、さらに光が必須の環境要因であり、光照射下において細胞は集合し子実体を形成するのに対し、暗黒下では ridge と呼ばれる不規則に分岐した細胞塊を形成する (Fig. 7) (Qualls *et al.*, 1978a, b)。Ridge は子実体に分化することはないため、*S. aurantiaca* による光照射下での子実体形成は一種の光形態形成と見なすことができ、その情報伝達系の解明は、光合成細菌や植物の光形態形成反応との対比から大変興味深い。

S. aurantiaca においても、*M. xanthus* と同様に子実体形成変異株同士の相補による細胞間シグナル欠損株が得られており、その解析から、*fbfA*、*fbfB* の2つの遺伝子の存在が明らかとなっている (Silakowski *et al.*, 1996, 1998)。これら遺伝子より推定されるアミノ酸配列はそれぞれキチン合成酵素、及びガラクトース酸化酵素と相同性を持っていたが、その機能、及び変異を相補する物質については全くわかっていない。また、*S. aurantiaca* においても *csgA* 遺伝子が存在し、また不活化することにより子実

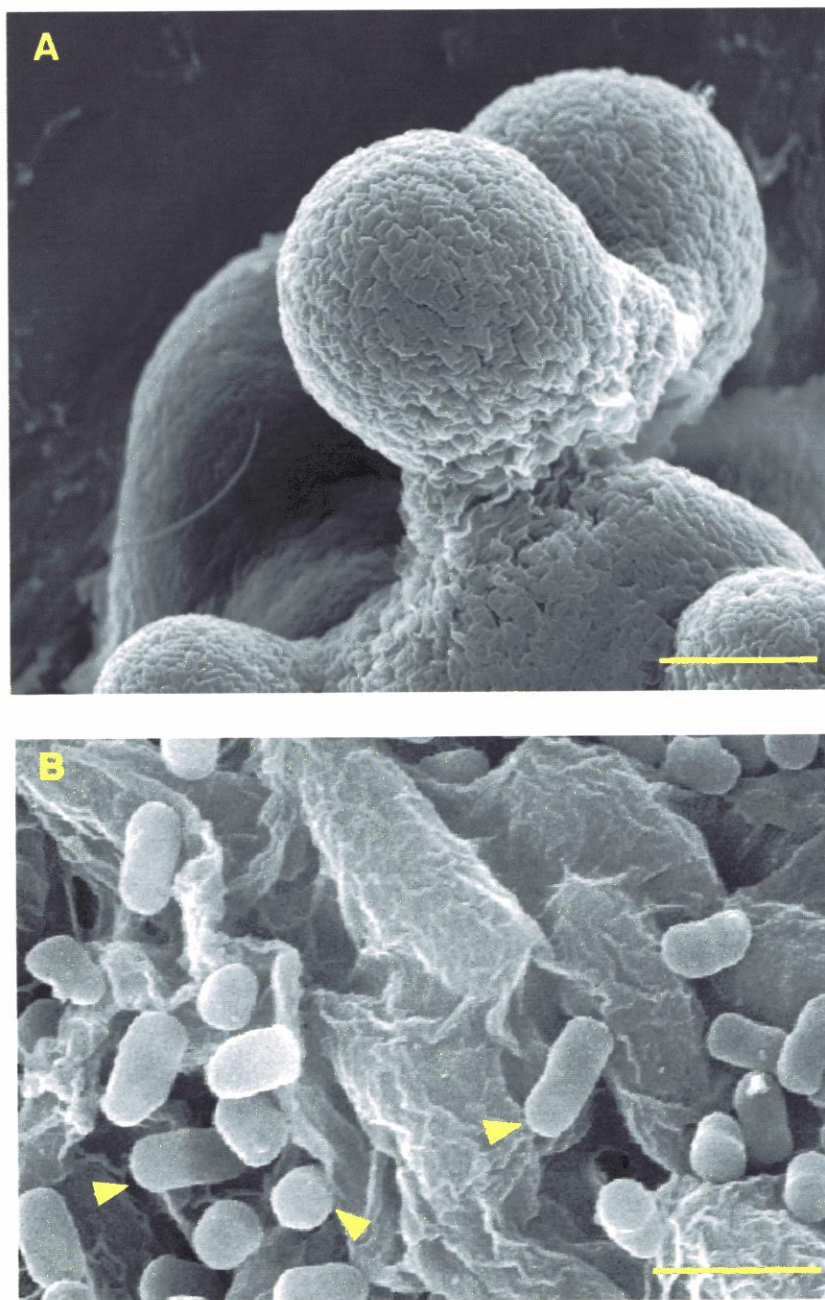


Fig. 6 粘液細菌*S. aurantiaca*の走査型電子顕微鏡写真

A: スポランギオール (sporangiole) 。バーは25 μm を示す。B:
放出された粘液胞子 (myxospores) (▶) 。バーは1 μm を示す。

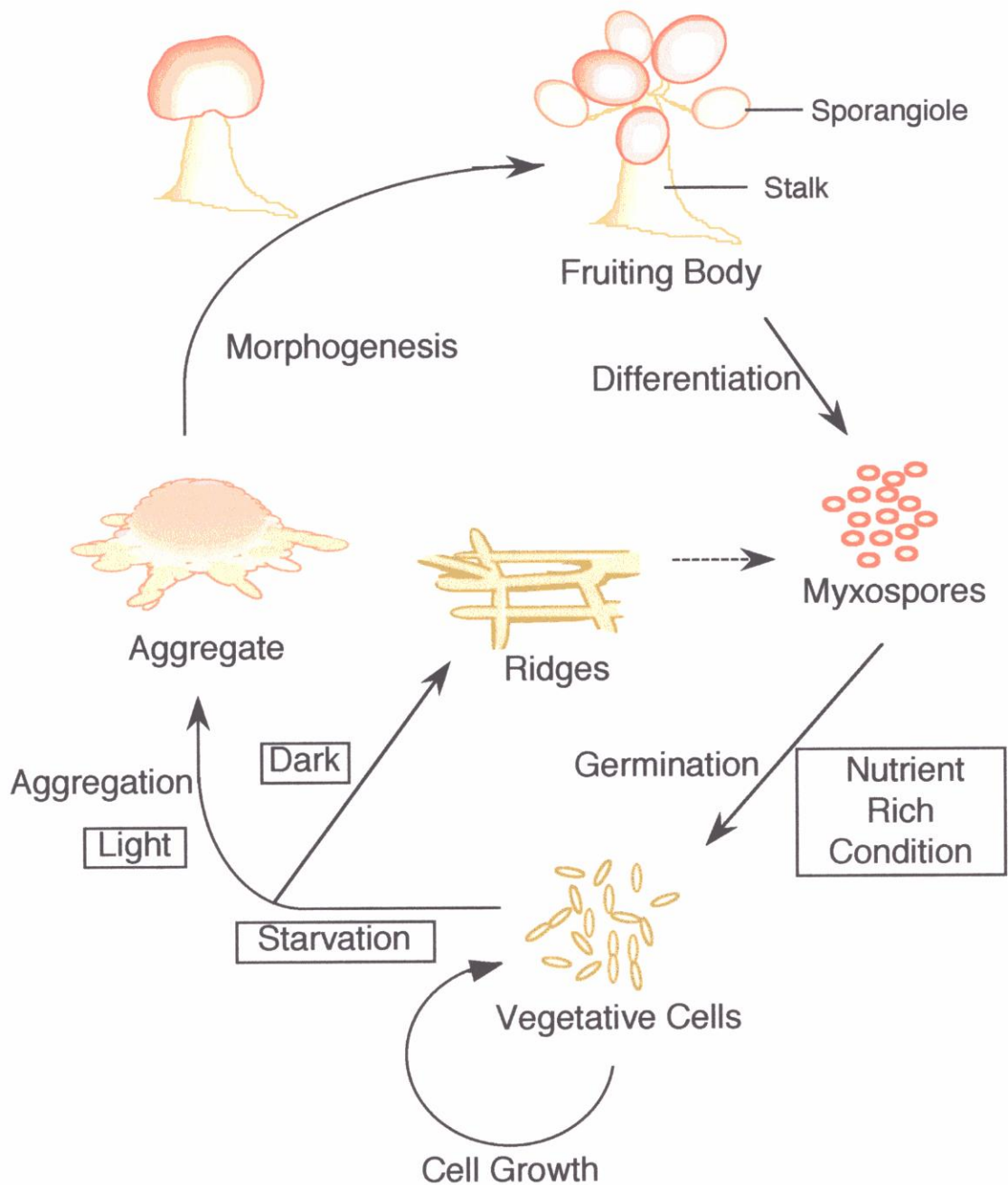


Fig. 7 粘液細菌 *S. aurantiaca* の生活環 (White and Shairer, 2000)

S. aurantiaca は、子実体形成に光が必須である。暗黒下では、細胞が峰のように連なった ridge を形成する。子実体内部の細胞は孢子を形成し、条件によって発芽して栄養増殖サイクルを繰り返す。

体形成に影響があると言われているが、その詳細は明らかではない (Schairer, 1993)。さらに、孢子形成時に誘導されるSP21タンパク質や (Heidelbach *et al.*, 1993)、子実体形成時に誘導されるシグマ因子SigBとSigC (Coudart, 1998)が見出されてきているが、これらの因子の機能と子実体形成との関連はわかっていない。このように、*M. xanthus*と比較して、*S. aurantiaca*の子実体形成経路の解明は進んでいない。

しかし、*S. aurantiaca*では、子実体形成を誘導する拡散性の細胞間シグナルの存在が報告されている (Qualls *et al.*, 1978b, Stephens *et al.*, 1982)。Stephensらは、重ねた濾紙の上に子実体を形成させ、水を溶媒とする下降式クロマトグラフィーによって子実体由来の培養液を回収した。この培養液を暗黒下での培養に添加すると、光照射下と同様に集合の形成と子実体への成熟が誘導され、また、光照射下においても、集合までの時間が短縮され、形成される子実体数が増加した。この子実体形成誘導因子の本体は低分子量の脂溶性物質であることが示唆されている。

現在までに見出されてきている原核生物の細胞間情報交換系では、それらの現象を制御する数々の細胞間シグナルが有機化学的に単離、同定されている (Dunny and Winans, 1999)。それらのなかで、生物発光、病原性などを誘導するグラム陰性細菌のホモセリンラクトン類、及び孢子形成を誘導する放線菌の γ -ブチロラクトン化合物などが代表的な例であり (Table 3)、これらシグナルは、拡散によって細胞内に取り込まれ、生命現象を制御する遺伝子群の活性化を直接行うことが知られている。このように、多くの原核生物では拡散性の細胞間シグナルが細胞間情報交換系における中心的な役割を果たしているが、*M. xanthus*では、子実体形成を促進する拡散性物質の存在が古くから示唆されてるのにも関わらず、その活性物質の本体はその後全く明らかにされていない (Lev, 1954)。また、*M. xanthus*では、前述の通り子実体形成に関与する遺伝子が多数見いだされてきており、また、これら遺伝子の変異株の子実体形成を相補する物質が同定されているが、変異株を相補する物質が実際に細胞間シグナルの本体であるかどうかは明らかではない。よって、粘液細菌において細胞間シグナルの存在が明らかになっているのは*S. aurantiaca*のみであり、*S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子の解析によって、粘液細菌の子実体形成機構の解明が進むことが期待される。

*S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子の実体は、その生産量が少ないことから未だ同定に至ってはならず、子実体形成誘導因子の生産・分泌経路や、形態形成誘導機構も不明である。また、*S. aurantiaca*では、*M. xanthus*で明らかになっている子実体形成を誘導する遺伝子群に関しても殆ど明らかにされていない。そこで本研究では、まず*S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子の実体を明らかにし、さらにその分子と環境要因あるいは*M. xanthus*で見出されている子実体形成遺伝子との関係を解析することより、粘液細菌の形態形成経路を明らかにすることを目的とした。

Table 3 原核生物の拡散性細胞間シグナル分子

Genus	Process(es) Regulated	Signaling Molecule(s)	References
<i>Agrobacterium</i>	Conjugation	HSLs ^a	Fuqua <i>et al.</i> , 1995
<i>Erwinia</i>	Plant Pathogenesis	HSLs	Swift <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas</i>	Mammalian Pathogenesis	HSLs	Costerton <i>et al.</i> , 1999
<i>Vibrio</i>	Bioluminescence	HSLs	Bassler <i>et al.</i> , 1994
<i>Streptomyces</i>	Antibiotic Production Development	γ -butyro- lactones	Horinouchi and Beppu, 1996

^aHSLs, homoserine lactones

第一章 子実体形成誘導因子の構造解析

1-1 序

*S. aurantiaca*の集合、及び子実体形成には、栄養飢餓、光照射、及び細胞が高い密度で存在することが必要である (Qualls *et al.*, 1978a, b)。Quallsらは、光照射下において寒天上に形成された*S. aurantiaca*の子実体の脇に、低細胞密度の栄養細胞を接種することによって、本来子実体形成の誘導されない低密度の細胞においても子実体形成が誘導されることを示した (Qualls *et al.*, 1978b)。これにより、*S. aurantiaca*は、寒天中を拡散し子実体形成を誘導する因子を生産することが初めて示唆された。

次いで、Stephensらは、栄養飢餓、光照射下で形成された*S. aurantiaca*の子実体の培養液を抽出し、その子実体形成誘導活性を検討した (Stephens *et al.*, 1982)。まず、重ねた濾紙の一番上に寒天を重ね、寒天上に子実体を形成させ、下の濾紙より水を移動相とする下降式クロマトグラフィーによって培養液を回収した。そして、この培養液を栄養飢餓の培養に添加すると、暗黒下においても集合、及び子実体形成が誘導されることを示した。Stephensらは、この子実体形成誘導因子を、細胞間で作用する情報伝達物質であることより「フェロモン」と命名した。この「フェロモン」は、クロロホルムで抽出され、熱処理、タンパク質分解酵素、フォスファターゼによって失活せず、ゲル濾過カラムで分子量が1,800以下の画分に溶出されることから、その本体は低分子量の脂溶性物質であることが示唆されている (Stephens *et al.*, 1982)。

この子実体形成誘導因子は、極微量にしか存在しないため永らくその構造は明らかにされてこなかったが、*S. aurantiaca*の子実体形成機構を解明するための鍵物質であると考えられる。そこで本章では、子実体形成誘導因子の単離・同定、及び構造解析を目的として以下の実験を行った。

1-2 材料と方法

細胞及び培養条件

濾紙上に形成させ乾燥させた*S. aurantiaca* DW4 (ATCC 33878)の子実体をCy固体培地 (0.3% casitone [Difco], 0.1% Yeast Extract [Difco], 1% CaCl₂, 1.5% agar) に塗布し、暗黒下、30℃で培養した。2-3日後、増殖した細胞を500 mlの三角フラスコに入れた150 mlの液体casitone培地 (1% casitone, 8 mM MgSO₄) に1白金耳接種し、暗黒下、30℃、150 rpmの振盪培養を行った。OD₆₆₀が0.3になるまで増殖させた培養液に終濃度10%のグリセロールを添加し、2 mlずつセラムチューブに分注して-80℃で保存した。この培養液2 mlを500 mlの三角フラスコに入れた150 mlの液体casitone培地に接種し、暗黒下、30℃、150 rpmの振盪培養を行なってOD₆₆₀が0.3になるまで増殖させることにより、*S. aurantiaca*の栄養増殖細胞を調製した。

子実体形成の誘導

栄養増殖細胞を $5,000\times g$, 10 minの遠心分離により回収し、 $2\times 10^8/5\ \mu\text{l}$ になるようにCPS培地 (3.4 mM CaCl_2 , 10 mM KCl , 10 mM NaCl) に懸濁した。懸濁した細胞を、24穴プレート (Iwaki) のウェル中に固化した2 mlの固体CPS培地 (CPS培地, 1.5% agar) の中央に $5\ \mu\text{l}$ ずつ接種し、白熱灯による $3.5\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の強度の光照射下、 30°C 、24 hrの培養を行うことで子実体形成を誘導させた。形成された子実体数は、SZH 10型実体顕微鏡 (Olympus) 下で計数した。

濾紙法による子実体形成誘導因子の生産と回収

子実体形成誘導因子の回収のため、 $22\times 7\text{ cm}$ に切断した3 MM濾紙 (Watman) 2枚に5 mlの0.5×CPSを添加し、その上に20 mlの固体CPS培地を重層した濾紙1枚を重ねた。この表面に、*S. aurantiaca*の栄養細胞 ($2\times 10^8/5\ \mu\text{l}$) を $5\ \mu\text{l}$ ずつ均等に25カ所にスポットした。 $3.5\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ の白熱光照射下、 30°C 、24 hrの培養を行った後、3枚の濾紙より、水を移動相とする下降式ペーパークロマトグラフィー法を用いて培養液10 mlを回収した。回収された培養液を5 mlのクロロホルムで2回抽出し、得られた下層を無水硫酸ナトリウムで脱水後、ロータリーエバポレーターで溶媒を除去した。抽出物を250 μl のメタノールに溶解させ、子実体形成誘導活性を検定した。

液体培地中での子実体形成誘導因子の生産と回収

6×10^{10} の栄養細胞を500 mlの三角フラスコに入れた120 mlのTPM培地 (10 mM Tris-HCl, 1 mM K_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer, 8 mM MgSO_4 , 0.1% CaCl_2 , pH 7.6) に懸濁し、自然光照射下、 30°C 、3日間、140 rpmで振盪培養をした後、 $7,000\times g$, 10 minの遠心分離により、培養液を回収した。培養液を60 mlのクロロホルムで2回抽出し、濾紙法と同様に子実体形成誘導因子を回収した。子実体形成誘導因子の大量精製のための液体培地の組成の検討においては、TPM培地に、0.2% (w/v) グルタミン酸1ナトリウム、0.4% (w/v) グルコース、あるいは両方の化合物を同時に添加した培地で同様に培養し、回収される子実体形成誘導活性を測定した。

子実体形成誘導活性の測定

メタノールに溶解させた被検試料10 μl を、滅菌水で100 μl に希釈した。これを1/2ずつに滅菌水で希釈した被検試料の希釈系列を作製し、各希釈試料の全量 (100 μl) を2 mlの固体CPS培地上に重層した。クリーンベンチ中で表面を乾燥させ、栄養増殖細胞を $2\times 10^8/5\ \mu\text{l}$ の密度で接種し、暗黒下、 30°C 、24 hrの培養を行った。子実体形成誘導因子の定量化のため、上記2 mlの固体CPS培地の系において、1つ以上の子実体が形成される活性の最少量を1 TUと定義した。

子実体形成誘導因子の大量精製

*S. aurantiaca*栄養細胞は、味の素株式会社に液体Casitone培地300 Lのスケールで大量培養し調製していただいた。2 Lの三角フラスコに入れた600 mlのTGG培地 (10 mM

Tris-HCl, 1 mM K_2HPO_4 - KH_2PO_4 buffer, 8 mM $MgSO_4$, 0.2% monosodium glutamate, 0.4% glucose, 0.1% $CaCl_2$, pH 7.6) に栄養細胞を接種して、 $3.0 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の自然光照射下、 30°C 、140 rpm、24 hrの培養を行った。100 L培養分の栄養細胞 (2×10^{13}) を TGG培地10.2 L分に接種したものを1バッチとして精製を行った。5,000×g, 30 minの遠心分離により培養上清を回収し、500 mlのXAD-2カラム (Organo) に培養液を吸着させた。500 mlの20%メタノールで洗浄後、1 Lの80%メタノールと500 mlの100%メタノールで溶出し、これら溶出液を合わせてロータリーエバポレーターでメタノールが除去される程度まで濃縮した後、残液を200 mlのクロロホルムで2回抽出した。クロロホルム層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、濃縮して20 mlのシリカゲル (silica gel 60, 100-210 μm , Kanto Chemical) カラムに供し、40 mlの酢酸エチル-クロロホルム (1:4, v/v) で溶出した。その後、活性画分を濃縮し、4段階の逆相HPLC操作によって精製を行った。最初の3段階のHPLC操作には、626 HPLCシステム (Waters) を用いて996 Diode Array detectorによって検出を行い、順番にODSカラム (Capcell Pak C18 UG120, 4.6 mm Φ × 250 mm, Shiseido)、RP8カラム (SymmetryShield RP8, 4.6 mm Φ × 250 mm, Waters)、CNカラム (Capcell Pak CN UG120, 2.0 mm Φ × 250 mm, Shiseido) を使用し、水-アセトニトリルのグラジエントにより溶出を行った。各段階の活性画分は、 H_2O で3倍量になるよう希釈し、次の精製操作に供した。ODSカラムを用いた分画操作では、流速1 ml/min、アセトニトリル濃度20%-100% /40 minのグラジエント溶出を行い、20-21 minの位置に活性が回収された。RP8カラムを用いた分画では、流速1 ml/min、アセトニトリル濃度30%-55% /50 minのグラジエント溶出を行い、21-22 minの位置に活性が回収された。CNカラムを用いた分画では、メタノール濃度35%-50% /30 min、流速0.1 ml/minのグラジエント溶出を行い、17-19 minの位置に活性が回収された。最終的には、活性画分をphenylカラム (Capcell Pak Phenyl UG120, 2.0 mm Φ × 250 mm, Shiseido) に供し、Series 1100システム (Hewlett Packard) を用いて、195 nm、200 nm、280 nmの波長のUV吸収をモニターし、流速0.1 ml/min、45%アセトニトリルによるアイソクラティック溶出を行った。

子実体形成誘導因子の構造解析

ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS) 分析は、5890 Series IIガスクロマトグラフィー (Hewlett-Packard) を連結したJMS-700 MStationマススペクトロメーター (JEOL) を用いた。子実体形成誘導因子は、DB-5 capillary column (0.32 mm Φ × 30 m, J&W Scientific) で分析した。カラム温度は、 80°C で2 min保持した後 $4^\circ\text{C}/\text{min}$ で 160°C まで上昇させた。試料の導入はスプリットレスモードで 180°C で行った。MSは、EI法によってイオン化を行い、電子エネルギー70 eV、トラップカレント300 μA の条件で行った。

絶対配置の決定は、子実体形成誘導因子を還元し、GC-MSで分析することによって行った。100 ngの子実体形成誘導因子を5 μl の5 mM水素化ホウ素ナトリウム (エタノール溶液) に溶解し、室温で30 min静置した。反応液を200 μl の水で希釈し、200 μl のジエチルエーテルで2回抽出した。得られた有機層を無水硫酸ナトリウム上で脱水

し、溶媒を除去した後に5 μ lのアセトニトリルに溶解させ、Chirasil-DEX CBカラム (0.25 mm Φ $\times$ 25 m, Chrompack) を用いたGC-MSによって分析した。キラルカラムのカラム温度は120 $^{\circ}$ Cで2 min保持した後、4 $^{\circ}$ C/minで180 $^{\circ}$ Cまで上昇させた。試料の導入はスプリットレスモード、180 $^{\circ}$ Cで行った。

1-3 結果

子実体形成条件と子実体形成誘導因子の存在の確認

*S. aurantiaca*の子実体形成は、報告されているとおり (Qualls *et al.*, 1978a, b)、光照射下において誘導され、暗黒下では誘導されなかった (Fig. 1-1)。子実体形成条件下における子実体形成誘導因子の生産・分泌の有無を確認するため、Stephensらの方法に従い (Stephens *et al.*, 1982)、栄養飢餓濾紙の上に*S. aurantiaca*の細胞を接種し、光照射下で培養することにより子実体を形成させた後、下降式クロマトグラフィーにより培養液を回収した。この培養液のクロロホルム抽出物を栄養飢餓培地に添加し、 2×10^8 / 5 μ lの密度の菌懸濁液を接種して培養を行なったところ、通常では子実体形成の起こらない暗黒下での培養において子実体形成が誘導された (Fig. 1-1)。このことより、暗黒下において子実体形成を誘導する子実体形成誘導因子が子実体形成条件下において分泌されていることが確認された。

この培養液抽出物を希釈して暗黒下の培養に添加したところ、濃度依存的に子実体形成を誘導した (Fig. 1-2)。よって、この暗黒下での子実体形成を指標に、以下の精製における子実体形成誘導因子の活性評価を行うこととした。評価に用いた2 mlの培養系において (詳細は方法の項参照)、1つ以上の子実体が形成される子実体形成誘導活性の最少量を1 TUとした。

子実体形成誘導因子の大量調製

子実体形成誘導因子の単離・精製には大量の試料調製が必要であるが、上記濾紙法による大量調製は困難である。そこで、液体培地から子実体形成誘導因子を回収する方法を検討した。まず、TPM培地に栄養細胞を高密度に接種し光照射下で振盪培養を行った結果、一定細胞数当たり濾紙法の1/8量の子実体形成誘導活性が回収された (Fig. 1-3)。さらに、TPM培地に各種化合物を添加した培地を検討した結果、グルタミン酸・グルコースを添加した培地において、最も多い子実体形成誘導活性が得られた。このことより、以下の子実体形成誘導因子の精製には、このグルタミン酸・グルコース培地 (TGG培地) で培養した培養液を用いることとした。

子実体形成誘導因子の単離

子実体形成誘導因子の精製には、培養液100 L分の栄養細胞 (2×10^{13}) をTGG培地10.2 Lに接種したものをを用いた。培養上清を、XAD-2カラム、シリカゲルカラム、及

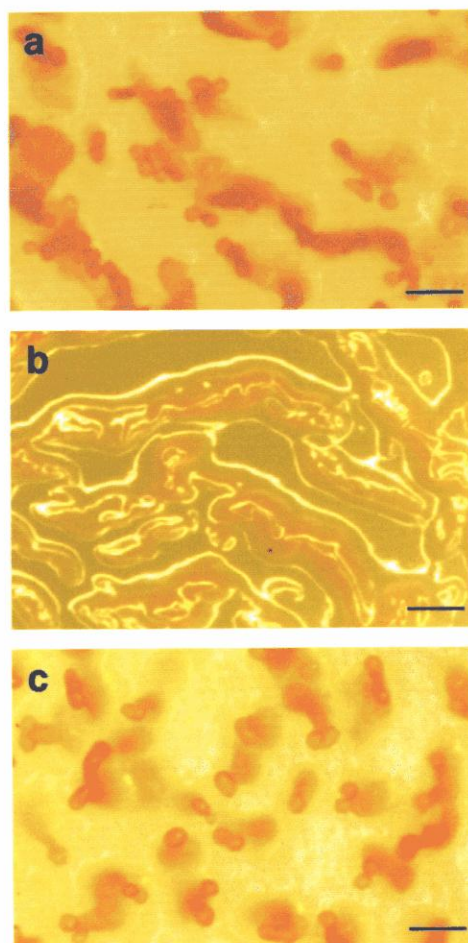


Fig. 1-1 *S. aurantiaca*の子実体形成に対する光照射、及び培養液のクロロホルム抽出物の効果

栄養飢餓培地に $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下 (a)、暗黒下 (b, c)、 30°C 、24 hrで培養した。(c)においては、白熱光照射下において子実体を形成させた本菌の培養液のクロロホルム抽出物をあらかじめ添加して培養した。バーは $200 \mu\text{m}$ を示す。

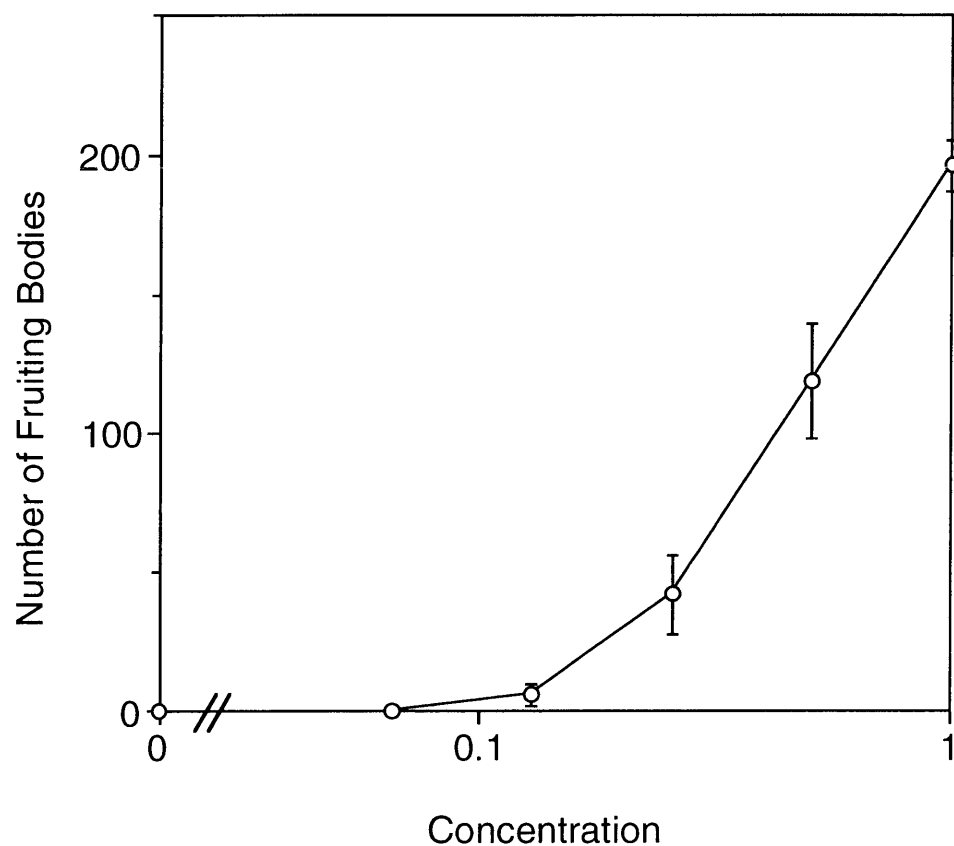


Fig. 1-2 培養液抽出物の子実体形成誘導活性

培養液のクロロホルム抽出物を段階希釈し、固体CPS培地に添加して、 $2 \times 10^8/5 \mu\text{l}$ の細胞を接種し、暗黒下、 30°C 、24 hrの培養を行った。 5×10^9 の細胞の培養液のクロロホルム抽出物を250 μl のメタノールに溶解させ、そのうちの10 μl を滅菌水で100 μl に希釈したものを1とした。バーは標準偏差を示す (n=3)。

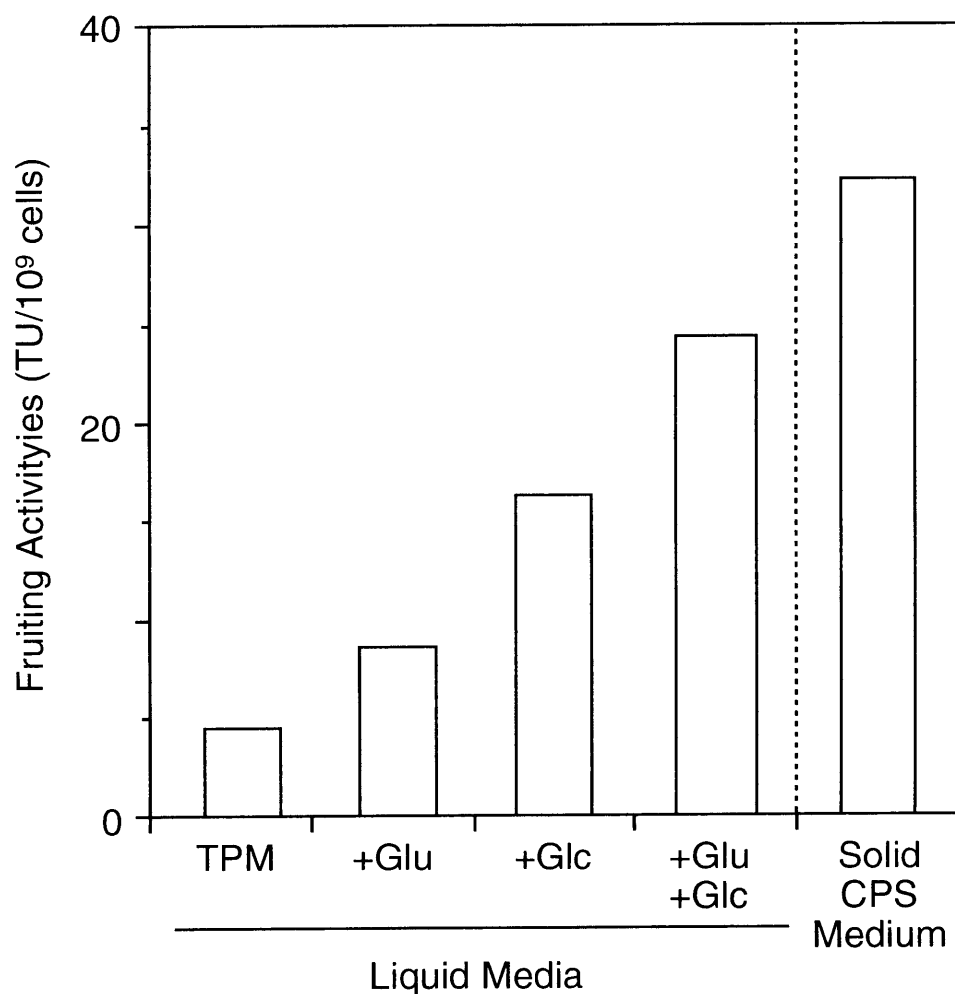


Fig.1-3 液体培地による子実体形成誘導活性の生産

120 mlの液体TPM培地に 6×10^{10} の栄養細胞を接種し、自然光照射下、30℃、3日間、140 rpmの振盪培養を行った後、培養液をクロロホルムで抽出し、子実体形成誘導活性を測定した。また、培地に0.2%グルタミン酸1ナトリウム (Glu)、0.4%グルコース (Glc)、0.2%グルタミン酸1ナトリウム・0.4%グルコース (Glu+Glc)を添加し、同様の操作を行った。これら液体培地より回収されたの子実体形成活性と、固体CPS培地からの子実体形成誘導活性の比較を行った。

び、ODSカラム、RP8カラム、CNカラムを用いたHPLCに供した (Table 1-1)。最終的にアイソクラティック溶出によるphenylカラムによるHPLCに供し、各画分毎に子実体形成誘導活性を測定したところ、活性のピークと一致する単一のUVピークを得た (Fig. 1-4)。この化合物は、200 nm以下の末端吸収と280 nm付近に弱い吸収を持ち (Fig. 1-5)、ケトンの存在が示唆された。本化合物が共役しないケトン残基を有し、そのケトンの280 nmでの分子吸光計数 ϵ を20と仮定すると、最終的に得られた子実体形成誘導因子の量は1.2 μg と計算された。上記すべての精製操作において、子実体形成誘導活性は1カ所の画分に回収された。よって、子実体形成誘導因子は、今回精製された単一分子であることが示唆された。培養上清からの精製度は9500倍、回収率は3%であった (Table 1-1)。なお、精製・構造解析後に判明したことであるが、本因子は揮発性であったために、最終的な回収率が低かったと考えられる。また、本精製により精製された子実体形成誘導因子の純度を100%とすると、1 TUが約50 pgに相当すると計算された。

子実体形成誘導因子のGC-EIMSを測定したところ、 m/z 185、182、167、141、127、125、114、97、85、72、69、57、55にフラグメントピークが得られた (Fig. 1-6b)。また、 m/z 182のピークに関して高分解能MSスペクトルを測定したところ、 $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}$ という分子式が導き出された。

子実体形成誘導因子の構造解析

本研究遂行中に、*S. aurantiaca*の集合を促進する物質として、粘液細菌学会において8-hydroxy-2,5,8-trimethyl-4-nonaone (Fig. 1-6a) が報告された (Hull *et al.*, 1997)。後にstigmoloneと命名されたこの化合物 (Plaga *et al.*, 1998) の分子式は $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$ (MW 200) であり、ケトンが存在する。また、筆者が得た子実体形成誘導因子のMSスペクトルは、stigmoloneの構造から推定されるフラグメンテーションパターンと矛盾しなかった (Fig. 1-6a, b)。さらに、子実体形成誘導因子の m/z 182のピークの高分解能MSスペクトルより得られた分子式と、stigmoloneの脱水により得られる化合物の分子式は同一であった。

