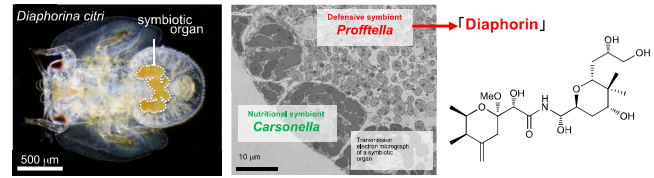


新規二次代謝物のユニークな細菌制御活性とその作用機構の探究

○高須 麗奈¹, 田邊 望夢¹, 安田 侑加¹, 伊豆 尚¹, 亀井 保博², 近藤 真紀², 中鉢 淳¹ (豊橋技科大,²基生研)

要旨 「ディアフォリン」は農業害虫「ミカンキジラミ (*Diaphorina citri*)」の共生細菌“*Candidatus Proffittella armatura*” (Gammaproteobacteria) が産生し、キジラミ体内に2-20 mMの高濃度で含まれる二次代謝物である (右図)。今回我々は、ディアフォリンが**枯草菌の増殖を抑制する一方、大腸菌の増殖・物質生産を促進する**、きわめてユニークな活性を持つことを明らかにした。大腸菌は、様々な有用物質の工業生産に頻用されており、ディアフォリンは、これらの**生産効率の改善**に利用できる可能性がある。そこでこの活性の作用機序解明を目指し、まず無細胞タンパク質合成系を用いて、細菌の遺伝子発現へのディアフォリンの影響を評価した。その結果、**原核性リボソーム**がその標的の一つであるとの強い示唆が得られた。



-ディアフォリンは枯草菌の増殖を抑制し、大腸菌の増殖と物質生産を促進する。

0-5 mMのディアフォリンを含む培地で枯草菌と大腸菌を培養し、分光測色、光学・電子顕微鏡観察で増殖状況を追跡し、β-ガラクトシダーゼアッセイで大腸菌の物質生産力を評価した。

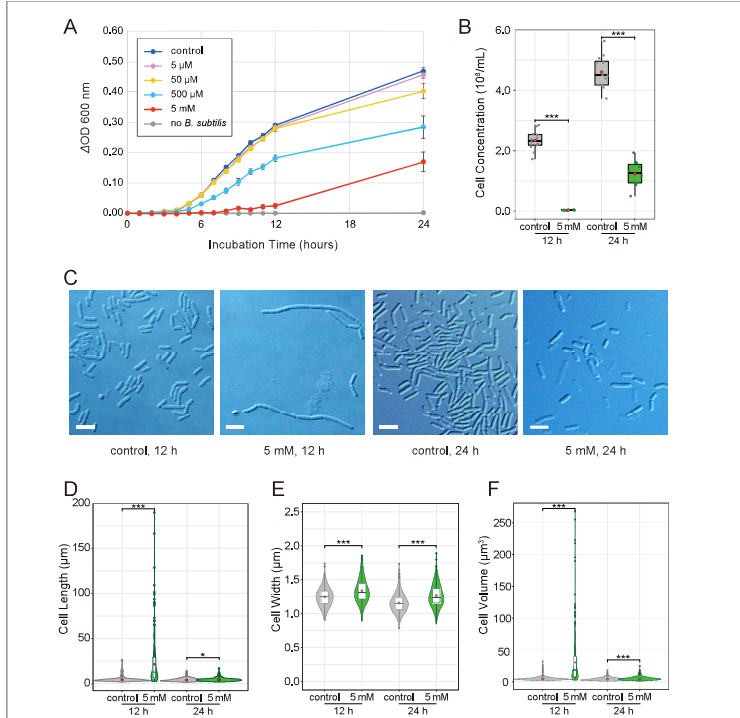


図1. ディアフォリンは枯草菌の増殖を抑制する。 (A) 0-5 mMのディアフォリンを含む培地中で培養した枯草菌の増殖曲線。エラーバー: 標準誤差 ($n = 12$)。 (B) 培地中の枯草菌の細胞密度 ($n = 12$)。***, $p < 0.001$, Welch t -検定。 (C) 枯草菌の微分干渉像。スケールバー, 5 μm 。 (D-F) 枯草菌細胞の長径, 短径, 体積 ($n = 1,200$)。*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$, Steel-Dwass検定。

