

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07370

研究課題名(和文)放線菌エネルギー代謝の恒常性維持と分化開始の連携メカニズム

研究課題名(英文) Mechanism of link between energy homeostasis and onset of differentiation in Streptomyces

研究代表者

上田 賢志 (UEDA, Kenji)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：00277401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ストレプトミセス属放線菌の抗生物質生産と細胞の形態分化は、高濃度の銅イオンによって促進される。ここでは、その生理的基礎として、細胞内エネルギーレベルの恒常性維持メカニズムが介在することを見出し、その具体事例として(1) Rexと呼ばれる転写調節蛋白質がATP合成酵素オペロンを負に制御するとともに、(2) LysR型の特異的転写調節蛋白質がコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体オペロンを誘導制御することを明らかとした。これらを通じて調節される細胞内のエネルギーレベルが分化開始の信号として機能すると推測される。

研究成果の概要(英文)：Antibiotic production and morphological differentiation in Streptomyces is stimulated by a high concentration of copper ion. Here, we revealed that the stimulation is based on the energy homeostatic mechanisms including the following systems: (1) negative regulation of ATP synthase operon by a transcriptional regulator Rex, and (2) positive regulation of succinate dehydrogenase operon by a specific LysR-type transcriptional regulator. Thus controlled intracellular energetic state may serve as a signal for the onset of development.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Streptomyces energy metabolism cell differentiation secondary metabolism homeostasis transcription regulation antibiotics

## 1. 研究開始当初の背景

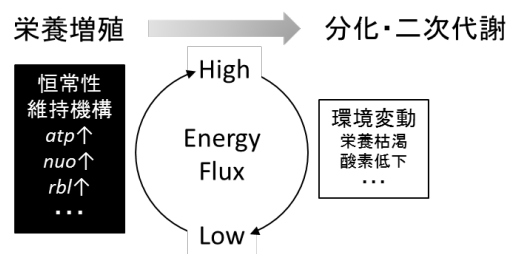
グラム陽性土壌細菌の一つである放線菌は、抗生物質や抗腫瘍活性物質などの生理活性物質を多様に生産する重要な産業微生物である。カビに似た複雑な形態分化を行うことから、放線菌は生物分化に関する遺伝解析のモデルとしても重要な位置を占めている。筆者らは、*Streptomyces* 属放線菌について、特にその二次代謝産物の生産と形態分化の開始を制御する遺伝メカニズムと環境因子に関する研究を推進し、継続して科学研究費を受けてきた。特に、H21-23年度の基盤研究(C)では、末端呼吸酵素に着目したエネルギー代謝と二次代謝・分化の連携に関する研究を推進し、その結果、本申請で取り上げる恒常性維持メカニズムの存在を想定する重要な予備的知見を得るに至った。

モデル株 *Streptomyces coelicolor* の呼吸酵素遺伝子を破壊した変異株では、細胞分化能と抗生物質生産能が低下する (Fujimoto et al. Microbiology, 162:1446, 2016)。DNA マイクロアレイによる転写解析から、この変異株では ATP 合成酵素遺伝子 (*atp*) や NADH デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*nuo*) をはじめとするエネルギー代謝関連遺伝子群ならびにリボソーム蛋白質遺伝子群 (*rbl*) の転写量が顕著に上がっていることが明らかになった。すなわち、呼吸不全に基づく信号伝達が、それを補うために関連遺伝子群の発現レベルを一斉に上昇させ恒常性を維持しようとするメカニズムが転写段階で存在していると考えられる。実際に、上記変異株の細胞内 ATP 濃度を測定したところ、親株に比べて極めて高いレベルの ATP が蓄積していることが判明した。また、ATP 合成阻害剤を変異株に添加すると、特定の阻害濃度下において顕著な分化と抗生物質の回復が観察された

(Fujimoto et al. Microbiology, 162:1446, 2016)。

これらの予備的知見をもとに、図に示す作業仮説を立てている。放線菌の分化と二次代謝の開始は、細胞内のエネルギー代謝効率が高い状態にあることに基づいて開始される。一方、環境条件の変動によって効率が低下すると転写レベルの恒常性維持メカニズムが作動しそれを補う。このメカニズムが細胞内 ATP レベルの検知を通じて分化の開始と連携している。

これまでの放線菌の二次代謝と分化の制御に関する研究は、その遺伝スイッチとして機能する制御遺伝子群の役割を中心に進められており、*S. coelicolor* においては *bld* カスケードと呼ばれる信号伝達系が、*S. griseus* においては自己調節因子 A-ファクターの信号伝達系がそれぞれ詳細に調べられてきた。これらの制御系には、複数の転写調節蛋白質を中心とする制御因子群が関わることがその機能を含めて明らかにされているが、それらがエネルギー代謝といかに連動しているかについてはほとんど知見がない。二次代謝と細胞分化の生理的役割を考える上で、また各種産業に於ける生理活性物質の効率的な生産系の確立のために、エネルギー代謝との連携に関する理解は重要な意義がある。