今回精製した子実体形成誘導因子がstigmoloneである可能性を検討するため、東京理科大学森謙治先生により合成、御供与いただいたstigmoloneの合成標品 (Mori and Takenaka, 1998) と、精製した子実体形成誘導因子との比較を行った。天然物と合成stigmoloneのGC-EIMSを測定したところ、両者はGC上でのリテンションタイムは等しく、また、EI-MSで同じフラグメンテーションパターンを示した (Fig. 1-7)。よって、今回得られた*S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子は8-hydroxy-2,5,8-trimethyl-4-nonaoneであると結論した。

子実体形成誘導因子の生物活性

生理活性物質は多くの場合1つの光学異性体のみが合成され、そのみが活性を示すことが知られている。Stigmoloneの5位の不斉中心の絶対配置は決定されておらず、この絶対配置を決定することは重要であると考えられた。そこで、まずキラル合成

Table 1-1 子実体形成誘導因子の精製スキーム

Column	Total Activity (TU)	Weight (μ g)	Recovery (%)	Specific Activity (TU/ μ g)	Purification (fold)
XAD-2	960,000	450,000	100	2.1	1
Silicagel	760,000	80,000	80	9.5	5
ODS	192,000		20		
RP8	152,000		16		
CN	44,000		5		
Phenyl	24,000	1.2	3	20,000	9,500

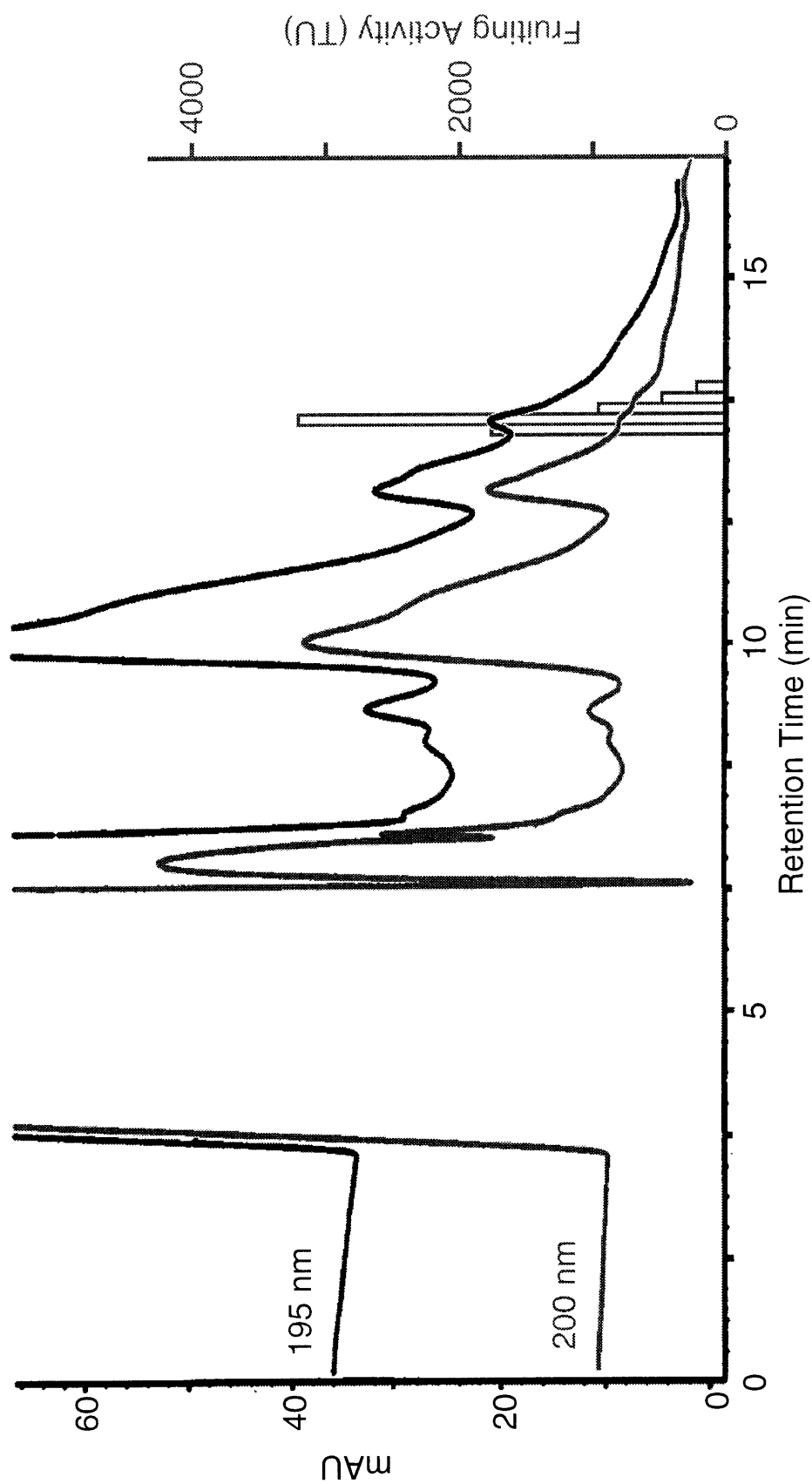


Fig. 1-4 逆相HPLCによる子実体形成誘導因子の精製
 前段階の活性画分の1/4量をCapcell Pak Phenyl UG120カラム (2.0 mm Φ $\times$ 250 mm) に供し、流速0.1 ml/min、45%アセトニトリルによるアイソクラティック溶出を行った。

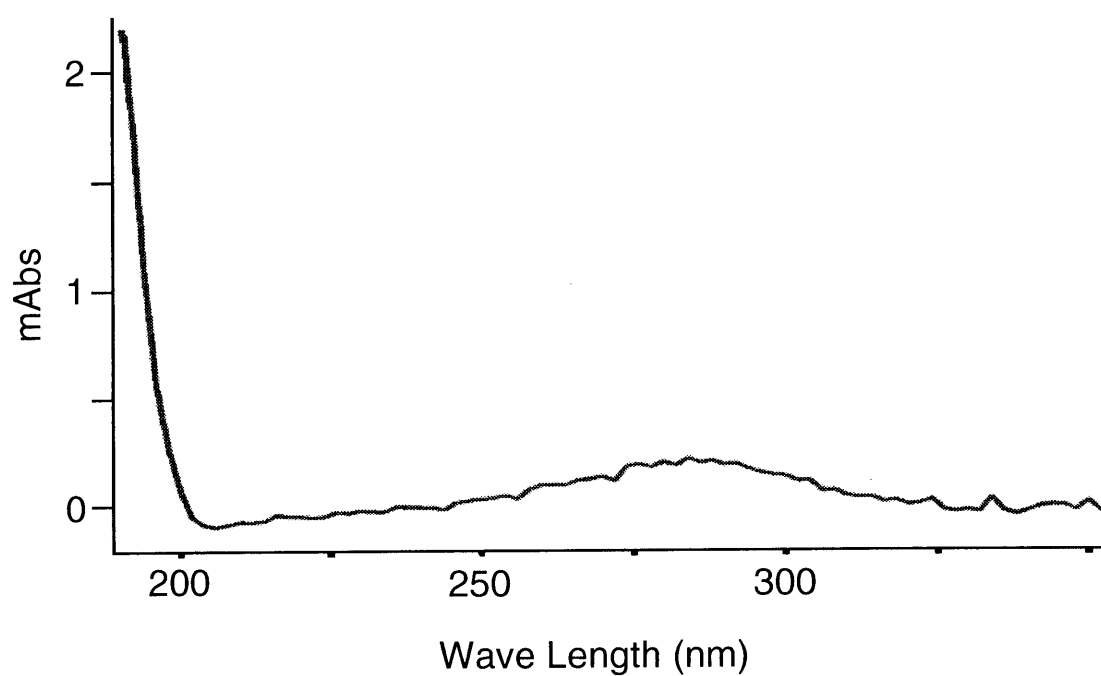


Fig. 1-5 精製された子実体形成誘導因子のUVスペクトル

Fig. 1-4のクロマトグラムにおける、活性のピークのUVスペクトルを示した。45%アセトニトリル中における子実体形成誘導因子のUVスペクトル。

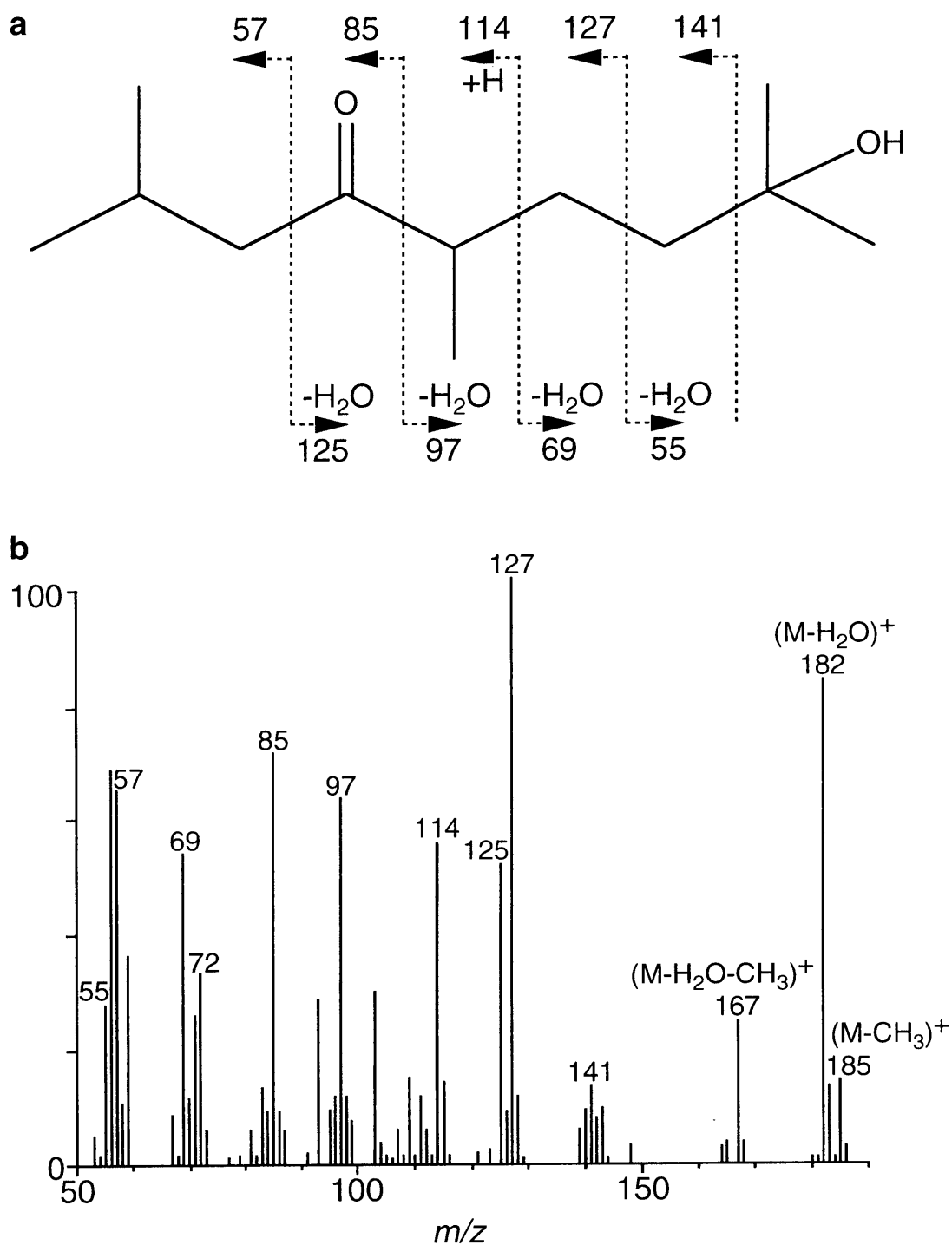


Fig.1-6 Stigmoloneの構造と、精製した子実体形成誘導因子のマススペクトル

Stigmoloneの構造と推定されるフラグメンテーションパターン (a) 、及び精製された子実体形成誘導因子のEIマススペクトル (b) 。

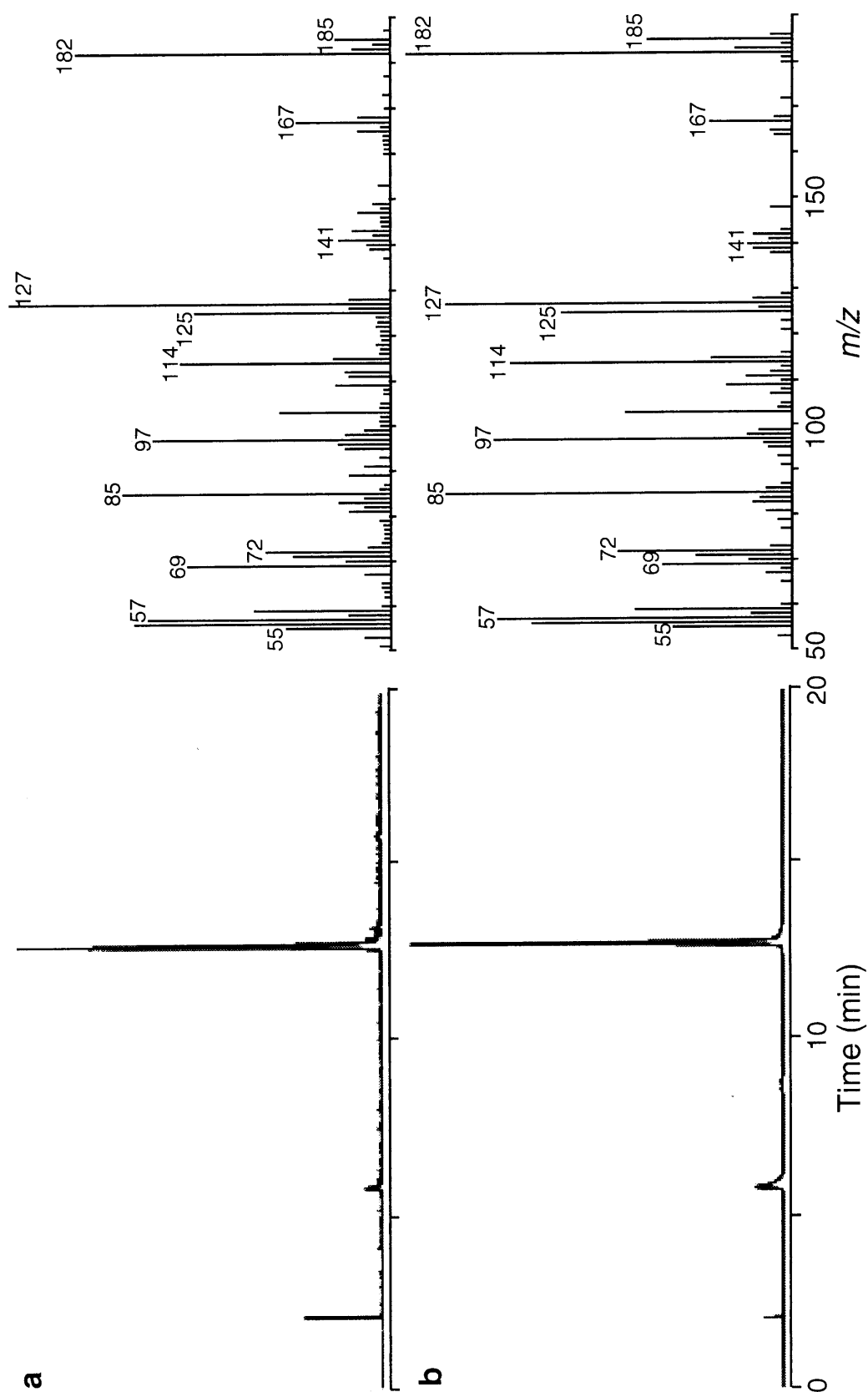


Fig. 1-7 精製した子実体形成誘導因子 (a) と合成stigmolone (b) のGC-EIMS
左側はm/z 182のマスクロマトグラム、右側は13 minの位置のマススペクトルを示す。

を行ったstigmolone（森先生より御供与、Mori and Takenaka, 1998）を用いて生物活性の検定を行った（Fig. 1-8）。意外なことに、*S*体、*R*体のエナンチオマーはほぼ同じ生物活性を持つことが判明した。また、ラセミ体と両エナンチオマーの活性もほぼ同じであった。よって、stigmoloneは、両方のエナンチオマーが同様の活性を持ち、また、両者を混合することによる阻害や促進効果はないことが示された。

天然物もこれら合成品とほぼ同じ活性を示すことが明らかとなり、改めて生理活性の面からも今回単離した*S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子がstigmoloneであることが確認された。

子実体形成誘導因子の絶対配置の決定

活性の比較からはstigmoloneの絶対配置を決定することは出来なかったため、分析機器を用いて分光学的に、あるいは化学的に子実体形成誘導因子の絶対配置を決定することを試みた。まず、合成品のCDスペクトルをJ-720型円二色性分散計（日本分光）により測定した。CDスペクトルにより、*R*-、並びに*S*-エナンチオマーを見分けることができた（Fig. 1-9）。1個の不斉中心をもつ脂肪属ケトンにおいて、不斉中心とカルボニル基との間の炭素原子が0-1個の場合、完全に符号の逆転したコットン効果曲線を与えることが観測されており（Djerassi and Geller, 1959）、stigmoloneの*R*体と*S*体は、280 nmにそれぞれ負と正のコットン効果を示した。しかし、天然物は微量でありCDスペクトル測定のための充分量のサンプルを得ることができなかった。

次に、各種キラルカラムを用いたGC-MSによって絶対配置の決定を試みた。

Chirasil-DEX CBカラム (Chrompack)、 α -、及び γ -DEXカラム (Supelco)、Chirasil-L-Valカラム (Chrompack)を検討したが、*R*-、及び*S*-エナンチオマーを分離することは出来なかった (data not shown)。さらに、両エナンチオマーのアルキルオキシム誘導体を合成し、これらのキラルカラムに供したが、やはり両エナンチオマーを分離することは出来なかった (data not shown)。

そこで、両エナンチオマーを水素化ホウ素ナトリウムによって還元し、 β -シクロデキストリン系カラム (Chirasil-DEX CB) を用いたGC-MSに供した。すると、両エナンチオマーとも、還元することによって生じた*threo*-と*erythro*-型の2つのジアステレオマーのピークが認められた (Fig. 1-10 a,b)。還元型*R*-エナンチオマーのピークは13.18 minと13.30 minの2つであったが、還元型*S*-エナンチオマーのピークは13.20 minと13.48 minであり、2つのエナンチオマーを区別することが出来た。そこで精製した子実体形成誘導因子を同様に処理しGC-MS解析を行ったところ、3つのピークが検出され、ラセミ体 (data not shown) と同様のパターンを示した (Fig. 1-10 c)。よって、精製した子実体形成誘導因子は、ラセミ体であることが示された。また、還元型*S*-エナンチオマーの13.48 minのピークは、還元したラセミ体のマスクロマトグラムにおいても他のピークと分離していたため、天然物における両エナンチオマーの存在比をこのピークの面積をもとに換算したところ、天然物における両エナンチオマーの存在比は1:1であった。

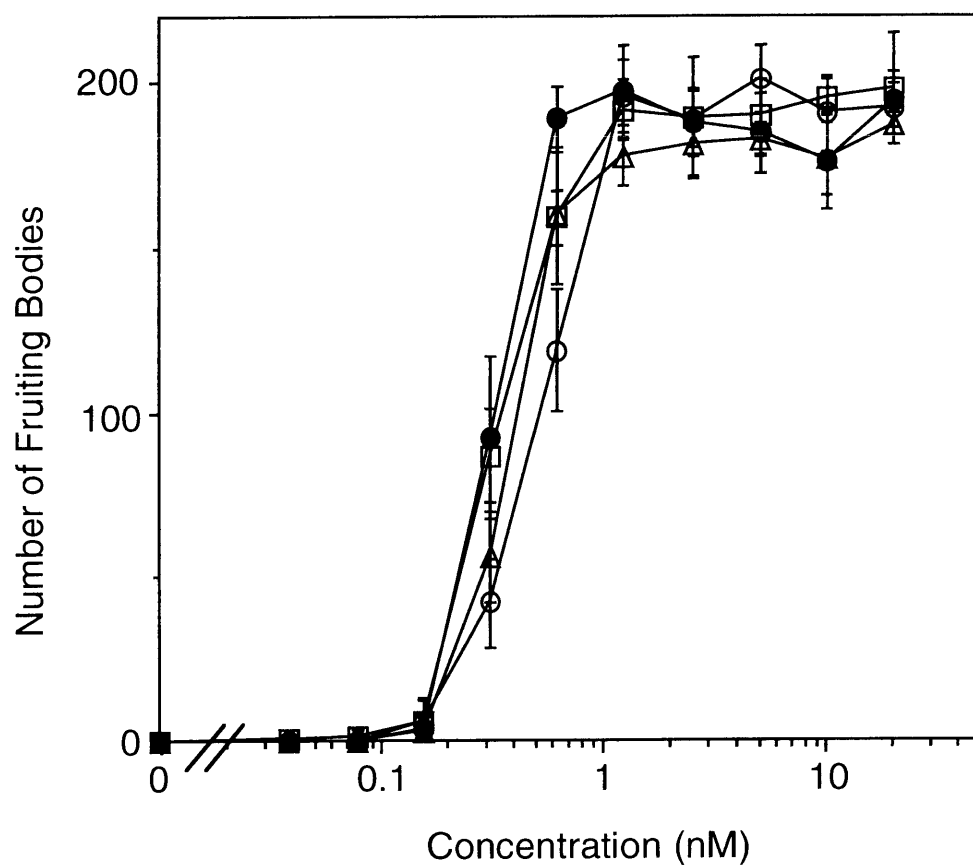


Fig. 1-8 子実体形成誘導因子とstigmoloneの子実体形成活性
 精製された子実体形成誘導因子 (△)、化学合成stigmoloneのラセ
 ミ体 (□)、*R*体 (○)、及び*S*体 (●)の子実体形成誘導活性を測定
 した。各化合物を60℃の固体CPS培地に添加し、培地を固化させた
 後、 $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を接種して、24時間、28℃の培養を行った。バ
 ーは標準偏差を示す (n=3)。

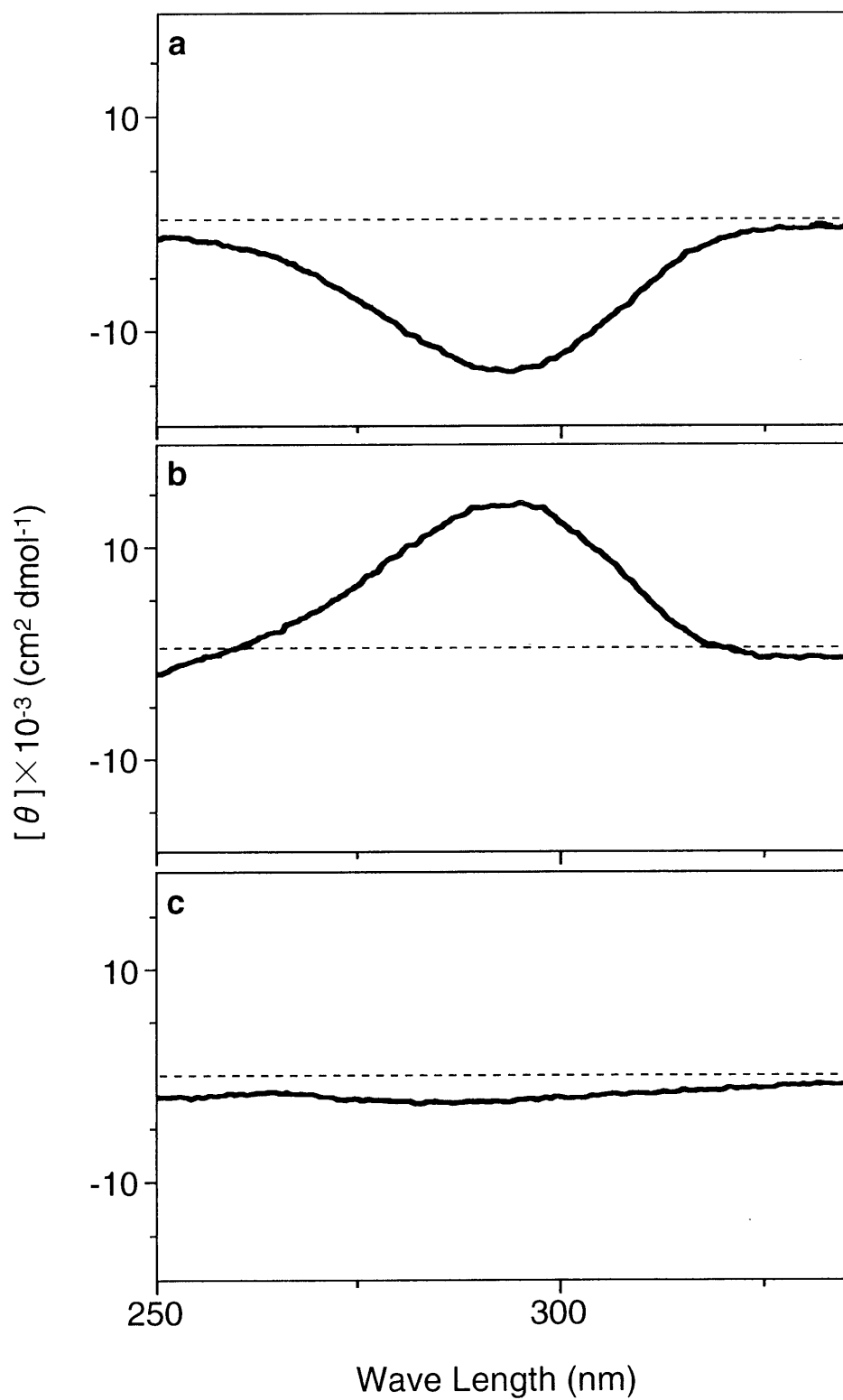


Fig. 1-9 StigmoloneのCDスペクトル

Stigmoloneの*R*体 (a)、*S*体 (b)、及びラセミ体 (c) のCDスペクトル。1 mgの各化合物を2 mlのメタノールに溶解させ、J-720型円二色性分散計で測定した。

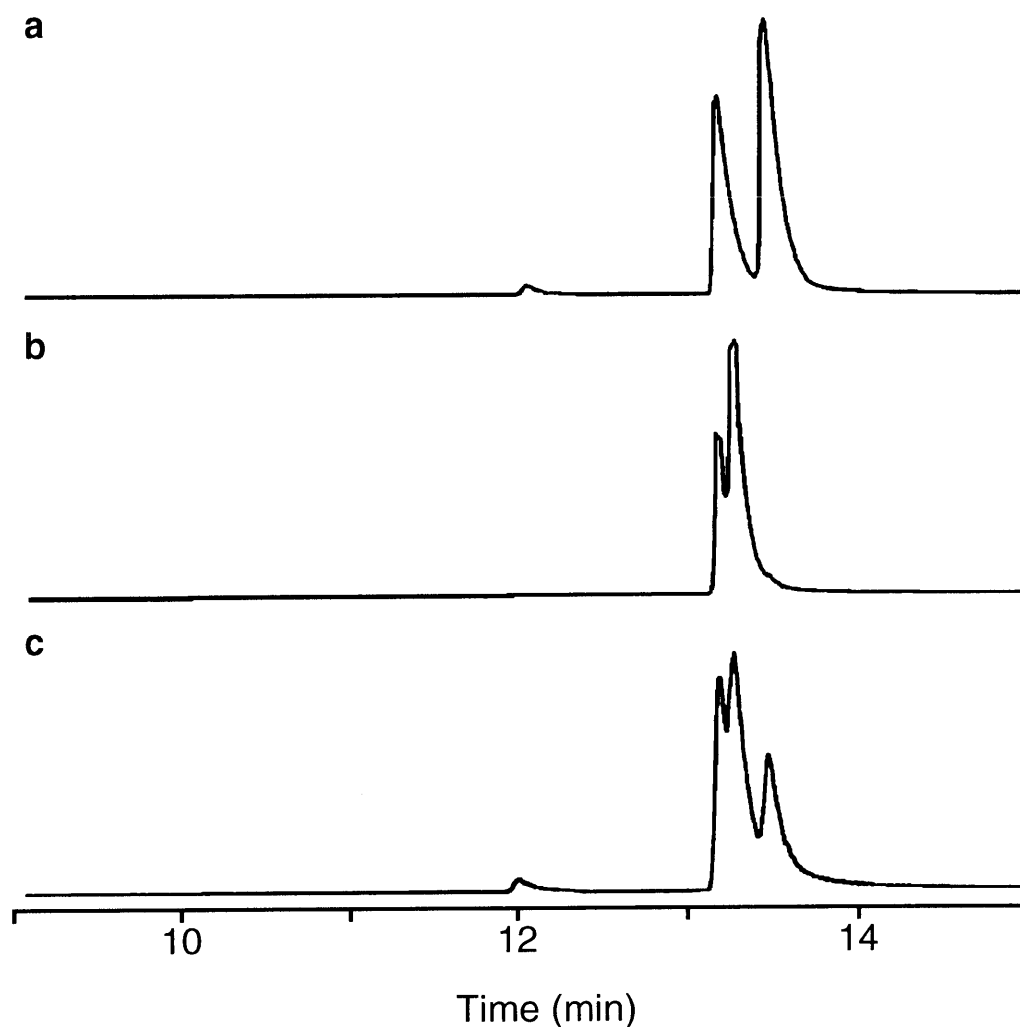


Fig. 1-10 還元した合成stigmoloneと子実体形成誘導因子のGC-EIMS
還元した合成stigmoloneの*S*体 (a)、*R*体 (b)、及び精製した子実体形成誘導因子 (c) の m/z 182のピークのマスキロマトグラム。Chirasil-DEX CBカラム (0.25 Φ $\times$ 25 m, Chrompack) を用いたGC-EIMSによって分析を行った。カラム温度は120 $^{\circ}$ Cで2 min保持した後4 $^{\circ}$ C/minで180 $^{\circ}$ Cまで上昇させた。試料の導入はスプリットレスモード、180 $^{\circ}$ Cで行った。

精製過程におけるラセミ化の検討

精製した子実体形成誘導因子はラセミ体であったが、精製の過程において天然物がラセミ化した可能性が考えられたため、合成stigmoloneを用いてラセミ化の可能性について検討した。まず、合成品の両エナンチオマーを精製過程と同様に処理し、絶対配置が変化するかどうかを検討した。クロロホルム抽出、シリカゲルカラムでの精製を行ったが、構造の変化は見られなかった (data not shown)。また、60℃のCPS培地に溶解させ、2日間室温で保温したサンプルにおいても、両エナンチオマーのラセミ化はみられなかった (data not shown)。よって、精製過程やアッセイ過程におけるstigmoloneのラセミ化の可能性は低いと考えられた。

さらに、天然物について、精製過程におけるラセミ化の可能性を排除するため、酸や塩基を用いない温和な条件での精製を行い、得られた化合物の絶対配置を決定した。回収された培養液をヘキサンで抽出し、Sep Pack C18カラム (Waters) に供しアセトニトル80%で溶出し、Capcell Pak C18カラムを用いたHPLCに供した。この精製画分を直接還元し、GC-MSによる分析を行ったところ、得られた子実体形成誘導因子はやはりstigmoloneのラセミ体であった (data not shown)。以上のことより、培養液中に生産された*S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子は、ラセミ体であると結論づけた。

1-4 考察

筆者は本研究で、暗黒下での子実体形成誘導活性を指標に、各種クロマトグラフィーを用いて子実体形成誘導因子の単離・精製を行ない、*S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子を単離した (Table 1-1, Fig. 1-4)。今回単離した*S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子は、本研究遂行中に報告されたstigmolone (Hull et al., 1997) と同一分子であった。Hullらは、本研究とは異なり、子実体形成ではなく集合を促進する物質の単離、精製を行った。集合を促進する因子は 10^{-9} Mで最大活性を持っており、本研究の子実体形成誘導因子が $1-2 \times 10^{-9}$ Mで最大活性を持っていたのとはほぼ一致する。よってstigmoloneは、*S. aurantiaca*において集合、及び子実体形成の両方を誘導することが明らかとなった。

*S. aurantiaca*は、光照射下においては規則正しい集合を形成し、全ての集合体の子実体へ成熟するのに対し、暗黒下では集合は認められず、子実体形成も起こらないため (Qualls et al., 1978a, 1978b)、暗黒下で子実体が形成されないのは、規則的な集合が形成されないためと考えられている。よって、stigmoloneによる集合の促進と、本研究における子実体形成誘導因子による子実体形成の誘導は、菌体に生じた同一の変化の結果を違う時期に観察している可能性が考えられる。しかし、集合体が形成されることによって自動的に子実体形成が誘導されるのかは不明であり、このことについては、次章でさらに追求する。

Stigmoloneは5位に不斉中心を有しており、多くの生理活性物質は光学異性が活性を左右することが知られているため (Mori, 1997)、子実体形成誘導因子の絶対配置と生理活性との関係を検討した。昆虫のフェロモンなどでは、光学異性体と生理活性との関係は様々である (Mori, 1997)。例えば、マメコガネ *Popillia japonica* の性フェロモン *japanilure* では片方のエナンチオマーのみが活性を持ち、もう片方のエナンチオマーは阻害的に働く。また、キクイムシ科の昆虫 *Gnathotrichus sulcatus* のフェロモン *sulcatol* はラセミ体であり、両方のエナンチオマーが混在していないと活性はない。*S. aurantiaca* の *stigmolone* は、両方のエナンチオマーが同様の活性を持ち、また、両者を混合することによる阻害や促進効果はなかった (Fig. 1-8)。さらに、培養液中に生産された *S. aurantiaca* の子実体形成誘導因子は、*stigmolone* のラセミ体であった (Fig. 1-10)。培養液中でのラセミ体の存在には、細胞内で最初からラセミ体の *stigmolone* が合成される可能性と、どちらか一方のエナンチオマーのみが合成された後に、ラセマーゼ等によってラセミ化される可能性が考えられる。これらの謎を解くためには、今後、*stigmolone* の生合成過程や分泌経路、受容機構の解明が必要である。

他の粘液細菌についても、子実体形成を促進する拡散性物質の存在は古くから示唆されてきた。*M. xanthus* では、すでに形成された子実体に寒天を重層し、その上に栄養細胞を接種すると子実体形成が促進されることが観察されている (Lev, 1954)。また、*M. virescens* においては、子実体由来の抽出物が子実体形成を促進することが示されている (Jennings, 1961)。しかし、これらの活性物質の本体は、その後全く明らかにされていない。よって、*stigmolone* は粘液細菌で単離・同定された初めての拡散性の子実体形成誘導因子である。*Stigmolone* は、*M. xanthus* の子実体形成においては効果が見出されていないことから (Plaga *et al.*, 1998、不藤、私信)、他の粘液細菌には *stigmolone* 以外の子実体形成誘導因子が存在することが期待される。序論に述べたとおり、*M. xanthus* においては分子生物学的手法によって子実体形成に参与する遺伝子や物質が解析されているが (Hagen *et al.*, 1978)、*stigmolone* のような拡散性の子実体形成誘導因子は同定されていない。よって、このような因子の単離には、本研究で用いた有機化学的手法が有効であると考えられる。

現在までに知られている原核生物の拡散性細胞間シグナルとして代表的なものに、グラム陰性細菌に広くみられ生物発光や病原性誘導などに関与するホモセリンラクトン類、放線菌の孢子形成や抗生物質産生を誘導する γ -ブチルラクトン類などがあげられる (Fig. 1-11) (Dunny and Winans, 1999)。しかし、今回単離された *stigmolone* は、これらとは構造的に異なる新しいタイプの細胞間シグナル分子であり、固有の生合成経路を持つことが期待される。大変興味深いのが、*stigmolone* は生産量が極めて少ないことから、その生合成経路の解析は困難であると予想される。

Streptomyces griseus の γ -ブチルラクトン化合物である A-ファクターは、 10^{-9} M の濃度で孢子形成、色素生産、及びストレプトマイシンの生産を誘導する (Horinouchi

