

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・乾燥に強い孢子に分化する。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（フェロモン）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、このフェロモンの実体や、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、フェロモンの様なシグナル分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*のフェロモン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により、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。

第一章では、フェロモン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フェロモンの単離・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のフェロモンを得た。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）。今回得られたフェロモンの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、得られたフェロモンがstigmoloneであると結論づけた。次に、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*の子実体形成フェロモンは、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、光照射下においては、stigmoloneは細胞の集合が誘導される栄養飢餓12-14時間後より増加しはじめ、子実体形成の誘導される18時間後に最大となった。子実体形成の見られない暗黒下

では光照射下の1/8以下のstigmoloneしか回収されなかった。よって、stigmoloneは光照射下において生産・分泌が促進されることが示された。また、子実体形成に対して光照射は、stigmoloneの生産が誘導される栄養飢餓後14-20時間の間のみに必要であることが示された。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・分泌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。*S. aurantiaca*においても、光照射によりカロテノイド合成が促進されることが判明したため、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の生産が誘導された。よって、光照射の下流に位置する活性酸素が、stigmolone生産・分泌を促進することが示された。

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を行っていることが示された。よってstigmoloneは、走化性における誘因物質として働いている可能性が示唆された。*S. aurantiaca*の子実体の内部の細胞は孢子に分化するが、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1/8の数の孢子が認められた。栄養飢餓条件下においてstigmoloneを除去しながら培養した場合には孢子形成は誘導されなかったため、stigmoloneが低濃度で孢子形成を誘導することが示唆された。また、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、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依存的事であることが知られている。Stigmoloneの生産・分泌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・分泌、及び集合、子実体・孢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・孢子形成は回復しなかった。従って、stigmoloneの生産・分泌、及びstigmolone受容能の獲得は、relA依存的事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、及び孢子形成能が欠損していることが知られている。*S. aurantaca*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・分泌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の発現量は光照射により変化しないことが示され、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明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 森 川 雪 香

粘液細菌は原核生物でありながら、栄養飢餓に際して、多細胞性の子実体を形成し、内部に粘液胞子をつくって、悪環境下での自らの生存を図る。粘液細菌の一種 *Stigmatella aurantiaca* では、その子実体形成は、栄養飢餓状態に加えて光の照射が必要である。また、この子実体誘導現象には低分子の有機化合物（フェロモン）が関わっている。本論文はこのような *S. aurantiaca* の子実体形成に関して、本フェロモン分子の構造と、その生産・受容と、光・飢餓などの環境因子、及び、それらに関わる遺伝子群について述べたもので、序章と3章からなる。

序章において申請者は粘液細菌のライフサイクルと子実体形成に関するこれまでの知見を概説し、本研究での意図を述べた。

第1章では、子実体形成誘導因子（フェロモン）の精製に向けて、その定量的生物検定法および大量液体培養系を確立し、フェロモンを精製した。構造解析の結果、本フェロモンは、同じ頃 *S. aurantiaca* の凝集誘導物質として構造決定された stigmolone (8-hydroxy-2,5,8-trimethyl-4-nonanone) であると同定された。さらに stigmolone にの5位の絶対位置について検討し、R体、S体、ラセミ体はいずれも同じ生物活性を示し、天然物はラセミ体であることを明らかにした。

第2章では、stigmolone の生産と栄養飢餓、及び、光照射との関係を時間軸で追究し、さらに、stigmolone 生産と活性酸素の関わりを検討した。その結果、stigmolone は栄養飢餓後14-20時間の間の光照射によって合成されることを明らかとした。さらに、活性酸素消去剤で stigmolone 合成が阻害されること、過酸化水素の添加によって暗黒下でも stigmolone 合成がおきることから、光シグナルは活性酸素に変換され伝達されることを示した。また、暗黒化でも微量の stigmolone が合成されており、胞子形成も誘導されることから、子実体形成と胞子形成の経路が別であることを示した。

第3章では、子実体形成に関わりがあるとされてきた飢餓の認識に関わる (p)ppGpp の合成酵素である RelA と、その欠損が子実体形成に影響するとされている csgA について、それらの遺伝子を単離し、欠損株・恒常的発現株などを作成することで、両遺伝子の子実体形成への関わりを検討した。RelA の欠損株では stigmolone の生産能がなくなっただけで、stigmolone の添加によっても子実体形成能は回復しなかった。このことから RelA はフェロモン合成能ばかりでなく、その受容能の獲得にも関わっていると結論した。また、csgA は stigmolone の合成を促進していることを明らかにし、csgA が栄養飢餓によって発現誘導されることを示した。

以上のように本論文は、粘液細菌 *S. aurantiaca* における子実体形成反応について、フェロモンの構造を明らかにするとともに、その生産能・受容能と子実体形成因子である光・栄養飢餓との関わりについて、多くのあたらしい知見を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が、博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。