

有用物質生産開始を決定する情報伝達の 分子解析と菌株育種への応用

Molecular Analysis of the Initiation of Secondary Metabolite Formation and its Application to Molecular Breeding of Producers

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96I00303)

プロジェクトリーダー

堀之内未治 東京大学大学院農学生命科学研究科・教授

コメンター

山田 靖宙 大阪大学大学院工学系研究科・教授

仁平 卓也 大阪大学大学院工学系研究科・助教授

別府 輝彦 日本大学生物資源科学部・教授



1. 研究目的

土壌細菌である放線菌は、抗生物質の大半を生産し、また複雑な形態分化を行うことを特徴とする。本研究プロジェクトはストレプトマイシン生産菌である *Streptomyces griseus* (堀之内)、バージニアマイシン生産菌である *Streptomyces virginiae* (山田、仁平) および土壌に生息する一般的な放線菌 (別府) について、抗生物質生産と形態分化の開始に低分子有機化合物が「微生物ホルモン」としていかに関与するかを分子レベルで解明し、その成果を生産菌の分子育種につなげようとするものである。

2. 研究成果概要

2.1 A-ファクターによるストレプトマイシン生産および形態分化の開始機構

ストレプトマイシン生産菌である *S. griseus* の抗生物質生産と気中菌糸・孢子への分化は、極微量の化学調節物質 A-ファクターにより開始される。菌体内に徐々に蓄積される A-ファクターが一定濃度に達すると、転写因子 AdpA をコードする遺伝子 *adpA* に結合してその転写を抑制していた A-ファクターレセプター蛋白 ArpA に結合して DNA から解離させ、その転写を「on」にする。このように誘導生産される AdpA は、ストレプトマイシン生合成遺伝子群内の転写因子 *strR* に結合してその転写を活性化し、*StrR* はストレプトマイシン生合成酵素遺伝子を活性化する。このように「A-ファクターは如何にストレプトマイシン生産を誘導するか」という情報伝達経路が明らかになった。AdpA は *strR* 以外にも、二次代謝、形態分化に必須な多くの遺伝子をスイッチ・オンする。また、A-ファクターと干渉しあう cAMP 経路、カルモジュリン等の制御系を発見し、それらの二次代謝、形態分化への調節機能を明らかにした。

2.2 バージニアマイシン生産の開始機構

バージニアブタノライド (VB) 生産菌である *Streptomyces virginiae* 及び IM-2 生産菌である *Streptomyces lavendulae* を対象として、VB 特異的リセプタータンパク質 BarA 及び IM-2

特異的リセプタータンパク質 FarA を単離し、該当遺伝子を取得した。大腸菌での組換え型リセプターの大量発現・精製後、*in vitro* での解析を行った結果、リセプタータンパク質は、固有のリガンドに対して極めて特異性・親和性が高い事、また特異的な DNA 配列を認識して、下流遺伝子の転写を抑制するリプレッサーである事を明らかにした。さらに、各リセプター遺伝子の完全破壊株の作成、表現形質の解析、及び周辺遺伝子の解析を通じて、*S. virginiae* に関しては、VB 経由の抗生物質耐性発現機構の詳細と抗生物質生合成誘導の大略を明らかにした。

2.3 低分子有機化合物を介した生態系における細胞間コミュニケーション

放線菌の二次代謝と形態分化の開始に対する環境要因として、培地炭素源と銅イオンが深く関わることを見出すと同時に、異種菌株間の拡散性信号物質を介した誘導現象が広く存在することを明らかにした。前者については関連する遺伝子群の取得と破壊株の作製に成功し、その形質から遺伝子の役割を明確にした。また後者については信号物質の単離精製を完了した。さらに、二次代謝や形態分化を制御する新規遺伝子群の同定とそれらの遺伝子破壊にも成功し、放線菌の二次代謝と形態分化に種々の外界要因が及ぼす影響を分子レベルで解明する基盤を確立した。

2.4 セリン・スレオニンキナーゼによる抗生物質生産の開始機構

Streptomyces coelicolor A3(2) の AfsR は 993 アミノ酸からなる転写因子であり、膜に緩く結合している AfsK によりセリンとスレオニン残基にリン酸化される。AfsK は外界の何らかの刺激を認知して自身のセリン、スレオニン残基をリン酸化してキナーゼ活性を上昇させる。リン酸化された AfsR は自身 DMA 結合活性を飛躍的に高め、63 アミノ酸をコードする *afsS* プロモータに結合する。AfsR-RNA ポリメラーゼ複合体は、AfsR の ATPase 活性を利用して closed complex から open complex に変換させ、*afsS* の転写を活性

化する。このように誘導合成された AfsS は何らかの機構でアクチノロージン、プロデイギオシン等の抗生物質生産を開始させる。

3. 結論

放線菌の抗生物質生産、形態分化の開始を決定する γ -ブチロラクトン化合物およびセリン/スレオニンキナーゼを介するタンパクリン酸化系による調節機構のほぼ全貌を解明した。

主な発表論文

- (1) Y. Ohnishi, S. Kameyama, H. Onaka and S. Horinouchi: The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* **34**, 1102-1119 (1999).
- (2) H. Yamazaki, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor (σ -AdsA) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **182**, 4596-4605 (2000).
- (3) H. Kinoshita, H. Ipposhi, S. Okamoto, H. Nakano, T. Nihira and Y. Yamada: Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *J. Bacteriol.* **179**, 6986-6993 (1997).
- (4) H. Nakano, E. Takehara, T. Nihira and Y. Yamada: Gene replacement analysis of the *Streptomyces virginiae* autoregulator receptor reveals that BarA acts as a repressor in virginiamycin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **180**, 3317-3322 (1997).
- (5) K. Ueda, Y. Tomaru, K. Endoh and T. Beppu: Stimulatory effect of copper on antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces tanashiensis*. *J. Antibiot.* **50**, 693-695 (1997).
- (6) K. Ueda, K. Matsuda, H. Takano and T. Beppu: A putative regulatory element for carbon-source-dependent differentiation in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* **145**, 2265-2271 (1999).

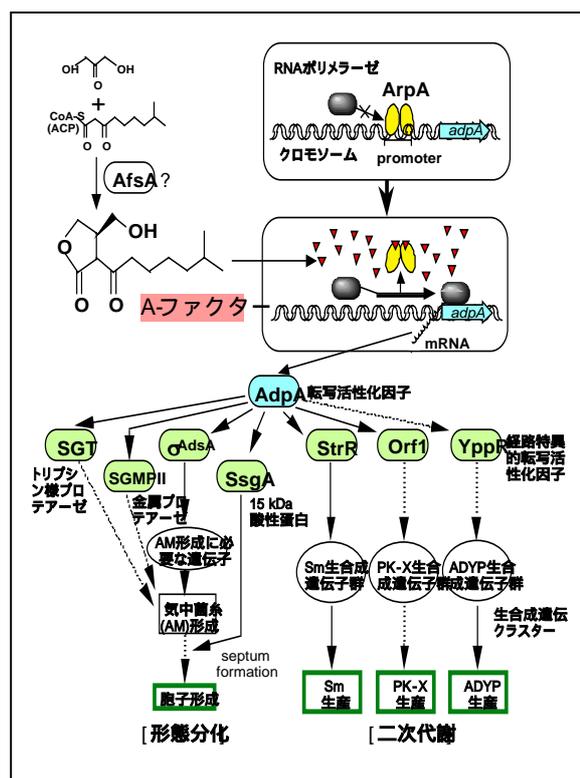


図. A-ファクター制御カスケード