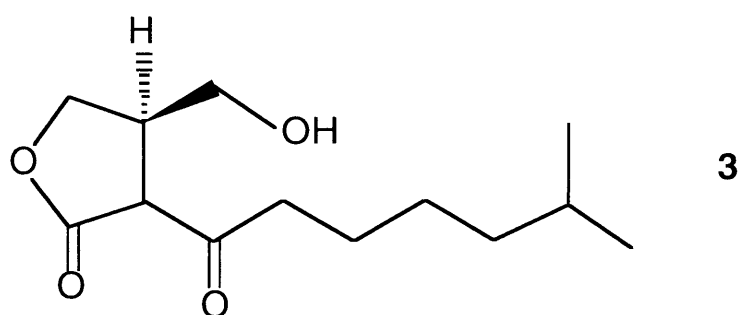
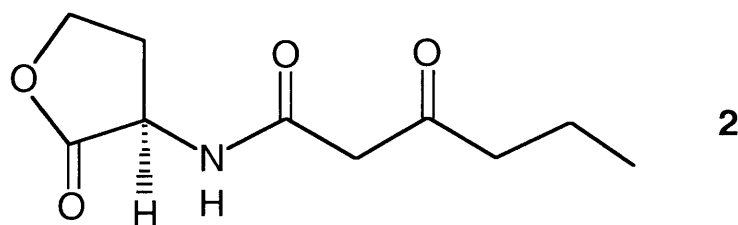
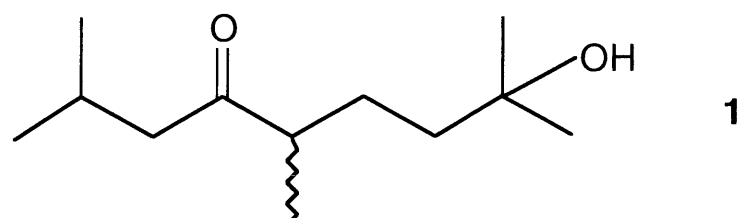


Fig. 1-11 原核生物の細胞間シグナル分子

1: *S. aurantiaca*の子実体形成誘導因子stigmolone 2: *Vibrio fischeri*の発光シグナル *N*-(3-oxohexanoyl)-L-homoserine lactone (Bassler *et al.*, 1994) 3: *Streptomyces griseus*の胞子形成、ストレプトマイシン産生シグナル、 γ -ブチロラクトン系化合物、A-factor (Horinouchi and Beppu, 1992)

and Beppu, 1992)。Stigmoloneは 10^{-9} Mで最大活性を持っていることから (Fig. 1-8)、標的分子に対してA-ファクターと同等のアフィニティーを有していると考えられる。A-ファクターは拡散により細胞内に取り込まれ、レセプターであるArpAと結合する。ArpAは*adpA*などの転写因子の発現を抑制しており、A-ファクターと結合することによりこれら遺伝子のプロモーター領域より解離し、複数の遺伝子発現の誘導が引き起こされる。AdpAなどの転写因子は、ストレプトマイシン合成酵素遺伝子群や、2成分制御系のレギュレーター遺伝子の発現を誘導し、それによって複数の情報伝達系路が活性化され则认为られている (Champness, 2000)。粘液細菌においても、複数の情報伝達系路の制御によって子実体形成が誘導されるため、stigmoloneによって誘導される*S. aurantiaca*の子実体形成においても、このような経路と同様のシグナル受容機構の存在が期待される。

第二章 子実体形成の生理学的解析

第1節 stigmoloneと環境要因との関係

2-1-1 序

*S. aurantiaca*の形態形成には、栄養飢餓、及び光が必須である (Qualls *et al.*, 1978a, b)。一方、第1章で明らかにしてきた通り、本菌は暗黒下での子実体形成を誘導する子実体形成誘導因子stigmoloneを生産している。この子実体形成誘導因子と環境要因との関係については、これまで、栄養飢餓によって子実体形成誘導因子が生産され、また、光によって本因子への感受性が高められる可能性が指摘されてきたが (Stephens *et al.*, 1982)、その詳細は明らかではない。

第1章において子実体形成誘導因子の構造をstigmoloneと同定したことにより、本因子と環境要因との関係を厳密に解析することが可能となった。ここでは、stigmoloneの生産・分泌、及びstigmoloneに対する感受性と栄養飢餓、及び光の環境要因との関係を解析する事によって、*S. aurantiaca*の子実体形成におけるstigmoloneの役割を明らかにすることを目的とした。

2-1-2 材料と方法

細胞の増殖と子実体形成の誘導

*S. aurantiaca*の培養と子実体形成の誘導は第1章の方法に従った。栄養飢餓後にstigmoloneを添加するには、22×7 cmに切断した3 MM濾紙2枚に 2×10^{-9} Mのstigmoloneを溶解させた5 mlの0.5×CPSを添加し、その上に 2×10^8 /5 μ lの密度の*S. aurantiaca*の栄養細胞をスポットした20 mlの固体CPS培地を重層した濾紙1枚を重ねた。

子実体形成誘導活性の測定

子実体形成誘導活性の測定には、第1章の方法に従って濾紙法より回収し、調製した培養液抽出物を用いた。抽出物の子実体形成誘導活性の検定は、4/5倍に希釈した被検試料の希釈系列を作製し、第1章の方法に従って行った。

StigmoloneのGC-MSによる定量

Stigmoloneの定量のため、培養液のクロロホルム抽出物をシリカゲル薄層クロマトグラフィー (HPTLC plates silica gel 60, Merck) に供し、クロロホルム-酢酸エチル (93:7, v/v) で展開した。薄層クロマトグラフィープレートを乾燥後、Rf 0.3の画分をかきとりメタノールで抽出した。メタノールをロータリーエバポレーターにより除去し、試料をアセトニトリルに溶解させ、第一章の方法により直接GC-EIMSによ

る分析に供した。Stigmolone量は、 m/z 182のマスキロマトグラムの面積より計算した。

2-1-3 結果

栄養飢餓条件下における *S. aurantiaca* の形態変化

S. aurantiaca の栄養飢餓、及び光照射の効果を検討するため、細胞を栄養飢餓培地に接種し、光照射下と暗黒下での形態変化を観察した (Fig. 2-1-1)。*S. aurantiaca* は、光照射下において半球形の盛り上がった集合 (aggregate) を形成し、すべての集合が順次子実体 (fruiting body) を形成した。暗黒下では、不規則な細胞塊 (ridge) を形成し、ridgeからは子実体は形成されなかった。よって、光照射によって集合、子実体形成が誘導され、暗黒下ではridgeが形成されることが確認された。

第1章で明らかにしたとおり、暗黒下においては、stigmoloneの添加によって子実体形成が誘導される。Stigmoloneの添加によって暗黒下で形成された子実体の形態は、光照射下において形成された子実体の形態と変わらなかった (data not shown)。また、粘液細菌の子実体の内部の細胞は孢子に分化することが知られているが (Dworkin, 2000)、stigmoloneの添加によって暗黒下で形成された子実体においては、光照射と同様に孢子が形成されていた (data not shown)。

子実体形成に必要な光の密度を測定したところ、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の密度において最も効果的に子実体を形成し、それ以下の場合は形成される子実体形成の数が少なかった。また、 $6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強光下では子実体形成の阻害が見られた。よって、今後は白熱灯による $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の光照射を行うこととした。

Stigmoloneの生産・分泌に対する環境要因の影響

栄養飢餓、及び光照射がstigmoloneの生産・分泌に及ぼす影響を解析した。栄養飢餓濾紙に細胞を接種後、光照射下と暗黒下で培養を行い、一定時間ごとに回収される子実体形成誘導活性を定量した。一定時間後に回収された子実体形成誘導活性と、同処理においてその2 hr前に回収された子実体形成誘導活性との差より、2 hrごとに新たに生産・分泌された子実体形成誘導活性を求めた。なお、栄養固体培地に細胞を接種した場合では、光照射下、及び暗黒下いずれにおいても子実体形成は認められず、子実体形成誘導活性も回収されなかった。

細胞を飢餓状態にすると、光照射下においては、集合は栄養飢餓後14 hrからはじまり、栄養飢餓後18 hrに最大数に達した。また、子実体の形成は栄養飢餓後18 hrから始まり、栄養飢餓後22 hrに最大数に達した (Fig. 2-1-2a)。光照射下において培地中に分泌された子実体形成誘導活性は、栄養飢餓後8 hrから検出され、栄養飢餓後16 - 18 hrに最大量となった (Fig. 2-1-2b)。よって、子実体形成誘導活性の生産・分泌は、栄養飢餓によって誘導されることが明らかとなった。

光照射下において、栄養飢餓後20 hr以降には子実体形成誘導活性の増加が見られ

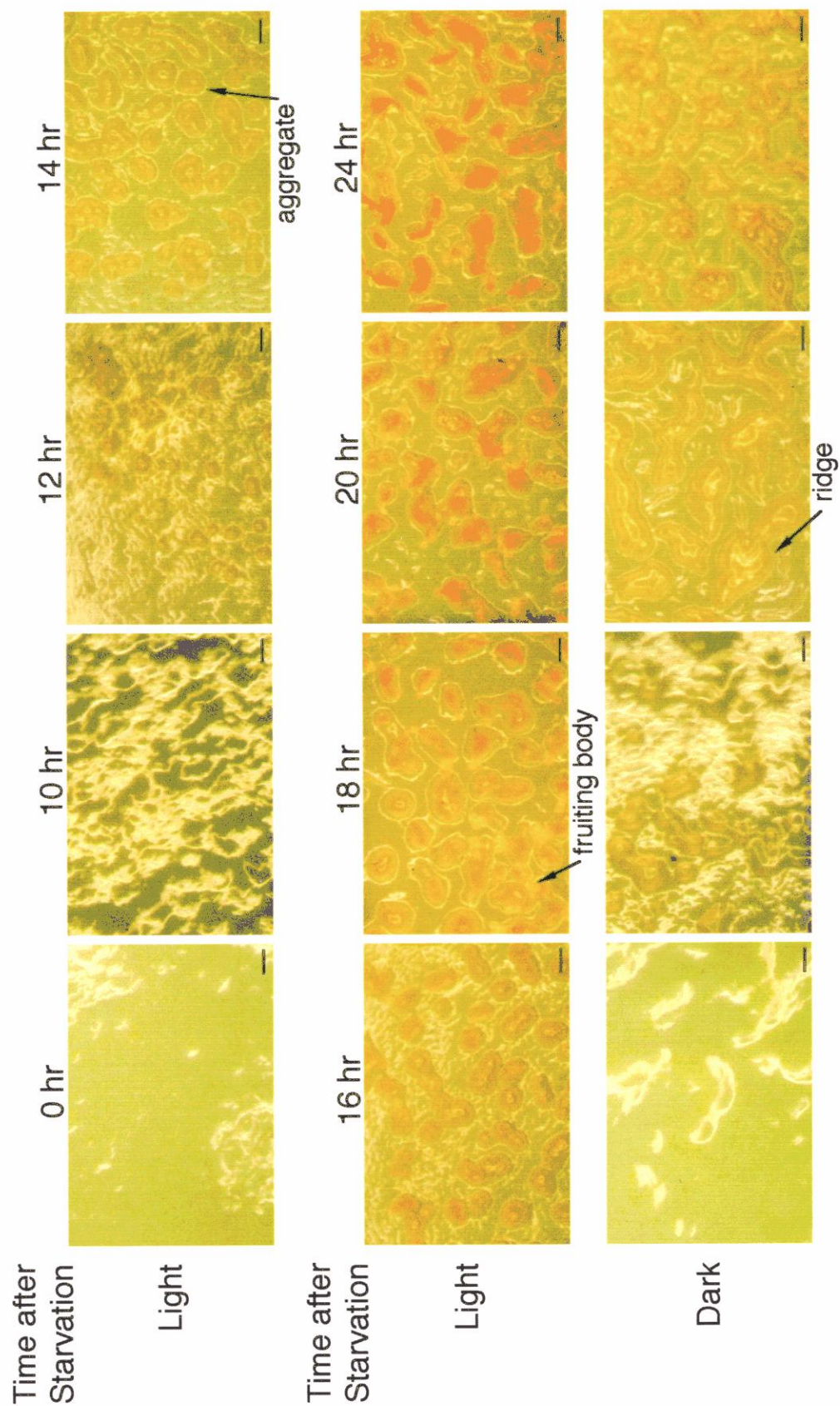


Fig. 2-1-1 栄養飢餓後の光照射下及び暗黒下での *S. aurantiaca* 細胞の形態変化

2 ml の固体CPS培地に $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、及び暗黒下で 30°C の培養を行った。暗黒下での栄養飢餓後0 - 14 hrの形態は、栄養飢餓後16 hrと同様であったため省略した。バーは $200 \mu\text{m}$ を示す。

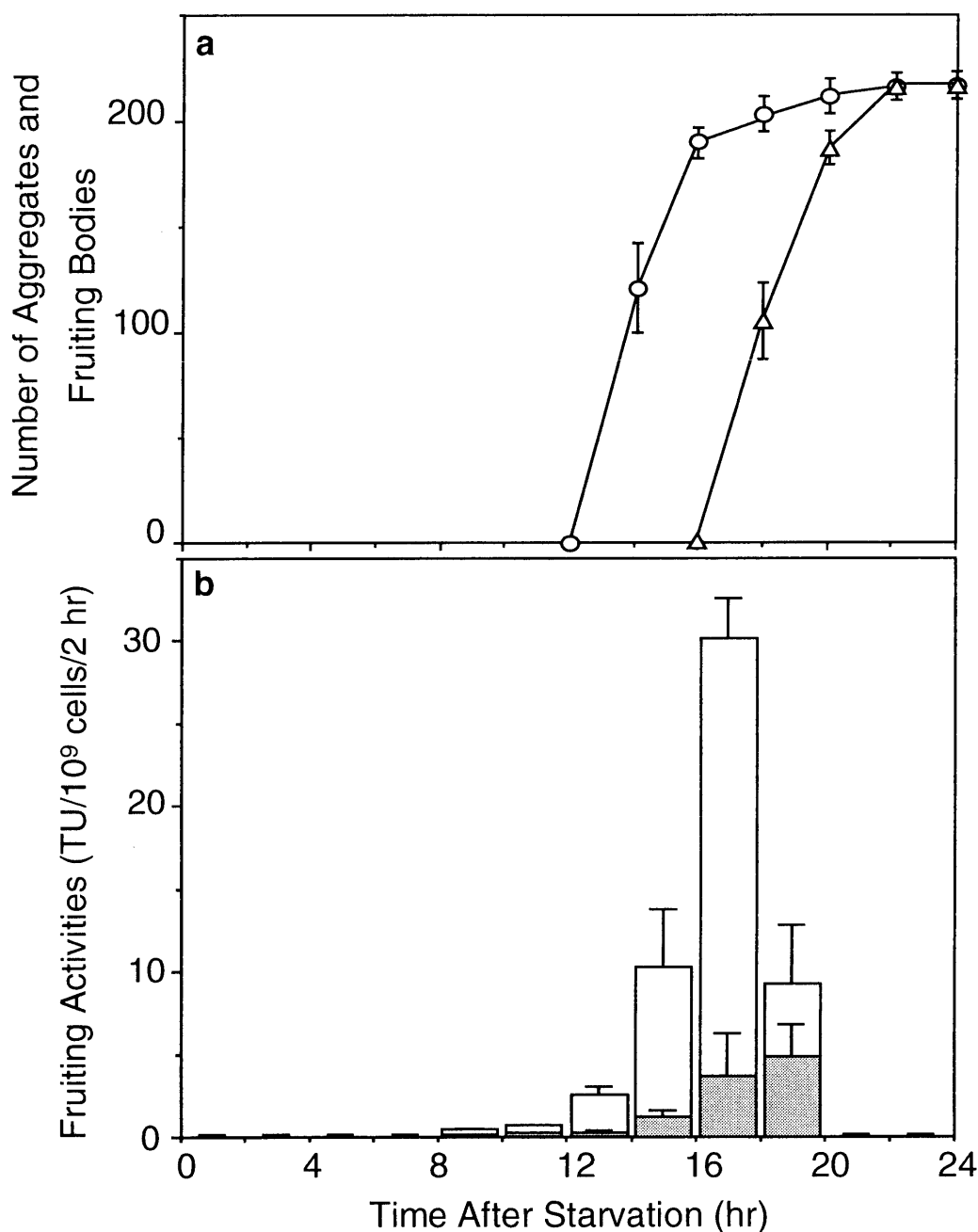


Fig.2-1-2 集合・子実体形成と子実体形成誘導活性の計時的変化

濾紙上に $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を25スポット接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、及び暗黒下で 30°C の培養を行った。a: 光照射下で形成された集合(○)と子実体(△)の数。子実体形成が誘導された後の集合の数には子実体の数を含んでいる。バーは標準偏差を示す

($n=3$)。b: 栄養飢餓後、光照射下(□)、及び暗黒下(■)において生産・分泌された子実体形成誘導活性。栄養飢餓後2-24 hrに培養液を回収し、蓄積された子実体形成誘導活性を測定した。測定した子実体形成誘導活性より、同処理の2 hr前に回収された子実体形成誘導活性を差し引いた値をグラフに示した。バーは3回の独立した実験より求めた標準偏差を示す。

なかったため (Fig. 2-1-2b)、この時間の細胞が新たな子実体形成誘導活性を生産・分泌能を保持しているかどうかを検討した。子実体が形成された後 (栄養飢餓後22 hr) に一度培養液を除去し、さらに2 hrの培養を行ったところ、子実体からは、新たな子実体形成誘導活性は回収されなかった (data not shown)。よって、子実体が形成されることによって子実体形成誘導活性の生産・分泌が止まることが示唆された。

暗黒下の培養においては、ridgeが形成され、子実体は認められなかったが (Fig. 2-1-1)、子実体形成誘導活性は、栄養飢餓後8 hrより検出され、18 hrにおいても光照射下の1/8程度であった (Fig. 2-1-2b)。よって、暗黒下においても、栄養飢餓によって子実体形成誘導活性の生産・分泌が誘導されるものの、その活性量は光照射下よりかなり低いことが示された。また、暗黒下においても、栄養飢餓後22 hr以降は新たな子実体形成誘導活性は検出されなかった。

上記実験で測定している子実体形成誘導活性が本当にstigmoloneに起因し、両者の活性の差異がstigmoloneの生産量の違いを反映しているのかを検証するため、栄養飢餓培地より回収した培養液のクロロホルム画分をTLCに供した活性画分をGC-MSにより解析した (Fig. 2-1-3)。光照射下、暗黒下どちらの培養からも、stigmoloneが検出された。また、マスキロマトグラム の面積より計算されたstigmolone量は、子実体形成誘導活性より計算されたstigmolone量とほぼ一致していた (Table 2-1-1)。よって、子実体形成誘導因子がstigmoloneの量を反映していると判断した。以上の結果より、stigmoloneの生産は栄養飢餓によって誘導され、暗黒下においても生産・分泌されているが、光照射下ではさらに促進されることが明らかとなった。

子実体形成誘導とstigmoloneの生産・分泌に対する光の影響

*S. aurantiaca*の子実体形成は、栄養飢餓後24 hrの連続した光照射により誘導されたが (Fig. 2-1-1)、連続した光照射が必要なのかどうかについて検討した。栄養飢餓後0 - 12 hrの間のみ光照射を行ったものでは子実体は形成されなかった (data not shown)。しかし、栄養飢餓後12 - 24 hrに光照射を行ったものでは、24 hrの連続照射と同様に子実体形成が誘導された (data not shown)。

さらに狭い時間帯を検討するため、栄養飢餓後10 - 24 hrの間に2 hrずつの光照射を行い、子実体を計数した (Fig. 2-1-4a)。栄養飢餓後10 - 12 hrに光照射を行った場合は子実体は形成されず、栄養飢餓後12 - 22 hrの間で2 hrの光照射を行ったものでは子実体が形成された。特に、栄養飢餓後14 - 16 hrに光照射を行った場合に最大数の子実体が形成された。なお、栄養飢餓後22 - 24 hrに光照射を行ったものでは、子実体は形成されなかった。よって、子実体形成を誘導する光照射の時間帯は、stigmoloneの生産・分泌が盛んな時間帯 (栄養飢餓後12 - 20 hr、Fig. 2-1-2) とほぼ一致することが明らかとなった。

上記の光照射による子実体形成と、stigmoloneの生産・分泌との関係を検討するため、2 hrの光照射によって生産・分泌されるstigmoloneの定量を、子実体形成誘導活性を測定することにより行った (Fig. 2-1-4b)。栄養飢餓後10 - 12 hrに光照射を行ったものから回収された子実体形成誘導活性は、暗黒下レベルであった。よって、子実

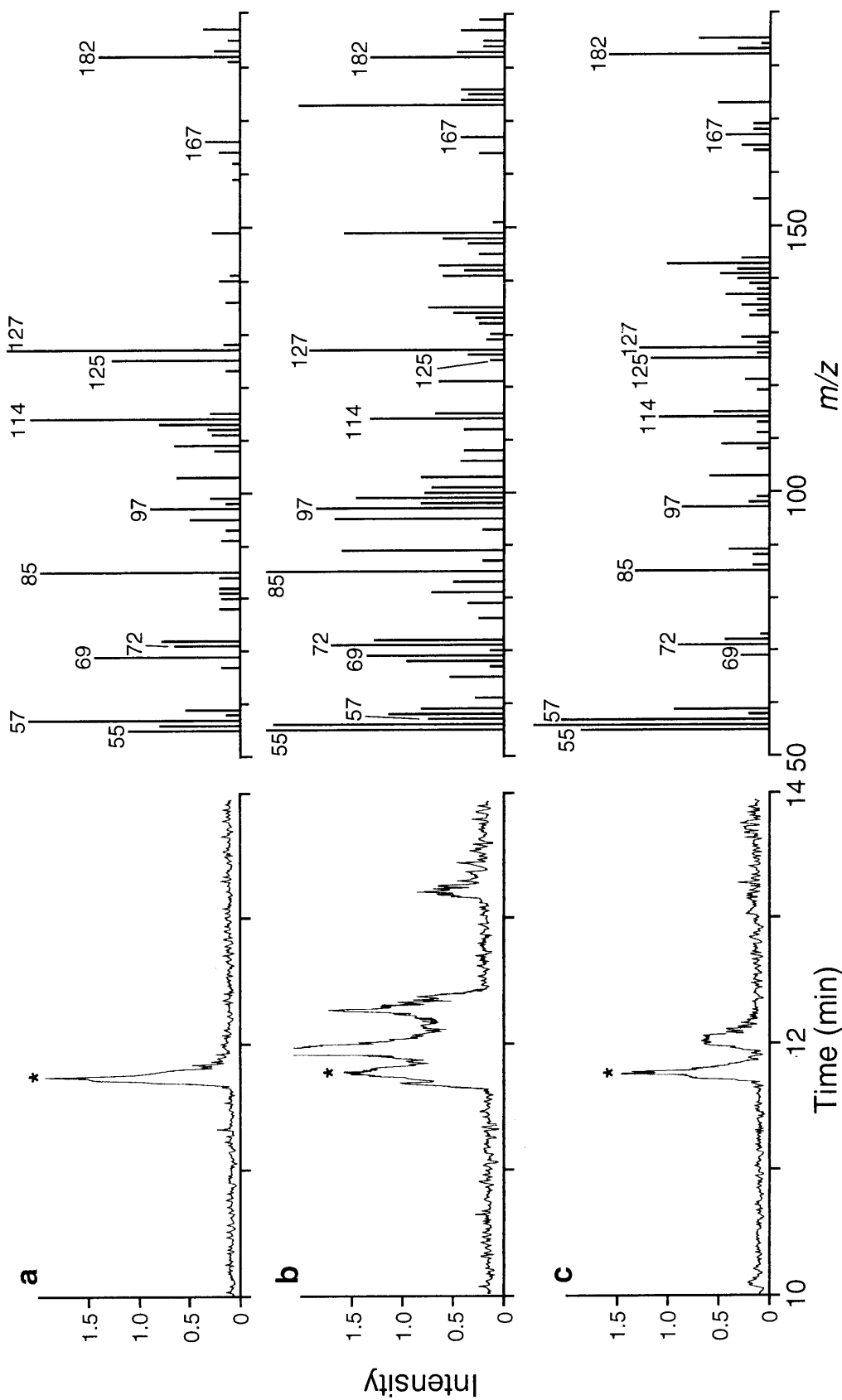


Fig. 2-1-3 GC-MSによるstigmoloneの検出

0.4 ng stigmolone標品 (a)、3.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下での培養より回収した試料 (b)、及び暗黒下での培養より回収した試料 (c) の、 m/z 182でのマスクロマトグラムと*で示したピークのMSを示す。光照射下の培養は 10^9 の細胞より試料を回収し、暗黒下の培養は 6×10^9 の細胞より試料を回収して、それぞれその1/3量をGC-MSに供した。

Table 2-1-1 光照射下、及び暗黒下での子実体形成誘導活性、及びGC-MSより求めたstigmolone量

Condition	Fruiting Activity (TU/10 ⁹ cells)	Stigmolone (ng/10 ⁹ cells)	
		Calculated ^a	Measured ^b
Light ^c	35	1.8	1.3
Dark	5	0.3	0.2

a Amount of stigmolone was calculated from the fruiting activity. One TU of fruiting activity was estimated as 50 pg.

b Amount of stigmolone was calculated from the area of MS-chromatogram in Fig. 2-1-3. Synthetic stigmolone was used as the standard.

c Cells were cultured in 3.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of incandescent light.

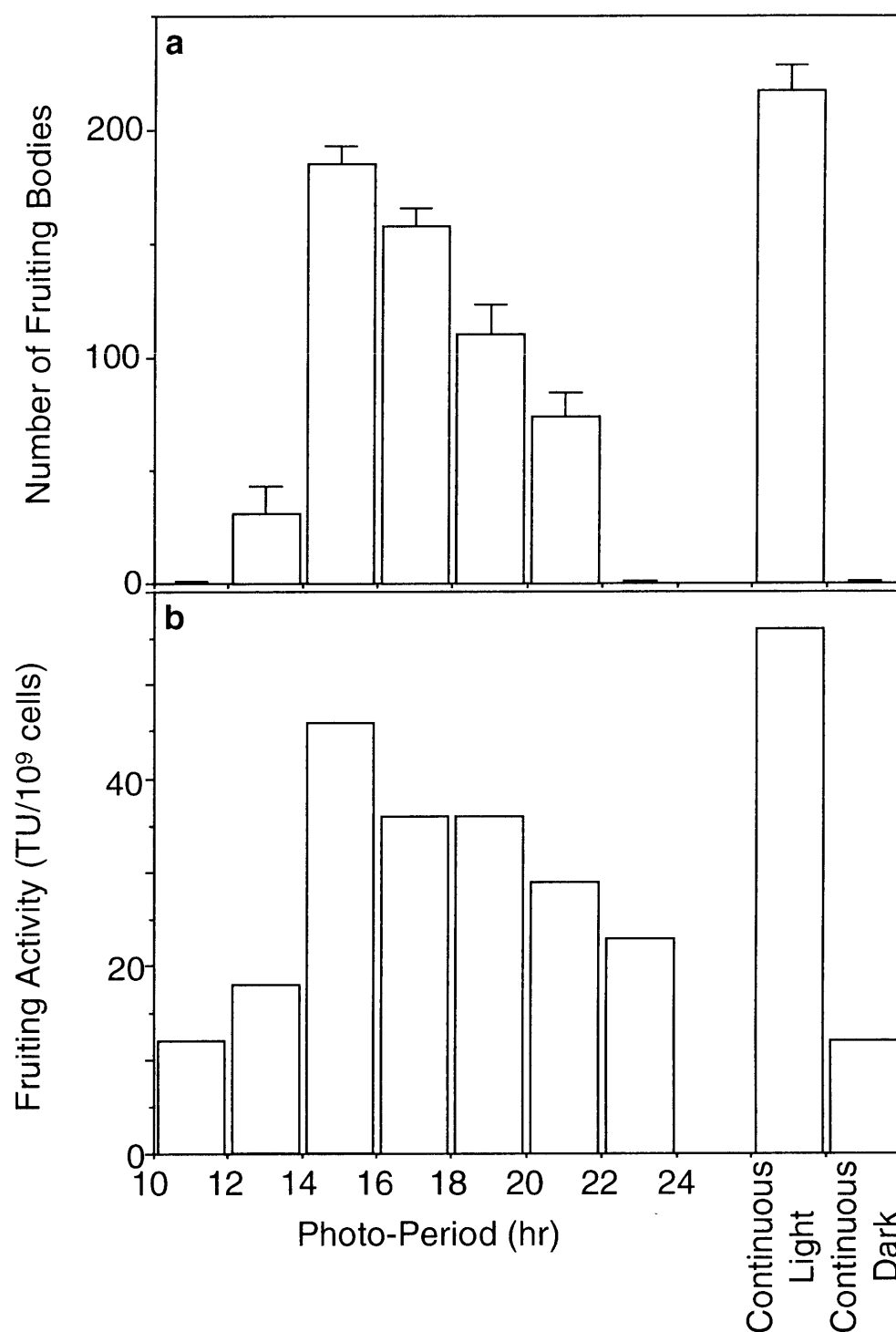


Fig. 2-1-4 子実体形成に必要な光照射の時期

$2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を固体CPS培地に接種し、暗黒下、 30°C で培養した。栄養飢餓後10 - 24 hrに、各試料に2 hrずつの $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射を行なった。栄養飢餓後36 hrに、子実体の計数 (a) と、子実体形成誘導活性の測定 (b) を行った。同時に、連続光照射、及び連続暗黒下で36 hrの培養を行った。バーは標準偏差を示す ($n=3$)。 (b)は一回の実験の結果。

体形成を誘導しない時間帯の光照射では、stigmoloneの生産・分泌も誘導されないことが明らかとなった。栄養飢餓後12 - 24 hrに光照射を行ったものでは、暗黒下レベル以上の子実体形成誘導活性が回収された。また、栄養飢餓後14 - 16 hrに光照射を行ったものより、最大の子実体形成誘導活性が回収された。よって、stigmoloneの生産・分泌を促進する光照射の時間帯は、子実体形成を誘導する光照射の時間帯とほぼ一致することが明らかとなった。このことより、子実体形成に光照射が必要であるのは、stigmoloneの生産・分泌を促進するためであることが示唆された。

子実体形成、及びstigmoloneの生産・分泌は、栄養飢餓後16 - 18 hrより減少した (Fig. 2-1-4a, b)。よって、stigmoloneの生産・分泌、及びstigmoloneへの感受性には、栄養飢餓後14 - 16 hrに頂点があることが明らかとなった。

連続照射下でstigmoloneの生産・分泌が認められない20 - 24 hrの間の照射 (Fig. 2-1-2b) でもstigmoloneの生産が誘導された (Fig. 2-1-4b)。これは、Fig. 2-1-4では一度の実験よりstigmoloneの測定を行っているため、実験精度の違いによるものと考えられた。また、22 - 24 hrの照射ではstigmoloneの生産が誘導されているのにも関わらず (Fig. 2-1-4b)、子実体形成が誘導されなかった (Fig. 2-1-4a)。このことより、stigmoloneの生産・分泌能が保持される時期とstigmoloneへの感受能が保持される時期が異なる可能性が示唆された。

Stigmoloneに対する感受性の獲得

Stigmoloneへの感受性が何によって獲得されるかを明らかにするため、stigmoloneに対する感受性に環境要因が及ぼす影響を検討した。なお、本論文では、stigmoloneによって誘導・促進される現象すべてを包括してstigmoloneへの感受性と定義する。まず、栄養増殖細胞にstigmoloneを添加したところ、子実体形成は認められなかった (data not shown)。このことより、stigmoloneの感受性が栄養飢餓条件下で獲得されることが示唆された。

次に、栄養飢餓後0、4、8 hrにstigmoloneを添加し、光照射下における子実体形成を観察した (Fig. 2-1-5)。栄養飢餓後0 hrにstigmoloneを添加した培養ではstigmoloneを添加してから子実体が現れるまでの所要時間は10 hrであったのに対し、栄養飢餓後4 hrにstigmoloneを添加した培養では所要時間は8 hr、栄養飢餓後8 hrにstigmoloneを添加した培養では所要時間は4 hrであった。栄養飢餓後にstigmoloneを添加すると子実体形成までの時間が短くなることから、栄養飢餓によってstigmoloneの感受性が獲得されることが示唆された。また、stigmoloneの添加から子実体形成が開始するまでの最短の所要時間は、およそ4 hrであることが示された。

栄養飢餓後0 hrにstigmoloneを添加した場合においても、栄養飢餓後8 hr以前には子実体形成は観察されなかった。Stigmoloneへの感受性が獲得される時間の特定には精度の問題もあり更なる実験が必要であるが、栄養飢餓後10 hrに初めて子実体が観察されることと、子実体形成開始までの所要時間が4 hrであることより、stigmoloneへの感受性の獲得は栄養飢餓後6 hr - 10 hrに行われると推定された。

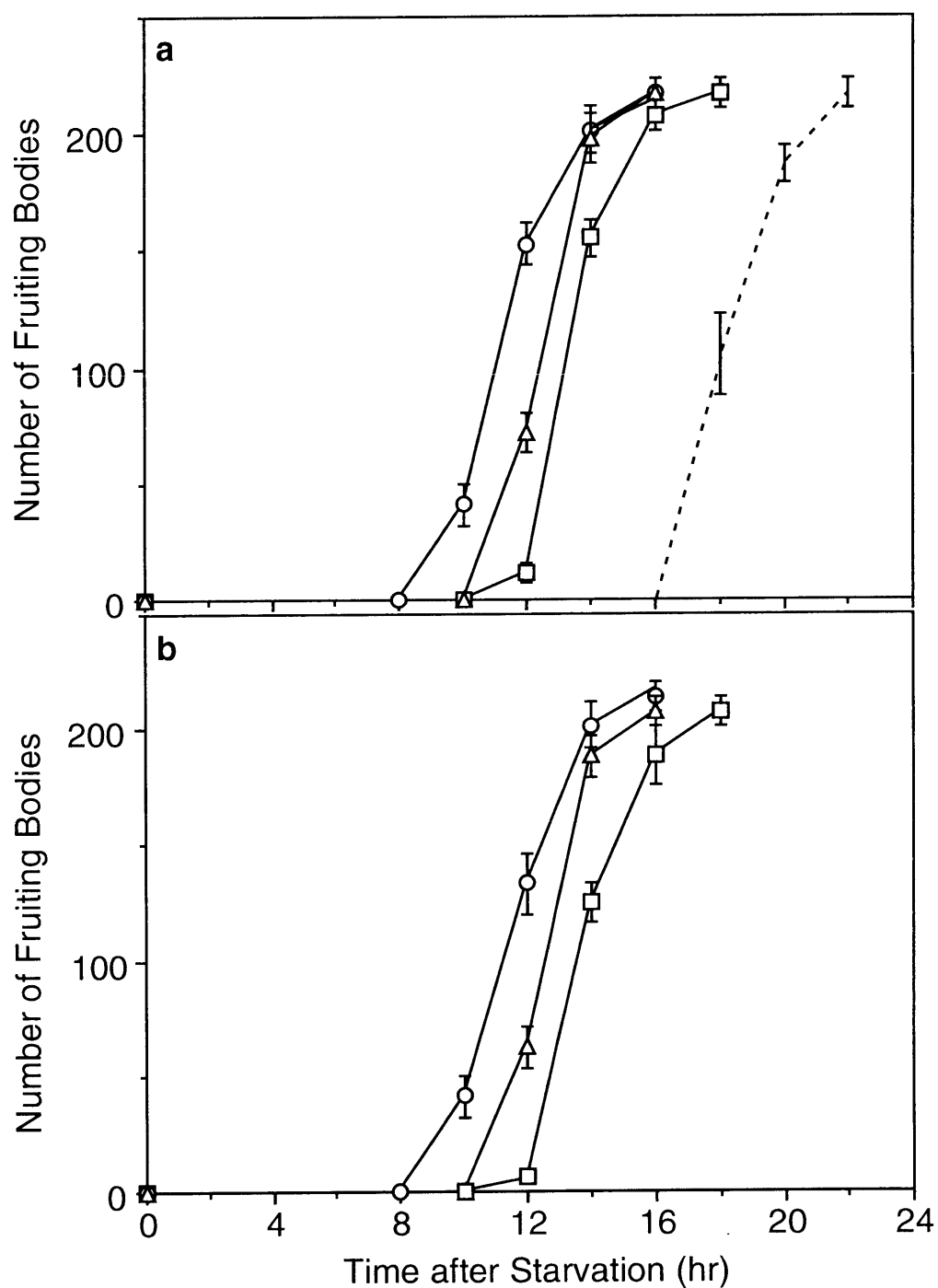


Fig. 2-1-5 Stigmoloneに対する感受性の獲得

2×10^{-9} Mのstigmoloneを培地に添加し、 $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を接種して、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下 (a)、及び暗黒下 (b) において 30°C 、24 hrの培養を行ったときに形成される子実体を4 hrおきに計数した。Stigmoloneは栄養飢餓後、0 hr (○)、4 hr (△)、8 hr (□) 後に添加した。Stigmoloneを添加せず光照射下で培養を行ったものは破線で示した。バーは標準偏差を示す (n=8)。

