

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25712008

研究課題名(和文)放線菌の転写・翻訳系改変による潜在能力活性化機構の解明と二次代謝産物発掘への応用

研究課題名(英文)Clarification of the mechanisms by which improved transcription/translation apparatus in actinomycetes exploits their potential and its application to explore new secondary metabolites

研究代表者

保坂 毅 (HOSAKA, Takeshi)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号：50391206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,800,000円

研究成果の概要(和文)：Streptomyces 属放線菌の抗生物質高生産リファンピシン耐性変異株、ストレプトマイシン耐性変異株、及びエリスロマイシン耐性変異株を用いた解析から、RNA ポリメラーゼやリボソームにおける点変異が、転写や翻訳の機能のみならず、ATP 産生やDNA 複製の仕組みまでも大きく変えることを突き止めた。そのような細胞全体の複雑な変化が二次代謝活性化をもたらすことを見出した。加えて、翻訳系を標的とする抗生物質の濃度依存的現象(ホルミシス効果)で放線菌の潜在的二次代謝能を効果的に引き出せることを見出し、その原理の活用が放線菌からの新しい二次代謝産物発掘に向けて極めて有用であることを実験的に証明した。

研究成果の概要(英文)：Biochemical and molecular biology analyses with antibiotic-overproducing drug-resistant mutants (rifampicin-, streptomycin-, and erythromycin-resistant mutants) of Streptomyces spp. revealed that a mutation in RNA polymerase, ribosomal protein or ribosomal RNA altered not only the transcription and translation apparatus but also the mechanisms of ATP generation and accuracy of DNA replication, resulting in activation of secondary metabolism, suggesting that such a dramatic alteration of cellular function causes increased production of secondary metabolites in Streptomyces strains. In addition, this study found that ribosome-targeting antibiotics at subinhibitory concentrations potentiate the production of secondary metabolites in Streptomyces strains and indicated that activating these strains by utilizing the dose-response effects of ribosome-targeting antibiotics could be used to effectively induce the production of cryptic secondary metabolites.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放線菌 二次代謝 抗生物質 転写 翻訳 RNAポリメラーゼ リボソーム

1. 研究開始当初の背景

ゲノム生物学の目覚ましい発展を背景に、様々な微生物の全ゲノム配列が次から次へと解読されている。抗生物質に代表される有用二次代謝産物の宝庫とされる放線菌では、放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)をはじめ、*Streptomyces avermitilis* (エバーメクチン生産菌)、さらには *Streptomyces griseus* (ストレプトマイシン生産菌) などの代表株における全ゲノム配列が決定された[Bentley, S. D. et al., *Nature* 417 (2002), Ikeda, H. et al., *Nat. Biotechnol.* 21 (2003), Ohnishi, Y., et al., *J. Bacteriol.* 190 (2008)]。その解析から、放線菌においては、二次代謝産物の生産に関与する遺伝子の多くが潜在的に存在していることが判ってきた。この事実から、“放線菌の潜在遺伝子(潜在能力)を目覚めさせれば、有用な二次代謝産物を新たに発見できる”という放線菌研究における新しい方向性が見えてきた。この事実を受けて、国内外の多くの研究者が放線菌における潜在遺伝子の重要性に着目し、その活性化と利用に向けた技術開発を進めている。放線菌における潜在能力の活性化事例としてこれまでに、one strain-many compounds (OSMAC) アプローチや遺伝子発現を劇的に変化させる化合物(希土類元素を含む化合物など)の培地への添加、さらには異種細菌を利用した複合培養など、培養そのものを工夫する手法、また、遺伝子工学技術を駆使して遺伝子発現そのものを直接的に操作する手法などが報告されている[Bode, H. B. & Muller, R., *Angrew. Chem. Int. Edn. Engl.* 44 (2005), Tanaka, Y. et al., *J. Antibiot.* 63 (2010), Onaka, H. et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011), Chiang, Y.M. et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15 (2011)]。一方、放線菌にリファンピシン(RNAポリメラーゼを標的とする薬剤)やストレプトマイシン(リボソームを標的とする薬剤)に対する耐性を付与すると、抗生物質生産が劇的に増大することがある。このような現象が認められるリファンピシン耐性変異株は RNAポリメラーゼ β

