

放線菌ストレプトミセス・グリセウスのA-ファクター制御カスケードの網羅的解明

● 堀之内 未治

東京大学・大学院農学生命科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

放線菌は多種多様な抗生物質の生産菌として、従来から工業微生物として重要な位置を占めている。約8,000種類といわれる抗生物質のうち、本菌群によって生産される抗生物質が大半を占め、人類の健康、長寿に貢献してきた。最近では、抗生物質以外にも、たとえば免疫抑制剤、高脂血症の治療剤等、いわゆる生理活性物質の供給源としても脚光を浴びている。一方では、放線菌は真核生物である糸状菌に似た複雑な形態分化を行い、「境界生物」(boundary microorganism)と呼ばれている。我々が長年に亘り研究を続けている微生物ホルモンA-ファクターによる二次代謝、形態分化の開始のためのシグナル伝達は、まさに「真核型」制御の根幹をなす。このように放線菌は、実用菌として重要であるばかりでなく、多細胞の形態分化のモデル生物として基礎生物学の格好の材料である。

以上のように、放線菌の二大特徴は、多種多様な二次代謝産物の生産と複雑な形態分化である。我々は、この二大形質を超微量で制御する微生物ホルモンA-ファクターについての複雑な調節ネットワークを提唱し、微生物学に大きなインパクトを与えた。世界中の多くの研究室からA-ファクター類似の調節機構の存在が次々に発表されており、我々の先行的な研究の正しさが証明されつつある。A-ファクターは放線菌研究における一大パラダイムとなっている。A-ファクターによるストレプトマイシン生合成に至る調節経路の主要ステップは既に解明されている。我々の大きな目標は、A-ファクター制御カスケードの全貌を明らかにすることであるが、本研究計画内では(1)カスケード内の重要な転写因子であるAdpAの標的遺伝子(プロテアーゼ群、グリキサジノン生合成遺伝子群を含む)の機能解明の継続、(2)adpA自身の転写抑制機構、(3)A-ファクター生合成遺伝子afsAの発現誘導機構および酵素反応機構、(4)A-ファクターレセプターのA-ファクターおよびDNAとの共結晶のX線構造解析を目標とする。以上の研究により、A-ファクター制御カスケードのうち3つの主要ステップ、即ち①A-ファクターの生合成、②A-ファクターによるレセプターの負の制御の解除、③二次代謝、形態分化に必要な多くの遺伝子をオンにするAdpAレギュロンの解明が期待できる。

〈研究開始時の研究計画〉

当面の大きな目標は、ストレプトマイシン生産菌であり、かつ世界の多くの研究者の標準株である *Streptomyces griseus* IFO13350の全ゲノム配列(8メガベース)を決定することであるが、本研究計画内では(1)ゲノム配列決定を見据えて、ほぼ完成しているBACライブラリーの完璧化とそれに基づいてAseI、DraIによるゲノム制限酵素地図を作製する。また、これまでにクロニング、解析されている *S. griseus*の遺伝子を整理化BACライブラリー上にマッピングする。(2)A-ファクター制御カスケード内の転写活性化因子AdpA、A-ファクター受容体であると同時に転写抑制因子であるArpAの標的遺伝

子をSELEX法により網羅的に同定、単離し、機能解析を行う。このためには、ゲルシフトアッセイ、DNase Iフットプリント法、遺伝子破壊・過剰発現、転写解析といった遺伝性化学的手法を駆使する。こうしたアプローチにより、A-ファクターによるホルモン制御の全貌に迫れる。

