

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05811

研究課題名(和文)放線菌のNO signaling及びNO恒常性維持機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of NO signalling and NO homeostasis in actinomycetes.

研究代表者

佐々木 康幸 (Sasaki, Yasuyuki)

東京農業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：50398814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*Streptomyces coelicolor*A3(2)の一酸化窒素シグナリング、及び恒常性維持機構の一部の分子レベルでのメカニズムが示唆された。本菌におけるNOによる抗生物質生産、及び形態分化の分子レベルでの制御機構が示唆された。さらに、低分子チオール化合物ミコチオールによる内在NOの濃度のコントロール、またNO依存的に鉄を取り込むことでNO代謝系鉄含有タンパク質群の活性の安定化など、NO恒常性維持機構が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、*Streptomyces coelicolor*A3(2)の一酸化窒素シグナリング、及び恒常性維持機構の一部の分子レベルでのメカニズムが示唆された。NOによる抗生物質、形態分化の制御についての報告はこれまでになく、*Streptomyces*属細菌を利用した工業的生産プロセスおよび生産性を、生育制御の観点から改善する新しい試みの展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study suggests a partial molecular mechanism for nitric oxide signalling and homeostasis in *Streptomyces coelicolor*A3(2). Molecular mechanisms of NO-induced antibiotic production and morphological differentiation in this bacterium were suggested. Furthermore, mechanisms of NO homeostasis were suggested, including control of the concentration of endogenous NO by the low-molecular-weight thiol compound mycothiol and stabilization of the activity of NO-metabolising iron-containing protein groups by NO-dependent iron uptake.

研究分野：応用微生物学

キーワード：actinobacteria *Streptomyces* nitric oxide signalling homeostatic regulation

1. 研究開始当初の背景

放線菌 *Streptomyces* 属細菌は、土壤中に生息するグラム陽性細菌である。本菌は大気中に菌糸を形成し、その後、孢子形成を行う複雑な形態分化能を有している。放線菌は形態分化に連動して多様な生理活性物質を生産することが知られており、これまでに発見された天然由来の抗生物質の多くは放線菌の生産物である。その中でも特に *Streptomyces* 属が生産する抗生物質は極めて多い。本菌群において、微生物ホルモン (A-factor, SCB など) が見出されて以来、そのホルモンによる二次代謝、形態分化の制御機構が明らかとされ、受容体やシグナリングカスケードが解明されている。しかしながら、微生物ホルモンのみでは、多くの代謝制御機構について説明できておらず、この本菌群の代謝調節機構を解明することは工業的、医学的に非常に価値があると考えられる。

近年、我々の研究グループにおいて、放線菌 *Streptomyces coelicolor*A3(2) が内在的に窒素酸化物を合成し、硝酸還元酵素 (Nar) とフラボヘモグロビン (Fhb) を介して順次循環させている事を見出した (Fig. 1)。加えて、本循環経路から生産される一酸化窒素 (NO) は、NO 依存性二成分制御系を介して細胞内の NO 濃度を自己調節していることが明らかとなった。さらに、抗生物質生産、および形態分化を制御しているシグナル分子である事が示唆されたが、新規シグナル分子 NO による分子レベルでの制御メカニズムに関しては不明であった。本代謝制御系は、*Streptomyces* 属細菌の多くに存在すると考えられたため、この微生物ホルモン様に働く窒素酸化物による代謝調節メカニズムを解明し理解を深めることは、極めて有用な細菌の重要知見を世界に与えるものと思われた。

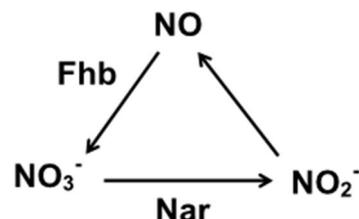


Fig. 1 循環型NO生産経路

2. 研究の目的

本研究期間において、NOの受容メカニズム、さらには細胞内NO恒常性維持機構の2点について焦点を定め重点的に解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) NO非生産株 (Nar破壊株) を作成しているため、次世代シーケンサーを用いて、野生株との網羅的な遺伝子発現の比較解析を行い、NO依存的に発現する遺伝子の探索を行った。具体的には野生株とNO低生産変異株を培養し、経時的に菌体を得る。得られた菌体からRNAを回収し、シーケンス解析を行い、両株の間の発現量に顕著な変化を示した遺伝子を特定した。