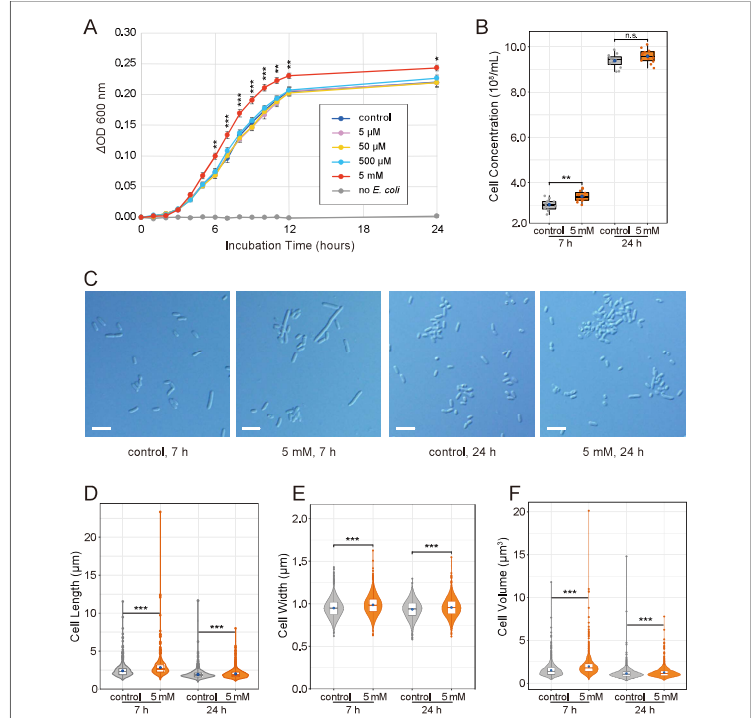


図3. ディアフォリンは大腸菌の増殖を促進する。 (A) 0-5 mMのディアフォリンを含む培地中で培養した大腸菌の増殖曲線。エラーバー: 標準誤差 ($n = 12$)。*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$, Dunnett検定。 (B) 培地中の大腸菌の細胞密度 ($n = 12$)。**, $p < 0.01$, Welch t -検定。 (C) 大腸菌の微分干渉像。スケールバー, 5 μm 。 (D-F) 大腸菌細胞の長径, 短径, 体積 ($n = 1,200$)。*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$, Steel-Dwass検定。

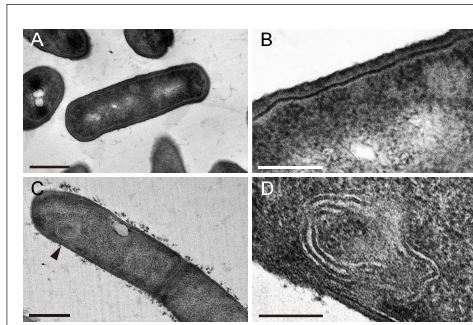


図2. ディアフォリンは枯草菌の細胞表面を損傷する。 ディアフォリンを含まない培地 (A, B) と5 mMのディアフォリンを含む培地 (C, D) で12時間培養した枯草菌の透過型電子顕微鏡像。B, D (バー: 200 nm) はA, C (バー: 500 nm)の拡大像。対照群 (A, B) の細胞表面が滑らかなのに対し、ディアフォリン処理群 (C, D) の細胞表面には一様に損傷が見られる。ディアフォリン処理群では細胞内に「リボソーム」と呼ばれる膜様構造 (Cアローヘッド, D) も観察され、やはり膜系のダメージが示唆される。