サブユニットをコードする *rpoB* 遺伝子に、ストレプトマイシン耐性変異株はリボソームタンパク質 S12 をコードする *rpsL* 遺伝子などに、それぞれ特定の変異を有する。研究代表者らは、これらの事実をもとに、特定の *rpoB* 変異や *rpsL* 変異が定常期の放線菌細胞内における RNAポリメラーゼ(転写)やリボソーム(翻訳)の機能を変化させ、結果的に放線菌が潜在能力を発揮(抗生物質を高生産)することを突き止めた[Ochi, K. et al., *Adv. Appl. Microbiol.* 56 (2004), Hosaka, T. et al., *Mol. Microbiol.* 61 (2006)]。さらに、研究代表者らは、上記の原理を抗生物質非生産性の放線菌 *Streptomyces* sp. 631689 に活用して、ペペリジン 4 分子を包含する新規な構造の抗生物質を発見した(放線菌の潜在能力を活性化することで、新しい二次代謝産物を発見できることを世界に先駆けて実証した)[Hosaka, T. et al., *Nat. Biotechnol.* 27 (2009)]。

以上のことから、薬剤耐性変異の利用により放線菌の転写・翻訳系を改変して潜在的な二次代謝産物生産能力を引き出すアプローチは、放線菌の代謝産物から新しい有用化合物を発掘するための有効な手法となることが期待できる。従って、この手法を実際に応用展開するとともに、放線菌における潜在的な二次代謝能の発現機構を解き明かすことは、放線菌利用の高度化を図る上で極めて重要な課題であると考え、本研究を実施するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、以下3つの検討課題に取り組み、放線菌の転写・翻訳系改変することでその潜在能力(潜在的な二次代謝産物生産能力)が目覚める仕組みを明らかにする。さらに、得られる新知見を活かして、放線菌の二次代謝活性化研究における新たな概念と技術を創出する。

(1) 転写・翻訳系の機能変化をもたらす抗生物質耐性変異による放線菌の二次代謝活性化機構の解析。

(2) 翻訳系を標的とする抗生物質のホルミ

シスによる二次代謝活性化現象の解析。

(3) 放線菌の二次代謝能活性化による新しい有用生理活性物質の探索。

3. 研究の方法

放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) とその近縁種 *Streptomyces lividans* 66 の野生株と薬剤耐性変異株を用いて、転写・翻訳系の機能変化をもたらす抗生物質耐性変異（リファンピシン耐性変異，ストレプトマイシン耐性変異，及びエリスロマイシン耐性変異），あるいは翻訳系を標的とする抗生物質のホルミシス効果が，放線菌の二次代謝能を向上させる仕組みを生化学・分子生物学的視点から解析した。加えて，抗生物質耐性変異や抗生物質のホルミシス効果を活用することで，様々な放線菌の潜在的二次代謝能を活性化できるか否かを検証し，これらの手法を駆使して新しい二次代謝産物の探索に取り組んだ。

4. 研究成果

(1) 転写・翻訳系の機能変化をもたらす抗生物質耐性変異による放線菌の二次代謝活性化機構の解析。ストレプトマイシン耐性変異及びエリスロマイシン耐性変異に関して興味深い新知見を得ることができた。以下に詳細を述べる。

① ストレプトマイシン耐性変異による二次代謝活性化機構。放線菌基準株 *S. coelicolor* A3(2)においてリボソームタンパク質 S12 の 88 番目のリジン(Lys, K)がグルタミン酸(Glu, E)に置換したストレプトマイシン耐性変異株 (*rpsLK88E* 変異株) は抗生物質を高生産する。種々の生化学・分子生物学的解析から，*rpsLK88E* 変異が 65 種類のシグマ因子の発現プロファイルを大幅に変化させ転写制御に大きな影響を与えること，さらには，この変化が定常期における翻訳因子発現量を増大させ高翻訳活性化の維持をもたらすこと，結果的に抗生物

質合成酵素の発現量を上昇させること，これらが原因となり変異株抗生物質を高生産することが判ってきた。さらに詳細な仕組みを解析するため，すなわち，*rpsLK88E* 変異による転写制御の変化に関わる因子を特定するために，野生株と *rpsLK88E* 変異株の様々な培養時期の細胞からリボソームを調製し，リボソームタンパク質やリボソーム会合タンパク質の存在量を詳しく比較解析した。その結果，*rpsLK88E* 変異株の遷移期及び定常期のリボソーム会合タンパク質画分に F_0F_1 ATP 合成酵素 α サブユニットが野生株よりはるかに多量含まれることが明らかとなった。この結果から，*rpsLK88E* 変異が F_0F_1 ATP 合成酵素 α サブユニットをリボソームに引き寄せる可能性があるものと推察した。 F_0F_1 ATP 合成酵素の局在が乱れることで酵素全体の機能が変化すると，細胞内 ATP 量のバランスが変化する。 F_0F_1 ATP 合成酵素で生産される ATP は，細胞内の重要なエネルギー物質であるとともに，RNA 合成の基質でもある。従って， F_0F_1 ATP 合成酵素の変化が転写に甚大な影響を及ぼすことは大いに考えられる。以上のように，*rpsLK88E* 変異による抗生物質高生産化の根本原理の解明に繋がる重要な知見を得ることができた(図 1)。