(2) 本菌の有する一酸化窒素依存性二成分制御系 DevS/R の作用メカニズムの詳細を調べた。リン酸基捕捉因子である Phos-tag を利用したウエスタンブロットにより、野生株とNO非生産株における転写因子 DevR の細胞内のリン酸化状態を継時的に解析した。

(3) 一酸化窒素 (NO) による気中菌糸形成制御機構の解明を主な目的として研究を行った。本菌では、気中菌糸形成がセカンドメッセンジャーである cyclic di-GMP (c-di-GMP) 量に依存してコントロールされることが明らかにされていた。NO低生産変異株を使用して、内在的に生産されるNOと細胞内c-di-GMP量の関連を細胞内NOマーカー遺伝子の発現解析やELISA法により細胞内c-di-GMP量を調べた。c-di-GMP量に依存性の形態分化に関与する転写因子と細胞内NOとの関連性をゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法等を使用して検証した。

(4) 放線菌は、特徴的な低分子チオール化合物のミコチオールを生産することが知られており、ミコチオールは酸化ストレス防御に関与することが報告されている。内在的に生産されるNOとミコチオールの関連性を検証するため、ミコチオール生合成遺伝子破壊株を作成し、内在性NO量を反映するマーカー遺伝子の発現量を測定した。さらに、破壊株の抗生物質生産能などを検証した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子群の網羅的解析を行った結果、複数のNO誘導性遺伝子群を見出した。その中で、金属イオンのキレーター分子であるシデロフォアの生合成遺伝子群の発現が顕著に誘導されたため、その生理的な意義の解明を試みた。本菌ではNOシグナリングを成立さ

せるために、細胞増殖に伴い NO 恒常性維持機構関連タンパク質及び酵素群の生産活性が上昇することが示唆された。これら NO 代謝系のタンパク質群は鉄を必要とする。その為、NO シグナリングに関連する抗生物質生産及び形態分化を正常に行うために細胞内鉄イオンが不足しないようシデロフォアを生産し環境中から鉄を積極的に取り込んでいることが示唆された。

(2) 野生株と変異株の間で DevR のリン酸化状態に変化は見出されなかったが、NO 非生産株における DevR の生産量が顕著に減少する事が明らかとなった。また、qPCR により devR 遺伝子の発現量を解析した結果、NO 非生産株における devR 遺伝子の発現量は野生株と比べて有意に減少しており、NO 発生剤の暴露により発現量が有意に回復する事が見出された。DevR の発現はリン酸化 DevR 自身によって促進されるため、これらの解析結果から NO は DevS の自己リン酸化に必須ではないがその安定化に重要であり、それに伴い DevR のリン酸化状態に影響が及ぶ事が示唆された。以上より、内在的に生産される一酸化窒素が DevS/R 二成分制御系を介して、抗生物質の生産を制御している分子メカニズムを明らかとした。

(3) 変異株では、野生株と比較して c-di-GMP 量が有意に減少しており、さらに、この変異株に NO 発生剤を暴露すると、c-di-GMP 生産活性が回復することを見出した。また、c-di-GMP 依存性転写因子 BidD の結合活性と細胞内 NO 量との関連性が示され、NO による c-di-GMP 量の調節を介した転写因子 BidD による気中菌糸形成制御機構が示唆された。