光照射がstigmoloneへの感受性の獲得に与える影響を明らかにするため、光照射下と暗黒下において、stigmoloneへの感受性を獲得する時間帯を検討した (Fig. 2-1-5)。光照射下と暗黒下では、 2×10^{-9} Mのstigmoloneを添加した場合には、子実体が形成されるまでの時間に大きな違いは見られなかった。よって、stigmoloneへの感受性の獲得と光照射との関連は見いだされなかった。

2-1-4 考察

*S. aurantiaca*は、栄養飢餓、光照射により子実体形成を誘導した (Fig. 2-1-1)。子実体形成の誘導に必要な光照射の時間帯は栄養飢餓後12 - 22 hrであり (Fig. 2-1-4a)、また、stigmoloneの生産・分泌に必要な時間帯は栄養飢餓後12 - 24 hrであった (Fig. 2-1-4a)。よって、*S. aurantiaca*は、光照射によってstigmoloneの生産・分泌を促進させることにより、集合、子実体形成を誘導することが示唆された。光照射下において、このとき起こっている変化をFig. 2-1-6に示した。*S. aurantiaca*は、光照射によって、栄養飢餓後14 hrより集合を誘導し、栄養飢餓後18 hrより子実体形成を誘導した (Fig. 2-1-2a)。Stigmoloneの生産・分泌は栄養飢餓により誘導され、光によって栄養飢餓後8-20 hrにさらに促進された (Fig. 2-1-2b、Table 2-1-1)。よって、*S. aurantiaca*は、栄養飢餓条件下、光照射によってstigmoloneの生産・分泌を促進させることが明らかとなった。Stigmoloneへの感受性は、栄養飢餓が引き金となり、栄養飢餓後10 hrまでに獲得された (Fig. 2-1-5)。Stigmoloneの生産・分泌が盛んになる時間帯と集合・子実体形成が誘導される時間帯がほぼ一致したことは、stigmoloneによって集合・子実体形成が誘導されることが示唆されていることに矛盾しなかった。

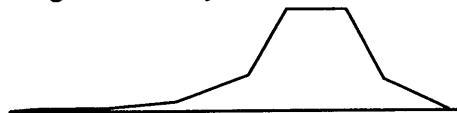
暗黒下においてもstigmoloneの生産は誘導されていたが (Fig. 2-1-2b、Table 2-1-1)、光照射下の約1/7量であった。暗黒下において生産、分泌されるstigmolone量は、 2×10^8 細胞あたり約40 pgと計算され、これは、2 mlの固体培地に 2×10^8 を接種した場合に1つ以上の子実体形成を誘導する活性である50 pg (第1章) よりも少なかった。よって、暗黒下において子実体形成が誘導されないのは、子実体形成の誘導に必要な量のstigmoloneの生産が誘導されないためであることが示唆された。

*S. aurantiaca*の子実体形成には、栄養飢餓が必要条件であるとされていたが、本研究により栄養飢餓は、stigmolone生産・分泌、及びstigmoloneへの感受性の獲得両方に必須であることが明らかとなった。また、光照射がstigmoloneの生産・分泌量を子実体形成誘導に必要な閾値までさらに促進することが示された。よって*S. aurantiaca*は、栄養飢餓と光という環境情報をstigmoloneという物質に変換し、それを受容することにより形態形成を制御している可能性が強く示唆された。この様に、stigmoloneは子実体形成誘導における鍵物質であり、stigmolone生産の誘導機構、及びstigmoloneにより誘導される現象を解析することにより、*S. aurantiaca*の形態形成機構が明らかになるものと期待される。

Light

Physiological Change

Stigmolone Synthesis/Secretion

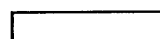


Acquisition of
Stigmolone Competency



Morphological Change

Fruiting Body
Formation



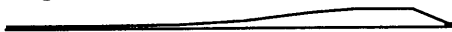
Aggregation



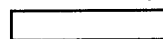
Dark

Physiological Change

Stigmolone Synthesis/Secretion



Acquisition of
Stigmolone Competency



Morphological Change

Ridge Formation

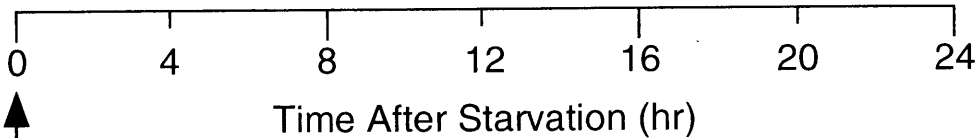
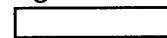


Fig. 2-1-6 第2章第1節において明らかとなった*S. aurantiaca*の栄養飢餓条件下における光照射下、及び暗黒下での細胞の変化。

第2節 子実体形成と活性酸素種の関係

2-2-1 序

粘液細菌 *M. xanthus* では、光によってカロテノイド合成が誘導されるが、その際の光レセプターはプロトポルフィリンIXであることが示唆されている (Burchard and Dworkin, 1966)。また、*M. xanthus* のカロテノイド合成の誘導には、プロトポルフィリンIXより発生すると考えられる活性酸素種が関与することが示唆されている (Hodgson and Murillo, 1993)。

前節で明らかにしたように、*S. aurantiaca* では、光によって stigmolone の生産・分泌が更に促進され、それによって子実体形成が誘導されるが、その際の光レセプター、及び光受容機構は明らかにはなっていない。ここでは、子実体形成、及び stigmolone 生産・分泌における活性酸素種の関与を解析することにより、*S. aurantiaca* の子実体形成における光受容機構の解明を試みた。

2-2-2 材料と方法

子実体形成の誘導

各化合物は、次のようにして固体CPS培地に添加した。マニトール (Wako) は100 μl の H_2O に溶解し、DABCO (1,4-diazobicyclo-[2,2,2]-octane、東京化成)、及び *n*-propyl gallate (Nakalai Tesque) はメタノール溶液を100 μl の H_2O で希釈した。 H_2O_2 を添加する場合は、過酸化水素水 (Wako) を100 μl の H_2O で希釈した。100 μl の各溶液を2 ml の固体CPS培地に重層しクリーンベンチで表面を乾燥させた。

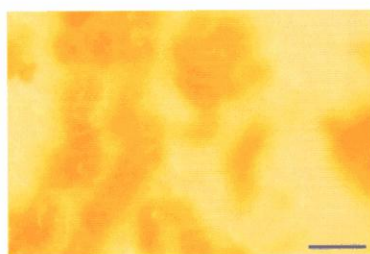
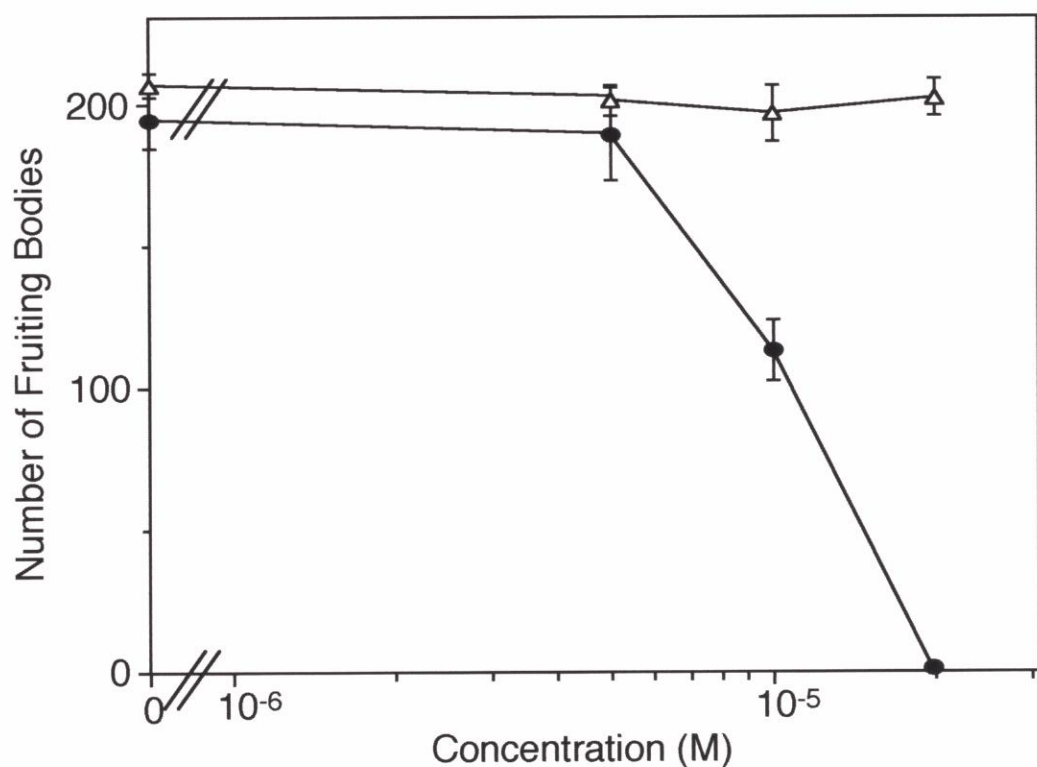
子実体形成誘導活性の測定

子実体形成誘導活性の回収は、第1章の方法に従って行った。各化合物を栄養飢餓濾紙に添加する場合は、60℃の固体CPS培地に *n*-propyl gallate のメタノール溶液、もしくは過酸化水素水を直接添加した。

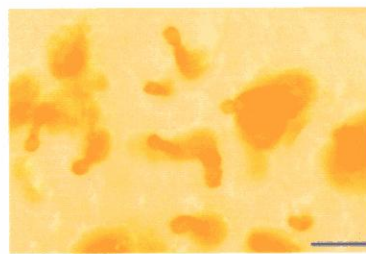
2-2-3 結果

活性酸素消去剤の子実体形成への影響

S. aurantiaca の子実体形成における活性酸素種の影響の検討のため、活性酸素の消去剤の子実体形成への影響を検討した。 $6 \times 10^{-5} - 10^{-3} \text{ M}$ のマニトール、 $2.5 \times 10^{-4} - 10^{-3} \text{ M}$ のDABCOを栄養飢餓培地に添加し光照射下で培養を行ったが、子実体形成の阻害は認められなかった。*n*-propyl gallate を栄養飢餓培地に添加し光照射下で培養すると、 10^{-5} M 以上の濃度で子実体形成が阻害された (Fig. 2-2-1)。よって、光の照射により



+ 2×10^{-5} M *n*-propyl gallate



+ 2×10^{-5} M *n*-propyl gallate
+ 2×10^{-9} M stigmolone

Fig. 2-2-1 子実体形成における活性酸素消去剤の影響

5×10^{-6} M - 2×10^{-5} Mの*n*-propyl gallate (●) を添加した固体CPS培地に、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、 30°C 、24 hrの培養を行った後、形成された子実体を計数した。また、同濃度範囲の*n*-propyl gallateに加え、 2×10^{-9} Mのstigmolone (△) を同時に添加し、その効果を検討した。バーは標準偏差を示す ($n=3$)。写真は、 2×10^{-5} Mの*n*-propyl gallateを添加したときの24 hr後の細胞。写真のバーは $200 \mu\text{m}$ を示す。

活性酸素種が発生し、それが子実体形成を誘導している可能性が示された。*n*-propyl gallateと同時に 2×10^{-9} Mのstigmoloneを添加し、光照射下で培養を行うと、子実体形成が回復した (Fig. 2-2-1)。よって、*n*-propyl gallateによる子実体形成の阻害は、細胞毒性によるものではなく、光照射下におけるstigmoloneの生産・分泌である可能性が示された。

活性酸素の子実体形成への影響

子実体形成における活性酸素種の影響の検討のため、活性酸素の発生剤の子実体形成への影響を検討した。 H_2O_2 を栄養飢餓培地に添加すると、暗黒下での培養において、 2.5×10^{-5} - 10^{-4} Mの濃度において濃度依存的に子実体形成が誘導された (Fig. 2-2-2)。 10^{-4} Mの H_2O_2 によって誘導された子実体の数は、 2×10^{-9} Mのstigmoloneによって誘導される子実体の数と変わらなかった。よって、子実体形成の誘導に関して、過酸化水素は光照射と同様の効果を示すこと明らかとなった。

n-propyl gallateと H_2O_2 の効果が同一の経路に対する阻害と促進効果によるものかを検討するため、これら化合物を栄養飢餓培地に同時に添加し、暗黒下で培養を行った (Fig. 2-2-3)。*n*-propyl gallateの添加により、 $2.5 - 5 \times 10^{-5}$ Mの H_2O_2 による子実体形成の誘導は阻害された。よって、これら2つの化合物は、共通の子実体形成経路に関与することが示唆された。

活性酸素のstigmolone生産への影響

活性酸素種が光照射と同様に子実体形成を誘導することは示されたが、これが光と同様にstigmoloneの生産を介して行われるかを明らかにするため、これら化合物を添加したときのstigmoloneの生産・分泌量を子実体形成誘導活性を指標に測定した (Fig. 2-2-4)。 10^{-4} Mの H_2O_2 を濾紙に添加し暗黒下で培養を行ったものでは、光照射下で培養したものと同レベルの量の子実体形成誘導活性が検出された。逆に、 10^{-5} Mの*n*-propyl gallateを添加し光照射下で培養を行ったものでは、検出された子実体形成誘導活性は減少していた。以上の結果より、活性酸素種がstigmoloneの生産・分泌を介して子実体形成を誘導していることが示唆された。

2-2-4 考察

以上のことより、活性酸素種は光照射と同様の効果を示し、stigmoloneの生産・分泌を誘導することによって子実体形成を誘導することが示唆された。*n*-propyl gallateはヒドロキシラジカルを消去することが知られており、 H_2O_2 は Fe^{2+} と反応しヒドロキシラジカルを生じることから、stigmoloneの生産・分泌を誘導するのはヒドロキシラジカルである可能性が考えられた。

これらのことより、*S. aurantiaca*において、活性酸素種が光受容からstigmoloneの生

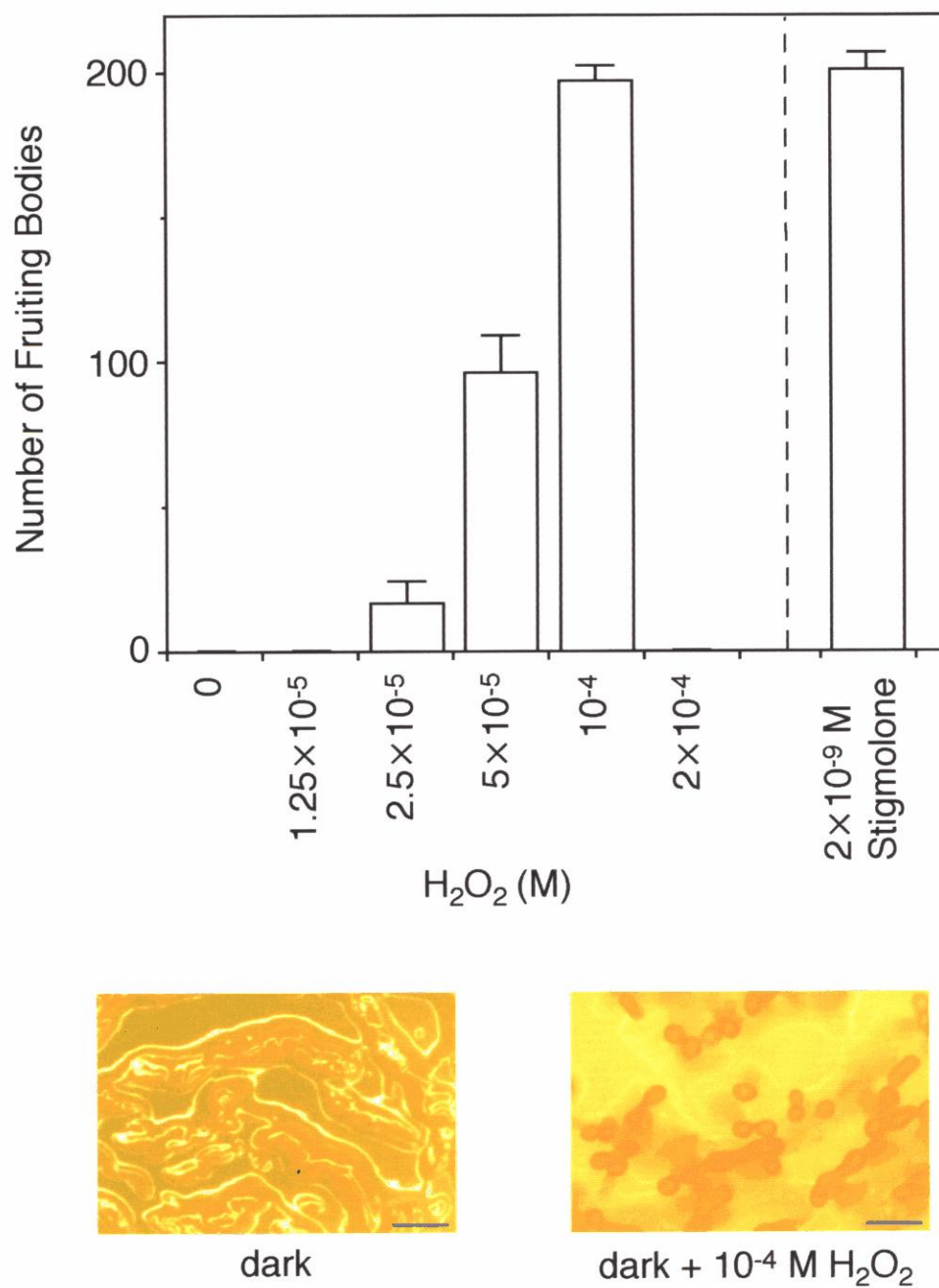


Fig. 2-2-2 暗黒下での子実体形成における H_2O_2 の影響

飢餓培地に $1.25 \times 10^{-5} - 10^{-4}$ Mの H_2O_2 を添加し、 $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を接種し、暗黒下、 30°C 、24 hrの培養を行った。バーは標準偏差を示す ($n=3$)。写真は、暗黒下、及び暗黒下において 10^{-4} Mの H_2O_2 を添加し培養したときの細胞。写真のバーは $200 \mu\text{m}$ を示す。

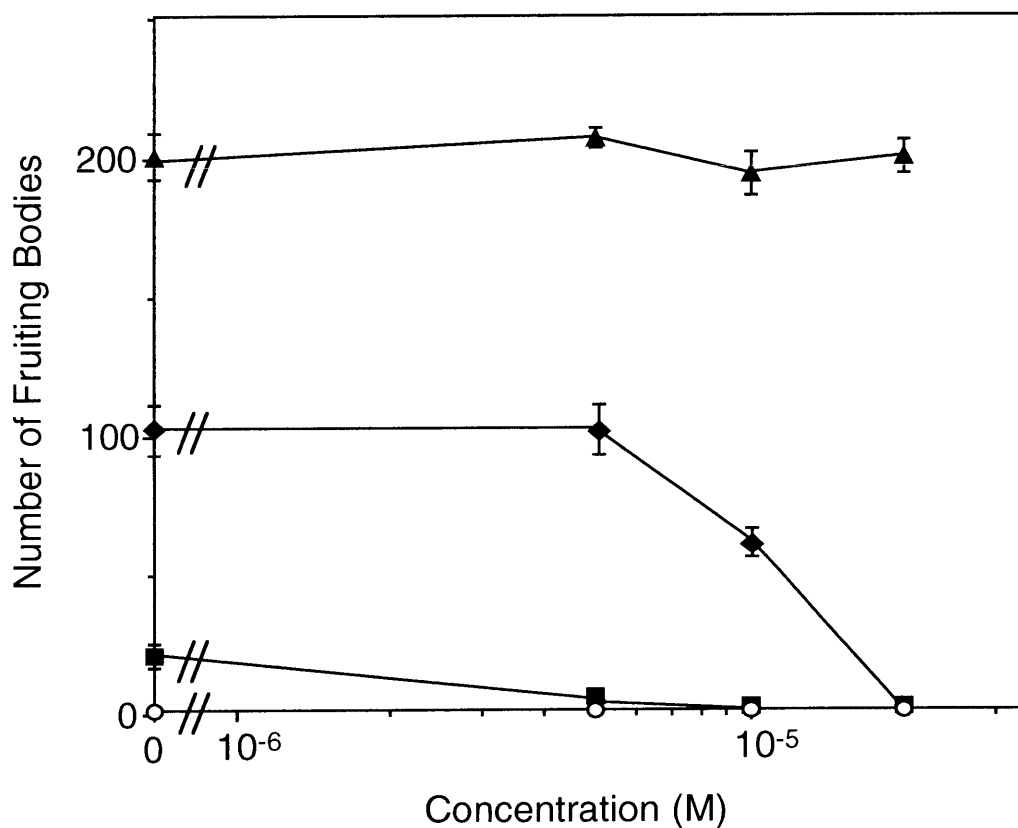


Fig.2-2-3 子実体形成における *n*-propyl gallate と過酸化水素の影響
 固体CPS培地に、 5×10^{-6} M - 2×10^{-5} M の *n*-propyl gallate と同時に、
 10^{-4} M (▲)、 5×10^{-5} M (◆)、 2.5×10^{-5} M (■) の H_2O_2 を添加し、
 黒下、30℃、24 hr の培養を行った。 H_2O_2 無添加の培養は○で示した。
 バーは標準偏差を示す (n=3)。

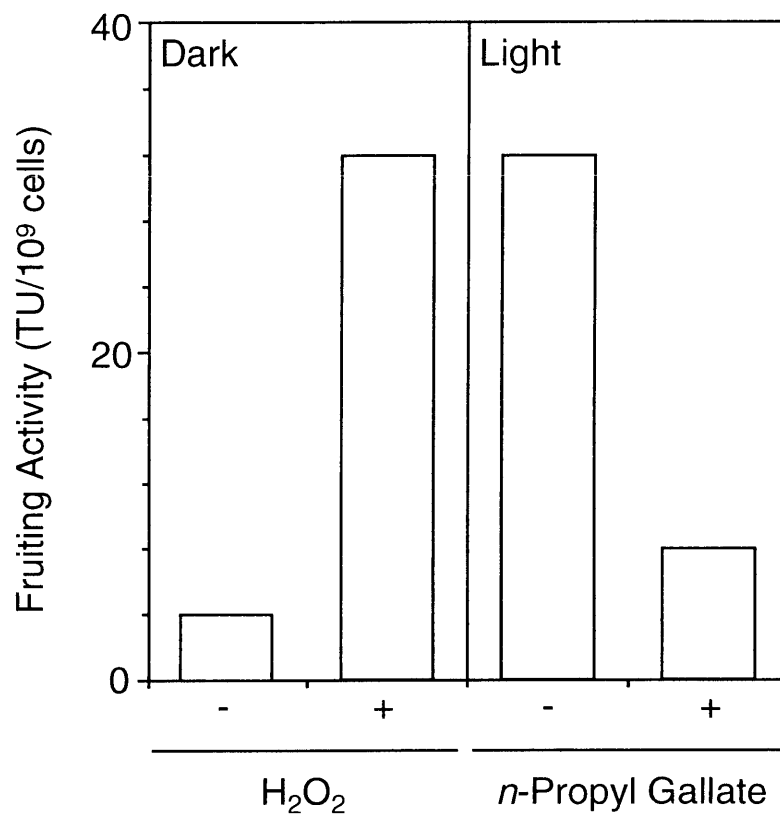


Fig.2-2-4 H₂O₂及び*n*-propyl gallate添加時に生産、分泌される子実体形成誘導活性

10⁻⁴ MのH₂O₂を添加し暗黒下、もしくは10⁻⁵ Mの*n*-propyl gallateを添加し3.5 μmol m⁻² s⁻¹の強度の白熱光照射下、30℃、24 hrの培養を行い、回収された子実体形成誘導活性を測定した。

産・分泌に至るまでの間の情報伝達系に関与していることが示唆された。*M. xanthus*のカロテノイド合成系における光のレセプターはプロトポルフィリンIXであることが示唆されており（Burchard and Dworkin, 1966）、プロトポルフィリンIXは光によって一重項酸素を発生させることが知られている（Malik *et al.*, 1990）。*M. xanthus*のカロテノイド合成においては、一重項酸素によってカロテノイド合成酵素遺伝子の制御遺伝子である *carQRS* オペロンの発現が誘導されることが示唆されている（McGowan *et al.*, 1993）。一重項酸素は生体内でスーパーオキシドやヒドロキシラジカルを生じるため、*S. aurantiaca*の子実体形成を誘導する活性酸素種は、ポルフィリンより発生した一重項酸素に由来する可能性が挙げられる。よって、光照射による *stigmolone*の生産・分泌の促進においても、活性酸素種によって *stigmolone*合成系遺伝子の発現誘導制御が行われる可能性が考えられた。

第3節 子実体形成の誘導機構の解析

2-3-1 序

Stigmoloneは、*S. aurantiaca*の栄養飢餓培養に添加することにより、暗黒下で集合（Plaga *et al.*, 1998）、及び子実体形成を誘導する（第1章）。暗黒下の培養では、集合の形成が起こらないために子実体形成が誘導されないと考えられているが、stigmoloneによって集合体の形成が誘導されることによって自動的に子実体が形成されるのかは解析されていない。

一方、原核生物における代表的な細胞間シグナルであるグラム陰性菌のホモセリンラクトン類、及び放線菌の γ -ブチロラクトン化合物などは、拡散によって細胞内に取り込まれ、生産された濃度によりquorum（会議の成立に必要な定足数の意）を感知する細胞密度因子であることが知られている（Dunny and Winans, 1999）。*S. aurantiaca*においては、栄養飢餓、光照射下の培養によって形成された子実体より拡散性の細胞密度因子が分泌されていることが示唆されているが（Qualls *et al.*, 1978b）、この因子がstigmoloneであるかどうかは解析されていない。

Stigmoloneに加えて、暗黒下において*S. aurantiaca*の子実体形成を誘導するいくつかの化合物が知られている。*M. xanthus*ではアデニン化合物が低密度培養において子実体形成を誘導することより（Shimkets and Dworkin, 1981）プリン化合物の*S. aurantiaca*での集合・子実体形成への効果が検討され、GMP、cGMP、GDP、GTPが光照射下において集合までの時間の短縮を引き起こし、また、GMPが、暗黒下において集合と子実体形成を誘導することが明らかとなった（Stephens and White, 1980）。光照射下における集合までの時間の短縮と、暗黒下における集合と子実体形成の誘導はstigmoloneと同じ作用であり、この2つの化合物は同じ経路を活性化すると考えられている。また、子実体形成誘導活性を有する化合物のスクリーニングより、カビ*Papulaspora* sp.由来のisoeugenitineが同定された（Fudo *et al.*, 1997、Fig. 2-3-1）。Isoeugenitineは、暗黒下において子実体形成を誘導するが、この化合物とstigmoloneとの関係は不明である。

粘液細菌の子実体の内部には胞子の形成が見られることから、子実体形成と胞子形成は関連していると考えられている（Dworkin, 2000）。しかし、*S. aurantiaca*においては、子実体形成を経ずにインドール、グリセロール、2-フェニルエタノール、*t*-ブタノール等を液体栄養培地に添加することで胞子形成が誘導される（Gerth *et al.*, 1992）。また、栄養飢餓条件下において、子実体形成の認められない暗黒下においても胞子形成が誘導されると言われているが（White and Schairer, 2000）、その詳細は明らかではない。

Stigmoloneは*S. aurantiaca*の子実体形成における鍵物質であるが、その子実体形成誘導機構については明白ではない。ここでは、*S. aurantiaca*の子実体形成におけるstigmoloneの役割、及び他の子実体形成誘導因子とstigmoloneとの関係を明らかにすることにより、stigmoloneによる子実体形成誘導機構を解析した。

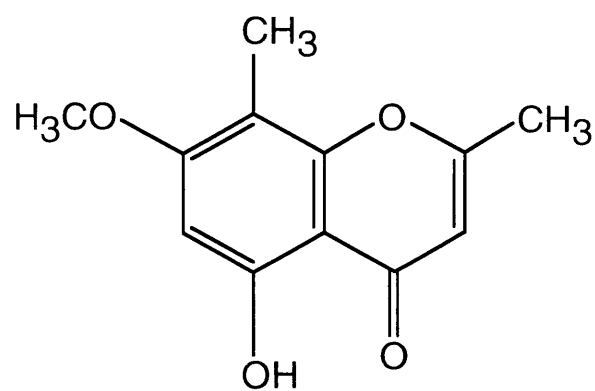


Fig. 2-3-1 Isoeugenitineの構造 (Fudo *et al.*, 1997)

2-3-2 材料と方法

子実体形成の誘導

各化合物をCPS培地に添加する場合は、GMP (Nakalai Tesque) は100 μ lのH₂Oに溶解させ、isoeugenitineはメタノール溶液をH₂Oで希釈し、2 mlの固体CPS培地に重層しクリーンベンチで表面を乾燥させた。Isoeugenitineは、味の素中央研究所の不藤亮介博士より御供与いただいた。

栄養飢餓後に培養液の交換を行う場合は、濾紙培地上に細胞を接種し、液体CPS培地を移動相とする下降式ペーパークロマトグラフィーに供した。

胞子の計数

胞子の計数には、MuellerとDworkin (Muller and Dworkin, 1991) の方法を用いた。固体培地に接種した細胞を白金耳で回収し、H₂Oに懸濁した。懸濁液を51℃、2 hr熱処理し、80 W, 30 secの超音波処理 (Astrason細胞破碎装置, Misonic) を2回行った。生き残った胞子を固体peptone培地 (1% casitone, 8 mM MgCl₂, pH 7.4, 1.5% agar) に接種し、30℃、7日間の培養を行い、形成されたコロニーを計数した。

子実体形成誘導活性の測定

子実体形成誘導活性の測定は、第1章の方法に従って行った。Isoeugenitineを添加した培養から子実体形成誘導活性を回収する場合は、培養液のクロロホルム抽出物をシリカゲル薄層クロマトグラフィー (HPTLC plates silica gel 60) に供し、クロロホルム-酢酸エチル (93:7, v/v) で展開した。薄層クロマトグラフィープレートを乾燥後、Rf 0.3の画分をかきとりメタノールで抽出して、子実体形成誘導活性を測定した。

2-3-3 結果

Stigmoloneの細胞密度への効果

子実体形成には高い細胞密度が必要であるが、このことが何に起因するかを解明するため、子実体形成における細胞密度の影響と、細胞密度に対するstigmoloneの影響を検討した (Fig. 2-3-1)。 *S. aurantiaca* は 5×10^7 - 2×10^8 /5 μ l の細胞密度において、栄養飢餓、光照射下で培養したときのみ子実体形成を行ない、 2.5×10^7 /5 μ l の低い細胞密度では子実体形成は認められなかった。同様の培養に 2×10^{-9} M のstigmoloneを添加したところ、 2.5×10^7 /5 μ l の低密度の培養において子実体形成が誘導され、また、 5×10^7 - 1×10^8 /5 μ l の細胞密度においては、形成された子実体の数の増加を引き起こした。よって、低細胞密度培養では、最大数の子実体形成を誘導するのに必要な量のstigmoloneが生産・分泌されていないことが示唆された。

生産・分泌されるstigmoloneの量と細胞密度との関係を検討するため、異なった細

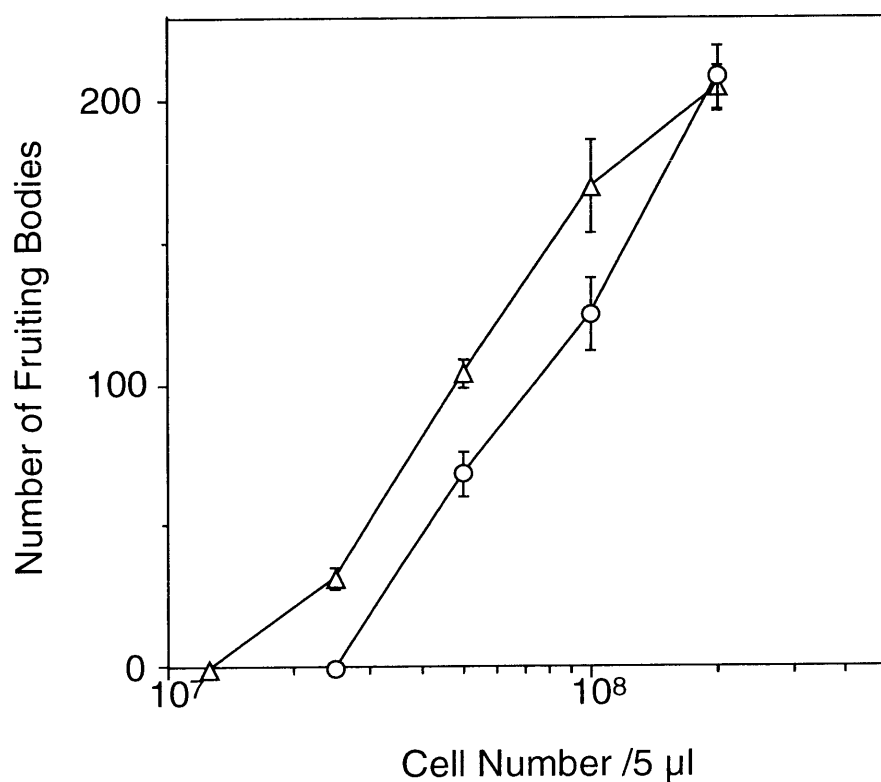


Fig. 2-3-2 子実体形成における細胞密度、及びstigmoloneの影響
 2.5×10^7 - 2×10^8 / 5 μ lの細胞を2 mlの固体CPS培地に接種し、3.5 μ mol m⁻² s⁻¹の強度の白熱光照射下 (○) において30℃、24 hr培養した。また、 2×10^{-9} Mのstigmoloneを添加し、光照射下 (△で同様の培養を行った。バーは標準偏差を示す (n=6)。

胞密度より回収される子実体形成誘導活性を測定した。 $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞密度より回収された子実体形成誘導活性と、 $2 \times 10^7 / 5 \mu\text{l}$ の細胞密度より回収された子実体形成誘導活性は、細胞数あたりの活性では大きな差はみられなかった (data not shown)。よって、各細胞より生産・分泌されるstigmoloneの量は一定であり、細胞密度には依存していないことが明らかとなった。このことより、子実体形成に高い細胞密度が必要なのは、生産・分泌されるstigmoloneの量が細胞数に依存するためであることが示唆された。