〈研究期間の成果〉

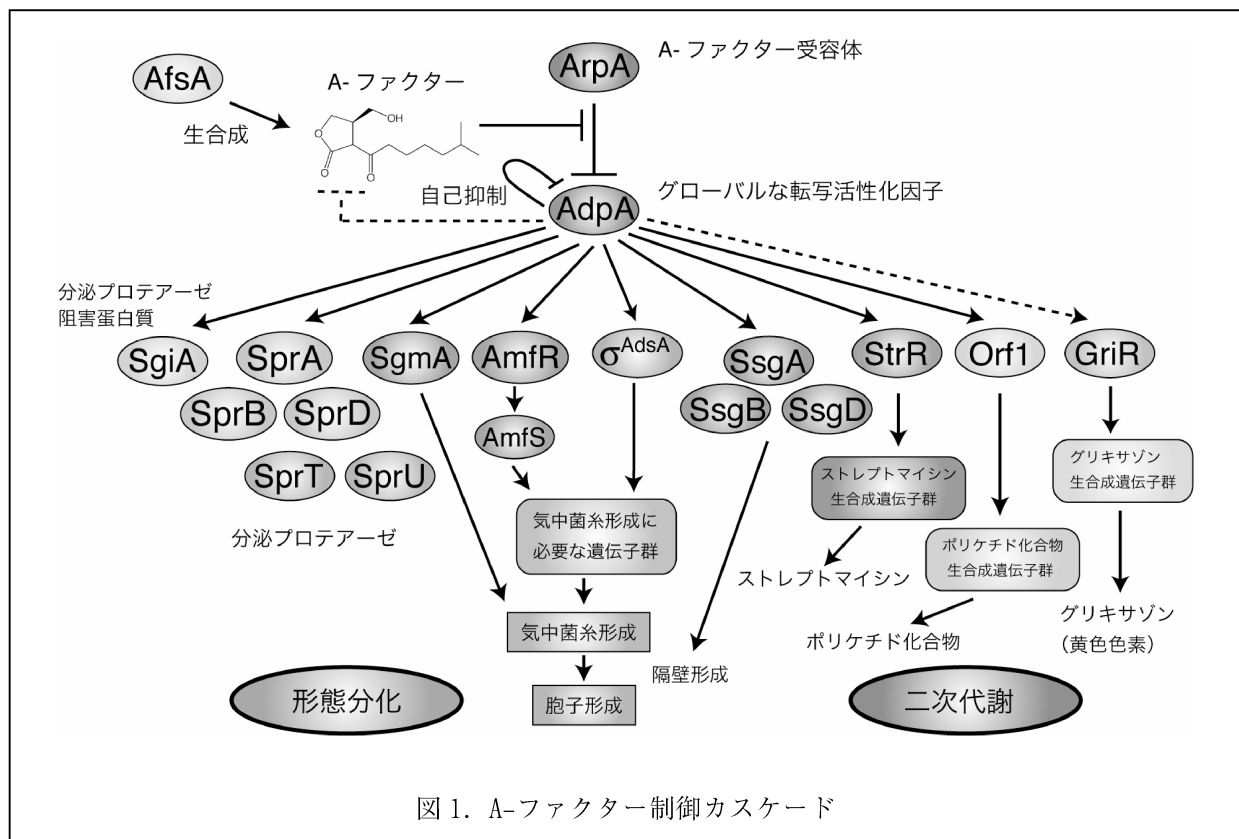
研究開始当時の最大の目標であった *S. griseus*のゲノム配列の解読については、GC含量の極めて高い10ヶ所程度のギャップを残して解読を完了した(未発表)。現在は、フィニッシュを目指してそのギャップを埋めつつある。また、A-ファクター制御カスケード内の多くの新しい「役者」を同定するとともに、A-ファクター受容体のX線結晶構造解析に成功し、当初の目標であった「A-ファクター制御カスケードの網羅的解明」に値する成果を得ることができたと考える(図1)。本研究では、A-ファクター制御と並行して二次代謝、形態分化を制御するセリン/スレオニンキナーゼを介する情報伝達(図2)、カルモジュリン、cAMPを介する制御についても追求した。成果を要約すると以下のとおりである。

