

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月1日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580103

研究課題名（和文） 放線菌の呼吸と二次代謝の連携：末端酸化酵素の新たな役割

研究課題名（英文） Connection between respiration and secondary metabolite formation in *Streptomyces*: An unknown role of the terminal respiratory enzymes研究代表者 上田 賢志 (UEDA KENJI)  
日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：00277401

研究成果の概要（和文）：

抗生物質などの有用な生理活性物質を生産する放線菌について、いかにそのエネルギー代謝が物質の生産性に連携しているかを調べた。エネルギー代謝フローの末端で重要な役割を担う呼吸に関与する酵素群に着目して、その遺伝子破壊などを行うことで、シトクロム酸化酵素と呼ばれる主要な呼吸酵素が抗生物質の生産開始の信号を発信する役割も担っていることを明らかにした。この成果は、有用物質を安価に生産するための技術に役立つ。

研究成果の概要（英文）：

We studied the connection between energy metabolism and secondary metabolism in *Streptomyces*, the bacteria renowned for the ability to produce useful biologically active substances such as antibiotics. By focusing on the role of enzymes involved in respiration, i.e. the important process at the terminus of energy metabolic flow, we revealed that the major respiratory enzyme termed cytochrome oxidase plays an important role in the signaling for the initiation of antibiotic production. The findings will be fundamental to the development of effective fermentation process for useful substances.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学

キーワード：(1) *Streptomyces* (2) copper (3) cytochrome oxidase (4) Sco1

(5) antibiotics (6) cell differentiation (7) regulation (8) lysyloxidase

1. 研究開始当初の背景

グラム陽性の土壌細菌である放線菌は、  
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、産業に欠かせない  
微生物である。放線菌はカビに似た複雑な  
形態分化を行うことから生物分化に関する

遺伝解析のモデルとしても重要な位置を占めている。我々は、*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、H19-20年度の基盤研究(C)では、二次代謝と分化にグルコースによる抑制ならびに銅イオンによる促進がおこることに着目した遺伝生化学的検証を進め、その結果、本研究で取り上げた呼吸系の役割に関する重要な予備的知見を得るに至った。

解読されている数々のゲノムに関する情報から、*Streptomyces*属をはじめとする放線菌群には一般に3種(シトクロム c 酸化酵素、シトクロム bd 型キノール酸化酵素、硝酸還元酵素)の異なる末端呼吸酵素が備わっていることが明らかである。これらの呼吸系の役割は、グルタミン酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* で特にそのアミノ酸発酵の基礎として詳しく検証されているが、*Streptomyces*属放線菌の生理における役割はこれまで全く調べられていなかった。我々は、*Streptomyces*属の二次代謝と形態分化にグルコースによる抑制と銅による促進が互いに相関して顕著におこることに基づいて、シトクロム c 酸化酵素複合体(いわゆる呼吸鎖末端の複合体 IV)の役割に着目した。本酵素は活性に銅を要求し、またその発現がグルコース抑制を受けることがいくつかの微生物において知られている。*S. coelicolor* A3(2)の *ctaCD* 遺伝子(ヘム-Cu 結合ドメインをコード)を破壊した変異株を取得した結果、やや増殖速度が低下するものの生育に大きな影響はないこと、その一方で抗生物質生産と気中菌糸への形態分化が全く起こらないことが判明した。この事実は、放線菌の栄養増殖には別の呼吸末端(おそらく bd 型キノール酸化酵素)が十分な機能を発揮するが、二次代謝と形態分化の開始にはシトクロム c 酸化酵素の活性が必須な役割を担うことを示していた。

## 2. 研究の目的

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、それらが一次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、その一次代謝との連携は重要な問題であり、本研究で取り扱った現象は、その問題に取り組むための具体的で普遍性の高い研究課題としてその意義は大きいと考えられた。

そこで、本研究では、*Streptomyces*の呼吸鎖末端に焦点を当てて特に次のことを明らかにすることを目的とした。

### (1)各呼吸鎖末端酵素の役割:

上記の3種の末端酸化酵素についてその欠損変異株を作成し、その生理的影響、特に二次代謝と形態分化の開始に対する影響を精査する。二次代謝産物の高生産性を賦与する末端酵素の分子内変異に関するデータを収集し構造面からの理解を深めると同時に発酵生産の高効率化への応用性を検討する。

### (2)呼吸鎖末端から分化開始への信号伝達:

上記で得られる変異株について網羅的な転写・翻訳産物解析を実施し、既知の信号伝達系をはじめとする一連の制御遺伝子の発現に対する影響を調査する。顕著な影響を受ける遺伝子についてその発現調節に関わる制御因子の同定と、その機能の呼吸鎖酵素との連動についてその生化学的基礎を明らかにする。

