

Notice on Plankton Seminar

#16005

13:30-15:30, 10 June. (Fri.) 2016 at room #N504

Teplitski, M., H. Chen, S. Rajamani, M. Gao, M. Merighi, R. T. Sayre, J. B. Robinson,
B. G. Rolfe and W. D. Bauer (2004)

Chlamydomonas reinhardtii Secretes Compounds That Mimic Bacterial Signals and
Interfere with Quorum Sensing Regulation in Bacteria

Plant Physiol. **134**: 137-146.

Chlamydomonas reinhardtii は細菌の細胞間情報伝達物質を模した物質を分泌し、
細菌のクオラムセンシング機構に干渉する

多くの細菌は細胞間情報伝達物質としてオートインデューサー (AI) を生産し、その濃度に依存して遺伝子の発現を制御する。この機構をクオラムセンシング (QS) と呼び、コロニー形成や宿主への感染、共生といった様々な細菌の制御要因となる。ところで、高等植物等の真核生物が AI-1 である N-アシルホモセリンラクトン (AHL) を模した AHL 様物質を産生することで、細菌の QS に影響を与える例が報告されている。本研究では、モデル生物である単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* が AHL 様物質を産生することを報告し、*C. reinhardtii* の AHL 様物質の検出及び、細菌の QS やそれに伴うタンパク質生産への影響を検討した。

実験ではバイオアッセイと HPLC 分析により、AHL 様物質の検出を行い、次にプロテオーム解析を用いて AHL 様物質が QS 機構に与える影響を検討した。アッセイには、AI 受容体として CviR, CepR, LuxP, LuxR, AhvR 及び LasR を持つ *Chromobacterium violaceum* CV026 株、*Pseudomonas putida* pAS-C8 株、*Vibrio harveyi* BB170 株、*Escherichia coli* JM109 pSB401 株、pSB536 株及び pSB1075 株を用いた。各細菌株の懸濁液を *C. reinhardtii*、*C. mutabilis*、*Chlorella vulgaris* 及び *Chlorella fusca* を培養した寒天培地上に塗抹し、それぞれの細菌株の生物発光等の反応の有無から AHL 様物質を検出した。また、HPLC 解析に供した *C. reinhardtii* は、TAP 液体培地で光条件下で培養し、OD₇₅₀ 値が 1.2 以上を示した培養の細胞を遠心濃縮し、改変 HS 培地中に再懸濁して、光強度 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、175 rpm の条件下で振盪培養した。培養 4、8 及び 12 日目に遠心分離で細胞を除去し、タンパク質を除去した後、酢酸エチルで試料を抽出し、ロータリーエバポレーターを用い溶媒を蒸発させた。その後、乾燥させた試料を HPLC に供した。また、*C. reinhardtii* 培養濾液抽出物中の LasR と CepR を励起する AHL 様物質を特定するためにアッセイを行い、LasR を励起する AHL 様物質を土壌根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* 1021 株を用いたプロテオーム解析に供した。*C. reinhardtii* 由来の AHL 様物質、細菌由来の AHL、そして両方を加えた TA 培地を用意し、各培地で *S. meliloti* を 28°C、200 rpm の条件下で振盪培養し、細胞を遠心濃縮して冷凍乾燥させた後、超音波処理で粉碎し、抽出したタンパク質をプロテオーム解析に供した。*S. meliloti* が産生したタンパク質は、Bradford 法を用いて定量し、PMF 法により特定した。

アッセイの結果、全ての藻類株は *V. harveyi* の生物発光を励起した。これは AI-2 の機能を持つ物質の生産を意味する。また、*C. reinhardtii* は LasR や LuxR, AhvR レポーター株の生物発光を阻害した。これは複数の AHL 様物質の生産を意味する。AHL 様物質のアッセイの結果、AHL 受容体である LasR と CepR を励起する HPLC 画分はそれぞれ 6 つずつ見られた。また、*S. meliloti* に *C. reinhardtii* 由来の AHL 様物質を与えたプロテオーム解析の結果、34 種類のタンパク質が検出され、そのうち 32 種類が特定された。また、細菌由来の AHL 添加実験区で検知された 25 種類のタンパク質のうち、16 種類は AHL 様物質添加実験区でも同様に検知された。細菌由来の AHL と藻類の生産した AHL 様物質の両方を添加した実験区では、検出されるタンパク質の濃度が単一の物質を添加した実験区よりも低い傾向にあった。これは細菌由来の AHL の働きを、藻類が生産した AHL 様物質が阻害したということの意味する。

本研究により、AI 受容体である LasR と CepR に影響を与える *C. reinhardtii* 由来の AHL 様物質は少なくとも 12 種類存在することが示された。また、それらの AHL 様物質は細菌由来の AHL と同様に *S. meliloti* 1021 株の QS 機構に作用し、それによりタンパク質の産生に影響を与えることが示唆された。以上のことから、*C. reinhardtii* は AHL 様物質を産生することで、細菌の AHL が仲介する機構に作用し、細菌の活動に影響を与えることが示唆された。

児玉敢