(1) 転写因子AdpAの標的遺伝子として、気中菌糸形成に必須なECFシグマ因子であるadsA(3)、おそらく基底菌糸のアポトーシスに関与する金属プロテアーゼsgmA(15)、気中菌糸に隔壁を入れるのに必須なssgA(19)、気中菌糸形成に必須であり、枯草菌のSpo0Aに比せられるamfR(25)およびその標的の1つであるamfS(11)、黄色色素グリキサジン(30)を同定した。これら標的遺伝子は、SELEX法を用いて同定した(4)が、明らかにAdpA依存性であることが確認された遺伝子であっても、破壊によってなんの発現形質の変化を示さない遺伝子もいくつかあった。形態分化にいたる情報伝達は、同じ属である *Streptomyces coelicolor* A3(2)とは大きく異なることが示された(14, 20)。

(2) AdpAの標的遺伝子の活性化機構を詳細に解析し、その活性化機構、結合コンセンサス配列、結合配列のプロモーターに対する相対位置と結合箇所の個数、二量体化ドメインのアミノ酸配列などから、本転写因子はAraC/XylSファミリーに属するものの新規サブファミリーの代表であることを提唱した(29)。

(3) 転写活性化因子であるAdpAは、自身の転写には抑制的に働く。adpAプロモーターは、AdpA結合部位を3箇所有し、上流からA、B、C部位と名付けた。B部位は完全に-35と-10配列に重なる。最も結合力が強いA部位に結合したAdpAは、B部位にも1分子のAdpAをリクルートしてDNAループを形成して安定化する。したがって、RNAポリメラーゼはプロモーターに近づけなくなり、結局転写抑制が起こる。転写開始部位の下流にあるC部位は、RNAポリメラーゼによる転写伸長を押さえると考えられた。この結果は、2005年度に公表された[J. Mol. Biol. 350, 12-26 (2005)]。

(4) A-ファクター受容体であり、かつ転写抑制因子で



あるArpAの種々の変異体の解析および発現形質の解析から、ArpAの標的は*S. griseus*内でadpAが唯一であることを証明した(27)。なお、arpAの下流には、RNaseがコードされ、気中菌糸形成に影響を与えることを確認した(2)。

(5) ArpAのホモログであるCprBのX線結晶構造から、A-ファクター(リガンド)結合ドメイン、DNA結合ドメインの構造を明らかにし、TetRファミリーとの相同性から、A-ファクター結合によりArpAがいかにDNAから解離するかを明らかにした(24, 26)。A-ファクターがArpAのC末側ポケットにすっぽり収納されるように結合すると、その情報が長い α -ヘリックスを介してN末側のDNA結合ドメインに伝えられ、DNA結合ヘリックスが外側に開く格好に構造変化して、その結果ArpAはDNAから解離する。

(6) A-ファクター制御カスケードと並行した系であるセリン/スレオニンキナーゼAfsKによる形態分化、二次代謝の制御について、AfsKに直接結合することによって自己リン酸化能を調節するKbpAを同定した(7)。また、AfsKの標的タンパクであるAfsRは、AfsK以外にもAfsLやPkaGによりスレオニン残基がリン酸化される(28)。さらに、AfsRはリン酸化によってそのDNA結合能が増大し、afsSのプロモーターに結合して転写活性化を行うことを明らかにした(12)。このように、AfsK/AfsL/PkaG → AfsR → AfsSという情報伝達を明らかにできた(13, 21)。つまり、AfsRは、複数のHanks型キナーゼが感知した細胞内外の栄養状態、環境変化を集約する役割を持つと推定される。なお、P2A型の脱リン酸化酵素は、形態分化に影響を及ぼすが、Afs系への関与は今後の課題である(1)。

(7) A-ファクター制御と並行する系として、グルコースに依存して基底菌糸から直接に胞子形成を行う変異株を取得し、原因遺伝子としてGntRファミリーのdasRを同定、解析した(10, 17)。転写抑制因子であるDasRの遺伝

子破壊、またはその標的であるDasAの過剰発現により、基底菌糸から気中菌糸を経ることなく、成熟胞子を形成する。このectopic sporulationは、グルコースの存在下でのみ観察される。また、真核生物のカルモジュリンと高い相同性を有するCabB(8)やグラム陽性菌では初めてとなるcAMPによる制御(5)を明らかにした。なお、二次代謝産物であるカロテノイドの生産は、A-ファクターではなく、sigma-Bにより制御されていた(6)。

