

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：82107

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292040

研究課題名(和文)放線菌の土壌環境適応戦略に関わる遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Study for gene expression control mechanism involved in the soil environment adaptation strategies of actinomycetes

研究代表者

藤井 毅 (FUJII, Takeshi)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所・その他部局等・領域長

研究者番号：00354100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子DasRは、土壌中で生育している*S. coelicolor*において、キチン存在下、キチン代謝関連遺伝子や抗生物質生産遺伝子群の発現制御に関与している。本研究では、DasRの発現を左右する制御因子を解明し、DasRを中心とした代謝制御カスケードを明らかにすることを目的に、DasRをコードする遺伝子*dasR*の転写調節領域に結合するタンパク質とDasRの発現調節因子の探索を試みた。その結果、DasR自身が強く*dasR*プロモーターに結合すること、また、その欠失がキチナーゼ生産量の増大とカタボライト抑制の喪失を招く転写因子がDasRの発現を制御することを見いだした。

研究成果の概要(英文)：In *Streptomyces coelicolor* growing in soil amended with chitin, a transcription factor DasR is involved in the regulation of expression of chitin metabolism-related genes and antibiotic production genes. In this study, in order to clarify the metabolic regulation cascade around the DasR, we tried to find factors which regulate *dasR* expression. As a result, we found that DasR itself binds strongly to *dasR* promoter, also that a transcription factor whose deletion leads to over production of chitinase and loss of catabolite repression of chitinase production controls expression of *dasR*.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現制御 転写カスケード キチナーゼ 抗生物質生産 放線菌 転写因子

1. 研究開始当初の背景

代表的な土壌細菌である放線菌は、他の微生物と競合しながら自然界に存在する基質を分解し栄養源としている。放線菌が自然環境中で分解する基質としては、キチンが挙げられる。キチンはセルロースに次いで自然界に多量に存在するバイオマスであるが、堅固な高次構造を有することから、その分解は簡単ではない。放線菌は、キチン分解酵素、キチナーゼを複数生産することで有名で、キチン分解能が放線菌同定の際の大きな指標にもなっている。我々は、いち早く放線菌キチナーゼに着目し、複数の放線菌キチナーゼ遺伝子をクローニングし、多くの放線菌が基質特異性の異なる構造的にも多様性に富んだ多数のキチナーゼ遺伝子を有することを明らかにした。また、キチナーゼがキチンを分解することによって生じる N,N' -ジアセチルキトビオース(キトビオース)によって、その膜輸送系蛋白質遺伝子とキチナーゼ遺伝子群の発現が誘導されること、また、グルコース存在下これら遺伝子の発現が強く抑制される等、放線菌のキチナーゼ遺伝子群の発現制御に関わる因子を研究してきた。

放線菌はこうした高分子基質を分解する酵素群を分泌する一方で、他の微生物の生育を抑えるために抗生物質を生産することでも有名である。これまで人類によって見いだされた有用な抗生物質や二次代謝産物の約6割は、放線菌類から見いだされたもので、医薬品の開発などで人類に多大な貢献をしてきた。放線菌における抗生物質の生産制御機構については、長年わたって膨大な量の研究が全世界で行われている。一般的に、放線菌の抗生物質生産は、孢子形成に至る一連の形態分化のプロセスや培地の栄養条件に大きく依存する。また、放線菌自身が生産するシグナル物質の生産から始まり抗生物質生産や形態分化に至る遺伝子発現カスケードに、多くの制御蛋白質が関与することも明らかにされている。我々も、抗生物質の生産制御蛋白質のプロモーターを特異的に認識するシグマ因子を明らかにしてきた。しかし、キチナーゼが生産される液体培養では形態分化は起こらず抗生物質は生産されないことから、これまでキチナーゼ生産は形態分化とは全く無関係であると思われてきた。