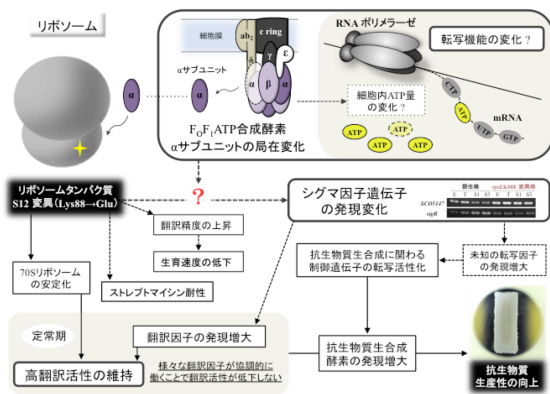


図 1 放線菌基準株 *S. coelicolor* A3(2) の *rpsLK88E* 変異株における転写機構改変メカニズム及び二次代謝活性化機構。

② エリスロマイシン耐性変異による二次代謝活性化機構。

先行研究において，放線菌へのエリスロマイシ

ン耐性の付与が、同菌の潜在的二次代謝を活性化させる現象を見出した。本研究では、放線菌基準株 *S. coelicolor* A3(2) を用いた解析から、二次代謝が活性化したエリスロマイシン耐性変異株が 23S rRNA 遺伝子と *nsdA* (negatively affecting *Streptomyces* differentiation) 遺伝子に点変異を有することを新たに明らかにした。これらの変異[23S rRNA 遺伝子の変異(*rrnA* 変異)と *nsdA* 変異]がエリスロマイシン耐性と二次代謝活性化にどのように関与しているか明らかにすることを目的として、各変異の特性を詳細に解析したところ、興味深いことに、両変異には DNA 複製精度を変化させる作用があることを新たに突き止めた。この現象に関わる鍵因子の特定は今後の課題となったが、抗生物質耐性が翻訳系のみならず DNA 複製にも影響を与えることが判り、このような細胞機能の複雑な変化が二次代謝活性化の根本原理であることも見えてきた。

(2) 翻訳系を標的とする抗生物質のホルミシスによる二次代謝活性化現象の解析。研究代表者は、前項で述べた課題に取り組む中で大変興味深い知見を得た。リンコマイシンは、リボソームに作用してタンパク質合成を阻害する抗生物質である。放線菌基準株 *S. coelicolor* A3(2) は、当然ながら、最小生育阻止濃度(MIC)以上のリンコマイシン存在下で生育できないが、1/80~1/2 MIC のリンコマイシン存在下では、非存在下に比べて色素抗生物質を高生産する。つまり、低濃度のリンコマイシン存在下において、*S. coelicolor* A3(2) は、潜在能力を発揮して、二次代謝が活性化した状態になる。演者らはこれまでに、MIC より低い濃度のリンコマイシンやクロラムフェニコールといった翻訳系を標的とする性抗生物質に二次代謝活性化作用があることを様々な放線菌で確認した。抗生物質のそのような濃度依存的現象はホルミシスといえる。ホルミシスとは、ある物質が持つ作用の二相性のことで、高濃度では有害に働くが、低濃度であれば逆に有益な作用をもたらす、生

物活性を刺激する現象を指す。抗生物質ホルミシスに関する研究は、Davies(ブリティッシュコロンビア大学)により先駆的に進められてきており、MIC より低濃度の抗生物質存在下で細菌の遺伝子発現が大きく変化することが実証されている。放線菌を対象とした分野において、抗生物質ホルミシスと表立って表現して活用した事例はさほど多くないが、研究代表者の成果に加えて、低濃度の抗生物質存在下で二次代謝産物の類縁体の生産パターンが変化する現象がいくつか報告されている。これらの成果は、抗生物質のポジティブな面を活用すれば、放線菌の潜在的二次代謝能を引き出せることを強く示唆している。