(8) A-ファクター制御下にある遺伝子として、III型ポリケチド合成酵素RppA(9, 16)以外に、coumarate/cinnamate:CoA ligaseを同定し(18)、これを微生物によるフラボノイドの発酵生産をさせるための「人工的生成遺伝子クラスター」の一員として用いた(22, 23)。これにより、世界で初めて微生物によるフラボノイド化合物の発酵生産が可能になったとともに、「非天然型」化合物群生産の足掛かりとなる。

〈国内外での成果の位置づけ〉

微生物ホルモンA-ファクターに関する我々の先行的かつ極めて興味深い研究を契機として、世界中のいくつかの研究室でA-ファクターやこれと類似な調節物質に関する研究が開始されている。大阪大学の山田、仁平グループ、英国ジョンイネス研のBibbグループ、ブリテイッシュコロロンビア大のThompsonグループがその代表である。このグループ以外にも、我々の発見、命名になるafsA, adpA, arpAの遺伝子名をタイトルに含む多くの論文が次々に発表されている。このことは、多くの放線菌において種々の二次代謝産物の生産、形態分化にA-ファクターやその類縁体が重要な役割を果たしていることの証明ともなっている。我々がこれまでに蓄積してきた研究成果は明らかに他を圧倒しているのが実状である。

AfsK/AfsR制御系は、それまで「真核生物型」といわれていたセリン/スレオニンキナーゼによる情報伝達を

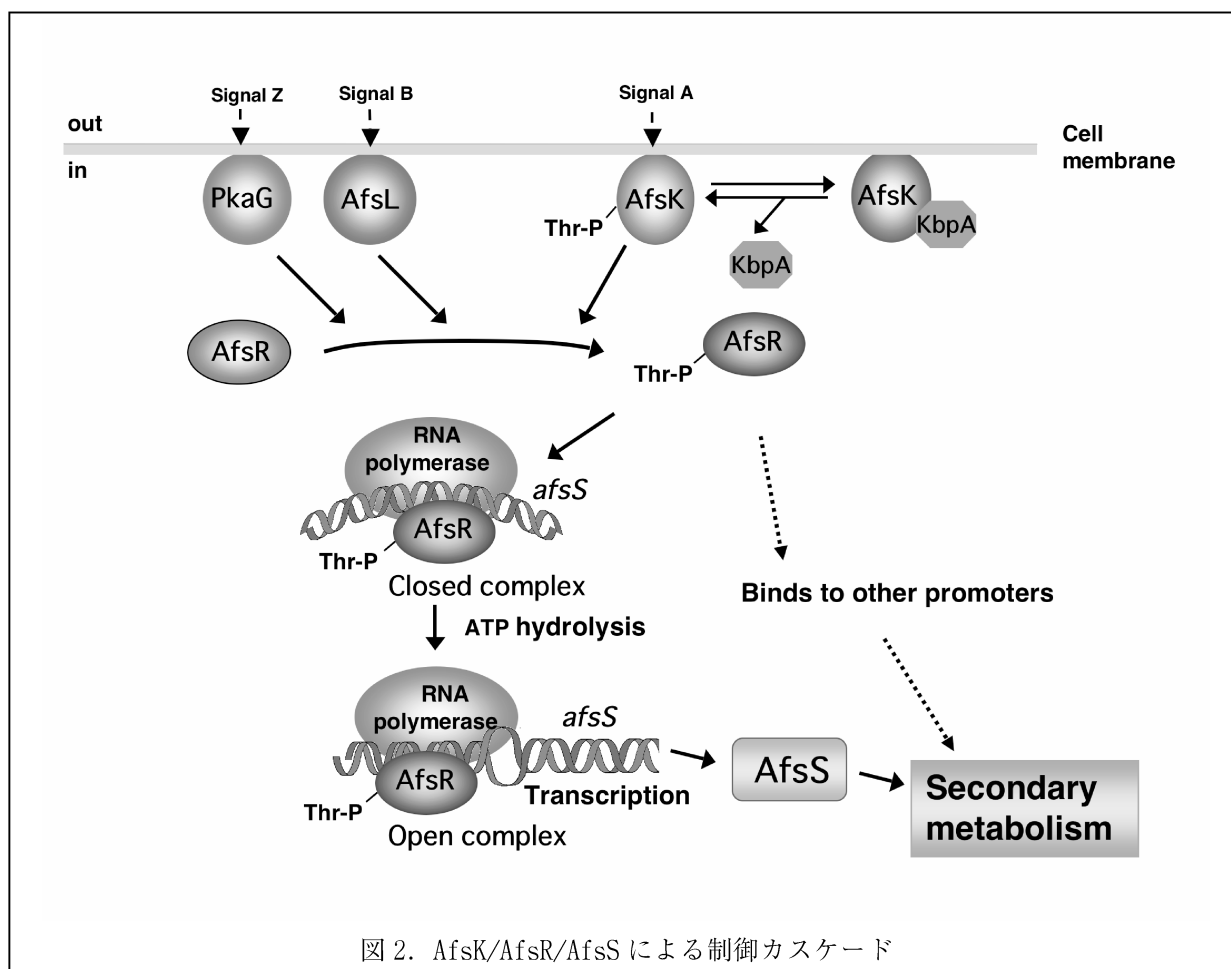


図 2. AfsK/AfsR/AfsS による制御カスケード

証明した世界最初の例であったが、その後多くの微生物種のゲノム解読によってその存在が明らかになるに至り、それらの機能解析が続けられている。ただし、これまでの真核生物の研究がそうであったように、DNA相同性から多くのキナーゼが見い出せてもそれらの真の標的タンパク質は相変わらず不明なものが多い。この点、生化学的手法で発見したAfsKキナーゼは、その標的としてのAfsRの転写因子としての機能、またそのAfsRの標的遺伝子としてのafsSを見い出していることから、セリン/スレオニンキナーゼを介するタンパク質リン酸化の情報伝達の解明において他をリードしている。

