

機関番号：32658

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21780081

研究課題名（和文） 放射菌における新規窒素代謝の解析

研究課題名（英文） Analysis of the novel nitrogen metabolism in *Streptomyces*.

研究代表者

佐々木 康幸（SASAKI Yasuyuki）

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：50398814

研究成果の概要（和文）：放線菌の好氣的に生産する膜結合型硝酸還元酵素（dNar）の生理的意義について解析した。作成した dNar 破壊株は野生型と比較して抗生物質生産に異常をきたした。また一酸化窒素(NO)ジオキシゲナーゼであるフラボヘモグロビン破壊株でも同様に二次代謝に影響が表れた。

研究成果の概要（英文）： We analyzed physiological roles of aerobic membrane-binding type nitrate reductase (dNar) and nitric oxide dioxygenase (flavo-hemoglobin) in *Streptomyces coelicolor*. As a result, the dNar destruction caused abnormality to the antibiotic production compared with that of a wild type. Moreover, the influence also appeared for the secondary metabolism in the flavo-hemoglobin destructant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：遺伝学、酵素学

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで絶対好気性細菌とされてきた土壌細菌である放線菌 *Streptomyces* 属細菌に、嫌氣的に生育可能な *S. antibioticus* を見出した。*S. antibioticus* に見出された新規窒素代謝系（図1）について、解析を行った結果、異化型硝酸塩還元酵素とフラボヘモグロビンが、本代謝系の主要構成酵素であることが示唆された。

異化型硝酸塩還元酵素（dNar）は、嫌気条件かつ硝酸塩存在時において発現、生産され

ることが、既知の知見であった。しかし、本菌は好氣的かつ硝酸非添加にも関わらず、dNar を生産しており、また本培養条件で有機体窒素から生産される亜硝酸と dNar の関連性があった。

以上の生命現象における本酵素らの生理的意義について同様の現象が観察された *S. coelicolor* について解析を開始した。

Novel Dissimilatory Nitrogen Metabolism in Actinomycetes
(Hypothesis)

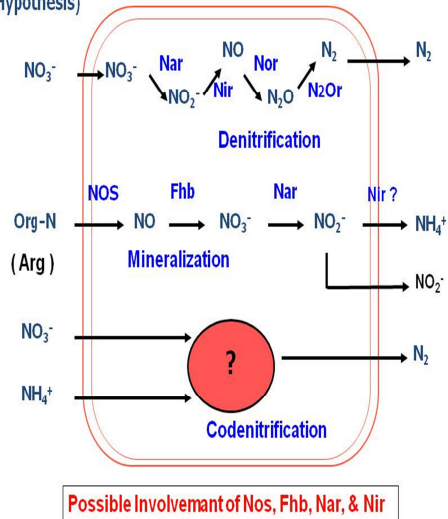


図1 *Streptomyces antibioticus* の新規窒素代謝経路（予想）と関連すると考えられる酵素群

Nar: 異化型硝酸塩酵素, Nir: 同化型ア硝酸塩還元酵素, Nor: 一酸化窒素還元酵素, N2Or: 亜酸化窒素還元酵素, NOS: 一酸化窒素合成酵素, Fhb: 一酸化窒素ジオキシゲナーゼ（フラボヘモグロビン）

2. 研究の目的

本研究は抗生物質、抗癌剤、免疫抑制剤生産菌として人類にとって非常に有用な放線菌の新たな窒素代謝系を分子レベルで明らかにし、各種発酵生産において本菌群の通気制御などの生育制御や、また本代謝系を利用した排水処理技術の開発などの応用面での目的と、さらには地球上の窒素サイクルの新たな知見を得ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) *S. coelicolor*A3(2)の異化型硝酸塩還元酵素 dNar は染色体上に3コピー存在する。dNar は三量体の細胞膜結合型の酵素で、触媒サブユニットのサブユニットは遺伝子 *narG* にコードされており、本研究では、この *narG*, *narG2*, *narG3* のそれぞれの単独破壊と3つ同時破壊株の作成を試みた。さらに表現型を野生株と比較した。

(2) flavohemoglobin は一酸化窒素(NO)を硝酸に還元する酵素である。これまで報告されている知見では、本酵素は、NO に対する解毒酵素で、外来の NO あるいは NO 発生剤によって細胞内での生産が誘導されることが知られている。しかし、本菌の flavohemoglobin はこれまでの結果から、非

NO ストレス条件下でも生産されており、本酵素のコードする *hmpA* 遺伝子の破壊を試みた。さらに表現型を野生株と比較した。

(3) 我々の研究グループにより *S. antibioticus* は細胞内に一酸化窒素を生産することが明らかとなっている。そこで *S. coelicolor* も *S. antibioticus* と同様に一酸化窒素を細胞内に生産するかを検証するため、一酸化窒素蛍光試薬 DAF-2DA を細胞内に取り込ませ、蛍光顕微鏡で観察した。また flavohemoglobin 過剰発現株を作成するため、pIJ6902 vector に *hmpA* 遺伝子を挿入し、*S. coelicolor* に導入した。本過剰発現系は、抗生物質であるチオストレプトンの添加により、制御可能である。過剰発現株作成後、放線菌の生産する一酸化窒素について検証した。表現型を野生株と比較した。