Stigmoloneの集合後への効果

Stigmoloneは集合を促進するが、集合が形成された後の必要性は解析されていない。そこで、濾紙上に細胞を接種し、光照射下で培養して集合を形成させ、集合体は形成されているが子実体形成はまだ行われていない栄養飢餓後16 hrに、液体CPS培地を移動相とする下降式ペーパークロマトグラフィーによってstigmoloneを含む培養液を交換し、栄養飢餓後24 hrに子実体の計数を行った (Fig. 2-3-2a)。培養液交換後に光照射下で培養した場合、栄養飢餓後24 hrには子実体形成が認められたが (A)、培養液交換後に暗黒下で培養した場合は子実体は形成されなかった (B)。よって、集合が形成された後も、子実体形成の誘導には、光照射により誘導される培養液中の子実体形成誘導因子が必要であることが示された。また、栄養飢餓後16 hrまで光照射下で培養を行い、培養液は交換せずに栄養飢餓後16 hrからは暗黒下で培養を行った場合には、子実体形成が認められた (C)。よって、栄養飢餓後16 hrに培養液の交換を行い、その後暗黒下で培養すると子実体形成が認められないのは、培養液の交換による影響であることが示された。一方、栄養飢餓後16 hrに培養液を交換した後stigmoloneを添加して暗黒下で培養を行うと、子実体の形成が認められた (D)。よって、集合が形成された後においても、子実体形成の誘導にはstigmoloneが必要であることが示唆された。

集合体が形成された後に培養液を交換し、その後暗黒下で培養した場合には、一度形成された集合体が消失することが観察された (Fig. 2-3-2b)。よって、集合体を形成した後にも、その保持にはstigmoloneが必要であることが示唆された。

胞子形成の条件

子実体形成と胞子形成の関係を明らかにするため、胞子形成の誘導機構を解析した (Table 2-3-1)。栄養増殖下では、光照射下と暗黒下どちらの場合でも胞子形成は認められなかった。よって、胞子形成は子実体形成と同様に、栄養飢餓によって誘導されることが示された。栄養飢餓条件下では、子実体の認められない暗黒下での培養においても、光照射下の12%の胞子形成が見られた。よって、子実体形成を経由せずに一部の細胞が胞子を形成することが明らかとなった。

また、栄養飢餓濾紙上に細胞を接種し、培養液の交換を行いながら培養を行ったところ、光照射、暗黒下どちらの場合においても、胞子形成は誘導されなかった。

Time after Starvation (hr)		Exchange of CPS Medium	
0	16		24
A	light	light	+
B	light	dark	+
C	light	dark	-
D	light	dark + stigmolone	+
E	light	light	-
F	dark	dark	-

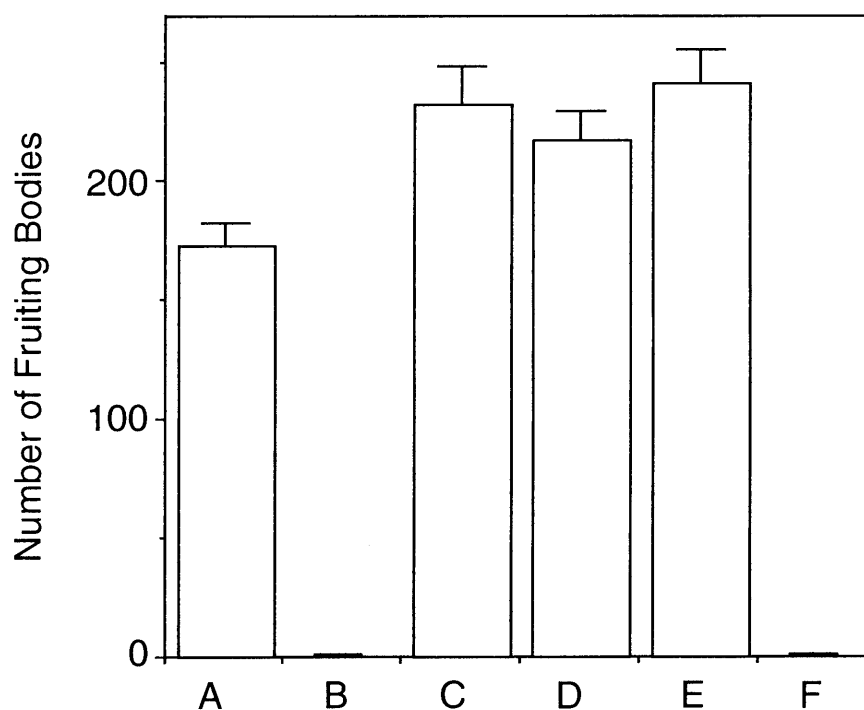


Fig. 2-3-3a 集合形成後におけるstigmoloneの効果

$2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を濾紙培地上に接種し、 30°C 、24 hrの培養を行い、子実体を計数した。バーは標準偏差を示す ($n=3$)。集合形成後におけるstigmoloneの効果の検討のため、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下で培養後、栄養飢餓後16 hrに下降式クロマトグラフィーによって、培地の交換を行った (A-C)。培地の交換後、光照射下 (A)、暗黒下

(B)、もしくは $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ のstigmoloneを添加し暗黒下 (C) において培養を行った。D-Eは培地の交換を行わずに、栄養飢餓後0 - 16 hrまで集合形成後におけるstigmoloneの効果光照射下で培養後、栄養飢餓後16 - 24 hrは暗黒下 (D)、集合形成後におけるstigmoloneの効果24 hr光照射下 (E)、及び24 hr暗黒下 (F) で培養を行った。

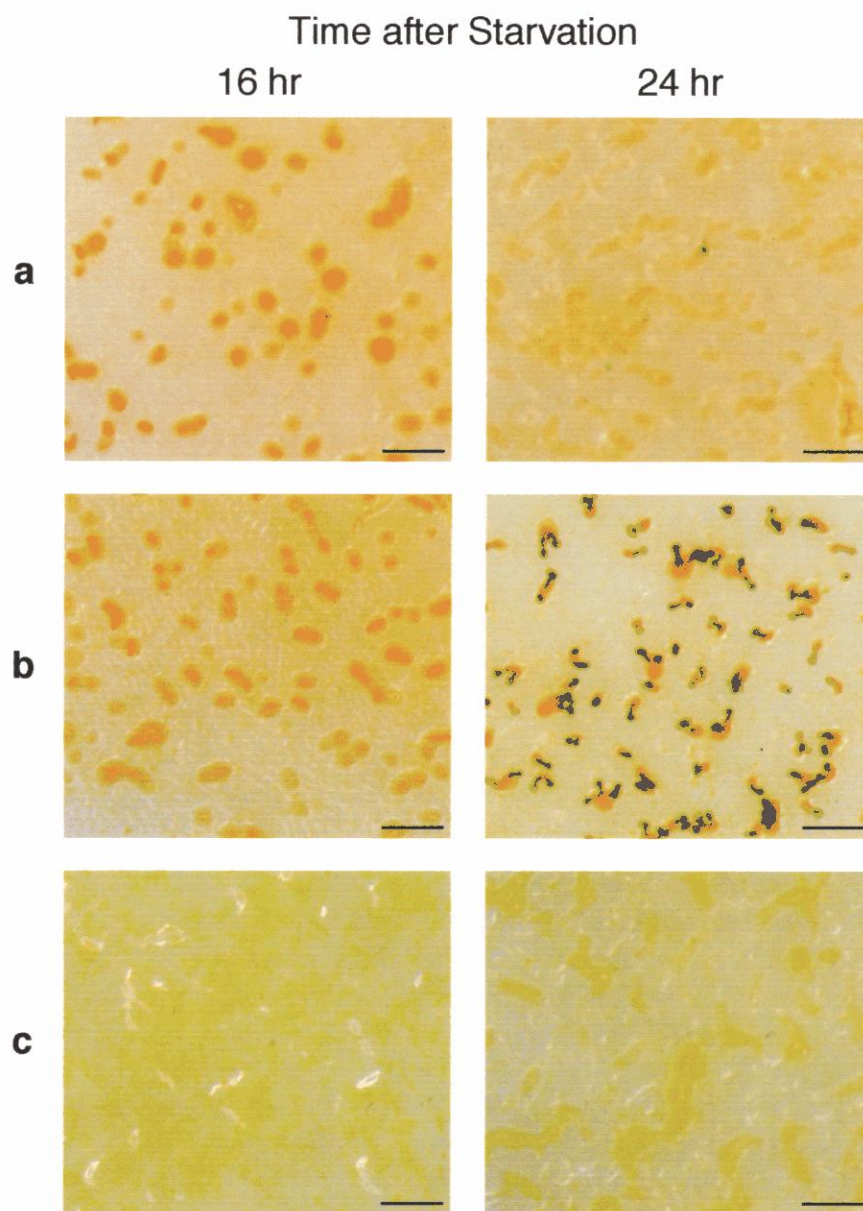


Fig. 2-3-3b 集合形成後におけるstigmoloneの効果

$2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を濾紙培地上に接種し、 30°C 、24 hrの培養を行った。 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下で栄養飢餓後16 hrに培養液を交換し、暗黒下で培養した (a、Fig. 2-3-3aのBにあたる)。培養液の交換を行わず、24 hrの $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下 (b、Fig. 2-3-3aのE)、または暗黒下 (c、Fig. 2-3-3aのF) で同様に培養を行った。バーは $500 \mu\text{m}$ を示す。

Table 2-3-1 *S. aurantiaca*の孢子形成条件

Conditions	Sporulation (%) ^a	
	Light ^c	Dark
Vegetative Growth	<0.1	<0.1
24 hr After Starvation	100	12
Starvation + Medium Exchange ^b	<0.1	<0.1

a Heat stable, sonication resistant spores were counted in each conditions. Number of spores of 24 hr after starvation in the light was set as 100%.

b Culture media were exchanged by descending chromatography using CPS medium as eluate. Descending chromatography was performed every 2 hr from 12 - 22 hr after starvation.

c Cells were cultured in $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of incandescent light.

GMP、isoeugenitineによる子実体形成の誘導

*S. aurantiaca*における、GMPによる子実体形成の誘導機構とstigmoloneとの関連性を解析した。 6×10^{-5} - 2×10^{-3} MのGMPを添加し、栄養飢餓条件下で培養することにより、暗黒下においても子実体形成が誘導された (Fig. 2-3-4)。このとき形成された子実体の数は、光照射下で誘導される子実体の数の半数以下であった。この子実体形成の誘導がstigmoloneの生産・分泌の誘導を介して行われているのかを調べるために、GMPの添加時に生産・分泌される子実体形成誘導活性を測定した。 10^{-3} MのGMPの添加により、光照射下の約1/2の子実体形成誘導活性が回収された (Table 2-3-3)。よって、GMPは、stigmoloneの生産・分泌を不完全ながら促進し、それによって子実体形成が誘導されることが示された。

暗黒下で0.5 - 1 $\mu\text{g/ml}$ のisoeugenitineを添加することにより、光照射下の70%程度の子実体形成が誘導されることが報告されているが (Fudo *et al.*, 1997)、0.5 - 1 $\mu\text{g/ml}$ のisoeugenitineの添加によって文献通り暗黒下で子実体形成が誘導された。この子実体形成の誘導がstigmoloneの生産・分泌の誘導を介して行われているのかを調べるために、isoeugenitineの添加時に生産・分泌される子実体形成誘導活性を測定した。1 $\mu\text{g/ml}$ のisoeugenitineを添加し暗黒下で培養した場合は、添加しなかった場合と同程度の量のstigmoloneしか生産・分泌されていなかった (Table 2-3-3)。よってisoeugenitineは、stigmoloneの生産・分泌誘導を介さずに子実体形成を誘導することが示された。このことより、isoeugenitineは、子実体形成の情報伝達経路において、stigmoloneの作用点よりも下流を誘導するか、stigmoloneとは独立の子実体形成誘導経路を持つことが考えられた。

2-3-4 考察

*S. aurantiaca*の栄養飢餓培養にstigmoloneを添加すると、本来集合の見られない暗黒下の培養においても集合が促進されることから (Plaga *et al.*, 1998)、stigmoloneによる子実体形成の誘導は、集合の促進によるものと考えられている。確かに、stigmoloneの生産・分泌は、集合体の形成が起きる以前に始まるが、最大量に達するのは集合が形成される時間帯と同じか少し後であることより (第2章第1節)、集合が形成された後もstigmoloneが必要であると考えられる。本研究により、培養液の交換によって一度形成された集合が消失し (Fig. 2-3-2)、stigmoloneの添加によって子実体形成が回復することが示された。よって、stigmoloneは、集合の形成後も集合の保持に必要であることが示唆された。粘液細菌の子実体形成において、集合は走化性によって促進され、誘因物質が集合の保持を行う理論が示されている (Stevens, 1995)。Stigmoloneは、集合の促進と保持に必要であったことから、走化性に関与する可能性が示された。しかし、*S. aurantiaca*において、集合がstigmoloneの存在下で保持されることは示したが、stigmoloneが誘因物質となり集合の保持を行うかどうかは

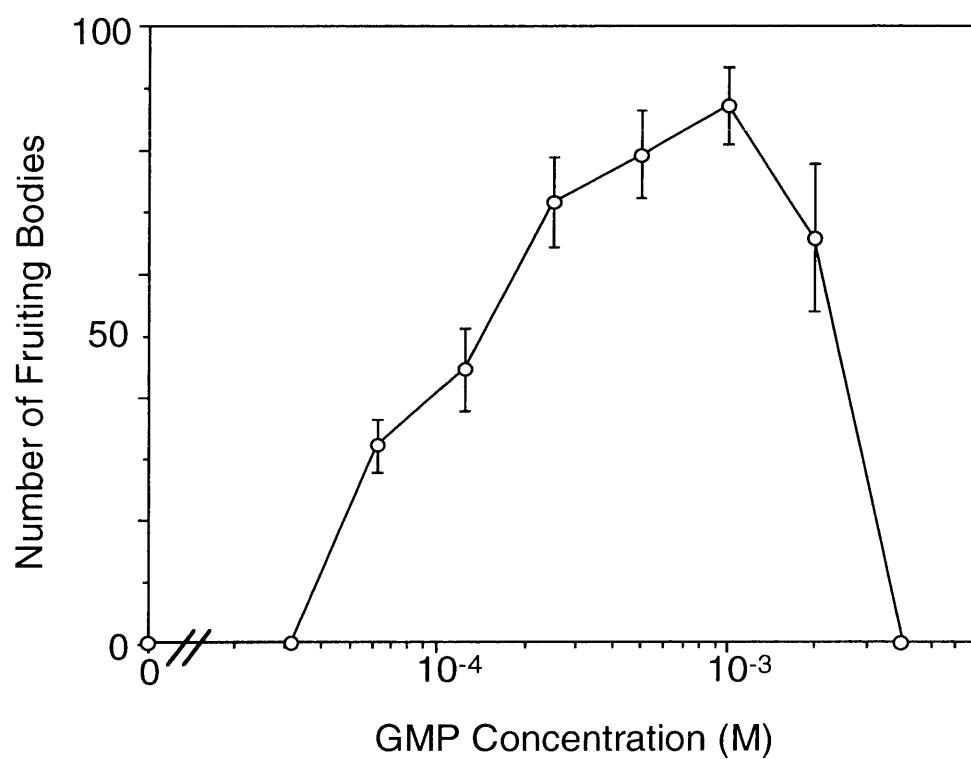


Fig. 2-3-4 GMPの子実体形成への影響

固体CPS培地に 3×10^{-5} - 4×10^{-3} MのGMPを添加し、 $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を接種して暗黒下で 30°C 、24 hrの培養を行った。バーは標準偏差を示す (n=3)

Table 2-3-2 GMP及びisoeugenitineの添加時に生産・分泌される子実体形成誘導活性

Treatment	Fruiting Activity (TU/10 ⁹ cells)
Light ^a	36
Dark	7
Dark + 10 ⁻³ M GMP	16
Dark + 1 µg/ml Isoeugenitine	7

a Cells were cultured in 3.5 µmol m⁻² s⁻¹ of incandescent light.

明らかではない。Stigmoloneによってどのように集合や子実体形成が誘導されるかを理解するには、さらに、stigmoloneのレセプターや、stigmoloneによって変化する生理現象の特定、及び誘導される遺伝子の同定が必要であると考えられる。

また、stigmoloneによる集合の促進、保持の後に、集合体の子実体へ形態分化する機構は明らかではない。粘液細菌と同様に、単細胞が集合し多細胞の子実体を形成する細胞性粘菌*D. discoideum*は、cAMPによって集合が誘導、促進されるが、集合体からの形態形成の誘導には形態形成因子DIF-1が必要である（Aubry and Firtel, 1999）。*S. aurantiaca*においても、形態形成にはこのような別の因子が必須かもしれない。

低細胞密度の培養では光照射下においても子実体は形成されないが、stigmoloneの添加によって子実体形成が誘導された（Fig. 2-3-1）。また、stigmoloneの生産量は細胞数に依存することが示された。Stigmoloneは細胞密度非依存的に生産・分泌されるが、細胞はその濃度依存的に反応することから、結果的にstigmoloneによって誘導される子実体形成は細胞密度に依存すると言える。このような濃度依存的に現象を誘導する細胞間シグナルとして、グラム陰性細菌において広く認められるquorum-sensingを行うホモセリンラクトン類がよく知られている（Nealson, 1999）。Quorumとは会議の成立に必要な定足数の意であり、液体培養液中に蓄積したホモセリンラクトン類の濃度が閾値以上に達すると、細胞が集団として生物発光、病原性などの生命現象を引き起こす。ホモセリンラクトン類の生産は細胞数に依存し、培養液中の濃度は細胞密度に依存するため、結果として細胞密度を測定するシグナルとして働く。*S. aurantiaca*の子実体形成は集団としての現象であり、また、stigmoloneは細胞数依存的に生産・分泌され、濃度依存的に感知されるため、stigmoloneはquorum-sensingを行うタイプの細胞間シグナルであると言える。

胞子形成は栄養飢餓によって誘導されたが、栄養飢餓条件下において培養液を交換し培養液中に蓄積した物質を除去すると胞子形成は誘導されなかった。このことから、培養液中に何らかの胞子形成誘導因子が存在する可能性が考えられた。しかし、この因子がstigmoloneであるかどうかは明らかではない。

GMPは光やstigmoloneと同様の作用を示すことが報告されていたが（Stephens and White, 1980）、stigmoloneの生産・誘導の促進を介して子実体形成を誘導することが明らかとなった（Table 2-3-2）。しかし、GMPの添加によって誘導されたstigmoloneの量と形成された子実体の数は、光照射と比較すると不完全であった（Fig. 2-3-4、Table 2-3-2）。Stephensらの研究ではGMPのほかに、cGMP、GDP、GTPにも集合の促進を誘導する活性があることが報告されている（Stephens and White, 1980）。数々のグアニン化合物が集合に効果があることから、GMPそのものがstigmoloneの生産・分泌誘導合成経路を活性化するかどうかは不明である。また、GMPは不完全ながら光照射のかわりとなったが、GMPと光照射との関係は明らかにはならなかった。GMPと光照射の関係の解明には、光照射によって*S. aurantiaca*細胞内のグアニン化合物の

濃度に変化がみられるかを測定する必要があると考えられる。

第2章の結果より、次のような子実体形成経路が考えられた (Fig. 2-3-5)。 *S. aurantiaca* は栄養飢餓によって stigmolone 生産・分泌能と感受性を獲得し、光照射によって stigmolone の生産・分泌をさらに促進する。光シグナルは活性酸素種を介して stigmolone の生産・分泌を促進する。GMP は、stigmolone の生産・分泌を促進するが、光との関係は明らかではない。栄養飢餓、光照射、高細胞密度により stigmolone の濃度が閾値以上に達すると、stigmolone によって集合の促進、保持が行われ、子実体形成が誘導される。

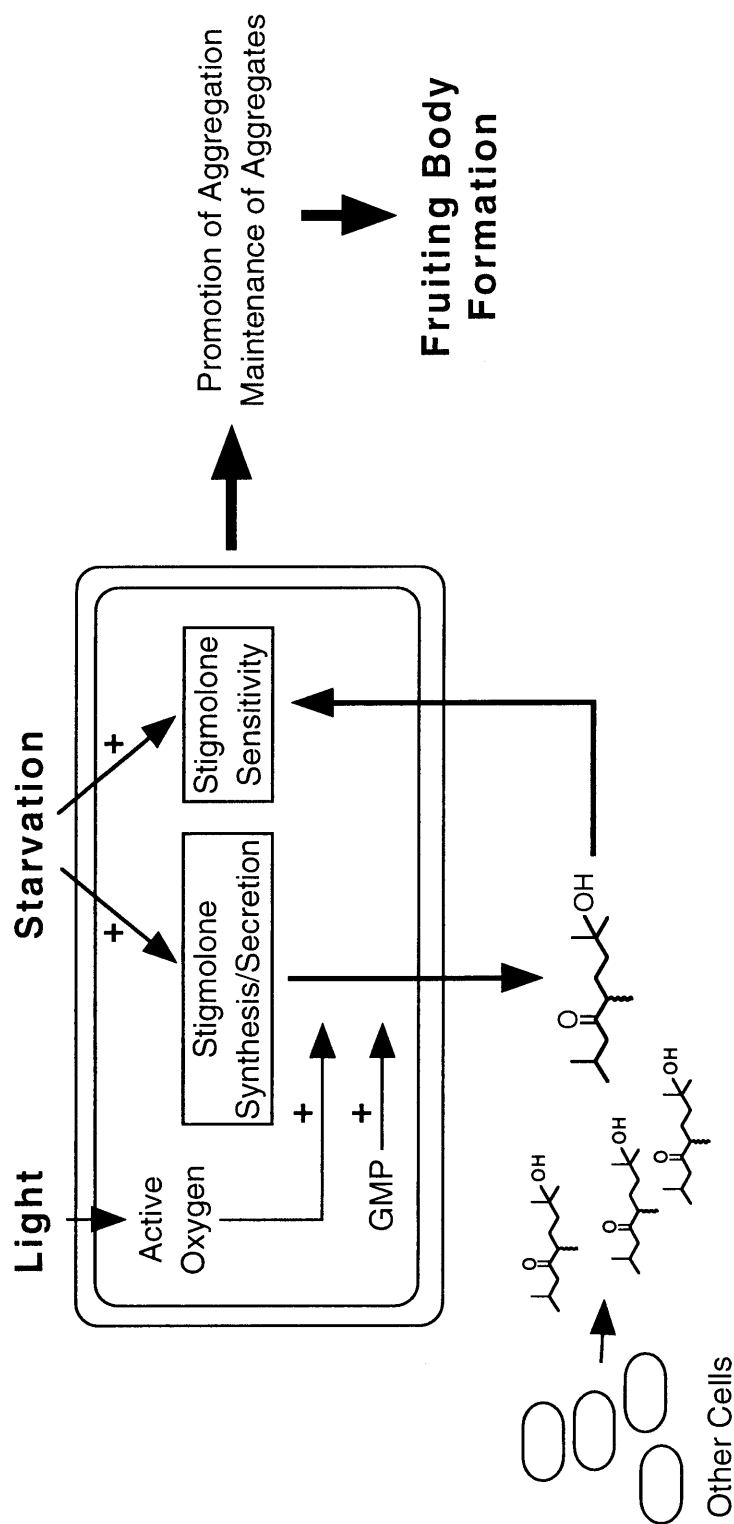


Fig. 2-3-5 *S. aurantiaca*の子実体形成誘導経路

第2章において明らかとなった*S. aurantiaca*の子実体形成経路を示した。*S. aurantiaca*は栄養飢餓によって stigmolone 生産・分泌能と感受性を獲得し、光照射によって stigmolone の生産・分泌をさらに促進する。光シグナルは活性酸素種を介して stigmolone の生産・分泌を促進する。GMP は、stigmolone の生産・分泌を促進する。栄養飢餓、光照射、高細胞密度により閾値以上の濃度の stigmolone が生産されると、集合の促進、保持に関与することによって子実体形成が誘導される。

第三章 子実体形成の分子生物学的解析

第1節 子実体形成における *relA* 遺伝子の解析

3-1-1 序

多くの原核生物はアミノ酸飢餓により、RNA合成の低下などの多面的な反応を引き起こす緊縮応答を行うことが知られている。この応答は、RelAタンパク質によって制御されており、RelAはアミノ酸の欠乏によりGTPとATPを基質としてグアノシン5'-二(三)リン酸3'-二リン酸 ([p]ppGpp) の合成を触媒する。(p)ppGppはアミノ酸飢餓により蓄積することから、緊縮応答における細胞内飢餓シグナルと考えられている (Cashel *et al.*, 1996)。

*M. xanthus*においては、栄養増殖期に*E. coli*由来の*relA*を過剰発現させることによって、子実体形成の初期に誘導される遺伝子群の発現が認められることが知られている (Singer and Kaiser, 1995)。また、*relA*欠損株では、集合、子実体形成は認められず、栄養飢餓によって誘導される遺伝子の発現も誘導されなかった (Harris *et al.*, 1998)。よって、*M. xanthus*においてRelAは子実体形成の初期の反応を制御することが示され、栄養飢餓の認識に関与すると考えられている。さらに、*M. xanthus*の子実体形成の初期には(p)ppGppの蓄積がみられ (Manoil and Kaiser, 1980)、また、*relA*欠損株では栄養飢餓による(p)ppGppの蓄積が欠損していたことから (Harris *et al.*, 1998)、多くの原核生物同様に、*M. xanthus*の飢餓応答はRelAを介して合成される(p)ppGppの蓄積によって行われると考えられている。

*S. aurantiaca*の子実体形成は、栄養飢餓によりstigmoloneの生産・分泌、及びstigmoloneへの感受性が誘導されるが、その栄養飢餓認識経路については明らかではない。ここでは、栄養飢餓条件下において*relA*を欠損させることによる細胞の変化を解析することにより、*S. aurantiaca*の子実体形成における*relA*の役割を解明した。

3-1-2 材料と方法

ゲノムDNAの調製

*S. aurantiaca*のゲノムDNAの調製は、StarichとZissler (Starich and Zissler, 1989)の方法を改変して行った。第1章の方法に従って*S. aurantiaca*の栄養増殖細胞を調製し、その培養液40 mlより、8,000g×10 minの遠心分離によって細胞を回収した。細胞の洗浄のため、ペレットを5 ml STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM EDTA) に懸濁し、8,000g×10 minの遠心分離を行った。上清を除去し、ペレットを3.6 ml STEに懸濁し、0.4 mlの20%ラウリル硫酸ナトリウム溶液を添加して70℃、30 min保温した。0.4 mlのフェノール-クロロホルムで抽出したのち、水層を等量のイソアミルアル

コール-クロロホルムで2回抽出することで除タンパク操作を行った。得られた水層に1 mlのイソプロピルアルコールを添加し、生じた沈殿をイエローチップの先で回収した。得られたペレットを70%エタノールで洗浄し、TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM EDTA) に溶解させた。溶液にRNase A (終濃度100 µg/ml) を添加し、室温で4 hr 静置し、DNAサンプルとした。また、*M. xanthus*のゲノムDNAについても同様に調製した。

*S. aurantiaca*のゲノムDNAライブラリーの構築

5 µgの*S. aurantiaca*ゲノムDNAを50 µlの系で、0.1 U *Sau*3AIによる、37℃、45 minの制限処理を行った。反応液を氷上に置き、0.25 M EDTAを1 µl添加した後に、65℃、15 minで保温することによって反応を停止させた。この反応液を0.8%アガロースゲル電気泳動で分離し、6 - 12 kbpのサイズのDNAを回収した。このDNA 0.4 µg分に1 µlのZAP Express vector (Stratagene)、1 µlの5×ライゲーションバッファー、0.5 µlのT4 DNA ligase (Gibco) を添加し、5 µlの系で4℃で二晩反応させた。この反応液を4 µlとり、パッケージングエクス (Gigapack III XL, Stratagene) と混和して22℃、2 hr処理した後、0.5 mlのSM緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 7 mM MgCl₂, 0.01% Gelatin)、20 µlのクロロホルムを加えた。この反応液を*E. coli* XL1-Blue MRF'に感染させプレATINGし、力価を測定した。*S. aurantiaca*のゲノムサイズは約10 Mbpと見積もられており (Neumann *et al.*, 1993)、平均のインサートサイズが5 kbpのライブラリーが得られたとするとゲノムを7回カバーするには 1.4×10^4 必要である。上の操作で充分量である 3×10^6 pfuのライブラリーが得られたため、1/10量を1回増幅してスクリーニングに用いた。

*relA*遺伝子とその周辺配列の解析

*M. xanthus*の*relA*の配列 (Harris *et al.*, 1998) をもとに、F-myx*relA*-557 (5'-ATCTAGCGCCGCTGGCCCAAC)、及びR-myx*relA*-1082 (5'-CTTGTACTTCCAGTGC GCGGC)の2つのプライマーを設計し、*M. xanthus*のゲノムDNAを鋳型にPCRを行った。得られた0.5 kbpのPCR産物の塩基配列を確認し、アルカリフォスファターゼ標識 (Alkali Phosphatase Direct, Amersham) を行って、プローブとして用いた。 1.2×10^4 pfuの*S. aurantiaca*ゲノムDNA λファージライブラリーをスクリーニングし、陽性のプラークに関して二次スクリーニングを行った。陽性のプラークよりRapid Excision Kit (Stratagene) を用いて*in vivo* excisionを行い、得られたプラスミドλ Stg-261及びλ Stg-243の塩基配列の決定を行った。

*relA*欠損株の作製

*S. aurantiaca*への遺伝子導入には、Beyerらの方法 (Beyer *et al.*, 1999) を改変して用いた。λ Stg-261由来の約1 kbの*Bam*HI, *Xho*I断片 (*relA*149 - 1116) をpCR2.1クローニングベクター (Invitrogen) に導入し、pYM201を作製した。このプラスミドを*E. coli* SCS110 (Stratagene、*rpsL*, (*Str*^r), *thr*, *leu*, *thi-1*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*,

supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^fZΔM15]) で増幅させ、プラスミドを得た。

2 mlの*S. aurantiaca*栄養細胞を500 mlの三角フラスコに入れた100 mlの液体peptone培地 (1% casitone, 0.1% MgCl₂, pH 7.4) に接種し、30℃、200 rpmで振盪培養を行った。OD₆₆₀が0.3になるまで培養後、5,000×g, 10 min、25℃の遠心分離によって集菌した。ボルテックスを用いて100 mlの10% グリセロールに菌体を懸濁し、同条件の遠心分離を行うことで洗浄を行った。菌体の洗浄は3度行った。その後、菌体を4℃に保温し、1 mlの20%グリセロールに懸濁した。こうして調製したコンピテントセルは、-80℃で保存した。

8 μlのH₂Oに溶解させたベクターに5 μlのplasmid denaturing reagent (10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA, 50% glycerol, 50% ethylene glycole) を加え、98℃、5 minの熱変成を行った。50 μlのコンピテントセルに3 μlの熱変成させたベクターを加え、細胞を0.1 cmキューベット (BioRad) に注入し、Gene Pulser (BioRad) を用いて100Ω, 25 μFのエレクトロポレーションを行った。その後、細胞を500 mlの三角フラスコに入れた100 ml peptone培地に接種し、30℃、200 rpm、18 hの振盪培養を行った。培養後、細胞を5,000×g, 10 minの遠心分離によって集菌し、60 μg/mlのカナマイシンを含む固体peptone培地に、軟寒天培地 (0.5% agar) を用いて接種した。

得られたカナマイシン耐性株よりDNAを抽出し、PCR法によりベクター配列のゲノム中への挿入を確認した。プライマーは、F-stgrelA-(-127) (5'-GTCCTAAAAACGC GGGGTCAA) と M13-R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC) 、及び R-stgrelA-1841 (5'-GGCACGGGATTACAACAGCG) とM13-F (5'-GTAAAACGACGGCCAG) を用いた。また、得られたPCR産物について塩基配列の確認を行った。

細胞の増殖

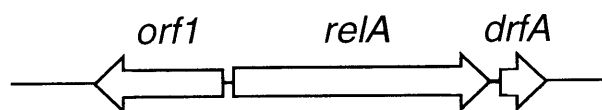
*S. aurantiaca*のカナマイシン耐性株の培養は、固体peptone培地、及びcasitone培地に終濃度60 μg/mlのカナマイシンを添加して行った。*M. xanthus*の培養は、*S. aurantiaca*と同様に行った。*M. xanthus*は、味の素中央研究所の不藤亮介博士より御供与いただいた。

3-1-3 結果

*relA*相同遺伝子のクローニングとその周辺領域の解析

*S. aurantiaca*の*relA*遺伝子配列の決定のため、*M. xanthus*の*relA*の配列の一部をプローブとして*S. aurantiaca*のゲノムDNAライブラリーをスクリーニングし、6468 bpのλ Stg-261、及び6097 bpのλ Stg-243の2つのクローンを得た。8927 bpをカバーするこれらクローンの塩基配列を決定したところ、5つの予測ORFが存在していた (Fig. 3-1-1)。ORF3より推定されるアミノ酸配列は、*M. xanthus*のRelAと87%の相同性を示した (Fig. 3-1-2)。よって、ORF3は*relA*であると結論づけた。ORF1は、*M. xanthus*のセ

M. xanthus



S. aurantiaca

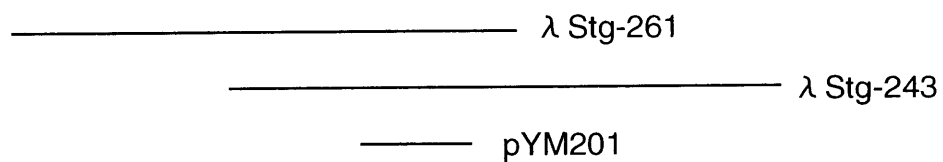
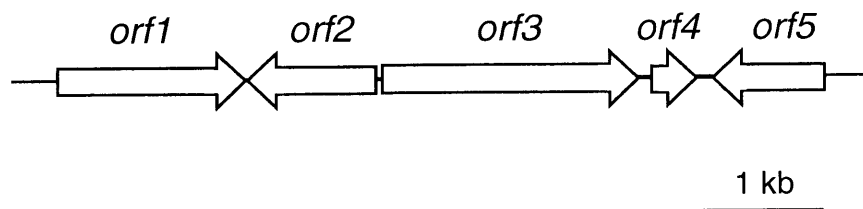


Fig. 3-1-1 *M. xanthus* (Harris *et al.*, 1998) 、及び *S. aurantiaca* の *relA* とその周辺遺伝子。得られたクローン λ Stg-261、及び λ Stg-243 がカバーする領域と、作製したプラスミド pYM201 のインサート部分を示した。

<i>S. aurantiaca</i>	MIRLNDILQR	VAS	YHPDPDL	DIKKAY
<i>M. xanthus</i>	MWGNVAPPLVQSYDCSSFDDSPERHPPT	V	SQYHPDPDL	DIKKAY