研究代表者はこれまでの解析から、放線菌 *S. coelicolor* A3(2) がリンコマイシン存在下で色素抗生物質を高生産する条件において、同菌の培養最終菌体量がリンコマイシン非存在下に比べて多くなることも見出した。抗生物質であるリンコマイシンが、放線菌の生育に対してプラスに働くことは全く予想外であった。加えて、この現象が起こる条件では、 F_0F_1 ATP 合成酵素の発現や機能が変化して、結果的に細胞内の ATP 量が高くなることも判ってきた。このことが菌体量増加の原因となっている可能性は十分に考えられる。その他には、リンコマイシン存在下で、ABC トランスポーターやリンコマイシンの標的である 23S rRNA のメチル化酵素の発現が劇的に高くなることも明らかになった。この結果は、細胞内にリンコマイシンが蓄積しないように、かつリンコマイシンが標的部位に作用しないようにと、細胞がリンコマイシンから逃れ生き延びようと活動している様子を如実に示している。詳細な仕組みは解析中であるが、以上のように、リンコマイシンという一つの抗生物質の作用で、放線菌の二次代謝の性質を大きく変えられることを明らかにできた。

(3) 放線菌の二次代謝能活性化による新しい有用生理活性物質の探索。

リンコマイシンのホルミシス効果で *S. lividans*

の潜在的二次代謝能を引き出すことに成功し、カルシウム依存性抗生物質[calcium-dependent antibiotic (CDA)]の新奇類縁体を発見した。加えて、抗生物質耐性変異(リファンピシン耐性変異, ストレプトマイシン耐性変異, エリスロマイシン耐性変異)と抗生物質(リンコマイシンあるいはクロラムフェニコール)のホルミシス効果を利用することで、*Streptomyces* 属放線菌のみならず、様々な放線菌の潜在的二次代謝能を引き出すことに成功し、両手法を組み合わせることで、効率的かつ効果的に放線菌の二次代謝を活性化できることも明らかにした。具体例として、土壌から分離した抗菌物質非生産性の放線菌 *Streptomyces* sp. THSU-12 に対して、リファンピシン耐性変異とクロラムフェニコールのホルミシス効果を活用することで、同菌株に潜在性の抗菌物質を検出可能なレベルまで生産させることに成功した。活性化で新たに生産が認められた二次代謝産物(抗菌物質)の単離・精製・構造解析は現在も検討中であるが、放線菌の二次代謝活性化とそれによる新しい有用二次代謝産物の探索において、転写・翻訳系を標的とする抗生物質の耐性変異とホルミシス効果を活用する手法が極めて有効であることを実験的に証明できた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. 保坂毅, 抗生物質ホルミシスの理解と応用, 生物工学会誌 94, 2016, 印刷中, 査読有.
2. Imai Y., Sato S., Tanaka Y., Ochi K., and Hosaka T., Lincomycin at subinhibitory concentrations potentiates secondary metabolite production by *Streptomyces* spp., *Applied Environmental Microbiology*, 81, 3869-3879, 2015, 査読有.
doi: 10.1128/AEM.04214-14
3. 保坂毅, 放線菌の潜在能力発現に関わる薬剤耐性変異の特性解析と抗生物質発掘への応

用, 日本放線菌学会誌, 28, 9-14, 2014. 査読有.

[学会発表] (計 18 件)

1. 下野和真, 今井優, 田中幸徳, 佐藤誠造, 越智幸三, 保坂毅, 抗生物質リンコマイシンがもたらす *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化の分子生物学的仕組みの解析, 2016 年度日本農芸化学会大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).
2. 長大哲, 越智幸三, 保坂毅, *Streptomyces* 属放線菌のリファンピシン耐性変異株における二次代謝活性化機構の解析と抗生物質探索研究への応用, 2016 年度日本農芸化学会大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).
3. 石塚美咲, 濱渦亮子, 今井優, 長大哲, 佐藤誠造, 越智幸三, 保坂毅, 抗生物質クロラムフェニコールのホルミシス効果による放線菌の潜在的二次代謝能の活性化, 2016 年度日本農芸化学会大会, 2016 年 3 月 30 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市).
4. 保坂毅, 抗生物質ホルミシスの分子生物学的機構の理解と放線菌の二次代謝研究への応用, 第 10 回ゲノム微生物学会年会シンポジウム, 2016 年 3 月 5 日, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区), 招待講演.
5. 保坂毅, 抗生物質ホルミシスの分子生物学的機構の解析とその応用, 第 5 回遺伝研研究会, 2015 年 11 月 6 日, 国立遺伝学研究所(静岡県三島市), 招待講演.
6. 下野和真, 丸山友子, 今井優, 田中幸徳, 佐藤誠造, 越智幸三, 保坂毅. 抗生物質リンコマイシンがもたらす *Streptomyces* 属放線菌の遺伝子発現変化と二次代謝活性化の分子生物学的機構の解析, 2015 年度日本放線菌学会大会, 2015 年 9 月 8 日, 富山国際会議場(富山県富山市).
7. 保坂毅, 石塚美咲, 長大哲, 濱渦亮子, 今井優, 佐藤誠造, 越智幸三, 抗生物質ホルミシ