放線菌のうち、英国で*S. coelicolor* A3(2)の、日本で*S. avermitilis*のゲノム解読がなされ、既に公表されている。また、米国のベンチャー企業が2種の放線菌ゲノムを解読したと発表している。英国では、*S. coelicolor* A3(2)のコンソーシアムを形成して二次代謝、形態分化についての制御機構の解明を目指しているが、その他は主として二次代謝産物そのものに興味があるようである。本研究で決定した*S. griseus*のゲノム情報をこれまでに蓄積してきた膨大な数の遺伝子、タンパク質、変異株との組み合わせによって、二次代謝、形態分化の制御体系に焦点を当てて有効利用すれば、他のグループでは得られない有意義な成果が大いに期待される。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

*S. griseus*のゲノムの完全解読を目指して、現在10ヶ所ほどのギャップを埋めているところである。逆転写を利用するなどの方策で、この問題は解決できる。また、線状の染色体末端に結合するタンパク質を同定する必要もある。これまでに報告されている*S. coelicolor* A3(2)や

巨大線状プラスミドの末端タンパク質とは異なるようであり、生化学的なアプローチを採る。

本研究では、当初の目的、実験計画に沿って遂行され、大略期待していた成果を得ることができたと考える。

〈今後の課題〉

*S. griseus*のゲノム情報を基に、約600種ある転写因子のみからなるDNA microarrayを外注によって作製し、種々の条件を検討している。近い将来には、全8,000種のORFからなるmicroarrayを作製し、A-ファクター制御カスケードやAfsK/AfsRシステム内のさらなる構成員の同定が可能となる。したがって、本特定研究による支援は、今後のA-ファクター研究に大いに役立つと期待される。「境界生物」としての放線菌の生物学を推進するブレークスルーになる。