**(3)呼吸鎖末端酵素の発現調節:**シトクロム c 酸化酵素のグルコース抑制の問題について、その転写調節に関与する制御遺伝子を同定し、その役割に関する検討を上記①②と同様の戦略で推進する。特にグルコース抑制解除による物質生産の高効率化の可能性と汎用性を重点的に検討する。

## 3. 研究の方法

放線菌に3種存在する呼吸鎖末端酵素について、その①二次代謝・分化に対する役割、②信号の出口(下流の制御)、③信号の入口(上流からの制御)を解明するべく遺伝学・生化学的研究を実施した。各酵素の欠損変異体の作成ならびにそれらを用いた網羅的発現解析を推進し、特に転写レベルの制御に集約すると予想される一連の信号伝達系の解明を目指した。

### (1)各呼吸鎖末端酵素の欠損変異体の作成と二次代謝・形態分化への影響調査:

すでに確立できている効率的な遺伝子破壊法をもちいて *S. coelicolor* および *S. griseus* の各呼吸鎖酵素に関する欠損変異体を作成し、得られた変異体についてその二次代謝と形態分化への影響を細かく観察した。各呼吸鎖末端に作用する阻害剤が各形質に及ぼす影響についても同様の観察を実施するとともに、それに耐性を示す変異体を分離した。

### (2)呼吸鎖末端酵素の影響をうける信号伝達経路の同定と役割の解析:

*S. coelicolor* A3(2)の *ctaCD* 遺伝子破壊株について、その分化欠損の性質が親型に復帰するサプレッサー変異の取得を行った。得られた変異株の染色体を供与体に用い、親株を宿主とするショットガンクローニングによってサプレッサー遺伝子の同定を試みた。

### (3) 呼吸鎖末端酵素の発現調節機構の解明:

各呼吸鎖末端酵素をコードする遺伝子クラスターについて、そのプロモーター領域と転写単位を S1 マッピング法を主に用いた転写解析によって同定した。同定されたプロモーターの活性を、各種条件において測定した。銅イオン飢餓によって誘発される転写制御に関与することが予想された転写因子と関連の制御蛋白質をコードする遺伝子について、その破壊と組み換え蛋白質を用いて調節メカニズムを解析した。

### (4) 銅イオンの利用性が影響する多様な生理的特性の解析:

銅イオンを運搬する役割を担うと考えられている Sco1 に相同な ScoC をコードする遺伝子について、その破壊株が多様な形質変化を示したことに基づいて、ScoC による銅輸送が影響する銅要求性の蛋白質を探索し、特にフェノールオキシダーゼとリジロキシダーゼについて、定法によるその遺伝子破壊株の作成ならびに組み換え蛋白質を用いた生化学的解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 各呼吸鎖末端酵素の欠失変異体の作成と二次代謝・形態分化への影響調査:

全ゲノム配列が明らかにされているモデル株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) と *Streptomyces griseus* を用いて、末端呼吸系をコードする遺伝子群の破壊株を取得した。その結果、シトクロム c 酸化酵素に関連する遺伝子の破壊株はすでに取得されていた *ctaCD* 変異株と同様に顕著な形態分化と抗生物質生産の抑制が認められることを見いだした。また、代替の呼吸鎖をコードする *cydABCD* 遺伝子破壊株も類似の形質を示すことを明らかにした。

複合体 IV の破壊株にみられるグルコース特異的な酸生成は、クエン酸・ピルビン酸・リンゴ酸の蓄積によることが判明した。*Streptomyces* の野生株は液体培養の初期に菌体の凝集と沈降をおこすが、*scoC* 破壊株ではそれが認められないことが明らかになった。このことから、ScoC が菌体の凝集関与するリジロキシダーゼ HyaS の活性化に関与することが示唆された。

### (2) 呼吸鎖末端酵素の影響をうける信号伝達経路の同定と役割の解析:

*S. coelicolor* A3(2)の *ctaCD* 破壊株を用いた DNA マイクロアレイ解析を実施し、この破壊株では一次代謝に関連する遺伝子群の転写が全般に高くなっていることを見いだした。特に、ATP 合成酵素コード遺伝子群の転写量の上昇が顕著であったことに基づき、細胞内 ATP 濃度を測定した結果、*ctaCD* 破壊株ならびに *cydABCD* 破壊株でその顕著な蓄積が起こっていることを発見した。細胞内 ATP の濃度が分化開始の鍵になっていることが推測される。

ATP 合成阻害剤の添加が及ぼす影響を調査し、強力な脱共役剤として知られる CCCP の添加がいくつかの呼吸酵素変異株において顕著な分化誘導活性を示すことが明らかになった。*ctaCD* 破壊株の分化欠損に対するサプレッサー変異株の取得に成功し、その細胞内 ATP 濃度が野生株レベルに低下していることを見いだされた。