ス現象の活用による放線菌の二次代謝活性化, 2015年度日本放線菌学会大会, 2015年9月8日, 富山国際会議場(富山県富山市).

8. 今井優, 越智幸三, 保坂毅. *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化とエリスロマイシン耐性に関する *rnaA-23S* rRNA 変異の解析, 2015年度日本放線菌学会大会, 2015年9月8日, 富山国際会議場(富山県富山市).

9. Hosaka T., Ribosome-targeting antibiotics at subinhibitory concentrations potentiate secondary metabolite production by streptomycetes, Society for Industrial Microbiology and Biotechnology Annual Meeting, August 3, 2015, Sheraton Philadelphia Downtown Hotel Philadelphia (USA). 招待講演.

10. 今井優, 佐藤誠造, 田中幸徳, 下野和真, 越智幸三, 保坂毅. 抗生物質リンコマイシンが *Streptomyces* 属放線菌における二次代謝のエリシターとして働く仕組みの分子生物学的解析. 2015年度日本農芸化学会大会, 2015年3月27日, 岡山大学(岡山県岡山市).

11. Imai Y., Sato S., Tanaka Y., Ochi K., Hosaka T., Lincomycin at subinhibitory concentrations activates the potential of *Streptomyces* strains to produce secondary metabolites, 17th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, 2014年10月8日~12日, Turkey (Aydin).

12. Fujisawa T., Iwakawa C., Ochi K., Hosaka T., Analysis of molecular mechanisms by which the ribosomal *rpsL* mutation activates secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2), 17th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, 2014年10月8日~12日, Turkey (Aydin).

13. Hosaka T., Activation of the potential to produce secondary metabolites in actinomycetes by modulating the RNA polymerase and/or ribosome, International Symposium of Industrial Microbiology-2014, 2014年6月28日, World

Expo Center, Dalian (China).

14. 今井優, 佐藤誠造, 田中幸徳, 越智幸三, 保坂毅. リンコマイシン存在下における *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化機構の解析, 2014年度日本放線菌学会大会, 2014年6月20日, つくばカピオ(茨城県つくば市).

15. 今井優, 佐藤誠造, 田中幸徳, 越智幸三, 保坂毅. リンコマイシンによる *Streptomyces* 属放線菌の潜在的抗生物質生産能の活性化. 2014年度日本農芸化学会大会(東京). 2014年3月28日, 明治大学生田キャンパス(川崎市).

16. 藤澤知弘, 岩川千紘, 越智幸三, 保坂毅. 放線菌の抗生物質高生産リボソーム変異株における転写機構の解析, 第15回静岡ライフサイエンスシンポジウム, 2014年3月8日, 静岡理科大学(静岡県袋井市).

17. 藤澤知弘, 岩川千紘, 越智幸三, 保坂毅. 抗生物質生産能が向上した *Streptomyces coelicolor* A3(2) の *rpsLK88E* 変異株におけるシグマ因子遺伝子の発現プロファイル, 2013年度日本放線菌学会大会, 2013年9月5~6日, メルパルク広島(広島県広島市).

18. 今井優, 越智幸三, 保坂毅. 亜致死濃度のリンコマイシンが放線菌の二次代謝に及ぼす影響, 2013年度日本放線菌学会大会, 2013年9月5~6日, メルパルク広島(広島県広島市).

[その他] ホームページ等

信州大学学術情報オンラインシステム SOAR, <http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.OULNjFkV.html>

信州大学応用分子微生物学研究室ホームページ,

<http://appl-mol-microbiol-shinshu-u.jimdo.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保坂 毅 (HOSAKA, Takeshi)

信州大学・学術研究院農学系・准教授

研究者番号: 50391206