4. 研究成果

(1) *S. coelicolor* の持つ異化型硝酸塩還元酵素 dNar 生産能欠損株を作成し、野生株と比較した結果、培養後3日目、4日目の固体培地上において、野生株では、ウンデシルプロジギオシン（赤色素）の生産は確認されるが、一方、dNar 生産能欠損株では、野生株と比較して顕著にアクチノロージン（紫色素）の生産活性が上昇した（図2）。

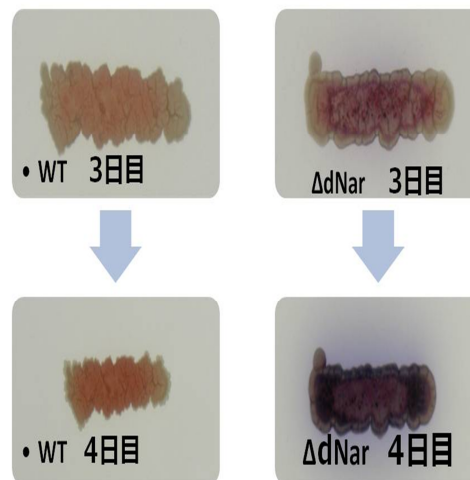


図2 *S. coelicolor* 野生型と dNar 破壊株の抗生物質生産能の比較
固体培地には Bennet 培地を使用した。赤色素: ウンデシルプロジギオシン, 紫色素: アクチノロージン

(2) *S. coelicolor* の恒常的発現している flavohemoglobin 生産能欠損株を取得した。結果、野生型と比較して、孢子形成能とアクチノロージン(紫色素)生産能が顕著に増加した(図3)。さらにこの現象は、*hmpA* 遺伝子を再導入することで相補され、本現象に flavohemoglobin が関与していることが明らかとなった。

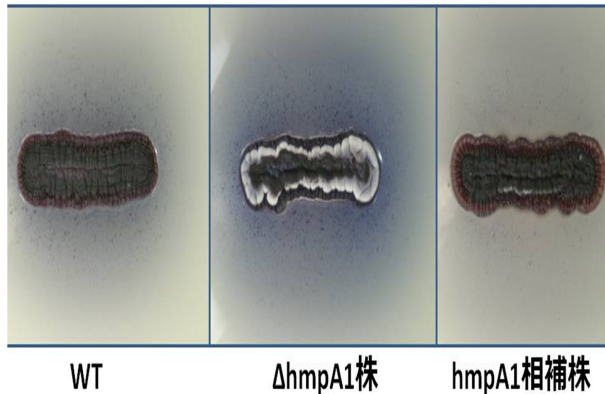
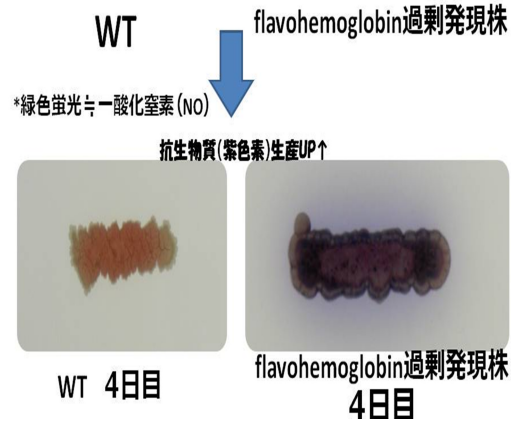
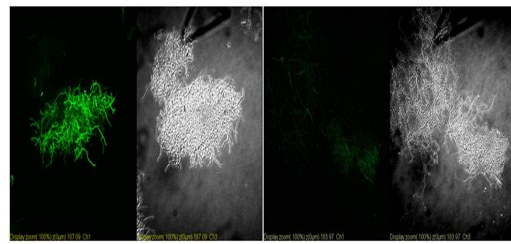


図3 野生株と flavohemoglobin 破壊株の表現型比較

(3) *S. coelicolor* が生体内に一酸化窒素を生産しているかどうかを検証するために、一酸化窒素蛍光指示薬 DAF-2DA を細胞に取り込ませ、蛍光観察した。その結果、蛍光が観察され、本菌は *S. antibioticus* と同様に一酸化窒素を何らかの基質から生産していることが明らかとなった(図4)。更に観察された蛍光、即ち一酸化窒素は flavohemoglobin 過剰発現によって消失した。また、flavohemoglobin 過剰発現株では、野生型と比較して、抗生物質アクチノロージンの生産能が上昇した(図4)。



(図4) *S. coelicolor* の一酸化窒素生産及び flavohemoglobin 過剰発現株と野生型の表現型の比較

以上の結果から、新たにいくつかの新規な生命現象が明らかとなり、非常に有意義な結果が得られた。今後は、一つ一つの現象について、その原因を分子レベルで解明していく予定である。

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)

〔学会発表〕(計2件)

1. 放線菌における異化型硝酸塩の関連した窒素代謝系の解析
日本農芸化学会
H20年3月(東京)

2. 嫌気条件下における *Streptomyces coelicolor* のプロテオーム解析
日本農芸化学会
H20年3月(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 康幸 (SASAKI Yasuyuki)
東京農業大学・応用生物科学部・助教
研究者番号: 50398814

(2) 研究分担者

無

(3)連携研究者
無