### (3) 呼吸鎖末端酵素の発現調節機構の解明:

複合体 IV に銅イオンを運搬する Sco1 蛋白質をコードする遺伝子の転写が数  $\mu\text{M}$  の銅イオンによって顕著に抑制されることを見いだした。また、conservon と呼ばれる放線菌に特異的に広く分布する機能未知の制御システムをコードする *cvn1* の破壊株についても同様のマイクロアレイ解析を行い、上記の *ctaCD* 破壊株と同様に一次代謝関連の多くの遺伝子の発現が上昇していることを見いだした。破壊株の性質に基づき、*cvn1* は一次代謝の制御に関与することが予想された。

*ScoC* 遺伝子の転写が銅イオンの添加によって抑制される現象について、同様の抑制が ECF  $\sigma$  因子とそのアンタゴニストをコードする *S. griseus* のオペロンにおいても起こっていることを見だし、銅イオンによって抑制されるプロモーター共通配列を見いだした。おそらく上記の ECF  $\sigma$  因子がこのプロモーターを認識・発現を司り、アンタゴニストによるその活性の抑制が銅イオンの添加によって促進されると予想された。

この *S. griseus* のオペロン (SGR6227-6228) について、それぞれの遺伝子破壊株を作成しその形質を観察した。その結果、両破壊株ともに気中菌糸形成・抗生物質生産の銅イオンへの応答性に低下が認められた。また、*scoC* 破壊株に見られたと同様に、菌体の凝集活性が欠損していた。凝集活性は銅イオンの添加によって回復したことから、これらの転写調節因子は *sco* オペロンまたは関連の銅イオン輸送システムの発現調節に関与している可能性が考えられた。

### (4) 細胞凝集に対するリジロキシダーゼ HyaS の役割:

放線菌細胞の凝集にタンパク質表面のリ

ジン残基に作用してアルデヒドを生成し架橋を形成する活性を有することが知られるリジルオキシダーゼが関与する可能性が考えられたことから、本酵素をコードすると予想される遺伝子 *hyaS* の破壊株を *S. griseus* において構築した。得られた破壊株は予想通りリジルオキシダーゼ活性を消失し、また細胞凝集活性も失っていた。*hyaS* の転写はグローバルレギュレーターである AdpA によって正に制御されていることから、この遺伝子にコードされるリジルオキシダーゼの活性を介した細胞の接着・凝集が放線菌細胞の分化に何らかの重要な意義を持っていることが強く示唆される。

#### 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 1 件)

① Fujimoto M, Yamada A, Kurosawa J, Kawata A, Beppu T, Takano H, Ueda K. Pleiotropic role of the *Sco1/SenC* family copper chaperone in the physiology of *Streptomyces*. *Microb Biotechnol.* in press.

[学会発表] (計 6 件)

①老沼研一, 山口 格, 高野英晃, 上田賢志. *Streptomyces coelicolor* が産出する菌体外ジアホラーゼの発見と解析. 日本農芸化学会 2012 年度大会. 2012/3/24. 京都女子大学

②高野英晃, 上田賢志. 放線菌 *Streptomyces griseus* における銅イオンに依存した転写抑制機構. 日本農芸化学会 2012 年度大会. 2012/3/23. 京都女子大学

③Fujimoto M, Yamada A, Takano H, Ueda K. Diverged Role of *Sco1/SenC* Family Copper Chaperon in the Developmental Physiology of *Streptomyces*. 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. 2011/12/13. Puerto Vallarta (Mexico)

④藤本正浩, 山田晃朗, 高野英晃, 上田賢志. 放線菌細胞の凝集現象: 銅シャペロン *Sco1* ホモログが果たす多様な役割. 日本農芸化学会 2011 年度大会. 2011/3/27. 京都女子大学

⑤藤本 正浩, 山田 晃朗, 高野 英晃, 上田 賢志. 放線菌細胞の凝集と沈降. 2010 年度日本放線菌学会大会. 2010/9/3. タワーホール船堀 (江戸川区船堀)

⑥藤本 正浩, 山田 晃朗, 高野 英晃, 上田 賢志. 放線菌の分化と二次代謝の開始においてシトクロム酸化酵素が果たす役割. 日本農芸化学会. 2010/3/28. 東京大学

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 活性汚泥処理法、活性汚泥処理剤、活性汚泥処理装置および活性汚泥処理システム

発明者: 高岡一栄、平田明日香、遠山朋子、斉藤政宏、上田賢志

権利者: 三井造船株式会社

番号: P 3 0 0 2 7

出願年月日: 平成 2 3 年 8 月 1 0 日

国内外の別: 国内

#### 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・准教授

研究者番号: 0 0 2 7 7 4 0 1

##### (2) 研究分担者

高野 英晃 (TAKANO HIDEAKI)

日本大学・生物資源科学部・助教

研究者番号: 5 0 3 8 5 9 9 4

##### (3) 連携研究者

該当なし