ところが近年キトビオースの取り込みに関与するキトビオース受容体の変異により、寒天培地上で放線菌の孢子形成に異常をきたすことが示され、放線菌のキチン代謝と形態分化が密接に関連していることが示唆された。また、キチンを構成する炭糖 N -アセチルグルコサミンの代謝調節蛋白質が、放線菌の形態分化と抗生物質生産に関与することからも、キチン代謝と抗生物質生産に何らかの関係があることが示唆された。申請者らは、先行する基盤研究(B)の課題、「土壌環境下における放線菌有用機能の発現制御ネットワークの解明」において、土壌中で生育してい

る放線菌 *Streptomyces coelicolor* にキチンを炭素源として加えた場合に誘導されてくる遺伝子群をゲノムワイドに解析した結果、キチナーゼ遺伝子群を始め主要な糖代謝や窒素代謝関連遺伝子ばかりでなく、ゲノム上に存在する複数の抗生物質生産関連遺伝子群がキチンによって誘導発現することを見いだした。さらに、その発現制御にこれまで様々な代謝遺伝子発現を制御することが知られていた転写制御因子 *DasR* が関与することを明らかにした。しかも、このようなキチンによる抗生物質生産関連遺伝子群の発現は土壌中で強く誘導されることから、土壌中の何らかの因子がその誘導に関与していることが示唆された。これは、土壌という元々放線菌が生存の場としている環境下で、餌となるキチンを他の土壌微生物と競合する際に抗生物質の生産を利用して、自らの生存に有利に働かせるという放線菌の土壌環境適応戦略の一端を示しているものと考えられる。

このような土壌環境下における抗生物質生産関連遺伝子群の発現制御機構が解明できれば、これまで液体培養ではその生産が確認されなかった新規抗生物質の発見や作物病原菌の防除技術、バイオマス廃棄物の除去技術等、放線菌を野外で利用する技術の開発に役立つことが期待される。我々は独自に開発した土壌からの RNA 抽出技術やマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析にこれまで精力的に取り組んできており、これらの解析技術を駆使して土壌環境下における放線菌の生存戦略を遺伝子発現制御の面から解き明かそうという本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

我々は、これまで先行する基盤研究(B)の課題において、マイクロアレイ解析により土壌中で生育する放線菌の網羅的遺伝子発現解析を行い、キチン存在下土壌中で生育している放線菌では、キチン代謝関連遺伝子や解糖系・窒素代謝等の主要代謝系遺伝子群ばかりでなく、複数の抗生物質生産遺伝子群の発現が高レベルに誘導されるという興味深い知見を得た。本研究では、土壌においてこれらキチン代謝関連遺伝子群や抗生物質生産遺伝子群の発現を制御することが明らかとなった転写因子、*DasR* を中心に、これら遺伝子群の発現制御に関わる転写因子群と制御カスケードを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株、培養条件

本研究では、放線菌でいち早くゲノム配列が明らかになった *S. coelicolor* A3(2)株の野生株 M145 とその派生株、及び放線菌、*S. lividans* の野生株 TK24 及びその派生株を供試菌として研究を行った。放線菌の培養は、液体培地の場合は30 振とう培養で、寒天平板培地の場合は、コロイダルキチンを唯一の炭素限としたキチン培地、R2YE 培地、

YEME 培地、SFM 培地を用いて 30 で培養し、定法 (Tobias Kieser, Mervyn J. Bibb, Mark J. Buttner, Keith F. Chater, David A. Hopwood (2000) Practical Streptomyces Genetic, John Innes oundation) に従い、それぞれキチナーゼ活性の検定や、形質転換、RNA 抽出、および孢子調整を行った。