## 2. 研究の目的

本研究では、上述の *Streptomyces* 属放線菌のエネルギー代謝の阻害によって引き起こされる遺伝子発現の変動をもとに、その基礎となる恒常性維持の遺伝制御メカニ

ズムを明らかにすることを目的とした。特に、(1)呼吸酵素変異株に於いて転写活性の上昇が認められた *atp* オペロンについて、その転写を調節する蛋白質の同定とその役割(2)呼吸鎖複合体 IV の活性に必須である銅イオンの欠乏によって転写が誘導される代謝酵素の役割とその調節機構の解明に注力した。これらをはじめとした一次代謝における恒常性の基礎となる遺伝制御メカニズムに関する理解は、エネルギー状態と分化・二次代謝の開始の制御的な連携を明らかにする上での鍵になると考えられる。

### 3. 研究の方法

*S. coelicolor* A3(2) M145 株と *S. griseus* NBRC13350 株について、DNA マイクロアレイならびに RT-PCR 法を用いた転写アッセイと、相同組み換えを利用した定法による遺伝子破壊を行った。また、大腸菌 Rosetta 株を宿主に用いた定法により組み換え蛋白質を調製し、蛍光標識したプローブ DNA を用いたゲルシフト法により蛋白質の DNA 結合活性を検定した。放線菌および大腸菌の培養条件は既報に記載の標準的なものを使用した (Fujimoto et al. *Microbiology*, 162:1446, 2016)。

### 4. 研究成果

#### (1) *atp* オペロンの転写調節メカニズム

*S. coelicolor* の細胞内において ATP 合成酵素オペロン (*atpIBEFHAGDC*) の発現制御に関わる蛋白質の同定を目的として、*atpI* 上流に位置するプロモーター領域をプローブとした DNA アフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、本プロモーターに特異的に結合すると考えられる複数の蛋白質を検出することに成功した。得られた蛋白質を LC-MS/MS を用いたフィンガープリント法によって分析したところ、得られた蛋白質の一つは細胞内のレドック

スバランスを感知し、転写調節を担うリプレッサーとして機能することが知られている Rex (Paget et al. *EMBO J.* 22:4856, 2003) であることが判明した。プローブに用いた *atpI* のプロモーター領域中には、Rex が特異的に認識・結合するコンセンサス配列である TGTG-6n-TTCAC が存在することが認められた。

そこで次に、Rex 蛋白質が特異的に *atpI* プロモーター領域に結合することを検証した。大腸菌を用いて調製した組換え Rex 蛋白質を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、同プロモーター領域への特異的な結合が確認された。リプレッサーである Rex の DNA 結合活性は NADH によって阻害されることが知られている。実際に、組み換え Rex 蛋白質の *atpI* プロモーターに対する結合は NADH によって強く阻害された。また、NADH と相互作用できないことで知られるアミノ酸置換変異体 RexG102A についても同様に機能を評価したところ、その標的 DNA に対する結合は NADH 存在下においても阻害されないことが確認された。さらに、同プロモーター中に存在する Rex 結合配列 (TGTG-6n-TTCAC) に変異を導入したプローブを用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、Rex の結合は確認されなかった。これらの結果から、Rex は *atpI* プロモーター領域の結合配列を特異的に認識し、細胞内 NADH 量に基づいて ATP 合成酵素遺伝子群の転写量を調節する役割を担っていると考えられた。

これまでの観察から、*S. coelicolor* において細胞内 ATP レベルと分化開始に密接な関連があることが示唆された。そこで、他の *Streptomyces* 属放線菌についても細胞内 ATP 含量と分化の関連を検証するため、脱共役剤である CCCP の添加効果を調べた。その結果、複数の種において、CCCP

添加時に分化が促進されることが示された。このことから、細胞内 ATP レベルが低いことが分化の開始に正に作用する、とするこれまでの *S. coelicolor* における観察が、他の *Streptomyces* 属細菌を含めた放線菌においても広く認められることが明らかになった。

冒頭に記載の、呼吸鎖複合体 IV の活性ドメインをコードする遺伝子 *ctaCD* の破壊株と野生株の転写レベルを比較したマイクロアレイ解析の結果において、*atp* オペロンをはじめとする一次代謝関連遺伝子に加えて、形態分化の開始に関与することが知られる *bldN* 遺伝子の転写量も *ctaCD* 破壊株において上昇していることが観察された。そこで、分化欠損株である *bldN* 破壊株の細胞内 ATP レベルと同遺伝子の転写量を解析したところ、野生株よりも顕著に上昇していることが示された。また、*bldN* 破壊株の COX 活性は野生株よりも顕著に上昇していることが示された。*bldN* は ECF 因子をコードしていることから、間接的に COX 活性や ATP 合成酵素遺伝子クラスターの転写調節に関与していることが考えられた。また、*bldN* 破壊株に ATP 合成阻害剤である CCCP を添加して培養すると孢子形成能が回復したことから、*bldN* 破壊株の分化能欠損には ATP レベルの上昇が関与することが予測された。