(4) 内因性 NO に対する MSH の役割を調べるため、MSH 生合成能欠損株を作製した。この変異株は、培養中に低分子 S-ニトロソチオールと細胞内 NO の減少を示した。このことから、MSH は S-ニトロソミコチオールを形成することで細胞内 NO の恒常性を維持し、NO シグナルを正常に保つことで、抗生物質生産に関与していることが示唆された。最後に、MSH が内因性 NO の代謝に関与し、NO の恒常性とシグナル伝達を維持するモデルを提案した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Honma Sota, Ito Shinsaku, Yajima Shunsuke, Sasaki Yasuyuki | 4. 巻 88 |
| 2. 論文標題 Nitric Oxide Signaling for Aerial Mycelium Formation in <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/aem.01222-22 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Honma Sota, Ito Shinsaku, Yajima Shunsuke, Sasaki Yasuyuki | 4. 巻 87 |
| 2. 論文標題 Nitric Oxide Signaling for Actinorhodin Production in <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) via the DevS/R Two-Component System | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.00480-21 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 本間颯太、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 「放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145株におけるNOシグナル伝達を基盤とした形態分化制御 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2021年度大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 本間颯太、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 「放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145株におけるNOシグナル伝達を基盤とした形態分化制御 |
| 3. 学会等名 2021年度日本放線菌学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 本間颯太、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌Streptomyces coelicolor A3(2) M145株における内在性N0による形態分化制御メカニズム |
| 3. 学会等名 日本農芸化学学会2022年度京都大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉住友希、渋井佑生子、小川翔大、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌Streptomyces coelicolor A3(2)におけるミコチオールを介した細胞内N0の制御 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学学会2022年度京都大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 杉本 聡、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌 Streptomyces coelicolor A3(2)における、内在性 N0 による鉄取り込み制御 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学学会2022年度京都大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 ○本間颯太、伊藤晋作、佐々木康幸、矢嶋俊介 |
| 2. 発表標題 放線菌Streptomyces coelicolor A3(2) M145株における内在性N0によるヘム含有型二成分制御系を介した抗生物質生産調節メカニズム |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2020年度大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 ○本間颯太、伊藤晋作、佐々木康幸、矢嶋俊介 |
| 2. 発表標題 放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145株における内性NOによるヘム含有型二成分制御系を介した抗生物質生産調節メカニズム |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉住友希、渋井佑生子、小川翔大、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145におけるMycothiолを介した一酸化窒素恒常性維持機構 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 杉本 聡、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145株において、シデロフォアによる鉄の取り込みは細胞内NO恒常性を維持する |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 本間颯太、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) 145株におけるNOシグナル伝達を基盤とした形態分化制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 杉本 聡、伊藤 晋作、矢嶋 俊介、佐々木 康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145株において、シデロフォアによる鉄の取り込みは細胞内NO恒常性を維持する |
| 3. 学会等名 日本放線菌学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉住友希, 本間颯太, 渋井佑生子, 小川翔大, 伊藤晋作, 矢嶋俊介, 佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145におけるMycothiолを介した一酸化窒素恒常性維持機構 |
| 3. 学会等名 日本放線菌学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 本間颯太、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145株におけるNOによる形態分化制御機構の解明 |
| 3. 学会等名 日本放線菌学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中島菜々海、石井花奈、本間颯太、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌 <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145株における細胞内NO濃度に与えるacetophenoneの影響 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2022年度大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中島菜々海、石井花奈、本間颯太、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌Streptomyces coelicolor A3(2) M145株における細胞内NO濃度に与えるacetophenoneの影響 |
| 3. 学会等名 日本放線菌学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sota Honma, Shinsaku Ito, Shunsuke Yajima, Yasuyuki Sasaki |
| 2. 発表標題 Nitric oxide signaling for aerial mycelium formation in Streptomyces coelicolor A3(2) M145 |
| 3. 学会等名 The 12th International NO Conference & The 22nd NOSJ (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 本間颯太、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌Streptomyces coelicolor A3(2) M145株における一酸化窒素を基盤とした形態分化制御機構 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中島菜々海、石井花奈、本間颯太、伊藤晋作、矢嶋俊介、佐々木康幸 |
| 2. 発表標題 放線菌Streptomyces coelicolor A3(2) M145株における細胞内NO濃度に与えるacetophenoneの影響 |
| 3. 学会等名 日本農芸化学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|