(2) *dasR* プロモーター結合タンパク質のスクリーニングと解析

dasR 遺伝子の転写調節部位を含む DNA 断片を Dynabeads® MyOne™ Streptavidin T1 に結合させ、アフィニティーバインディングアッセイ系用のアフィニティービーズを作成した。このビーズと放線菌の細抽出液を混合し、15 分間室温で振とうさせた。15 分後、マグネットで樹脂を沈殿させ上清を回収した。バッファ 5 ml を加えて樹脂を洗浄、マグネットで樹脂を沈殿させ、上清を回収した。この洗浄操作を計 3 回行った後、2 M KCl Tris-HCl (pH8.0) 500 μl 加え、樹脂を懸濁し、マグネットで樹脂を沈殿させ、上清を回収した。この溶出操作を計 2 回行ない得られた画分を SDS-PAGE でビーズに固定化した *dasR* プロモーターに結合したタンパク質を分離、ゲルから抽出したタンパク質をトリプシン消化物の質量分析を行いタンパク質の同定を行った。

(3) 遺伝子発現量の定量

dasR 遺伝子やその標的遺伝子の発現を定量するため、*S. coelicolor* A3(2) のゲノム情報に基づき、*dasR* 遺伝子やその標的遺伝子と考えられている遺伝子について、定量 PCR を行うためにそれぞれの遺伝子に特異的なプローブの設計を行った。設計したプローブは、DNA 断片や液体培養細胞から抽出した RNA を鋳型にしたモデル系でその定量性を検証し、各遺伝子それぞれについてその発現を定量的に解析するための遺伝発現解析系を確立し、標的遺伝子の転写量を定量 RT-PCR を用いて測定した。

4. 研究成果

放線菌 *S. coelicolor* において、キチン代謝関連遺伝子群や抗生物質生産遺伝子群の発現を制御することが明らかとなった転写因子、DasR の発現を左右する制御因子を明らかにするため、1) DasR をコードする遺伝子 *dasR* の転写調節領域に特異的に結合するタンパク質をスクリーニングし、DasR の発現への制御の有無を確認するとともに、2) DasR がキチナーゼ生産を制御することに着目し、これまで我々が取得しているキチナーゼ生産に異常をきたした放線菌変異株の中から、*dasR* の発現に異常をきたしているものを探すこととした。

1) *dasR* の転写調節領域に特異的に結合するタンパク質のスクリーニングと解析

磁気ビーズに *dasR* の転写調節領域を含む DNA 断片を固定化し、その転写調節領域に特異的に結合するタンパク質をスクリーニングするためのアフィニティーバインデ

ィングアッセイ系を確立、この系を用いて、*dasR* 転写調節領域に結合するタンパク質のスクリーニングを行った結果、キチナーゼ関連遺伝子群の発現を誘導する誘導基質キトピオース存在下、および非存在下で、*dasR* 転写調節領域に結合する複数のタンパク質を検出することができた。これらタンパク質のバンドを切り出し、トリプシン消化物の質量分析を行いタンパク質の同定を試みた結果、非常に強く *dasR* 転写調節領域に結合するタンパク質として、*dasR* 遺伝子の遺伝子産物である DasR タンパク質とこれまでに *S. coelicolor* のアミノ酸代謝や抗生物質生産に関与することが明らかになっている転写因子 NdgR タンパク質が検出された。*dasR* 転写調節領域には DasR タンパク質が結合する際に標的となる DNA 配列、*dre* が存在することから、このアッセイ系が確かに転写領域に結合するタンパク質をスクリーニングできることが示唆された。このことから、NdgR も *dasR* の転写を制御する新たな転写因子であることが期待された。そこで、NdgR を解析している研究者から *ndgR* 変異株と *ndgR* 発現用プラスミドを譲り受け、*ndgR* 変異株における *dasR* の転写とキチナーゼ生産性を調べた。その結果、*ndgR* の変異は、グルコースやジアセチルキトピオースの存在下での *dasR* の転写量にほとんど影響が無いこと、大腸菌で大量生産した NdgR タンパク質の *dre* に対する結合が配列特異的なものでなく非特異的な結合によるものである事、さらにコロイダルキチン存在下のキチナーゼ生産性も *ndgR* 破壊株とその野生株でほとんど変わらなかったことから、この転写因子は、*dasR* 遺伝子の転写には関与していないことが明らかとなった。現在、アフィニティーバインディングアッセイの際の標的配列に対する結合特異性を高める条件を検討している。

2) キチナーゼ生産に異常をきたした放線菌変異株における *dasR* 遺伝子の発現解析

我々はこれまでに、放線菌 *S. lividans* の変異株の中に配列情報から転写因子と考えられる遺伝子にトランスポゾンが挿入された変異株 KG03 を見いだしている。この株は、野生株に比べ、キチナーゼ生産量が著しく高く、カタボライト抑制もかからなくなっている (図 1)。

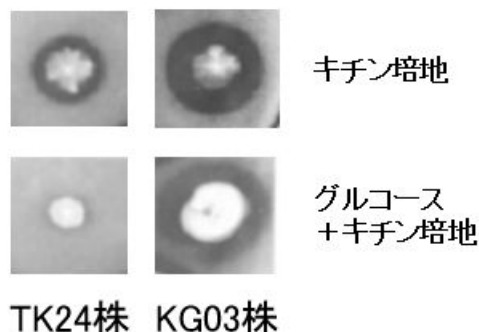


図 1. 放線菌 *S. lividans* の野生株 TK24 のゲノムにトランスポゾンが挿入されたことでキチナーゼの生産に異常をきたした KG03 変異株

この転写因子も DasR 同様キチナーゼ生産を制御していると考えられることから、この転写因子が *S. coelicolor* で DasR の発現を制御している、あるいは DasR によってその発現が制御されている可能性が示唆された。そこで、*S. coelicolor* のゲノム上に存在するこの転写因子様遺伝子のホモログ遺伝子を破壊した変異株を作成し、野生株とキチナーゼ生産を比較した結果、この破壊株は *S. lividans* の変異株 KG03 同様、野生株 M145 株に比べ、キチナーゼ生産量が著しく高く、カタボライト抑制もかからなくなっていることが確認され、この転写因子は、*S. coelicolor* でも DasR 同様キチナーゼ遺伝子群の転写制御に関与する因子であることが明らかとなった。そこで、この転写因子が DasR の発現を制御している可能性を確認するため、この遺伝子破壊株における *dasR* やキチン代謝関連遺伝子群の発現を野生株と比較した。その結果、キチン存在下増殖中の破壊株から経時的に RNA を抽出し、キチナーゼをはじめキチン代謝関連遺伝子群と *dasR* 遺伝子の発現を RT-PCR で定量し野生株と比較した結果、この遺伝子の破壊株では、*dasR* やキチン代謝関連遺伝子群の転写量が增大しており、この転写因子が、*dasR* をはじめキチン代謝関連遺伝子群の発現制御に関与していることが示唆された。現在、この転写因子遺伝子を大腸菌にクローニングし、遺伝子産物を大量に生成して、1) のアフィニティーバインディングアッセイ系の配列特異性を見直した後に、*dasR* 遺伝子の転写領域への結合性を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

- 1) Nazari B, Kobayashi M, Saito A, A Hassaninasab, Miyashita K, Fujii T (2013) Chitin induces gene expression in secondary metabolic pathways in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. (査読あり) 29: 707-713. DOI: 10.1128/AEM.02217-12.
- 2) Tomita M, Kikuchi A, Kobayashi M, Yamaguchi S, Ifuku S, Yamashoji S, Ando A, Saito A (2013) Characterization of antifungal activity of the GH-46 subclass III chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*. 104:737-748. (査読あり) DOI: 10.1007/s10482-013-9982-5
- 3) Saito A, Ebise H, Orihara Y, Murakami S, Sano Y, Kimura A, Sugiyama S, Ando A, Fujii T, Miyashita K. (2013) Biochemical and genetic characterization of the DasD protein possessing *N*-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiology Letters*. (査読あり) 340: 33-40. DOI: 10.1111/1574-6968.12069
- 4) 藤井毅・王勇 (2013) 土壌からの RNA の

抽出技術とその利用技術の開発, *In* 土壌微生物相の解明による土壌微生物性の解析技術の開発, 農林水産省研究成果, 494: 25-28, 農林水産省, 東京 (査読なし)

- 5) 王勇、長岡和成、早津雅仁、酒井順子、多胡香奈子、藤井毅、(2013) 土これまで困難だった黒ボク土壌からの RNA 抽出法の開発、農業環境技術研究所研究成果情報、29:36-37 (査読なし)
- 6) ベナムナザリ、藤井毅(2013) 土壌環境下、放線菌の抗生物質生産遺伝子群の発現がキチンによって誘導される、農業環境技術研究所研究成果情報、29:38-39
- 7) Kouzai Y, Saito A (2013) Organ- and stage-specific expression of the lectin gene in tomato. *静岡理工科大学紀要*. 26: 27-33. (査読なし)
- 8) Dohi H, Kanazawa T, Saito A, Sato K, Uzawa H, Seto Y, Nishida Y (2014) Bis(β-lactosyl)-[60] fullerene as novel class of glycolipids useful for detection and decontamination of biological toxins in *Ricinus communis* family. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 10:1504- 1512. (査読あり) DOI: 10.3762/bjoc.10.155.
- 9) 齋藤明広 (2014) キチン分解の分子生物学と土壌微生物学. *土と微生物*. (査読なし) 68: 79-80.
- 10) Sawaguchi A, Ono S, Oomura M, Inami K, Kumeta Y, Honda K, Sameshima-Saito R, Sakamoto K, Ando A, Saito A (2015) Chitosan degradation and associated changes in bacterial community structures in two contrasting soils. *Soil Science and Plant Nutrition*. 61: 471-480. (査読あり) DOI: 10.1080/00380768.2014.1003965.
- 11) Viens P, Dubeau M-P, Kimura A, Desaki K, Shinya T, Shibuya N, Saito A, Brzezinski R (2015) Uptake of chitosan-derived D-glucosamine oligosaccharides in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiology Letters*. (査読あり) 362: 1-9. DOI: 10.1093/femsle/fnv048.

〔学会発表〕(計 17 件)

- 1) 増田航, 齋藤明広「ナタマメ根粒からの微生物の分離と同定」日本土壌微生物学会大会, 東京農工大学府中キャンパス, 2013 年 6 月 20 日.
- 2) 須山奈月, 藤田実加子, 田澤健太, 中島政哉, 齋藤明広, 西田芳弘, 土肥博史「放線菌 ABC 輸送体の基質特異性解明に向けたキトビオース型二糖類の合成」日本糖質学会, 大阪国際交流センター, 2013 年 8 月 6 日.
- 3) 菊地彩美, 安藤昭一, 齋藤明広「キトサン検出用タンパク質プローブの開発と糸状菌の細胞壁構造の解析への利用」第 44 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (浜松), 静岡大学工学部, 2013 年 11 月 3