## (2) 誘導型コハク酸デヒドロゲナーゼの発現制御メカニズム

筆者らのこれまでの観察により、放線菌の抗生物質生産と形態分化が銅イオンの添加によって促進されることが明らかとなっている。その効果は、銅イオンを必要とする呼吸鎖 IV の活性化を通じて上述の細胞内 ATP レベルに影響することで発揮されるものと考えられる。銅イオンの添加効果に着目して *S. griseus* において実施したト

ランスクリプトーム解析の結果から、本菌のゲノム上に 2 コピー存在するコハク酸脱水素酵素 (succinate dehydrogenase; Sdh) オペロンの 1 つが銅イオンの欠乏によって誘導されることが予想された。そこで、その調節機構に関する検証を行った。

Sdh は、TCA サイクルと電子伝達系で働く酵素で酸化的リン酸化に関わる呼吸酵素の一つである。Sdh は、コハク酸をフマル酸に酸化すると同時にユビキノンをユビキノールへ還元する反応を担う、TCA サイクルを構成する酵素の中で唯一の膜蛋白質であり、フラボ蛋白質 (SdhA)、鉄-硫黄蛋白質 (SdhB)、1 つもしくは 2 つの膜アンカー蛋白質 (SdhC もしくは SdhC と D) から構成される。多くの放線菌には、この Sdh をコードするオペロンが 2 つ存在する。1 つは SdhA、B、C、D をコードする *sdh1*、もう一方は SdhA、B、C ホモログをコードする *sdh2* である。*sdh2* オペロンには機能未知の LysR 型転写調節蛋白質 (LysR-type transcriptional regulator; LTTR) をコードする遺伝子 SGR708 が隣接して存在し、その配置は *Streptomyces* 属において広く保存されていることから、SGR708 が *sdh2* の転写制御に関与することが予想された。このことから、本オペロンの転写調節に焦点を当てた。

前述の DNA マイクロアレイ解析の結果において、10  $\mu$ M の銅イオンの培地への添加は *S. griseus* の *sdh1* オペロンの転写には影響しないが、*sdh2* オペロンの転写レベルを 1/5 程度に低下させることが示された。すなわち、*sdh1* は構成的に発現する一方、*sdh2* は銅イオンの欠乏によって誘導されることが予想された。次に、それを確認するため各遺伝子の転写レベルをセミ定量 RT-PCR により解析した。その結果、DNA マイクロアレイ解析の結果と一致して、野生株では 10  $\mu$ M の銅イオンの添加で *sdh2*

オペロンの転写レベルの低下が確認された。さらに、本オペロンの転写調節蛋白質と予想した SGR708 の遺伝子破壊株では 10  $\mu$ M の銅イオン添加の有無に関わらず *sdh2* オペロンの転写レベルは低下していた。一方、*sdh1* オペロンは構成的に転写されていた。このことから、SGR708 は *sdh2* オペロンの発現を正に制御するローカルレギュレーターとして機能すると考えられた。

そこで次に、SGR708 蛋白質が *sdh2* オペロン上流のプロモーター領域に結合するかについて、大腸菌を用いて調製した組み換え蛋白質を用いたゲルシフトアッセイを行った。SGR708 組み換え蛋白質を発現させた大腸菌の細胞抽出液を *sdh2* プロモーター中の調節領域と予想される配列を含むプローブ DNA と混合し電気泳動したところ、予想通り特異的に結合することが確認された。また、このときの結合活性は、銅イオンの濃度依存的に阻害されることも確認された。さらに、同プロモーター中に存在する SGR708 蛋白質の結合配列と予想された ATAG-7n-CTAT に変異を導入したプローブを用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、SGR708 の結合は確認されなかった。この SGR708 結合配列は *Streptomyces* 属の *sdh2* プロモーター領域中に高度に保存されていた。これらの結果から、SGR708 は *sdh2* プロモーター領域の結合配列を特異的に認識・結合し、細胞内の銅イオン濃度に基づいて *sdh2* オペロンの転写制御を行うことが示唆された。

*S. griseus* が保有する 2 つの *sdh* オペロンの生理学的役割を理解することを目的として、それぞれを破壊した株を作製し、その生育を観察した。その結果、*sdh2* 破壊株は野生株との生育に有意な差は見られなかった。一方、*sdh1* 破壊株は野生株及び *sdh2* 破壊株よりも細胞収量が多くなる傾向が認められた。このことから、Sdh1 を介する