VYSAKVHQGQLRKSGEPYLVHPLEVAGILAEKLDEASIVTGLLHDTIEDTLATAEELTE
 VYSAKVHQGQLRKSGEPYLVHPLEVAGILGELKLDEASIVTGLLHDTIEDTLATEEELTE
 LFGPEVSQ^LVDGVT^KLSKFSASATLSQEEKQAENFRKMIIAMAQDIRVILV^KLADRTHNM
 LFGSEVAH^LVDGVT^KLSKFSASASLSQEEKQAENFRKMIIAMAQDIRVILV^KLADRTHNM
 RTLDHMSEEKQARIAQETLDIYAPLANRLGISWIKTELEDLSFRYVKPQ^{DY}FSLLEKLN^R
 RTLDHMSEEKQARIAQETLDIYAPLANRLGISWIKTELEDLSFRYVKPQ^{EF}FALQAKLN^K
 RKKEREKYIEDTSTL^VRSKLEERNLEGEVSGRFKHVYSIYKKIKAQ^{GIE}FDQIHDIIA^{FR}
 RKKEREKYIEDTCDLIRSKLAERGLKGEVSGRFKHVYSIYKKIKS^{QID}FDQIHDIIA^{FR}
 LLMPTVPSCYEALGLVH^QLWKVPVGRFKDFIAIPKPNMYQSLHTTVIGPLSERVEVQ^{IRT}
 IIAPTAPSCYEALGLVH^{EM}WKVPVGRFKDFIAIPKPNMYQSLHTTIIGPLSERVEVQ^{IRT}
 PDM^{NK}VAAEGIAAHWAYKEGKALISKDDEKFAWL^RQLMEWQQDLKDPKEFLET^VKVDL^{FT}
 SEM^{HK}IAAEGIAAHWKYKEGKAVISKDDEKFAWL^RQLMEWQQDLKDPKEFLET^VKVDL^{FT}
 DEVFVFTP^KGDV^KSLPRGATPVDFAYAIHSDV^GGRCVGAKVNGKIVPLRYKMKN^{DM}VEV
 DEVFVFTP^KGDV^RSLPRGATPVDFAYAIHSDV^{GN}RCVGAKVNGKIVPLRYKMKN^{DT}VEV
 LTSPQAHP^SKDWLTFVKTSRAQQRIRNFIKQQQR^DKS^LQLGRELAERELKRYQLN^{LN}RLL
 LTSPQQH^SPKDWLTFVKTSRAQQRIRGFIKQQQREK^SLS^LQLGRELADRELKRFQLN^{FN}RLL
 KNGEL^{KK}AAEVLGYRVEDDLLVAIGYGK^VTPPQ^LLQ^RVAP-DKV----GEDREPLPS^{APA}
 KSGEM^{KK}AAVDLGRVEDDMLVAIGYGK^VTPPQ^LSHRLVPQEKLNAEAGGRADAN^PAAT
 AHEGNGAS^MLPGLSRVTDLAKRLVGRQSRSGVQIGGVDDVLVRFGRCCNPVPGDPIV^{GFI}
 TSGGAGNS^VLPGLSRVTDLAKRLVGRSNRSGVQIGGVDDVLVRFGRCCNPVPGDPIA^{GFI}
 TRGRGVT^VHTDKCEKALATDPERRVDV^{AW}DIRGEYKRPVTLRILSADRPG^{ML}SDITNTFS
 TRGRGVT^VHTVGCEKALATDPERRVDV^{SW}DVRGDFKRPVTLRVLTADRPG^{LL}ADITNTFS
 KKGVNISQANCRATGDDRAVNTFEVTISDLKQLTELMRSIERIQGVQS^{VERI}
 KKGVNISQANCRATGDDRAVNTFEVIISDLKQLTDLMTIERLQGVYS^{VERI}

Fig. 3-1-2 *S. aurantiaca*と*M. xanthus* (Harris *et al.*, 1998) のRelAのアミノ酸配列のアライメント。赤字は同一アミノ酸を表す。

リン/スレオニン型キナーゼPkn3遺伝子 (Inouye *et al.*, 2000) と相同性を示し、ORF2は*M. xanthus*の*relA*の上流に存在する機能未知の予想ORF、ORF4は*M. xanthus*の*relA*の下流に存在する*dfrA*と相同性を示した (Harris *et al.*, 1998)。ORF5の推定アミノ酸配列は*Pseudomonas stutzeri*のcopper transport ATP-binding protein (Zumft *et al.*, 1990) などのABCタンパク質と相同性を持っていた。

*relA*欠損株の作製

*S. aurantiaca*の*relA*遺伝子の機能の解析のため、*relA*遺伝子の欠損株を作製し、その解析を行った。pCR 2.1ベクターに*relA*の部分配列を導入したプラスミドpYM201を、プラスミド上のゲノム相同配列とゲノム上の配列の間の一回交叉によって*S. aurantiaca*のゲノムDNA中に挿入した (Fig. 3-1-3)。得られた形質転換株について、ベクターが挿入された場合のみ増幅されるプライマーを用いてPCRを行なったところ、予想される長さのDNAの増幅が見られた。また、PCR産物の塩基配列の決定を行ったところ、増幅が予想される配列と一致した。よって、得られた形質転換株にはベクターが挿入されていると判断し、以降本菌株を、*relA*欠損株と呼ぶことにした。

*relA*欠損株における子実体形成

*relA*遺伝子の集合、子実体形成における役割の解析のため、*relA*欠損株を固体CPS培地に接種して培養を行った (Fig. 3-1-4)。光照射下で培養することにより野生株は子実体を形成するが、*relA*欠損株では光照射下において集合、子実体形成は認められなかった。また、暗黒下においては、ridgeの形成も誘導されなかった。よって、*relA*遺伝子は集合、子実体形成、及びridge形成に必須であることが示された。*relA*欠損株にstigmoloneを添加しても、集合、子実体形成は認められなかった。よって、*relA*遺伝子は、stigmoloneの感受性に必須であることが示された。また、*relA*欠損株にstigmoloneを添加することにより、スポットした細胞集団の表面が波打つ現象 (rippling) が見られた。よって、*relA*欠損株においても、細胞のripplingに関してはstigmoloneに対する受容能を保持していることが示された。

*relA*欠損株におけるstigmoloneの生産・分泌

*relA*遺伝子のstigmolone生産・分泌への役割を検討するため、*relA*欠損株より培養液を回収し子実体形成誘導活性を測定することにより、stigmoloneの定量を行った (Fig. 3-1-5)。*relA*欠損株では、光照射下、暗黒下どちらにおいてもstigmoloneは全く検出されなかった。よって、*relA*遺伝子は、stigmoloneの生産・分泌においても必須であることが示された。

*relA*欠損株における孢子形成

*relA*遺伝子の孢子形成への役割を解析するため、*relA*欠損株における孢子形成を検討した (Table 3-1-1)。栄養飢餓条件下で培養を行った細胞の孢子を計数したが、*relA*欠損株では光照射下、暗黒下ともに孢子形成は認められなかった。よって、孢子

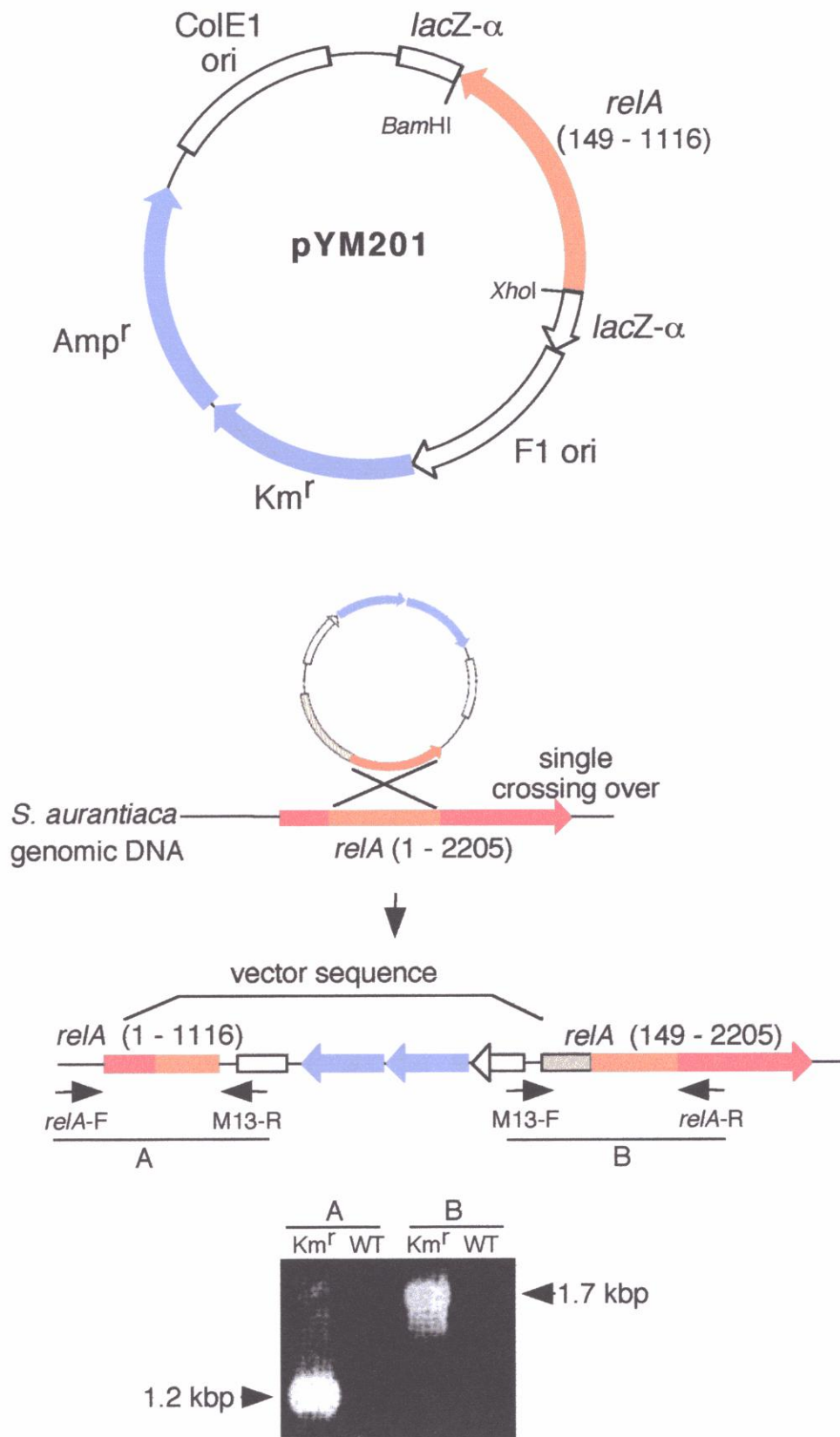


Fig. 3-1-3 *relA*欠損株の作製

pYM201を*S. aurantiaca*に導入することによって*relA*欠損株を作製した。得られたカナマイシン耐性株について、ゲノムDNAをテンプレートとしたPCRを行い、挿入配列の確認を行った。カッコ内の数字は、*relA*の開始コドンからの塩基数を示す。

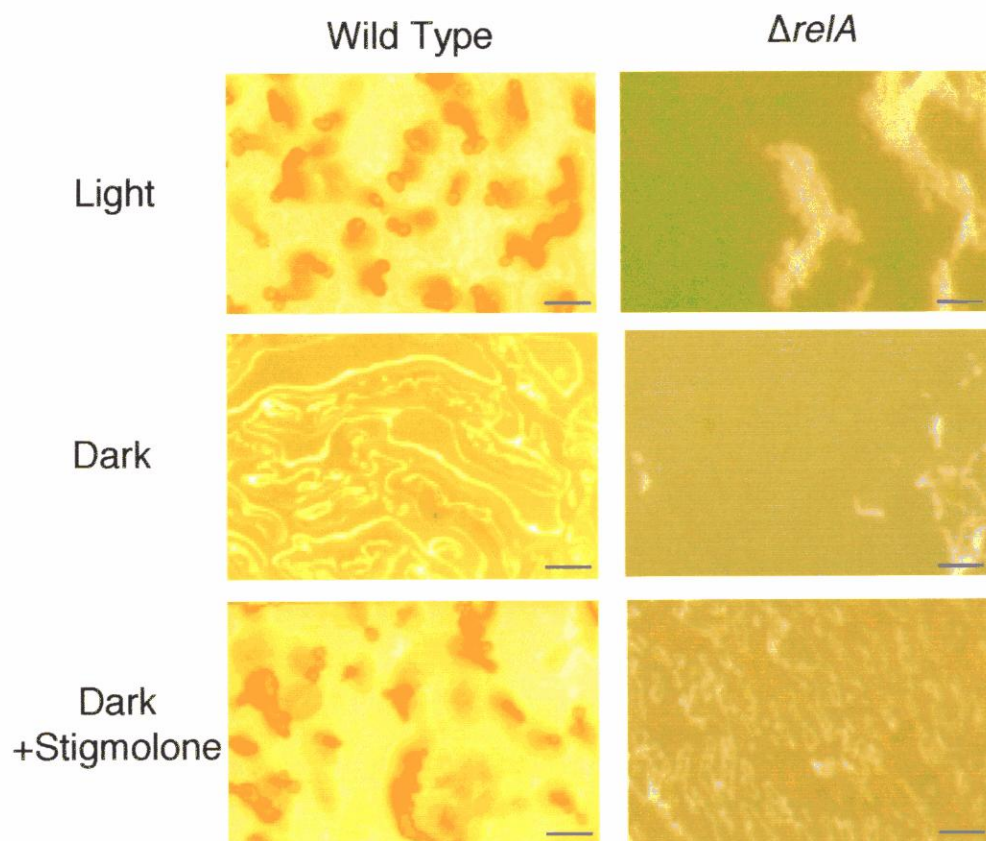


Fig. 3-1-4 *relA*欠損株の栄養飢餓応答

$2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の細胞を2 mlの固体CPS培地に接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、もしくは暗黒下で 30°C 、24 hrの培養を行った。また、暗黒下の培養に、 $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ のstigmoloneを添加し、暗黒下で同様に培養した。バーは $200 \mu\text{m}$ を示す。

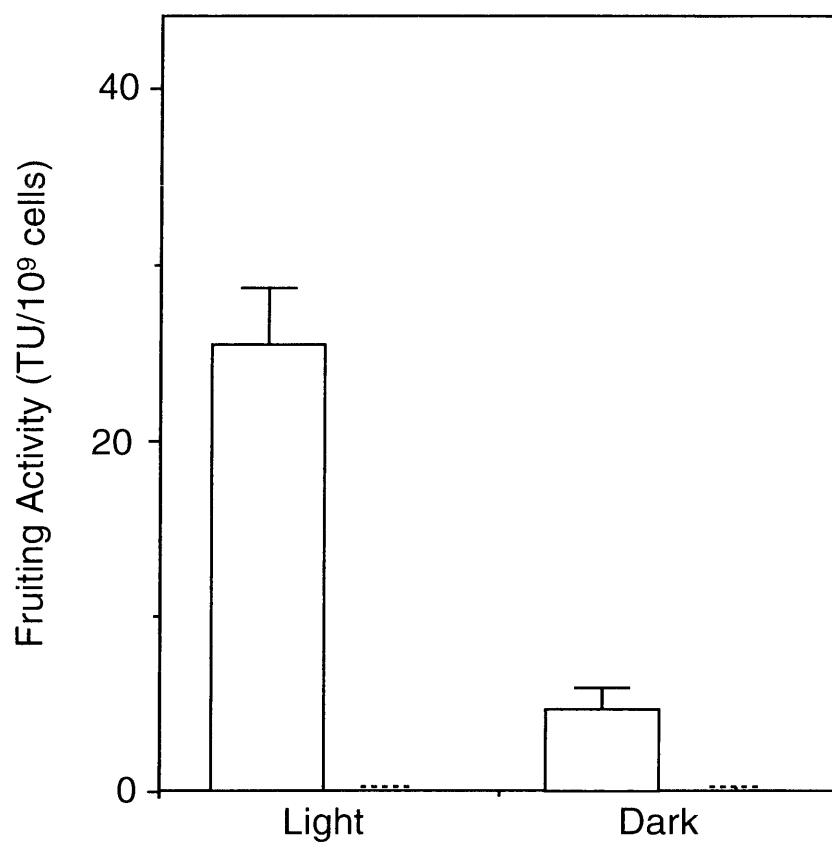


Fig. 3-1-5 *relA*欠損株における子実体形成誘導活性

*S. aurantiaca*野生株 (□) と *relA*欠損株 (▨) を、濾紙上に $2 \times 10^8/5 \mu\text{l}$ の密度で25スポット接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、及び暗黒下) で30℃、24 hrの培養を行い、回収された子実体形成活性を示した。バーは3回の独立した実験より得られた標準偏差を示す。

Table 3-1-1 *relA*欠損株における孢子形成

Strains and Treatments	Sporulation ^a (%)	
	Light ^b	Dark
Wild Type	100	12
$\Delta relA$	<0.1	<0.1
$\Delta relA$, + 2×10^{-9} M Stigmolone	<0.1	<0.1

a Heat stable, sonication resistant spores were counted in each conditions. Number of spores of 24 hr after starvation in the light was set as 100%.

b Cells were cultured in $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of incandescent light.

形成においても、*relA*は必須であることが示された。また、*relA*欠損株における孢子形成の欠損は、光照射下、暗黒下ともにstigmoloneの添加によって回復しなかった。

3-1-4 考察

栄養飢餓は、stigmoloneの生産・分泌、及びstigmoloneへの感受性を誘導する（第2章第1節）。*relA*欠損株では子実体形成条件下においても、stigmoloneの生産・分泌は認められなかった（Fig. 3-1-5）。また、*relA*欠損株にstigmoloneを添加しても、*relA*欠損株の集合、子実体・孢子形成は回復しなかった（Fig. 3-1-4）。従って、栄養飢餓によるstigmoloneの生産・分泌、及びstigmolone受容能の獲得には、*relA*が必須であることが示された。*RelA*は多くの原核生物において栄養飢餓シグナルである(p)ppGpp合成酵素であり（Cashel *et al.*, 1996）、また、粘液細菌*M. xanthus*においても*RelA*を介して合成される(p)ppGppの蓄積が栄養飢餓シグナルとなることが示唆されている（Harris *et al.*, 1998）。*S. aurantiaca*の栄養飢餓応答に*relA*遺伝子が必須であったことより、*S. aurantiaca*の栄養飢餓も(p)ppGppの蓄積を介して認識されることが示唆された。

*M. xanthus*の子実体形成では、栄養飢餓後、集合の開始より少し前の時期から集合が行われる時期に、細胞集団がうねを形成するripplingが観察される（Shimkets and Kaiser, 1982）。Ripplingは子実体形成時に観察され、いくつかの子実体形成欠損株においては観察されないことから（Søgaard-Andersen *et al.*, 1996）、子実体形成と密接に関係していると考えられている。*relA*欠損株においても、細胞のripplingに関してはstigmoloneに対する受容能を保持していた（Fig. 3-1-4）。このことより、*relA*欠損株は、集合、子実体形成に対する感受性は失われているものの、stigmoloneのレセプターは保持している可能性が示唆された。*relA*欠損株は、*S. aurantiaca*の栄養飢餓認識機構のみならず、stigmoloneのレセプターの同定に役立つかもしれない。

第2節 子実体形成における *csgA* 遺伝子の解析

3-2-1 序

粘液細菌 *M. xanthus* では、子実体形成機構の解析は主に遺伝学的方法により行われており、いくつかの細胞間シグナル欠損株が単離されている (Hagen *et al.*, 1978)。そのなかのひとつ *csg* 変異株は、集合、及び子実体形成能が欠損している。細胞間シグナルの同定のため、*csg* 変異株の欠損を相補する活性を有する *M. xanthus* の野生株由来の 17 kDa のペプチドが単離され、CsgA と命名された (Kim and Kaiser, 1990a, b)。CsgA の配列と *csg* 変異株の変異遺伝子より予想されるアミノ酸配列の一部が一致したため (Shimkets and Asher, 1988)、CsgA は *M. xanthus* の細胞間シグナル伝達系路に関与していると考えられている。また、CsgA は短鎖アルコールデヒドロゲナーゼ (SCAD) との相同性が指摘されており (Lee and Shimkets, 1994)、子実体形成誘導活性に酵素活性が必要なことが示唆されている (Lee and Shimkets, 1994、Lee *et al.*, 1995)。SCAD は一般に二級アルコールとケトンの変換反応を触媒するが、CsgA の基質は未だ明らかにはされておらず、CsgA がシグナルとして働いているのか、C-シグナルの合成を触媒しているのかは未解決である。また、*S. aurantiaca* においても *csgA* 遺伝子が存在し、また不活化することにより子実体形成に影響があると言われているが、その詳細は明らかではない (Schairer, 1993)。

M. xanthus においては、CsgA は栄養飢餓後発現が誘導され、その濃度は集合の後期に最大に達する (Kim and Kaiser, 1990a)。一方、*S. aurantiaca* の細胞間シグナルである stigmolone も栄養飢餓によって誘導され、その濃度は集合の後期に最大に達する (第2章第1節)。また、*M. xanthus* の *csgA* 変異株では、細胞は不規則な峰である ridge を形成することが観察されているが (Kim and Kaiser, 1990b、Søgaard-Andersen *et al.*, 1996)、*S. aurantiaca* においては、暗黒下の培養において細胞は ridge を形成し、その原因は、stigmolone の不足であることが示唆されている (第2章第1節)。

このように、*csgA* 遺伝子と stigmolone は共通の特徴をもっており、また、stigmolone には SCAD の基質となりうるケトンを分子内に有することから、*S. aurantiaca* における stigmolone の生産・分泌と *csgA* との関係に着目した。*M. xanthus* においては、*csgA* 遺伝子が子実体形成において集合の促進と胞子の誘導という主要な情報伝達系路に関与することから (Søgaard-Andersen *et al.*, 1996)、*S. aurantiaca* における *csgA* と stigmolone の関係の解析により、stigmolone と子実体形成の情報伝達経路との関連性が解明できると考えられる。ここでは、stigmolone の生産・分泌を中心として、*S. aurantiaca* の *csgA* 遺伝子の機能を解析することにより、stigmolone を中心とした子実体形成経路の解明を行った。

3-2-2 材料と方法

csgA遺伝子とその周辺配列の解析

*S. aurantiaca*のcsgAは、プロトポルフィリノーゲン酸化酵素遺伝子*hemG*相同配列を含むクローンλ Stg-123に偶然含まれていた。*hemG*相同配列を含むクローンは、*M. xanthus*の*hemG*の配列 (Dailey and Dailey, 1996) の一部をプローブとして選別した。*M. xanthus*の*hemG*の配列をもとにF-myxhemG-4 (5'-CACCACATGCCGAGGACA)、及びR-myxhemG-1416 (5'-CTACGGGGCGTGGGAGGT) の2つのプライマーを設計し、*M. xanthus*のゲノムDNAを鋳型にPCR反応を行った。得られた1.4 kbpのPCR産物の塩基配列を確認し、アルカリフォスファターゼ標識を行い、プローブとして用いた。

csgA変異株の作製

csgA欠損株の作製のため、λ Stg-123をBamHIにより処理し、csgAのコード領域を含む1.5 kbpの断片をpCR 2.1ベクターのBamHIサイトに導入しpYM103を得た。pYM103をClaI及びSacIで処理し、csgAの開始コドンより-22 bpから484 bpまでを含む0.5 kbpの断片 (csgA -22 - 484 bp) をpCR 2.1のHindIII, SacIサイトに導入し、pYM112を得た。pYM113をエレクトロポレーション法により*S. aurantiaca*に導入してカナマイシン耐性株を得た。得られたカナマイシン耐性株よりDNAを抽出し、PCR法によりベクター配列のゲノム中への挿入を確認した。プライマーは、R-stgcsgA-552 (5'-CTACCAGGGGCACCTCGCGGCC) とM13-Fを用いた。また、得られたPCR産物について塩基配列の確認を行った。

csgA恒常発現株の作製のため、pYM103をClaI及びSacIで処理し、csgAの開始コドンの上流27 bpから484 bpまでを含む0.5 kbpの断片 (csgA [-22] - 484 bp) を得た。この断片を、pCR 2.1ベクターに、csgAが*lac*プロモーターの下流に正の方向に導入されるようXbaI, SacIサイトに導入し、pYM111を得た。pYM111をエレクトロポレーション法により*S. aurantiaca*に導入することによってカナマイシン耐性株を得た。得られたカナマイシン耐性株よりDNAを抽出し、PCR法によりベクター配列のゲノム中への挿入を確認した。プライマーは、R-stgcsgA-552とM13-Rを用いた。また、得られたPCR産物について塩基配列の確認を行った。

ノーザンハイブリダイゼーション

フェノール-SDS法によりRNAの抽出を行った。*S. aurantiaca*の栄養細胞 1.2×10^9 を $8,000g \times 10 \text{ min}$ の遠心分離により回収し、0.5 mlの溶液A (0.5% SDS, 20 mM sodium acetate, 10 mM EDTA, pH 5.5) に懸濁した。懸濁液に0.5 mlの飽和フェノール溶液 (20 mM sodium acetate, 10 mM EDTA, pH 5.5) を添加し、60°C、5 min振盪した。反応液の12,000 rpm, 3 minの遠心分離を行い、上層に×2.5容量のエタノールを加え、12,000 rpm, 5 minの遠心分離を行った。上清を除去し、ペレットを70%エタノールで洗浄後400 µlの溶液Aに再懸濁した。エタノールによる同様の沈殿洗浄操作を3回を行い、100

μlの溶液Aに溶解させて全RNA試料とした。栄養飢餓状態の細胞からのRNAの抽出は、菌体 1.2×10^9 を固体CPS培地よりかき取り、同様の操作を行った。

5 μgのRNAをホルムアルデヒドゲル（1×MOPS buffer、0.66 Mホルムアルデヒド、1%アガロース）電気泳動により分離し、臭化エチジウムによる核酸の染色を行って写真を撮り、20×SSC（0.33 M NaCl, 0.33 M sodium citrate, pH 7.0）を用いてナイロンメンブレン（Nylon membrane positively charged, Boehringer Mannheim）へトランスファーした。トランスファー後、メンブレンを乾燥させ、UVクロスリンカー（GS Gene Linker, BioRad）で150 mJのUVを照射し、RNAを固定した。ハイブリダイゼーションと検出は、DIGシステムキット（Boehringer Mannheim）に従って行った。プローブは、pYM111を鋳型とし、DIG RNAラベリングキット（Boehringer Mannheim）により標識したものを用了。

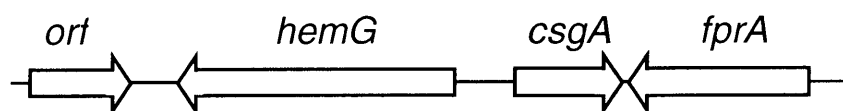
3-2-3 結果

csgAとその周辺配列の解析

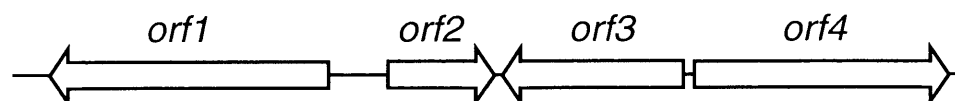
hemG相同配列を含む6 kbのラムダファージクローンλ Stg-123のうち、5166 bpの塩基配列を決定した。決定した配列には4つの予測ORFが存在しており（Fig. 3-2-1）、ORF2の配列は、データベース上に登録されている*S. aurantiaca*のcsgAと100%一致した。また、ORF2の配列より推定されるアミノ酸配列は*M. xanthus*のCsgAと52.6%の相同性を示した（Fig. 3-2-2）。また、ORF3は*M. xanthus*のcsgAの下流に存在するビタミンB₆生合成系酵素であるピリドキサミンリン酸酸化酵素遺伝子fprAと相同性を示した（Harris et al., 1998）。ORF4は、*Agrobacterium tumefaciens*のグリコーゲン合成酵素glgAと相同性を示した。

ORF1は、*M. xanthus*のプロトポルフィリノーゲン酸化酵素遺伝子（hemG）（Dailey and Dailey, 1996）と相同性を持っていた。*M. xanthus*の光受容体はプロトポルフィリンIXであり、プロトポルフィリノーゲン酸化酵素によりその合成が触媒されるが、第2章第2節において、*S. aurantiaca*の光によるstigmolone生産、及び子実体形成に活性酸素種が関与しており、*M. xanthus*の光受容経路と共通の光受容経路が存在する可能性が示唆されたため、*S. aurantiaca*のhemG相同遺伝子であるORF1についての解析を行った。ORF1を*E. coli*のプロトポルフィリノーゲン酸化遺伝子hemGの欠損株LG285（京都大学井口八郎先生より御供与、Narita et al., 1999）に導入し発現させたところ、LG285のhemGの機能が相補された。よって、*S. aurantiaca*のORF1は、プロトポルフィリノーゲン酸化酵素遺伝子（hemG）であることが明らかとなった。そこで、*S. aurantiaca*の子実体形成におけるhemGの機能の解析を試みた。ベクター上のhemG遺伝子相同配列の一部と、*S. aurantiaca*ゲノムDNA上のhemGとの一回交叉により*S. aurantiaca*のhemG欠損株の作製を試みたが、形質転換体を得ることはできなかった。よって、hemGは*S. aurantiaca*においては必須遺伝子である可能性が高く、その欠損株

M. xanthus



S. aurantiaca

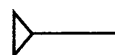


1 kbp

λ Stg-123

————— pYM 103

PlacZ



pYM 111

————— pYM 113

Fig. 3-2-1 *M. xanthus* (Kaiser and Shimkets, 1999) と *S. aurantiaca* の *csgA* 及び周辺遺伝子。得られたクローン λ Stg-123 がカバーする領域と、作製したプラスミド pYM103、111、113 のインサート部分を示した。

S. aurantiaca MRAFA**SAVSDGPLDVLINNA**
M. xanthus MRA**FATNVCTGPVDVLINNA**

GVSGKWCSFMEDYEDMTKVMETNSVGPMRLSAALM
GVSGLWCALGDVDYADMARTFTINALGPLRVTSAML

PAVLKGPTRKIIHLTTRMASLTENTRGGVYGFEGGA
PGLRQGALRRVAHVTSRMGSLAANT**-----D**GGA****

*

YAYRMSKAALNVCMRTMAVD**FRDQGLITAAINPGWV**
YAYRMSKAALNMAVRSMSTD**LRPEGFVTVLLHPGWV**

* *

RTEMGGKLAPMRPEDAVRGMLRVIDDITKEQSGMFL****
QTDMGGPDATLPAPDSVRGMLRVIDGLNPEHSGRFF****

DFQGREVPW
DYQGTEVPW

Fig. 3-2-2 *S. aurantiaca*と*M. xanthus* (Kim and Kaiser, 1990a) のCsgAの配列のアライメント。赤字は同一アミノ酸を表す。*はSCADの保存配列 (Persson *et al.*, 1991) を示す。

の作製には条件不活性化株の作製が必要であることが示唆された。

csgA欠損株の作製

*S. aurantiaca*のcsgAを不活化させることにより、csgA遺伝子の子実体形成、及びstigmoloneの生産・分泌への影響を検討した。csgA遺伝子の-22 - 484 bpの領域を含む断片をpCR 2.1に導入したpYM112を、ベクター上のゲノム相同配列とゲノム上の配列の間の一回交叉によって*S. aurantiaca*のゲノムDNA中に挿入し、csgA遺伝子の破壊を行った（Fig. 3-2-3）。得られたカナマイシン耐性株について、一回交叉によってベクターが挿入された場合のみ増幅されるプライマーを用いてPCRを行なったところ、形質転換体のみでDNAの増幅が見られた（Fig. 3-2-3）。よって、形質転換体では*S. aurantiaca*のゲノム中にベクターが挿入されていることが示された。

形質転換体におけるcsgA遺伝子の転写産物の欠損を確認するため、ノーザンハイブリダイゼーションによってcsgA遺伝子の発現を解析した（data not shown）。形質転換体では、栄養増殖下、栄養飢餓下どちらにおいてもcsgA転写産物は検出されなかった。よって、得られた形質転換体が、csgA欠損株であると結論づけた。

csgA欠損株の解析

csgA欠損株の子実体形成、及びstigmoloneの生産・分泌への影響を検討した。csgA遺伝子の不活化は子実体形成に影響があることが報告されているが（Schairer, 1993）、csgA欠損株は、光照射下においても子実体形成を誘導しないことが確認された。csgA欠損株にstigmoloneを添加し暗黒下で培養したところ、子実体形成の回復がみられた（Fig. 3-2-4 a, b）。よって、csgA遺伝子は、stigmoloneの感受性には影響しないことが明らかとなった。

csgA遺伝子の欠損により光照射によっても子実体形成が誘導されなかったため、csgA欠損株に活性酸素を添加することによって、csgA遺伝子の光情報伝達系における影響を解明した。栄養飢餓培養において、csgA欠損株にH₂O₂を添加し暗黒下で培養したところ、子実体形成は回復しなかった（Fig. 3-2-4 a, b）。よって、csgAは子実体形成情報伝達経路において、活性酸素種の下流を活性化することによって子実体形成を誘導することが示唆された。

csgA遺伝子の欠損はstigmoloneの感受性には影響しなかったため、csgA遺伝子の欠損によるstigmolone生産・分泌における影響を検討した。csgA欠損株では、光照射下で培養を行っても、子実体形成の誘導に必要な量のstigmoloneが生産・分泌されていなかった（Fig. 3-2-5）。よって、csgAの欠損により、光照射によるstigmoloneの生産・分泌の増加が誘導されないことが示された。このことより、csgA欠損株では光照射下、及びH₂O₂の添加によって子実体形成が誘導されなかったのは、十分な量のstigmoloneが生産・分泌されていないためであることが示唆された。また、csgA欠損株では、光照射下、暗黒下ともに、野生株の光照射下の約1/10量ながらstigmoloneの生産・分泌が認められた、よって、csgAはstigmoloneの生産・分泌に必須ではないが、子実体形成を誘導する量を促進するのに必要であることが示唆された。

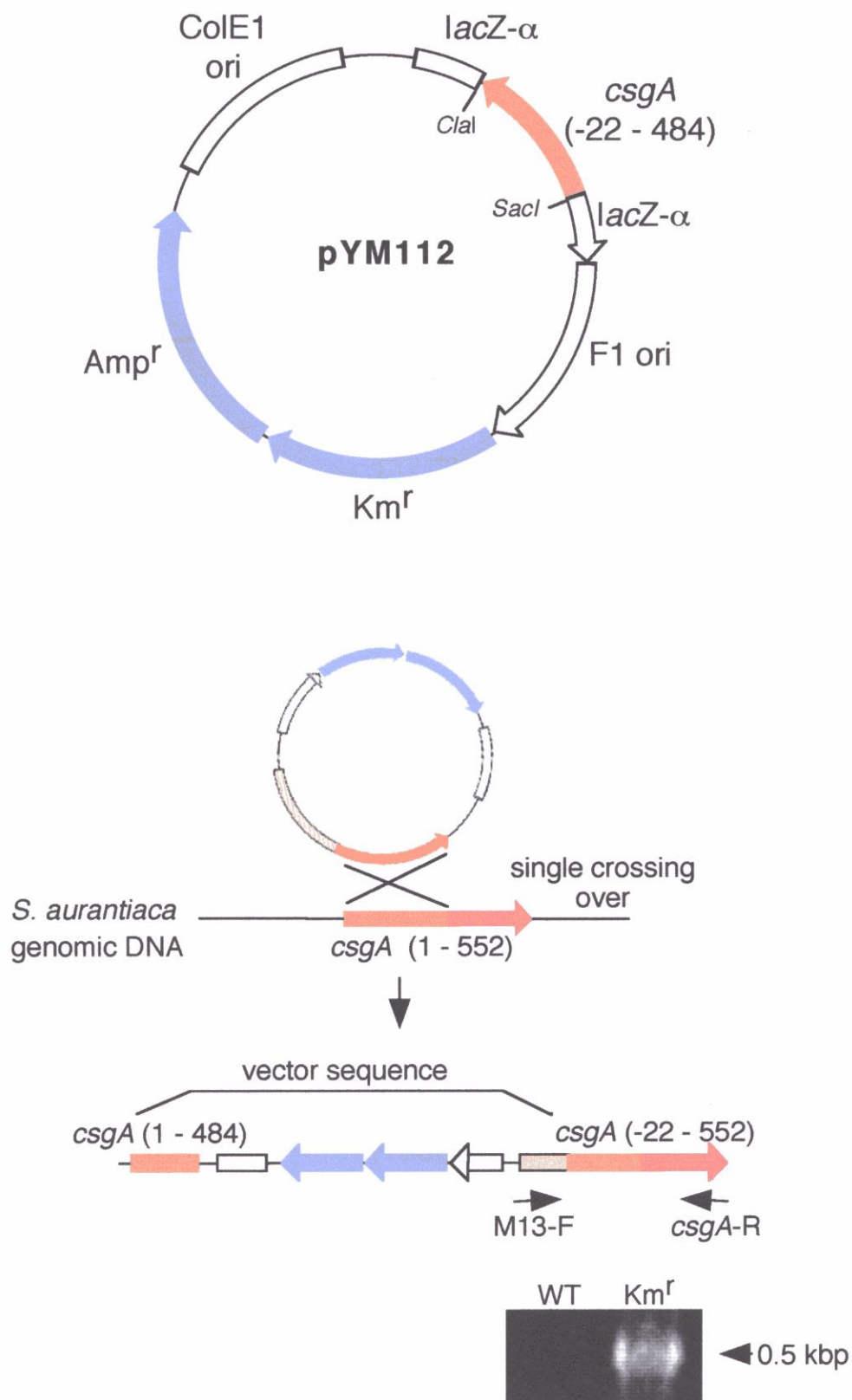


Fig. 3-2-3 *csgA*欠損株の作製

pYM113を*S. aurantiaca*に導入することによって*csgA*欠損株を作製した。得られたカナマイシン耐性株について、ゲノムDNAをテンプレートとしたPCRを行ない、挿入配列の確認を行った。カッコ内の数字は、*csgA*の開始コドンからの塩基数を示す。

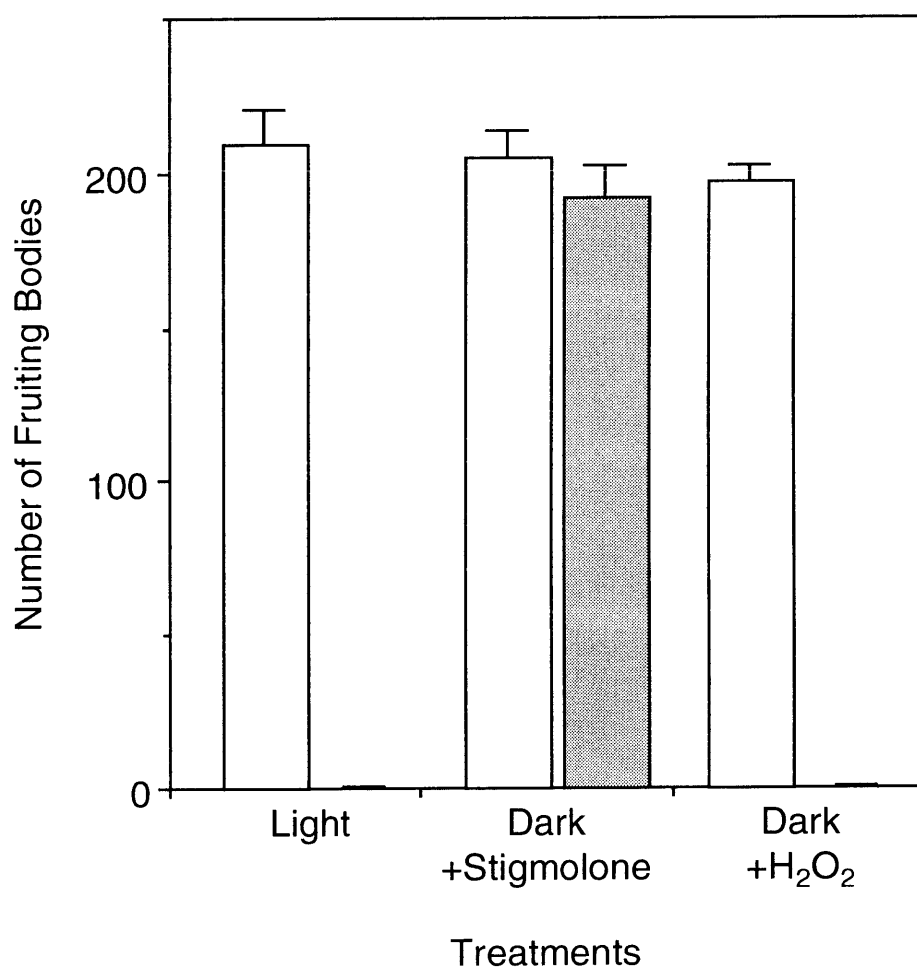


Fig. 3-2-4a *csgA*欠損株の子実体形成

*S. aurantiaca*野生株 (□) と *csgA*欠損株 (■) を、 $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の密度でCPS培地に接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、もしくは暗黒下で、 30°C 、24 hrの培養を行った。Stigmoloneは $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 H_2O_2 は 10^{-4} M 添加した。バーは標準偏差を示す (n=3)。

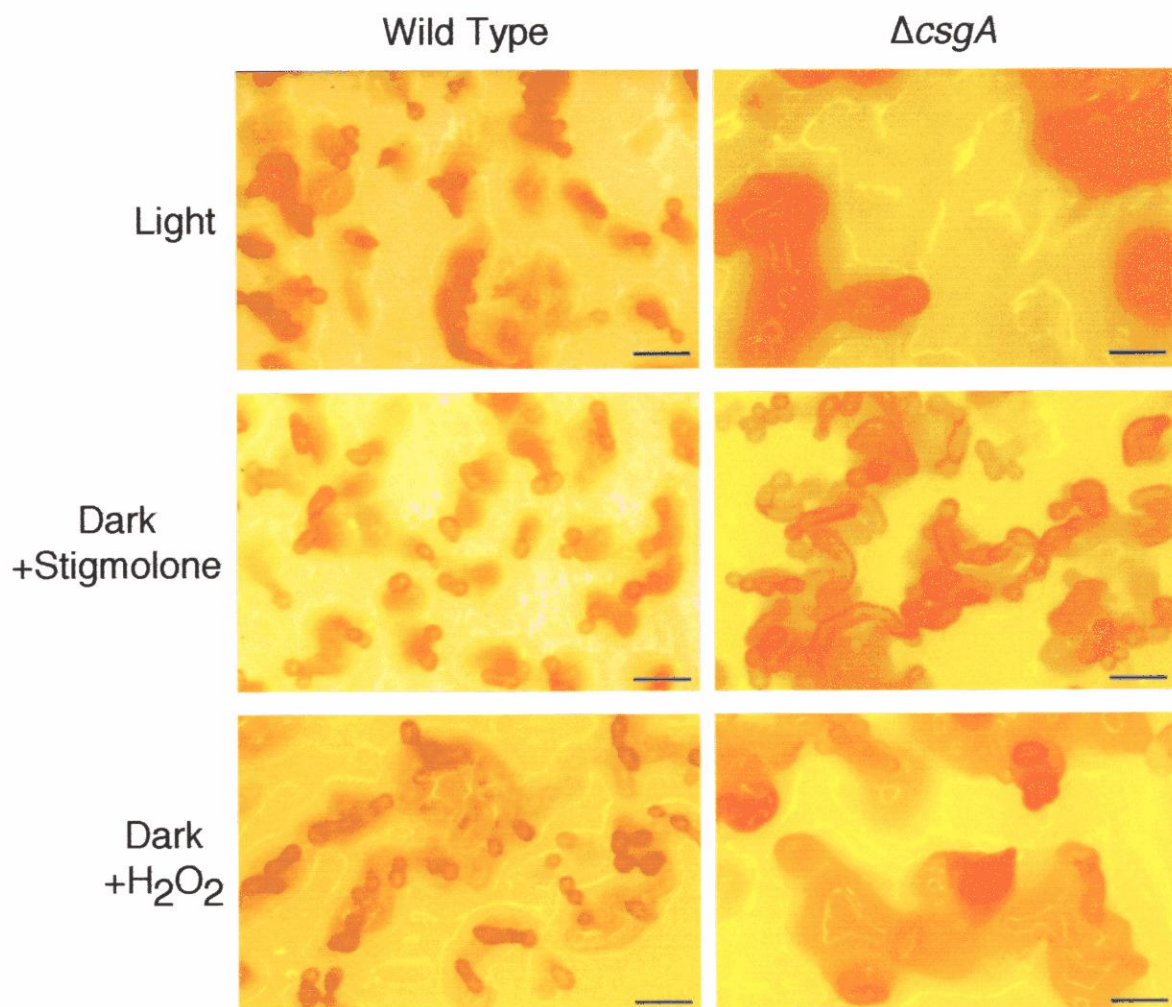


Fig. 3-2-4b *csgA*欠損株の子実体形成

*S. aurantiaca*の野生株、及び*csgA*欠損株を $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の密度で2 mlの固体CPS培地に接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、もしくは暗黒下で、 30°C 、24 hrの培養を行った。Stigmoloneは $2 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 H_2O_2 は 10^{-4} M 添加した。バーは $200 \mu\text{m}$ を示す。

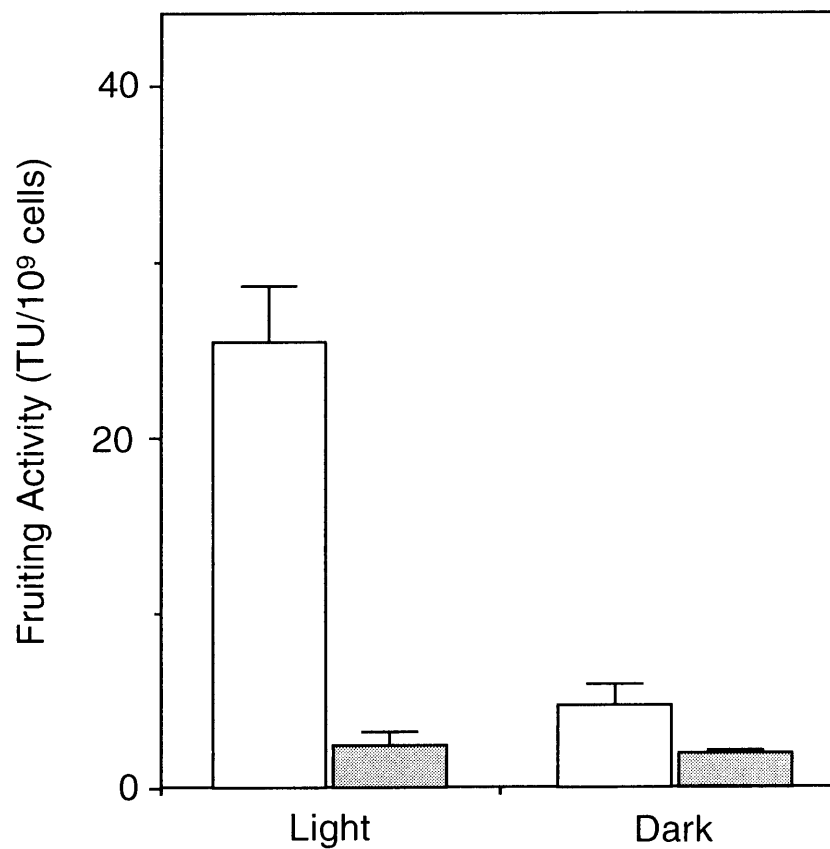


Fig. 3-2-5 *csgA*欠損株における子実体形成誘導活性

*S. aurantiaca*野生株 (□) と *csgA*欠損株 (■) を、濾紙上に $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の密度で25スポット接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、もしくは暗黒下で、 30°C 、24 hrの培養を行い、回収された子実体形成活性を示した。バーは3回の独立した実験より得られた標準偏差を示す。

csgA恒常発現株の作製

*S. aurantiaca*に過剰量のcsgAを発現させることにより、csgA遺伝子の子実体形成、及びstigmoloneの生産・分泌への影響を検討した。リボソーム結合配列(RBS)を含むcsgAの(-22) - 484 bpの領域をpCR 2.1ベクターのlacプロモーターの支配下においたpYM111ベクターを、ベクター上のゲノム相同配列とゲノム上の配列の間の一回交叉によって*S. aurantiaca*のゲノムDNA中に挿入した(Fig. 3-2-6)。得られたカナマイシン耐性株について、一回交叉によりベクターが挿入された場合のみ増幅されるプライマーを用いてPCRを行なったところ、形質転換体のみでDNAの増幅が見られた(Fig. 3-2-7)。よって、形質転換体のゲノムDNA中には、ベクターが挿入されていることが示された。

形質転換体におけるcsgA遺伝子の発現が恒常的に行われているかどうかを確認するため、csgA遺伝子をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行った(Fig. 3-2-7)。*M. xanthus*においては、csgAは栄養飢餓により発現することが知られているが(Kim and Kaiser, 1990a)、*S. aurantiaca*の野生株においても、csgA遺伝子は栄養飢餓によって発現が誘導された。形質転換体では栄養増殖下、及び栄養飢餓条件下でcsgA遺伝子の発現が認められた。よって、得られた形質転換体は、csgA遺伝子恒常発現株であると結論づけた。

csgA恒常発現株の解析

csgA恒常発現株の子実体形成、及びstigmoloneの生産・分泌への影響を検討した。野生株は光照射下のみで子実体形成を行い、暗黒下での子実体形成は認められないが、csgAを恒常発現させた株では、光照射下に加え、暗黒下においても子実体形成が誘導された(Fig. 3-2-8 a, b)。よって、csgAの恒常的な発現が、光照射のかわりとなることが示された。

csgA遺伝子の恒常的な発現により、本来光照射においてのみ誘導される子実体形成が認められたため、csgA恒常発現株において光照射の下流であることが示唆されている活性酸素種(第2章第2節)とcsgA遺伝子の関係を解明した。栄養飢餓条件下でヒドロキシラジカルの消去剤*n*-propyl gallateを添加し、光照射下で培養を行ったところ、野生株では子実体形成が阻害されるのに対し、csgA恒常発現株では*n*-propyl gallateの添加に関わらず子実体形成が誘導された(Fig. 3-2-8 a, b)。よって、csgAの恒常的な発現が、活性酸素種のかわりとなることが示唆された。

野生株では、栄養飢餓と光照射によってstigmoloneの生産・分泌が誘導、促進され、それによって子実体が形成されることが示唆されているため(第2章第1節)、csgA遺伝子の恒常的な発現がstigmolone生産・分泌に与える影響を検討した。csgA恒常発現株では、暗黒下においても、野生株の光照射下とほぼ同じ量のstigmoloneが回収された(Fig. 3-2-9)。よって、csgA遺伝子の恒常的な発現により、暗黒下においてもstigmoloneの生産・分泌が促進されることが示された。このことより、csgA恒常発現株が、暗黒下、あるいは*n*-propyl gallateの存在下においても子実体を形成するのは、stigmoloneの生産・分泌が光非依存的に促進されているためであることが示唆された。

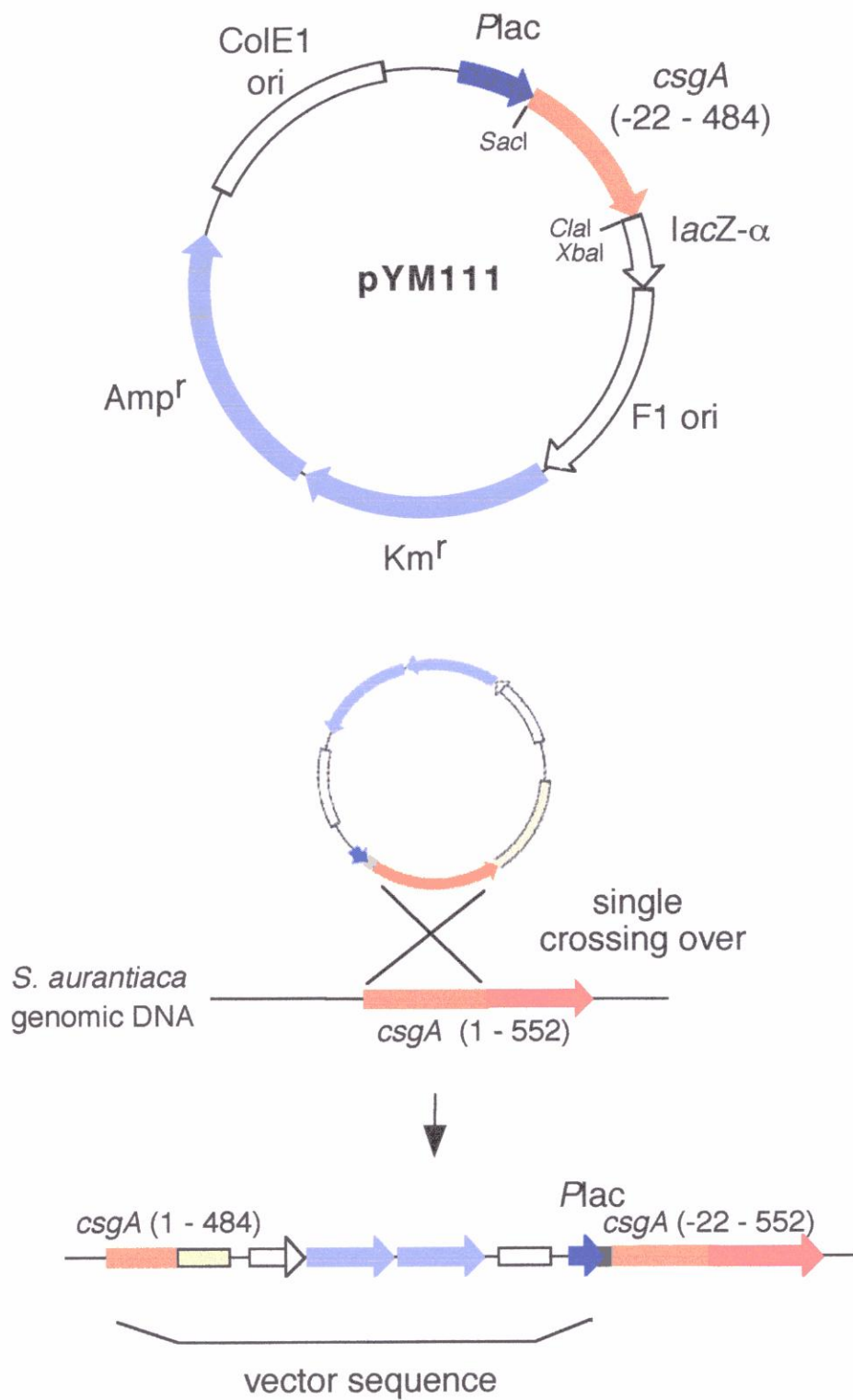


Fig. 3-2-6 *csgA*恒常発現株の作製

pCR 2.1の*lac*プロモーターの下流に*csgA*のリボソーム結合部位 (RBS) を含む部分配列を導入した。カッコ内の数字は、*csgA*の開始コドンからの塩基数を示す。

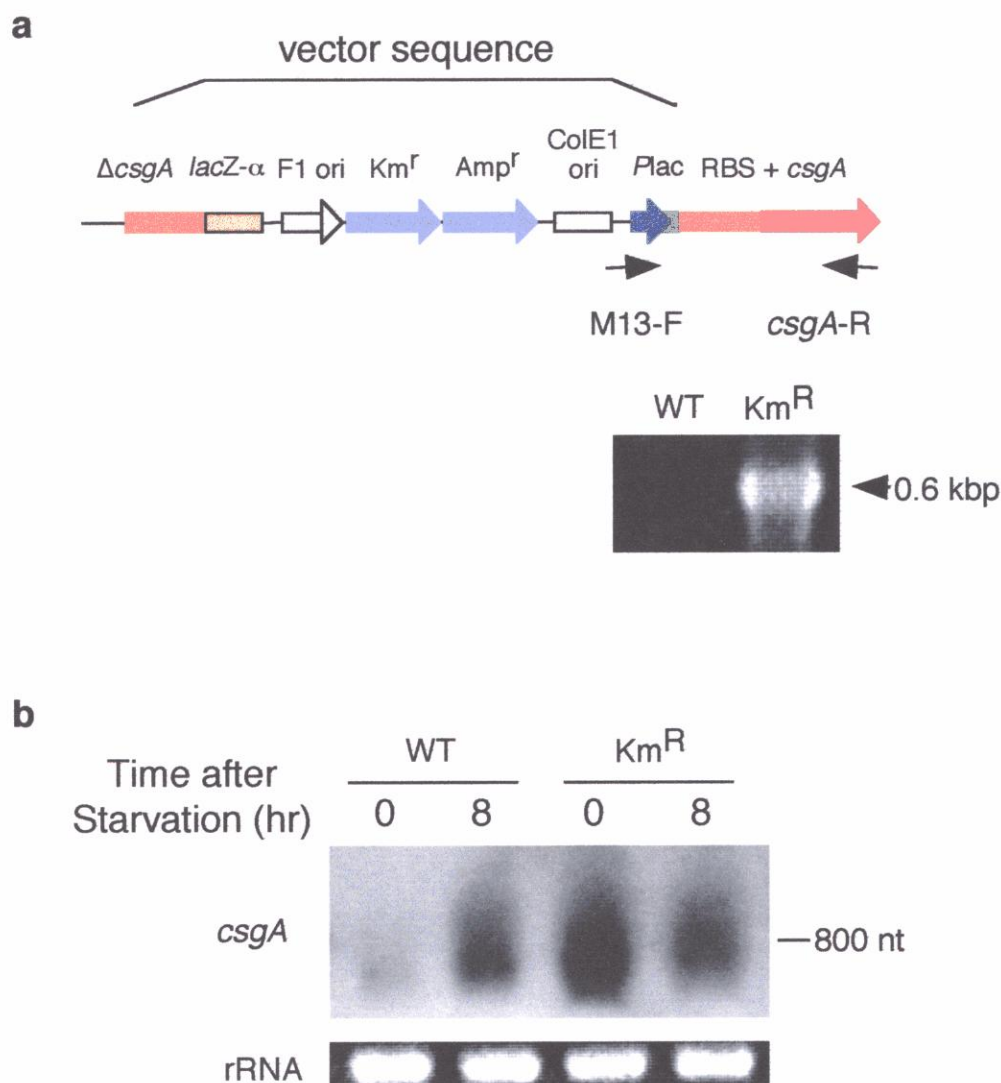


Fig. 3-2-7 *csgA*恒常発現株の解析

pYM111を*S. aurantiaca*に導入することによって得られたカナマイシン耐性株について、ゲノムDNAをテンプレートとしたPCR (a) を行い、挿入配列の確認を行った。形質転換体の*csgA*恒常発現株の確認のため、栄養増殖下、及び栄養飢餓後8 hrの細胞よりRNAを抽出し、*csgA*遺伝子の転写産物をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーション (b) を行なった。

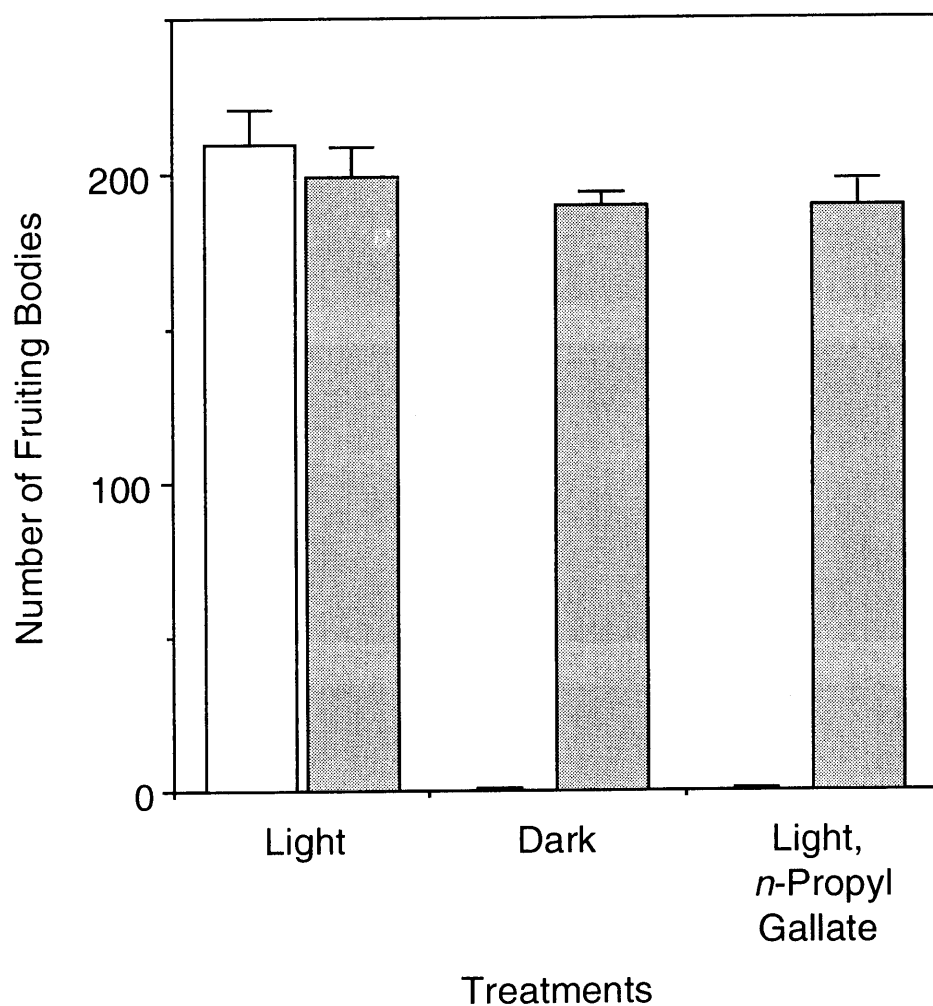


Fig. 3-2-8a *csgA*恒常発現株の子実体形成

*S. aurantiaca*野生株 (□) と *csgA*恒常発現株 (■) を、 $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の密度でCPS培地に接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、もしくは暗黒下で、 30°C 、24 hrの培養を行った。*n*-propyl gallateは、 2×10^{-5} M添加した。バーは標準偏差を示す ($n=3$)。

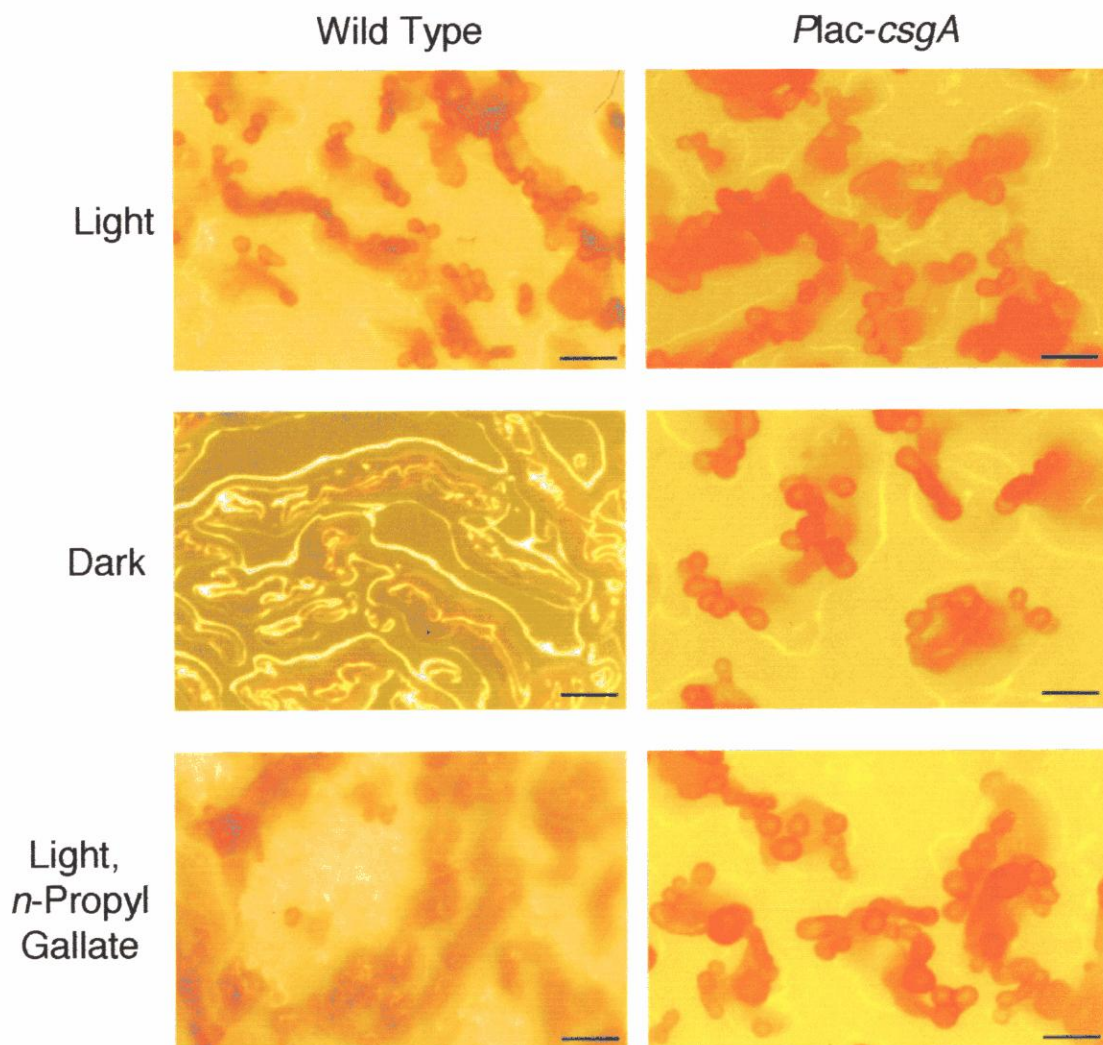


Fig. 3-2-8b *csgA*恒常発現株の子実体形成

*S. aurantiaca*の野生株、及び*csgA*恒常発現株を $2 \times 10^8 / 5 \mu\text{l}$ の密度で2 mlの固体CPS培地に接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、もしくは暗黒下で、 30°C 、24 hrの培養を行った。*n*-propyl gallateは、 $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ 添加した。バーは $200 \mu\text{m}$ を示す。

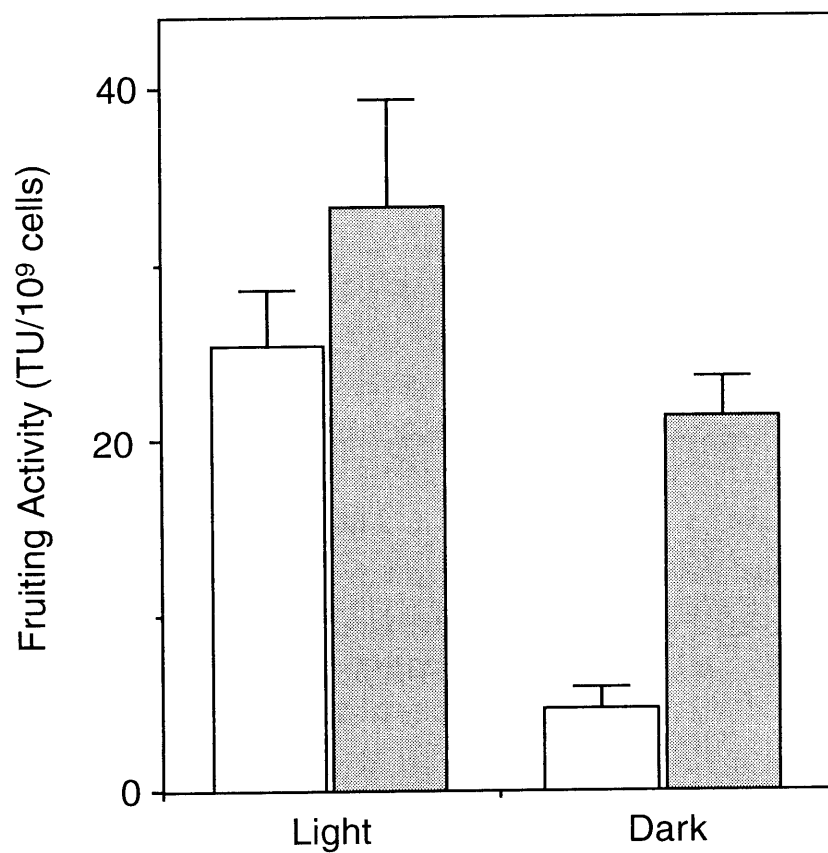


Fig. 3-2-9 *csgA*恒常発現株における子実体形成誘導活性

*S. aurantiaca*野生株 (□) と *csgA*恒常発現株 (■) を、濾紙上に $2 \times 10^8/5 \mu\text{l}$ の密度で25スポット接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、もしくは暗黒下で、 30°C 、24 hrの培養を行い、回収された子実体形成活性を示した。バーは3回の独立した実験より得られた標準偏差を示す。

また、*csgA*恒常発現株の光照射下では、回収されたstigmoloneの量は、暗黒下の培養よりも増加していた。このことより、*csgA*恒常発現株においても、光によるstigmoloneの生産・分泌の促進機構は保持されていることが示唆された。

*csgA*の発現パターンの解析

*csgA*はstigmoloneの生産・分泌の促進を行うことが示唆されたが、stigmoloneは栄養飢餓と光によってその生産・分泌が誘導、促進されることから（第2章第1節）、栄養飢餓、及び光と、*csgA*遺伝子の発現との関係を解析した。ノーザンハイブリダイゼーション法により*csgA*発現パターンの解析を行ったところ（Fig. 3-2-10）、野生株において、栄養増殖下ではバックグランドレベルの*csgA*遺伝子の転写産物しか検出されなかったが、*csgA*の転写産物は、栄養飢餓後2 hrに増加し、4 - 8 hrに高いレベルで検出され、栄養飢餓後12 hrに減少し、栄養飢餓後16 hrには消失した。よって、栄養飢餓によって*csgA*の発現が誘導されることが示された。子実体形成、及びstigmoloneの生産・分泌を誘導する光照射の時間帯は栄養飢餓後12 - 20 hrであるが（第2章第1節）、この時間帯においては、光照射下と暗黒下における*csgA*遺伝子の発現量に大きな差は見られなかった。よって、*csgA*の発現と子実体形成を誘導する光照射との間に相関は見出されなかった。

stigmoloneの生産・分泌は栄養飢餓により誘導されることから、栄養飢餓による*csgA*遺伝子の発現誘導機構の解析のため、*relA*欠損株における*csgA*遺伝子の発現を解析した。*relA*欠損株では、*csgA*遺伝子は栄養飢餓後2 hrに認められたが、栄養飢餓後4 hr以降は野生株と比較すると*csgA*の発現は抑制されていた。よって、*csgA*遺伝子の発現と*relA*の間の関係は明らかにはならなかった。

3-2-4 考察

*M. xanthus*の子実体形成に重要な役割を果たしている*csgA*について、*S. aurantiaca*における子実体形成やstigmoloneとの関係を明らかにした。*csgA*の欠損によって、光照射下においても子実体形成は誘導されなかった（Fig. 3-2-4）。よって、*csgA*は光照射を介した子実体形成に必須であることが示された。*csgA*の恒常的な発現により、ヒドロキシラジカルの消去による子実体形成の阻害が回復した（Fig. 3-2-8）。また、*csgA*の欠損によって、 H_2O_2 による暗所での子実体形成が誘導されなかった（Fig. 3-2-4）。これら活性酸素種は、光受容からstigmoloneの生産・分泌の間の情報伝達系に関与していることが示唆されている（第2章第2節）。よって、*csgA*によるstigmoloneの生産・分泌は情報伝達系路において、光照射、及び活性酸素種よりも下流であることが示唆された。

*csgA*欠損株にstigmoloneを添加したところ子実体形成の回復がみられたため（Fig. 3-2-4）、*csgA*遺伝子は、stigmoloneの感受性には影響しないことが明らかとなった。

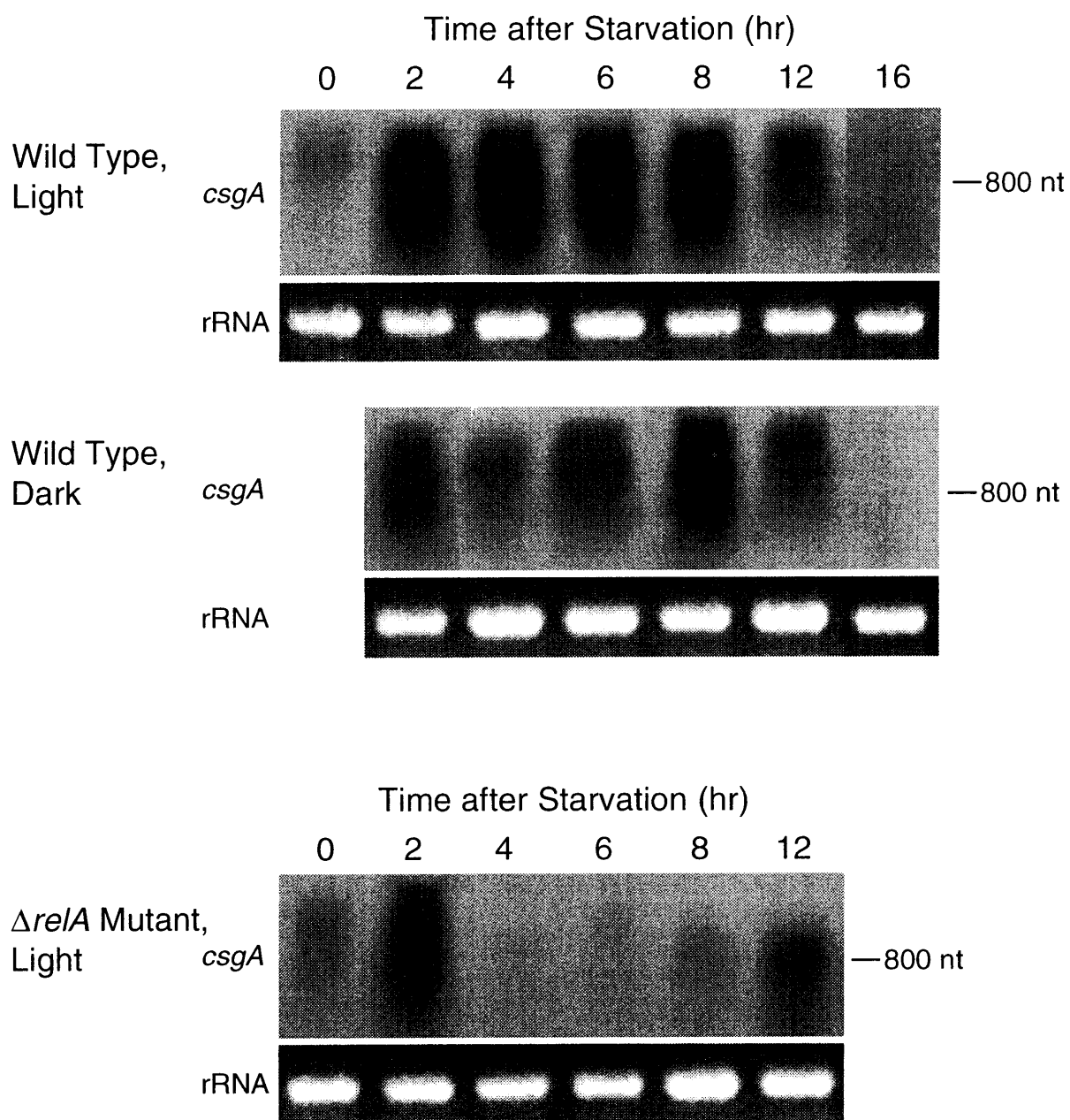


Fig. 3-2-10 *csgA*遺伝子の発現パターン

*S. aurantiaca*野生株、及び*relA*欠損株を 2×10^8 /5 μ lの密度でCPS培地に接種し、 $3.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の強度の白熱光照射下、もしくは暗黒下で、 30°C の培養を行った。栄養飢餓後0 -16 hrよりRNAを抽出し、*csgA*の発現パターンを解析した。

*csgA*を恒常的に発現させることにより、光非依存的にstigmoloneの生産・分泌が認められた (Fig. 3-2-9)。また、*csgA*の欠損により、stigmoloneが生産・分泌される量が、野生株の約1/10に減少した (Fig. 3-2-5)。これらのことより、*csgA*は、stigmoloneの生産・分泌に関与することが示唆された。

*M. xanthus*においてCsgAが酵素活性を持ち、*S. aurantiaca*において*csgA*がstigmoloneの生産・分泌に関与することが示唆されたことから、*csgA*がstigmoloneの合成に関与することが期待された。しかし、*csgA*の欠損によっても、わずかながらstigmoloneが生産・分泌されていたことから (Fig. 3-2-9)、*csgA*がstigmoloneの生合成に直接関与するかどうかはわからなかった。*csgA*欠損株によるstigmoloneの生産が非特異的な反応によって生成する可能性を考えると、*csgA*は、stigmoloneの合成に関与する可能性が考えられる。また、*csgA*欠損株によるstigmoloneの生成が特異的な反応によるものであるとすると、stigmoloneの生産・分泌は、栄養飢餓によって誘導され、光照射によって更に促進されることから (第2章第1節)、*csgA*は、stigmoloneの生産・分泌の更なる促進に関与する可能性が考えられる。*csgA*の機能を解析するには、stigmoloneの生合成経路の解明や、CsgAタンパク質の機能の解析が必要である。

*csgA*の欠損により、光によるstigmoloneの生産・分泌の促進が行われず (Fig. 3-2-5)、また、*csgA*の恒常的な発現によって、光、及び活性酸素種が存在しなくともstigmoloneの生産・分泌は促進された (Fig. 3-2-9)。これらのことより、*csgA*の発現が光により制御されていることが予想された。しかし、*csgA*の発現と子実体形成を誘導する光照射との間には相関は見られなかったため、光によるstigmoloneの生産・分泌の促進は、*csgA*の発現誘導とは別の機構により行われていると考えられた。

第3章より得られた結果より、Fig. 3-2-11に、stigmolone、及び第3章で解析を行った2つの遺伝子に関する子実体形成経路を示した。Stigmoloneの生産・分泌の誘導と感受性の獲得は、*relA*を介して行われる。*csgA*の発現は栄養飢餓によって誘導され、stigmoloneの生産・分泌の促進に関与する。光照射と*csgA*の発現、及び*relA*と*csgA*の関係は明らかではない。

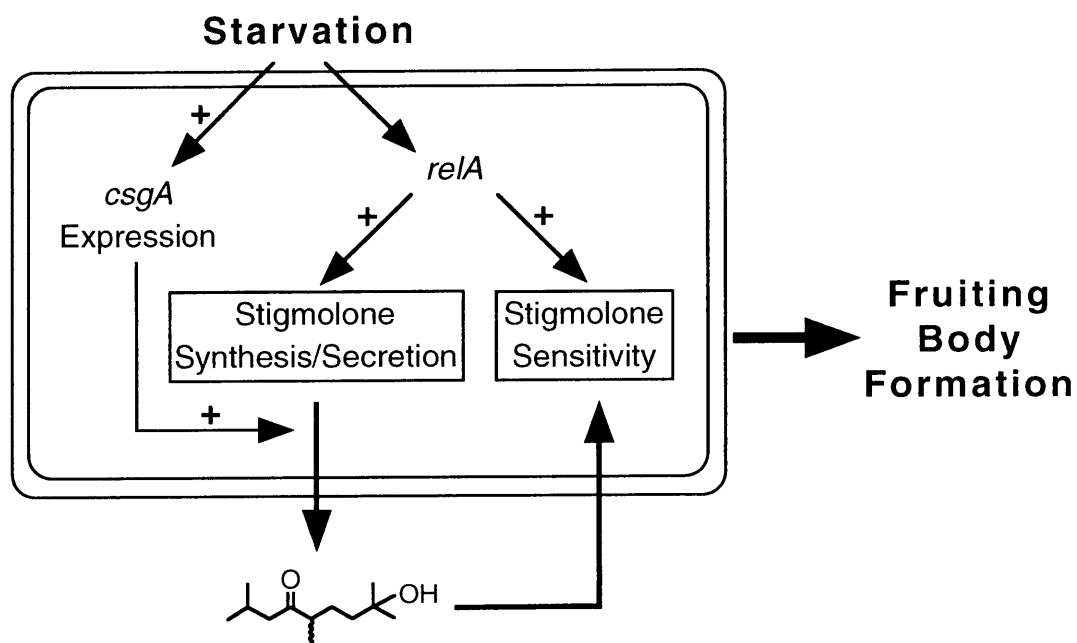


Fig. 3-2-11 *S. aurantiaca*の子実体形成経路

第3章において明らかとなった*S. aurantiaca*の子実体形成経路を示した。Stigmoloneの生産・分泌の誘導と感受性の獲得は、*relA*を介して行われる。*csgA*の発現は栄養飢餓によって誘導され、stigmoloneの生産・分泌の促進に関与する。*relA*と*csgA*の関係は明らかではない。

総括

本研究は、まず *S. aurantiaca* の子実体形成誘導因子の実体を明らかにすること、さらにその分子と、環境要因あるいは *M. xanthus* で見出されている子実体形成遺伝子群との関係を解析することより、粘液細菌の形態形成経路を明らかにすることを目的とした。

第1章では、子実体形成誘導因子の構造決定を行ない、培養液中に生産・分泌された *S. aurantiaca* の子実体形成誘導因子を 5-(*R,S*)-8-hydroxy-2,5,8-trimethyl-4-nonaone と決定した。

第2章では、stigmolone と栄養飢餓や光との関係、及び stigmolone の機能を解析した。Stigmolone は、栄養飢餓によって生産・分泌が誘導され、光照射下においてさらに促進されることを明らかにした。さらに、集合、子実体形成に光照射が必要なのは、stigmolone の生産・分泌を促進するためであることを示唆した。また、活性酸素種とグアニン化合物は、stigmolone の生産・分泌を誘導することが示された。このことより、活性酸素種やグアニン化合物が光シグナル伝達系路の下流に位置することが示唆された。しかし、光照射とグアニン化合物の関係は明らかではない。

Stigmolone への感受性は、栄養飢餓条件下において獲得されることを明らかにした。これらのことより、*S. aurantiaca* は、栄養飢餓と光という環境情報を stigmolone という物質に変換し、それを受容することにより形態形成を制御している可能性が強く示唆された。

Stigmolone は、集合を促進することにより子実体形成を誘導するが、さらに、stigmolone が集合の保持に必要であることを示した。また、stigmolone が細胞密度を感じ取るタイプのシグナルであることを示唆した。子実体の内部は孢子に分化するが、子実体形成が認められなくても孢子形成が行われることから、集合・子実体形成、及び孢子形成の経路は分岐していることが示唆された。

第3章では、*M. xanthus* で見出されている子実体形成に関与する遺伝子と、*S. aurantiaca* の子実体形成、及び stigmolone との関係の解析を行った。Stigmolone の生産・分泌の誘導、及び stigmolone への感受性の獲得は栄養飢餓によって誘導されるが、これら2つの現象は、原核生物において広く認められている飢餓シグナル(p)ppGpp 合成酵素である *relA* に依存的であることを示した。また、子実体形成と同様に栄養飢餓条件下において誘導される孢子形成が *relA* 依存的であることを明らかにした。

M. xanthus の子実体形成に重要な役割を果たしていることが知られている *csgA* について、解析を行った。*csgA* は、光による stigmolone の生産・分泌の促進に必須であることが示された。Stigmolone は栄養飢餓により生産・分泌が誘導され、光によってさらに促進されるが、*csgA* 遺伝子の発現はそのうちの栄養飢餓により誘導されることが判明した。また、子実体形成、及び stigmolone の生産・分泌の促進に光照射が必要な時間帯における *csgA* の発現量と光照射との相関は見出されなかった。よって、光照射と *csgA* の発現誘導との関係については明らかではない。

以上の結果より推定された*S. aurantiaca*の子実体形成情報伝達経路をFig. 9に示す。

*S. aurantiaca*は栄養飢餓状態になると、RelAにより合成されるppGppによって、stigmolone生産・分泌能と感受能を獲得し、*csgA*遺伝子の発現が誘導される。Stigmoloneの生産・分泌は*csgA*遺伝子の発現、光照射、及びGMPによって更に促進される。光のシグナルは活性酸素種を介して伝達される。高密度の細胞により生産・分泌されるstigmoloneの濃度が閾値に達すると、集合の促進と保持により子実体の形成が誘導される。

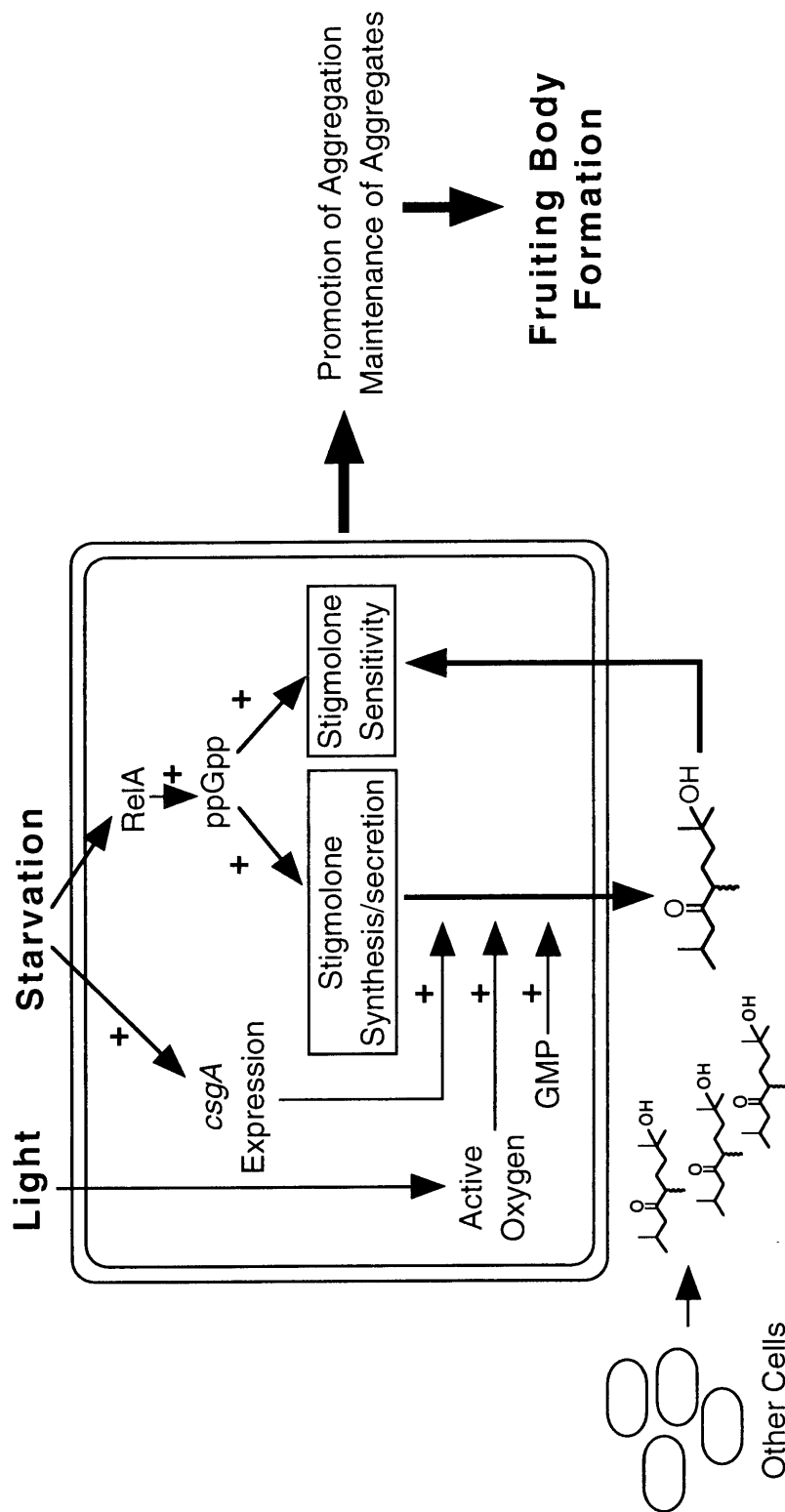


Fig. 9 *S. aurantiaca*の子実体伝達経路モデル

本研究より推定された*S. aurantiaca*の子実体形成経路。*S. aurantiaca*は栄養飢餓状態になると、RelAにより合成されるppGppによって、stigmolone生産・分泌能と感受能を獲得し、csgA遺伝子の発現が誘導される。Stigmoloneの生産・分泌はcsgA遺伝子の発現、光照射、及びGMPによって更に促進される。光のシグナルは活性酸素種を介して伝達される。高密度の細胞により生産・分泌されるstigmoloneの濃度が閾値に達すると、集合の促進と保持により子実体の形成が誘導される。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始適切なご指導、ご教唆を賜った奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科教授 磯貝彰先生、同助教授 高山誠司先生、同助手 蔡晃植先生、同助手 柴博史先生、同教務職員 岩野恵先生、学術振興会研究員 中島芳浩博士、同研究員 円谷徹之博士に感謝の意を表します。

粘液細菌について貴重な情報をいただき、また、isoeugenitine、*Myxococcus xanthus*を御恵譲頂いた、味の素中央研究所山中茂博士、不藤亮介博士に感謝の意を表します。

東京理科大学理学部教授 森謙治先生には、stigmoloneの合成標品を御供与賜り、また、子実体形成誘導因子の絶対配置についてご助言頂きました。ここに感謝の意を表します。

ノーザンハイブリダイゼーション法を御指導頂いた、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科博士後期課程 川野光興氏に感謝の意を表します。

実験補助をしていただいた、奈良先端科学技術大学院大学 大学職員 塚本潤子氏、同職員 中西登貴子氏、同職員 佐藤寛子氏に感謝の意を表します。

最後に、奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科細胞間情報学講座に在籍している方々、並びに過去に在籍していた方々に、いろいろとお世話になりました。深く感謝いたします。

参考文献

- Arnold, J. W. and L. J. Shimkets. 1988. Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **170**:5771-5777.
- Aubry, L. and R. Firtel. 1999. Integration of signaling networks that regulate *Dictyostelium* differentiation. *An. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**: 496-517.
- Bassler, B. L., M. Wright, and M. R. Siverman. 1994. Multiple signaling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*. *Mol. Microbiol.* **9**:773-786.
- Benaissa, M., J. Vieyres-Lubochinsky, R. Odeide, and B. Lubochinsky. 1994. Stimulation of inositide degradation in clumping *Stigmatella aurantiaca*. *J. Bacteriol.* **176**:1390-1393.
- Beyer, S., B. Kunze, B. Shilakowski, and R. Muller. 1999. Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochim. Biophys. Acta.* **145**:185-195.
- Blackhart, B. D. and D. R. Zusman. 1985. 'Frizzy' genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **82**:8767-8770.
- Blair, D. F. 1995. How bacteria sense and swim. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:489-522.
- Burchard, R. P. and M. Dworkin. 1966. Light-induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **91**:535-545.
- Cashel, M., D. R. Gentry, V. J. Harnandez, and D. Vinella. 1996. The stringent response. in F. C. Neidhardt, R. Curtiss III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (Eds.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp.1458-1496. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Champness, W. 2000. Actinomycete development, antibiotic production, and phylogeny: questions and challenges. in Y. V. Brun and L. J. Shimkets (Eds.), *Prokaryotic Development*, pp.221-242. American Society of Microbiology, Washington, DC

- Chang, B.-Y. and M. Dworkin. 1994. Isolated fibrils rescue cohesion and development in the dsp mutant of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **176**:7190-7196.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*. **284**:1318-1322.
- Coudart, M. P. 1998. Independent patterns of expression of two alternative sigma factors, SigB and SigC, of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* during development. *Mol. Biol. Rep.* **25**:183-188.
- Dailey, H. A. and T. A. Dailey. 1996. Protoporphyrinogen oxidase of *Myxococcus xanthus*. *J. Biol. Chem.* **271**:8714-8718.
- Davis, J. M., J. Mayor, and L. Plamann. 1995. A missense mutation in *rpoD* results in an A-signaling defect in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **18**:943-952.
- Djerassi, C. and L. E. Geller. 1959. Optical rotatory dispersion studies XXIV. Effect of distance of a single asymmetric center from an aliphatic carbonyl function. *J. Am. Chem. Soc.* **81**:2789-2794.
- Downard, J., S. V. Ramaswamy, and K.-S. Kil. 1993. Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus* development. *J. Bacteriol.* **175**:7762-7770.
- Downard, J. and D. Toal. 1995. Branched-chain fatty acids-the case for a novel form of cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **16**:171-175.
- Dunny, G. M. and S. C. Winans. 1999. Bacterial life: Neither lonely nor boring. in G. M. Dunny and S. C. Winans (Eds.), *Cell-cell signaling in bacteria*, pp.1-5. ASM Press, Washington, D. C.
- Dworkin, M. 1962. Nutrition requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **84**:250-257.
- Dworkin, M. 2000. Introduction to the myxobacteria. in Y. V. Brun and L. J. Shimkets (Eds.), *Prokaryotic Development*, pp.221-242. American Society of Microbiology, Washington, DC
- Eastman, D. and M. Dworkin. 1991. Endogenous ADP-ribosylation during development of the prokaryote *Myxococcus xanthus*. *Microbiology*. **140**:3167-3176.

Ellehaug, E., M. Norregaard-Madsen, and L. Sogaard-Andersen. 1998. The FruA signal transduction protein provides a checkpoint for the temporal co-ordination of intercellular signals in *Myxococcus xanthus* development. *Mol. Microbiol.* **4**:807-817.

Fudo, R., T. Ando, S. Sato, T. Kameyama, and S. Yamanaka. 1997. Isolation of isoeugenitin as a fruiting body inducer for *Stigmatella aurantiaca* from a soil fungus *Papulaspora* sp. *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**:183-184.

Fuqua, C., M. Burbea, and S. C. Winans. 1995. Activity of the *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer regulator TraR is inhibited by the product of the *traM* gene. *J. Bacteriol.* **177**:1367-1373.

Gerth, K., R. Metzger, and H. Reichenbach. 1993. Induction of myxospores in *Stigmatella aurantiaca* (myxobacteria): inducers and inhibitors of myxospore formation, and mutants with a changed sporulation behavior. *J. Gen. Microbiol.* **139**:865-871.

Glaessner, M. F. 1976. Early phanerozoic worms and their geological and biological significance. *J. Geol. Soc. Lond.* **132**:259-275.

Hagen, D. C., A. P. Bretscher, and D. Kaiser. 1978. Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Develop. Biol.* **64**:284-296.

Hagen, T. J. and L. J. Shimkets. 1990. Nucleotide sequence and transcriptional products of the *csg* locus of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **172**:15-23.

Harris, B. Z., D. Kaiser, and M. Singer. 1998. The guanosine nucleotide (p)ppGpp initiates development and A-factor production in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **12**:1022-1035.

Hartzell, P. L. and P. Youderian. 1995. Genetics of gliding motility and development in *Myxococcus xanthus*. *Arch. Microbiol.* **164**:309-323.

Hartzell, P. L. 1997. Complementation of sporulation and motility defects in a prokaryote by a eukaryotic GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:9881-9886.

Heidelberg, M., H. Skladny, and H. U. Schairer. 1993. Purification and characterization of SP21, a development-specific protein of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J. Bacteriol.* **175**:905-908.

Hildebrandt, K., D. Eastman, and M. Dworkin. 1997. ADP-ribosylation and the extracellular fibrils of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **23**:231-235.

Hodgkin, J. and D. Kaiser. 1979. Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (Myxobacterales): two gene systems control movement. *Mol. Gen. Genet.* **171**:177-191.

Hodgson, D. A. and F. J. Murillo. 1993. Genetics of regulation and pathways of synthesis of carotenoids. in M. Dworkin and D. Kaiser (Eds.), *Myxobacteria II*, pp.157-181. American Society for Microbiology, Washington, DC

Horinouchi, S. and T. Beppu. 1992. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:377-398.

Hull, W. E., A. Berkessel, I. Stamm, and W. Plaga. 1997. Intercellular signaling in *Stigmatella aurantiaca*: Proof, purification and structure of a myxobacterial pheromone. 24th Meeting on the Biology of Myxobacteria, New Braunfels, TX, p25.

Inouye, S., R. Jain, T. Ueki, H. Nariya, C.Y. Xu, M. Y. Hsu, B. A. Fernandez-Luque, J. Munoz-Dorado, E. Farez-Vidal, and M. Inouye. 2000. A large family of eukaryotic-like protein Ser/Thr kinases of *Myxococcus xanthus*, a developmental bacterium. *Microb. Comp. Genomics.* **5**:103-120.

Jelsback, L. and L. SØgaard-Andersen. 1999. The cell surface-associated intercellular C-signal induces behavioral changes in individual *Myxococcus xanthus* cells during fruiting body morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:5031-5036.

Jennings, J. 1961. Association of a steroid and a pigment with a diffusible factor in *Myxococcus virescens*. *Nature.* **190**:190.

Julien, B. and D. Kaiser. 1998. Spatial and temporal regulation of *devTRS*. 25th International Meeting on the Biology of Myxobacteria, Delphi, Greek, p21.

Kaiser, D. 1986. Control of multicellular development: *Dyctyostelium* and *Myxococcus*. *Ann. Rev. Genet.* **20**:539-566.

Kaiser, D. 2000. Cell-interactive sensing of the environment. in Y. V. Brun and L. J. Shimkets (Eds.), *Prokaryotic Development*, pp.263-275. American Society of Microbiology, Washington, DC

- Kim, S. K. and D. Kaiser. 1990a. C-factor: a cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis. *Cell*. **61**:19-26.
- Kim, S. K. and D. Kaiser. 1990b. Purification and properties of *Myxococcus xanthus* C-factor, an intercellular signaling protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**:3635-3639.
- Kim, S. K. and D. Kaiser. 1991. C-factor has distinct aggregation and sporulation thresholds during *Myxococcus* development. *J. Bacteriol.* **73**:1722-1728.
- Kuner, J. and D. Kaiser. 1982. Fruiting body morphogenesis in submerged cultures of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **151**:458-461.
- Kuspa, A., K. L. Kroos, and D. Kaiser. 1986. Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Develop. Biol.* **117**:267-276.
- Kuspa, A. and D. Kaiser. 1989. Genes required for development signaling in *Myxococcus xanthus*: three *asg* loci. *J. Bacteriol.* **171**:2762-2772.
- Kuspa, A. and L. Plamann, and D. Kaiser. 1992a. A-signaling and the cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **174**:7360-7369.
- Kuspa, A. and L. Plamann, and D. Kaiser. 1992b. Identification of heat-stable A-factor from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **174**:3319-3326.
- Lee, K. and L. J. Shimkets. 1994. Cloning and characterization of the *socA* locus which restores development to *Myxococcus xanthus* C-signaling mutants. *J. Bacteriol.* **176**:2200-2209.
- Lee, B.-U., K. Lee, J. Mendez, and L. J. Shimkets. 1995. A tactile sensory system of *Myxococcus xanthus* involves an extracellular NAD(P)⁺-containing protein. *Genes Dev.* **9**:2964-2973.
- Lev, M. 1954. Demonstration of a diffusible fruiting factor in myxobacteria. *Nature*. **173**:501.
- Li, S.-F., B.-U. Lee, and L. J. Shimkets. 1992. *csgA* expression entrains *Myxococcus xanthus* development. *Gene. Dev.* **6**:401-410.
- Li, Y. and L. Plamann. 1996. Purification and phosphorylation of *Myxococcus xanthus* AsgA protein. *J. Bacteriol.* **178**:289-292.

- Malik, Z., J. Hanania, and Y. Nitzan. 1990. New trends in photobiology. Bacterial effects of photoactivated porphyrins-an alternative approach to antimicrobial drugs. *J. Photochem. Photobiol.* **141**:279-304.
- Manoil, C. and D. Kaiser. 1980. Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and myxospore formation. *J. Bacteriol.* **141**:279-304.
- McBride, M. J. and D. R. Zusman. 1989. 'Frizzy' aggregation genes of the gliding bacterium *Myxococcus xanthus* show sequence similarities to the chemotaxis genes of enteric bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:424-428.
- McBride, M. J., T. Kohler, and D. R. Zusman. 1992. Methylation of FrzCD, a methyl-accepting taxis protein of *Myxococcus xanthus*, is correlated with factors affecting cell behavior. *J. Bacteriol.* **174**:4246-4257.
- McGowan, S. J., H. C. Gorham, and D. A. Hodgson. 1993. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: DNA sequence analysis of the *carR* region. *Mol. Microbiol.* **10**:713-735.
- Mori, K. 1997. Pheromones: synthesis and bioactivity. *Chem. Commun.* 1153-1158.
- Mori, K. and Takenaka. 1998. Pheromone Synthesis, CXCI. - Synthesis of the enantiomers of 8-hydroxy-2,5,8-trimethyl-4-nonanone, the myxobacterial pheromone of *Stigmatella aurantiaca* to induce the formation of its fruiting body. *Eur. J. Org. Chem.* 2181-2184.
- Muller, C. and M. Dworkin. 1991. Effects of glucosamine on lysis, glycerol formation, and sporulation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**:7164-7175.
- Narita, S., H. Inokuchi, and S. Taketani. 1999. Oxidation of protoporphyrinogen IX mediated by the *Escherichia coli* aerobic coproporphyrinogen oxidase. *Mol. Gen. Genet.* **261**:1012-1020.
- Nealson, K. H. 1999. Early observations defining quorum-dependent gene expression. in G. M. Dunny and S. C. Winans (Eds.), *Cell-cell signaling in bacteria*, pp.277-289. ASM Press, Washington, D. C.
- Neumann, B., A. Pospiech, and H. U. Schairer. 1993. A physical and genetic map of the *Stigmatella aurantiaca* DW4/3.1 chromosome. *Mol. Microbiol.* **10**:1087-1099.

Ogawa, M., S. Fujitani, X. Mao, and S. Inouye, and T. Komano. 1996. FruA, a putative transcription factor essential for the development of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **22**:757-767.

Persson, B., M. Krook, H. Jornvall. 1991. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* **200**:537-543.

Plaga, W., T. Stamm, and H. U. Shairer. 1998. Intercellular signaling in *Stigmatella aurantiaca*: Purification and characterization of stigmolone, a myxobacterial pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:11263-11267.

Plamann, L. and H. B. Kaplan. 1999. Cell-density sensing during early development in *Myxococcus xanthus*. in G. M. Dunny and S. C. Winans (Eds.), *Cell-cell signaling in bacteria*, pp.277-289. ASM Press, Washington, D. C.

Plamann, L., A. Kuspa, and D. Kaiser. 1992. Proteins that rescue A-signal-defective mutants of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **174**:3311-3318.

Plamann, L., J. M. Davis, B. Cantwell, and J. Mayor. 1994. Evidence that *asgB* gene encodes a DNA-binding protein essential for growth and development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **176**:2013-2020.

Plamann, L., Y. Li, B. Cantwell, and J. Mayor. 1995. The *Myxococcus xanthus asgA* gene encodes a novel signal transduction protein required for multicellular development. *J. Bacteriol.* **177**:2014-2020.

Qualls, G. T., K. Stephens, and D. White. 1978a. Light-stimulated morphogenesis in the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Science.* **201**:444-445.

Qualls, G. T., K. Stephens, and D. White. 1978b. Morphogenetic movements and multicellular development in the fruiting myxobacterium, *Stigmatella aurantiaca*. *Develop. Biol.* **66**:270-274.

Ramsey, W. S. and M. Dworkin. 1968. Microcyst germination in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **95**:2249-2257.

Reichenbach, H. and M. Dworkin. 1992. The myxobacteria. in A. Balows, H. G. Trueper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (Eds.), *The Prokaryotes*, 2nd ed, pp.3416-3487. Springer Verlag, New York

Sager, B. and D. Kaiser. 1994. Intercellular C-signaling and the traveling waves of *Myxococcus*. *Genes Develop.* **8**:2793-2804.

Schairer, H. U. 1993. *Stigmatella aurantiaca*, an organism for studying the genetic determination of morphogenesis. in M. Dworkin and D. Kaiser (Eds.), pp.333-346. *Myxobacteria II*, American Society for Microbiology, Washington, DC

Seilacher, A., P. K. Bose, and F. Pfluger. 1998. Triploblastic animals more than 1 billion years ago: trace fossil evidence from India. *Science*. **282**:80-83.

Shi, W., F. F. Ngok, and D. R. Zusman. 1996. Cell density regulates cellular reversal frequency in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**:4142-4146.

Shimkets, L. J. and M. Dworkin. 1981. Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Devel. Biol.* **84**:51-60.

Shimkets, L. J. and S. J. Asher. 1988. Use of recombination techniques to examine the structure of the *csg* locus of *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* **211**:63-71.

Shimkets, L. J. and H. Rafiee. 1990. CsgA, an extracellular protein essential for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol.* **172**:5299-5306.

Shimkets, L. J. and C. R. Woese. 1992. A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis for their classification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**:9459-9463.

Shimkets, L. J. and D. Kaiser. 1999. Cell contact-dependent C signaling in *Myxococcus xanthus*, in G. M. Dunny and S. C. Winans (Eds.), *Cell-cell signaling in bacteria*, pp.83-97. ASM Press, Washington, D. C.

Silakowski, B., A. Pospiech, B. Neumann, and H. U. Schairer. 1996. *Stigmatella aurantiaca* fruiting body formation is dependent on the *fbfA* gene encoding a polypeptide homologous to chitin synthases. *J. Bacteriol.* **178**:6706-6713.

Silakowski, B., H. Ehret, and H. U. Schairer. 1998. *fbfB*, a Gene encoding a putative galactose oxidase is involved in *Stigmatella aurantiaca* fruiting body formation. *J. Bacteriol.* **180**:1241-1247.

Singer, M. and D. Kaiser. 1995. Ectopic production of guanosine penta- and tetraphosphate can initiate early developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Genes Dev.* **9**:1633-1644.

Smith, D. R. and M. Dworkin. 1997. A mutation that affects fibril protein, development, cohesion and gene expression in *Myxococcus xanthus*. *Microbiology*. **143**:3683-3692.

Søgaard-Andersen, L., F. J. Slack, H. Kimsey, and D. Kaiser. 1996. Intercellular C-signaling in *Myxococcus xanthus* involves a branched signal transduction pathway. *Gene Develop.* **10**:740-745.

Søgaard-Andersen, L., P. Soholt, E. Ellehauge, and A. Boysen. 1997. *fruA*, an essential locus in the C-factor signaling pathway, may serve to coordinate early developmental signals and C-factor signaling during fruiting body morphogenesis in *M. xanthus*. 24th Meeting on the Biology of Myxobacteria, New Braunfels, TX, p27.

Søgaard-Anderson, L. and D. Kaiser. 1996. C-factor, a cell surface-associated intercellular signaling protein, stimulated the cytoplasmic Frz signal transduction system in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**:2675-2679.

Starich, T and J. Zissler. 1989. Movement of multiple DNA units between *Myxococcus xanthus* cells. *J. Bacteriol.* **171**:2323-2336.

Stephens, K. and D. White. 1980. Morphogenetic effects of light and guanine derivatives on the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J. Bacteriol.* **144**:322-326.

Stephens, K. and G. C. Hegeman, and D. White. 1982. Pheromone produced by the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *J. Bacteriol.* **149**:739-747.

Stevens, A. 1995. Trail following and aggregation of Myxobacteria. *J. Biol. Sys.* **3**:1059-1068.

Sudo, S. Z. and M. Dworkin. 1969. Resistance of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **98**:883-887.

Swift, S., G. S. A. B. Dewart, and P. Williams. 1996. The inner workings of a quorum sensing signal generator. *Trends Microbiol.* **4**:463-465.

Thony-Meyer, L. and D. Kaiser. 1993. *devRS*, an autoregulated and essential genetic locus for fruiting body development in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **175**:7450-7462.

Toal, D. R., S. W. Clifton, B. A. Roe, and J. Downard. 1995. The *esg* locus of *Myxococcus xanthus* encodes the E1a and E1b subunits of a branched-chain keto acids dehydrogenase. *Mol. Microbiol.* **16**:177-189.

Ward, M. J. and D. R. Zusman. 2000. Developmental aggregation and fruiting body formation in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. in Y. V. Brun and L. J. Shimkets (Eds.), *Prokaryotic Development*, pp.243-262. American Society of Microbiology, Washington, DC

White, D., and H. U. Shcairer. 2000. Development of *Stigmatella*. in Y. V. Brun and L. J. Shimkets (Eds.), *Prokaryotic Development*, pp.285-294. American Society of Microbiology, Washington, DC

Wireman, J. W. and M. Dworkin. 1975. Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria. *Science*. **189**:516-523.

Yang, Z., Y. Geng, D. Xu, H. B. Kaplan, and W. Shi. 1998. A new set of chemotaxis homologues is essential for *Myxococcus xanthus* social motility. *Mol. Microbiol.* **5**:1123-1130.

Zhang, C.-C. 1996. Bacterial signaling involving eukaryotic-type protein kinases. *Mol. Microbiol.* **20**:9-15.

Zumft, W. G., A. Viebrock-Sambale, and C. Braun. 1990. Nitrous oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Genes for copper-processing and properties of the deduced products, including a new member of the family of ATP/GTP-binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **192**:591-599.