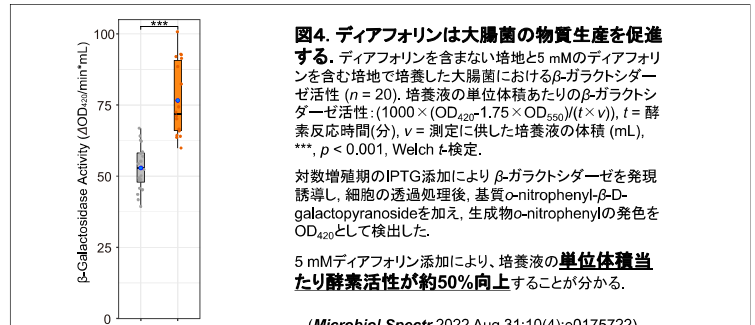


図4. ディアフォリンは大腸菌の物質生産を促進する。 ディアフォリンを含まない培地と5 mMのディアフォリンを含む培地で培養した大腸菌におけるβ-ガラクトシダーゼ活性 ($n = 20$)。培養液の単位体積あたりのβ-ガラクトシダーゼ活性: $(1000 \times (\text{OD}_{420} - 1.75 \times \text{OD}_{550}) / (t \times v))$, t = 酵素反応時間 (分), v = 測定に供した培養液の体積 (mL), ***, $p < 0.001$, Welch t -検定。
対数増殖期のIPTG添加によりβ-ガラクトシダーゼを発現誘導し、細胞の透過処理後、基質o-nitrophenyl-β-D-galactopyranosideを加え、生成物o-nitrophenylの発色をOD₄₂₀にて検出した。
5 mMディアフォリン添加により、培養液の**単位体積当たり酵素活性が約50%向上**することが分かる。
(Microbiol Spectr 2022 Aug 31;10(4):e0175722)

-ディアフォリンの細菌制御活性の主な標的はリボソームらしい。

ディアフォリンのユニークな細菌制御活性は、世界のカンキツ産業に致命的な被害を及ぼすカンキツグリーニング病原体“*Candidatus Liberibacter spp.*” (Alphaproteobacteria) の伝播など、ミカンキジラミの細菌叢に影響を与えている可能性がある。また、ディアフォリンによる大腸菌の物質生産促進は、**有用物質の工業生産効率の改善**への応用が期待される。しかし、この活性の発現機序は不明である。ディアフォリンは、真核性リボソームへの結合によりタンパク質合成を阻害することが知られるペリリン類の類縁体であるため、ディアフォリンの作用機序探究の第一歩として、枯草菌と大腸菌のリボソームを用いた無細胞タンパク質合成系へのディアフォリンの作用を調査した。

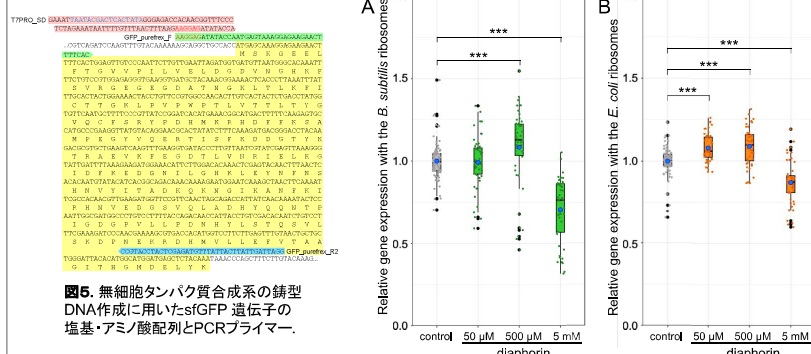


図5. 無細胞タンパク質合成系の鑄型DNA作成に用いたsfGFP遺伝子の塩基・アミノ酸配列とPCRプライマー。

図6. 細菌リボソーム活性は低濃度のディアフォリンで促進され、高濃度のディアフォリンで阻害される。 (A) 枯草菌リボソームのタンパク質合成活性。 (B) 大腸菌リボソームのタンパク質合成活性。タンパク質合成はPURExpress 2.0 kit (GeneFrontier)を用いて評価。産物はSDS-PAGEによる分離後、sfGFPの蛍光をTyphoon 9400 image analyzer (GE Healthcare)を用いて定量。青点は平均値 ($n = 48$)。***, $p < 0.001$, Steel検定。

枯草菌リボソーム、大腸菌リボソームのいずれについても、ディアフォリン濃度が低い条件ではタンパク質合成が有意に上昇するのに対し、ディアフォリン濃度が5 mMの高濃度では、一転してタンパク質合成が低下することが明らかとなった。これは

- ディアフォリンの細菌制御活性の**主な標的分子がリボソーム**である
- 細菌の**細胞内ディアフォリン濃度**が、**抑制と促進の方向性を規定**する

ことを示唆する。ただし、枯草菌では培地中のディアフォリンが低濃度でも抑制的に働いており (図1A)、枯草菌にはリボソーム以外の標的が存在する可能性が示唆される。これは、透過型電子顕微鏡観察で明らかとなった細胞表面の損傷 (図2) と矛盾しない。

(PLoS One 2023 Nov 14;18(11):e0294360, bioRxiv 2024 Feb 10.1101/2024.01.05.574368)

展望

ディアフォリンの作用機序の理解を進めるべく、現在、経時的マルチオミクス解析を計画中。