代謝は細胞増殖度に対して負に作用する性質を有する可能性が考えられた。

## 総括

本研究において、*S. coelicolor* の ATP 合成酵素オペロン *atp* が転写レベルで調節されているとするこれまでにない知見が得られた。ゲノム情報が明らかな *Streptomyces* 属細菌において、ATP 合成酵素オペロンの上流領域には Rex の結合コンセンサス配列が存在し、かつ *rex* 遺伝子も高く保存されていることから、Rex による *atp* オペロンの制御機構は *Streptomyces* 属において普遍的に作動している可能性が高い。これらの観察は、本メカニズムがエネルギー代謝の恒常性維持機構の一つであると同時に、エネルギー代謝と分化開始の連携にも関与している可能性を想起させる。今回明らかになった、呼吸欠損時における *atp* オペロンの転写活性化がどのような意義を持つかは明確ではないが、一つに、ATP 合成酵素の発現量を上昇させることで呼吸酵素欠損によるエネルギーレベルの低下を補っている可能性が考えられる。ATP 合成酵素遺伝子クラスターの転写調節に関する知見は、*Salmonella*、*Bacillus*、*Corynebacterium* 属細菌等において報告されているが、*Streptomyces* 属については本研究が初めてである。細胞内 ATP レベルが如何に分化の開始に連携しているかについては依然明らかではないが、本研究によって得られた細胞内における恒常性維持に関する知見は、放線菌の基礎ならびに応用研究において重要である。

本研究ではさらに、*S. griseus* が有するコハク酸デヒドロゲナーゼ複合体をコードするオペロンの一つである *sdh2* が、銅センサーとして機能する SGR708 蛋白質によって銅イオン欠乏時に転写誘導されることを明らかにした。ゲノム情報が明らかな

*Streptomyces* 属細菌において、*sdh2* オペロンの上流領域には SGR708 の結合領域と予想されるコンセンサス配列が存在し、かつ隣接して SGR708 相同遺伝子が共通して存在していることから、この制御機構は *Streptomyces* 属細菌において普遍的に作用していると予想される。銅イオン欠乏下では、呼吸鎖複合体 IV の活性が低下するために、電子伝達系で生産されるプロトン量が減少すると考えられる。銅イオン欠乏時に特異的に誘導発現する *Sdh2* は、呼吸鎖複合体 IV の活性低下を補うことでエネルギー代謝の恒常性を維持する役割を担っていると推測される。

銅イオンが放線菌の形態分化と二次代謝に広く促進的に作用することに着目した一連の検証によって、銅の利用性と細胞内エネルギーレベルに対する恒常性維持メカニズムが存在していることが明らかになった。いずれも特異的な調節蛋白質による転写段階での制御であり、今後それらの調節蛋白質の機能と役割に基づいた詳しい知見が得られると期待される。また、これらの制御に基づいて調節される細胞内のエネルギーレベルがいかなる信号として機能して細胞分化と二次代謝の開始に連携するかについての検証を進めることによって、放線菌の複雑な生活環のプログラムに対する新たな理解が進むと考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Ueda K, Beppu T. Antibiotics in microbial coculture. *J Antibiot.* 2017. 70:361-365. (査読有)

Takano H, Nishiyama T, Amano S, Beppu T, Kobayashi M, Ueda K. *Streptomyces* metabolites in divergent microbial interactions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2016. 43:143-148. (査読有)

Fujimoto M, Chijiwa M, Nishiyama T, Takano H, Ueda K. Developmental defect of cytochrome oxidase mutants of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology.* 2016. 162:1446-1455. (査読有)

〔学会発表〕(計 3 件)

学会発表

1) 高原薫平, 上田賢志, 高野英晃. 放線菌 *Streptomyces griseus* が保有する呼吸鎖複合体 II の銅イオン濃度特異的な転写制御. 日本農芸化学会 2018 年度大会. 2018 年 3 月 17 日. 名城大学 (名古屋)

2) Kenji Ueda. Newly discovered endogenous signaling routes in *Streptomyces*: the role of ATP and nitric oxide. The 13<sup>th</sup> International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. 2016 年 10 月 17 日. Wuhan, China (招待講演)

3) 千々和雅人, 高野英晃, 上田賢志. 放線菌におけるエネルギー代謝と分化・抗生物質生産の連携に関する研究. 日本農芸化学会・2016 年度大会. 2016 年 3 月 30 日. 札幌コンベンションセンター (札幌)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 賢志 (UEDA, Kenji)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号: 00277401

(2) 研究分担者

高野 英晃 (TAKANO, Hideaki)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号: 50385994

西山 辰也 (NISHIYAMA, Tatsuya)

日本大学・生物資源科学部・助手

研究者番号: 10759541

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし