

平成21年5月21日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580097
 研究課題名（和文） 放線菌の分化と二次代謝の開始に対するグルコース抑制機構の解明
 研究課題名（英文） Study on the glucose repression mechanism for the initiation of morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces*
 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：

抗生物質をはじめとする生理活性物質を多様に生産するとともに、カビに類似の複雑な細胞分化を行うことで知られる細菌・放線菌において、その物質生産と細胞分化の開始の制御に着目した研究を推進した。その結果、放線菌が有する3種の呼吸鎖のうち、シトクロム酸化酵素が分化の開始に必須の役割を持つことを見いだした。本酵素が呼吸以外に分化の開始に制御的に連動するという知見はこれが初めてで、今後微生物を用いた物質生産に関する重要な基礎になると予想される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：Streptomyces; morphological differentiation; secondary metabolism; copper; regulation; terminal respiratory chain; conservon

1. 研究開始当初の背景

グラム陽性のバクテリアである放線菌は、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、産業および医療上重要な微生物である。放線菌はまた、カビに似た複雑な形態分化を伴う生活環を有することから、生物分化に関する遺伝解析のモデル生物としても重要である。現在までに3種の *Streptomyces* 属と1種の *Nocardia* 属を含む株のゲノム解読がなされ、9Mb 前後の巨大な

線状染色体がもつユニークな遺伝的諸性質が明らかにされている。そこから明らかになった衝撃的な事実のひとつは、それらの菌における生産性が知られていなかった化合物の生合成遺伝子群が数多く見いだされたことであり、従来の探索手法はそれらを見落としてしまっていることを示している。また、遺伝子発現の調節に関与する遺伝子群が多数存在し、この菌の生理・分化の複雑な遺伝制御体系の存在を裏付けている。この制御に

おける複雑性と二次代謝産物の見えない多様性の間には密接な関連があり、たとえば生産制御における脱抑制によって高生産をもたらすような培養法や育種法が開発できれば、従来では認知できなかった代謝産物の検出も可能になるものと期待される。

我々はこれまでに、*Streptomyces griseus* と *Streptomyces coelicolor* A3(2) を主な材料として用い、分化と二次代謝の開始を制御する主軸メカニズムとそれらに影響する環境因子群を同定してきた。前者については、特に *S. griseus* の *amf* 遺伝子群に焦点を当てた詳細な解析を行い、それが分化開始のスイッチとして機能するユニークなペプチドを生産するシステムであること、ならびに東京大学の堀之内教授らによって全体像が解明されつつある A-ファクターカスケードの最も下流に組み込まれる制御系であることを明らかにした。後者に関しては、異種間で作用する信号分子の存在から金属イオンや光などの環境因子群を見いだしたが、特に分化と二次代謝の開始に顕著なグルコース抑制が作用する現象が放線菌全般に広く認められることを明らかにした。

分化と二次代謝に対するグルコース抑制の問題は、基礎と応用の両面に関する課題としてこれまでにいくつかのモデル株において取り上げられてきた。特に、生産効率に大きな影響を与える点で重要が高く、その抑制を解除する育種によって高生産株が得られることが期待されている。最も遺伝学的解析の進んだモデル株 *S. coelicolor* A3(2) においては、分化と二次代謝の開始を行わない *bld* 変異株の多くが炭素源に依存した形質を示すことが以前より知られているが、この現象に対し、Pope ら (Mol Microbiol 19:747, 1996) は、*bld* 変異株に共通してグルコース抑制の異常が起こっていることを指摘し、*bld* 変異はグルコース抑制に影響する変異であるとする説を発表した。しかしそれ以後、分化・二次代謝の開始に対するグルコース抑制の問題に具体的な説明を与える知見は種を問わず得られていない。一次代謝におけるグルコース抑制の具体的なメカニズムに関しても、未だ極めて知見に乏しい状況にある。

我々は、図に示した *S. griseus* の A-ファクターカスケードに対するグルコース効果の影響を調査した。その結果、高濃度のグルコースは分化と抗生物質生産を顕著に抑制するが、一連の制御遺伝子の転写には大きな影響を与えないことが判明した。この結果は、グルコース抑制が A-ファクターとは独立して作用していることを示唆している。我々はさらに、微量の銅イオンの添加が見かけ上グルコース抑制を解除する効果を示すことを発見した。この事実は、銅イオンによって誘導される何らかの生理機能がグルコ

ース抑制メカニズムの中核に関連していることを示しており、我々は最近、それが末端呼吸系における銅利用性の調節にあることを突き止めた。呼吸活性と分化・二次代謝の開始が連動していることは合理的であると考えられるが、それに関連した知見はこれまでにほとんど得られていない。さらに我々は、

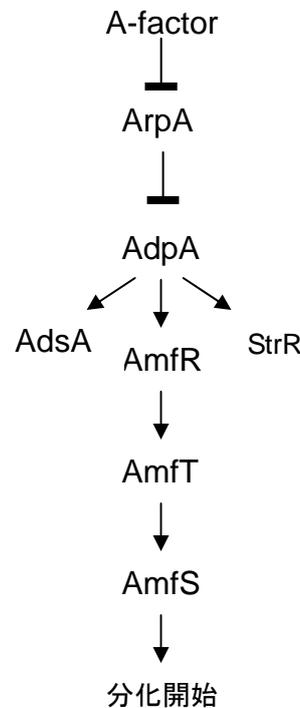


図 分化開始制御系 Amf は A-ファクターカスケードに含まれる

conservation と呼ばれるユニークなオペロンが GPCR 様の制御系をコードすることを初めて明らかにし、それが一次代謝と二次代謝の連携を調節しているという全く新しい可能性を最近見いだした。

2. 研究の目的

上記の背景に基づき、本研究では未だ明らかにされていない放線菌の分化と二次代謝の開始に対するグルコース抑制の遺伝メカニズムを解明することを目的とした。我々の作業仮説は、一次代謝におけるグルコース抑制と、分化・二次代謝の開始に対するグルコース抑制系が連携しており、その信号伝達が A-ファクターによる自己調節シグナル伝達と下流で合流し、分化のスイッチを入れる、という図式である。本研究では、A-ファクターカスケードとは独立して調節体系をなすと予想される呼吸系の制御に焦点をあてて検討を進めると同時に、主に遺伝学的手法

を用いて関連制御因子の広範な探索を行った。また、*S. coelicolor* を材料として積極的に取り入れ、同様の制御に関する知見の収集に努めた。分化と二次代謝の開始に対するグルコース抑制現象が放線菌に普遍的であることから、本研究によって得られる知見は、放線菌全般における遺伝制御メカニズムに共通性の高い重要な情報を与えると期待され、高効率物質生産を賦与する培養法ならびに菌株育種法を確立することを目的とした応用研究に橋渡しできる点で将来性も高く見込まれる。

3. 研究の方法

平成19年度

(1) 末端呼吸系の調節と分化・二次代謝への連動

前年度の解析によりストレス応答 σ 因子群と分化・二次代謝開始のグルコース抑制の関連性が明確になった場合は、各 σ 因子群によって特異的に転写されるレギュロン遺伝子群を網羅的に同定する。一方、現段階で一つの可能性として予測されるように anti-anti- σ 因子である BldG の役割がグルコース抑制機構とリンクしている場合は、ストレス応答 σ 因子の経路と並行して当制御蛋白により制御を受ける他の制御系を同定するための実験を遂行する。その際、主に BldG 蛋白質と相互作用する蛋白質のスクリーニングを中心に進める。

(2) conservon のグルコース抑制における役割

これまでに真核生物の GPCR に類似の膜信号伝達系をコードすることが我々によって明らかになっている Conservon について、その G 蛋白サブユニットが相互作用すると推測される未知のエフェクター蛋白を同定する。このエフェクター蛋白の機能がグルコース抑制の解除と分化・二次代謝の開始を連動させる制御系を明らかにする鍵を握ると考えられる。in vitro および in vivo の pull-down アッセイおよび two-hybrid システムを用いたスクリーニングにより、*S. coelicolor* A3(2) の CvnD9 蛋白に特異的に相互作用する蛋白を取得する。

(3) 分化・二次代謝に対するグルコース抑制耐性変異株の分離

グルコース抑制を遺伝学的に解析するために一般に用いられるグルコース耐性変異株の取得は、これまでなされてこなかった。その原因としてデオキシグルコースなどのアナログ体が顕著に増殖を阻害する活性を示すことにあった。そこで、ここでは改めて高濃度グルコースを用いてそれに耐性的に分化・抗生物質生産を開始する *S. griseus*

の変異株の取得を行う。得られた変異株について一連の表現形質と既知の制御遺伝子の転写活性を調査し、分類する。その中に宿主として安定な株を選抜し、それを用いたショットガンクローニングによって相補遺伝子の取得をおこなう。

(4) グルコース依存的な形態分化の抑制を賦与する遺伝子群の解析

すでに取得されている、プラスミド上で導入することで野生株の形態分化ならびに抗生物質生産を炭素源依存的に抑制する性質を示す DNA 断片について、その塩基配列の決定とコードされる蛋白質群の機能と役割に関する検討をおこなう。*S. coelicolor* A3(2) を用いて、これまでに知られている分化後期に発現することが知られている制御遺伝子群のプロモーターを網羅的に調査し、グルコース抑制をうけるプロモーターを同定する。また、並行してすでに導入した同菌の DNA マイクロアレイを用いてグルコースに依存的に発現が変動するならびにグルコース抑制に何らかの関与が予想される銅イオンに依存的な遺伝子群を検索する。

平成20年度

(1) 末端呼吸系の調節と分化・二次代謝への連動

前年度の解析によりストレス応答 σ 因子群と分化・二次代謝開始のグルコース抑制の関連性が明確になった場合は、各 σ 因子群によって特異的に転写されるレギュロン遺伝子群を網羅的に同定する。一方、現段階で一つの可能性として予測されるように anti-anti- σ 因子である BldG の役割がグルコース抑制機構とリンクしている場合は、ストレス応答 σ 因子の経路と並行して当制御蛋白により制御を受ける他の制御系を同定するための実験を遂行する。その際、主に BldG 蛋白質と相互作用する蛋白質のスクリーニングを中心に進める。

(2) conservon のグルコース抑制における役割

前年度に引き続き CvnD9 に相互作用するエフェクター蛋白の探索、ならびに得られた蛋白の機能と役割に関する遺伝学ならびに生化学的解析を推進する。エフェクター分子の機能からグルコース抑制メカニズムとその解除の機構を推測し、特に分化・二次代謝の開始を制御することが知られる *bld* カスケードとの関わりを転写レベルで明らかにする。

(3) 分化・二次代謝のグルコース抑制に関与する DNA 断片の解析

前年度に取得したグルコース耐性変異株を宿主に用いて相補遺伝子の取得を広範におこなう。得られた DNA について塩基配列の決定を行い、相補に関与する遺伝子の特定、そこにコードされる蛋白質の機能と役割に

関する遺伝生化学的解析を進める。昨年度に先行してすすめている、プラスミド上で導入することで野生株の形態分化ならびに抗生物質生産を炭素源依存的に抑制する性質を示すDNA断片についても引き続き関連蛋白質群の機能と役割に関する検討をおこなう。また、グルコース抑制をうける分化・二次代謝に対する後期制御遺伝子のプロモーターを検索し、その制御に関与する転写調節蛋白質群を同定するための実験を進める。

(4) グルコース抑制機構と既知の信号伝達系および一次代謝との関連性

上述の方法によって明らかになった分化・二次代謝開始のグルコース抑制に関与する制御遺伝子群が、A-ファクターカスケードをはじめとする既知の信号伝達系並びに一次代謝とどのように連動するかを明らかにするための実験を計画し、遂行する。現段階において予想される体系の概略は、一次代謝におけるグルコース抑制と今回解明を目指す分化・二次代謝開始にリンクするグルコース抑制系が連携しており、その信号伝達がA-ファクターによる自己調節シグナル伝達とその最も下流で合流し、分化のスイッチを入れる、という図式である。

4. 研究成果

(1) 末端呼吸系の調節と分化・二次代謝への連動

ゲノム情報及び相同組換え技術を用いて *S. coelicolor* および *S. griseus* のシトクロム酸化酵素関連の種々の遺伝子破壊株を作製し、その表現型を観察した。銅イオン特異的キレート剤を添加した培地では *S. griseus* 野生株における形態分化能及びストレプトマイシン(Sm)生産能は低下するが、*sco1* の破壊株においても野生株に比べ形態分化能及びSm生産能の顕著な低下が認められた。また *S. coelicolor* や *S. avermitilis* における *sco1* 破壊株においても形態分化能及び二次代謝産物生産能の顕著な低下が認められ、これら *sco1* 破壊株の表現型は培地中への銅イオン添加によって回復した。

次に *S. coelicolor* においてシトクロム酸化酵素のヘム-Cu結合ドメインをコードしている *ctaCD* 遺伝子の破壊株を作製し、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、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を観察した。これらの結果から、末端酸化酵素の活性が形態分化と二次代謝に何らかの重要な連携を有することが示唆された。また *ctaCD* 破壊株はグルコースを唯一の炭素源とする最小培地において生育速度に変化は認められないがマルトースを唯一の炭素源とする場合の

み野生株に比べ顕著な生育速度の低下が認められ、従来の末端酸化酵素としての役割以外にグルコース抑制に関する機能を有していることが示唆された。

また、代替の末端呼吸系(キノールオキシダーゼ)をコードする *cyd* オペロンの破壊株を *S. coelicolor* を用いて作出した。その結果、気中菌糸への分化ならびに色素性抗生物質の生産が顕著に阻害された上記の *ctaCD* の破壊株に対比して、キノールオキシダーゼの破壊株では分化と抗生物質生産はやや抑制されながらも開始することが判明した。このことから、シトクロム酸化酵素複合体は増殖には必須ではないが、分化と二次代謝の開始には必須であることが強く示唆された。

さらに、*ctaCD* 依存的に転写量が変動する遺伝子を探索するために、*S. coelicolor* 野生株と *ctaCD* 破壊株についてDNAマイクロアレイ解析を行った。その結果、抗生物質合成遺伝子を含む274個の遺伝子において転写量が変動していた。これらをもとに、銅イオンによる放線菌の分化・二次代謝促進現象機構が解明されると考えられる。

上記の呼吸鎖の役割を明確にするために、阻害剤の効果についても検証した結果、銅特異的キレート剤BCDAならびに呼吸阻害剤アジ化ナトリウムはいずれも分化の開始を阻害することが観察された。BCDA耐性を示す変異株の中にはアジ化ナトリウムに耐性を示すものがみつかることから、これらの阻害剤が共通の標的に作用していることが示唆された。また、いくつかの分化欠損株は低濃度のアジ化ナトリウムの添加で分化が顕著に回復する性質を示すことも明らかになった。

(2) *conservon* のグルコース抑制における役割

分化と二次代謝のグルコース抑制に制御的に関連することが示唆されている *cvn* オペロンについて、*S. coelicolor* A3(2)が有する13コピーの網羅的破壊を実施した。その結果、*cvn1* の破壊株において培地炭素原に依存する複雑な形質の変化が認められた。これまでに得られている *cvn9* の破壊株同様、*cvn1* オペロンの完全欠失株は、グルコースによる分化の抑制を受けにくい形質を示す一方で、グルコース非存在下における分化は抑制される性質を示した。*cvn1* オペロンの *CvnA* 成分は他のオペロンの同成分と比較して鎖長が長く、その機能に今回の顕著な形質変化が関連している可能性が考えられた。

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0件)

[学会発表] (計3件)

- 1) 藤本正浩、野坂草馬、高野英晃、上田賢志、別府輝彦、放線菌の抗生物質生産と形態分化に対してシトクロム酸化酵素が果たす役割. 日本農芸化学会平成21年度大会(平成21年3月29日, 博多)
- 2) 高野英晃、藤本正治、野坂草馬、黒澤隼平、河田章寛、別府輝彦、上田賢志、銅蛋白Sco1の役割;なぜ銅イオンは放線菌の分化と二次代謝を促進するか. 日本放線菌学会平成20年度大会(平成20年7月11日, 山梨)
- 3) 山本泰弘、高野英晃、上田賢志、別府輝彦、放線菌*Streptomyces coelicolor*におけるconservonの網羅的破壊. 日本農芸化学会平成20年度大会(平成20年3月28日, 名古屋)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

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: 00277401

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

高野英晃(TAKANO HIDEAKI)
日本大学・生物資源科学部・助手
研究者番号: 50385994

別府輝彦(BEPPU TERUHIKO)

日本大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号: 80011873