- 日 .
- 4) Akihiro Saito, Masayo Tomita, Ayami Kikuchi, Masashi Yamaguchi, Shinsuke, Ifuku, Akikazu Ando. Characterization of antifungal activity of the GH-46 subclass III chitinase from *Bacillus circulans* MH-K1. 10th Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium, 米子コンベンションセンター, 2013年10月13日 .
 - 5) 小野翔太, 本田一馬, 大村大, 澤口亜美, 坂本一憲, 鮫島(齋藤)玲子, 安藤昭一, 齋藤明広「土壌でのキトサンの分解と微生物群集構造の変化」日本微生物生態学会, 鹿児島大学, 2013年11月23日 .
 - 6) 藤井毅「土壌抽出 RNA から明らかになった抗生物質生産遺伝子の土壌における誘導発現」農業環境技術研究所 30周年セミナー(招待講演)2014年3月7日
 - 7) 齋藤明広「キトサン分解酵素の抗菌作用とキトサン検出用プローブの開発」第25回静岡ライフサイエンスシンポジウム(招待講演)静岡理科大学 2014年3月8日 .
 - 8) 岩堀昂平, 山本広也, 内田泰, 関清彦, 光富勝, 齋藤明広「『蟹漬』からのキチン分解微生物の分離」日本キチン・キトサン学会, 順天堂大学, 2014年8月7日 .
 - 9) 小野翔太, 桑田佑太, 本田一馬, 石丸梢, 山崎誠志, 鮫島(齋藤)玲子, 齋藤明広「キチン添加が畑土壌の微生物とキチン分解関連酵素に及ぼす影響」日本土壌肥料学会, 東京農工大学小金井キャンパス, 2014年9月10日 .
 - 10) 増田航, 畠中雄佑, 岡崎伸, 上村桂一, 齋藤明広「ナタマメ根粒菌から分離された細菌株の DNA-DNA 交雑法と MALDI-TOF/MS による類別」環境微生物系学会合同大会 2014, アクトシティ浜松, 2014年10月23日 .
 - 11) 飯野藤樹, ナザリベナム 齋藤明広, 王勇, 藤井毅「土壌環境下における放線菌キチナーゼ遺伝子群と抗生物質生産関連遺伝子群の発現誘導」環境微生物系学会合同大会 2014, アクトシティ浜松, 2014年10月23日 .
 - 12) 増田航, 畠中雄佑, 齋藤明広「ナタマメ根粒菌の分類と収穫量への影響」日本土壌微生物学会, つくば国際会議場, 2015年5月23日
 - 13) 齋藤明広「*Streptomyces* 属放線菌のキチン分解物トランスポーター」日本キチン・キトサン学会(招待講演), 東海大学熊本キャンパス, 2015年8月21日 .
 - 14) 井浪かおり, 小野翔太, 桑田佑太, 樽松愛理, 大塚恵巳, 鮫島(齋藤)玲子, 齋藤明広「畑土壌でのキチン分解とそれに伴う微生物群集構造と酵素活性の変化」日本キチン・キトサン学会, 東海大学熊本キャンパス, 2015年8月21日 .
 - 15) 鈴木道彦, 齋藤明広, 小林麻理子, 横山知史, 大宮祥子, 栗剣, 杉田慶, 三木邦夫,

齋藤純一, 安藤昭一「MH-K1 キトサナーゼの構造と反応機構」日本キチン・キトサン学会, 東海大学熊本キャンパス, 2015年8月21日 .

- 16) 井浪かおり, 桑田佑太, 鮫島(齋藤)玲子, 齋藤明広「キチン添加が畑土壌のキチン分解関連酵素と微生物に及ぼす影響 キチン添加 90 日後までの影響」日本土壌肥料学会, 京都大学, 2015年9月10日 .
- 17) Akihiro Saito, Chibaru Inuma, Takayuki Ohnuma, Tomonori Shinya, Yusuke, Kimura, Yuzusa Aoki, Liu Feng, Yoshitake Desaki, Naoto Shibuya, Tamo, Fukamizo, Akikazu Ando, Takeshi Fujii, Kiyotaka Miyashita " Uptake of a chitin-degradation product via the constitutive *N*-acetylglucosamine/*N,N*-diacetylchitobiose binding protein NgcE^{SCO} of an ABC transporter in *Streptomyces coelicolor* A3(2) ", 日本微生物生態学会, 土浦亀城プラザ, 2015年10月19日 .

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計1件)

名称: 抗生物質生産関連遺伝子のスクリーニング方法
発明者: 藤井毅、ナザリベナム
権利者: 独立行政法人農業環境技術研究所
種類: 特許
番号: 特願 2014-042420
出願年月日: 平成 26 年 3 月 6 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等

http://www.niaes.affrc.go.jp/researcher/fujii_t.html
<http://www.sist.ac.jp/col/teacher/search/detail/655>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
藤井 毅 (FUJII Takeshi)
国立研究開発法人 農業環境技術研究所・
生物生態機能研究領域・領域長
研究者番号: 00354100
- (2) 研究分担者
齋藤 明広 (SAITO Akihiro)
静岡理科大学・理工学部・准教授
研究者番号: 50375614
- (3) 連携研究者
なし