A-ファクター制御の下流にある多くの二次代謝酵素遺伝子を同定し、その遺伝子産物の反応機構を解明してきた。また、これらを「人工的生合成遺伝子クラスター」の一員として用い、たとえば微生物によるフラボノイド化合物群の発酵生産を達成した。いわゆるコンビナトリアル生合成を実用的な物質生産に応用したもので、今後とも放線菌の二次代謝酵素をこうした方面への応用に活かせる方向性を見い出せた。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 111101211
T. Umeyama, A. Naruoka and S. Horinouchi: Genetic and biochemical characterization of a protein phosphatase with dual substrate specificity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* 258, 55-62 (2000)

2. 111101223
Y. Ohnishi, Y. Nishiyama, R. Sato, S. Kameyama and S. Horinouchi: An oligoribonuclease gene in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 182, 4647-4653 (2000)
3. 111101235
H. Yamazaki, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: An A-factor-dependent extracytoplasmic function sigma factor (sAdsA) that is essential for morphological development in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 182, 4596-4605 (2000)
4. 111101244
S. Horinouchi, H. Onaka, H. Yamazaki, S. Kameyama and Y. Ohnishi: Isolation of DNA fragments bound by transcriptional factors, AdpA and ArpA, in the A-factor regulatory cascade. *Actinomycetologica* 14, 37-42 (2000)
5. 111101254
S. Horinouchi, Y. Ohnishi and D.-K. Kang: The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces griseus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 27, 177-182 (2001)
6. 111101302
H.-S. Lee, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: A σ B-like factor responsible for carotenoid biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 95-101 (2001)
7. 111101315
T. Umeyama and S. Horinouchi: Autophosphorylation of a bacterial serine/threonine kinase, AfsK, is inhibited by KbpA, an AfsK-binding protein. *J. Bacteriol.* 183, 5506-5512 (2001)
8. 111101326
T. Yonekawa, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: A calcium-binding protein with four EF-hand motifs in *Streptomyces ambofaciens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 156-160 (2001)
9. 202051015
N. Funata, Y. Ohnishi, Y. Ebizuka and S. Horinouchi: Properties and substrate specificity of RppA, a chalcone synthase-related polyketide synthase in *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.* 277, 4628-4635 (2002)
10. 202051031
J.-W. Seo, Y. Ohnishi, A. Hirata and S. Horinouchi: ATP-binding cassette transport system involved in regulation of morphological differentiation in response to glucose in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 184, 91-103 (2002)
11. 202141153
K. Ueda, K. Oinuma, G. Ikeda, K. Hosono, Y. Ohnishi, S. Horinouchi and T. Beppu: AmfS, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 184, 1488-1492 (2002)
12. 202201156
P.-C. Lee, T. Umeyama and S. Horinouchi: afsS is a target of AfsR, a transcriptional factor with ATPase activity that globally controls secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* 43, 1413-1430 (2002)
13. 209241014
T. Umeyama, P.-C. Lee and S. Horinouchi: Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 419-425 (2002)
14. 209241021
S. Horinouchi: A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Front. Biosci.* 7, d2045-d2057 (2002)
15. 210101041
J. Kato, A. Suzuki, H. Yamazaki, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: Control by A-factor of a metalloendopeptidase gene involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 184, 6016-6025 (2002)
16. 210051118
N. Funata, Y. Ohnishi, Y. Ebizuka and S. Horinouchi: Alterations of reaction and substrate specificity of bacterial type III polyketide synthase by site-directed mutagenesis. *Biochem. J.* 367, 781-789 (2002)
17. 210191257
Y. Ohnishi, J.-W. Seo and S. Horinouchi: Deprogrammed sporulation in *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* 216, 1-7 (2002)
18. 301250951
M. Kaneko, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: Cinnamate: coenzyme A ligase from the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 185, 20-27 (2003)
19. 301250952
H. Yamazaki, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: Transcriptional switch on of ssgA by A-factor, which is essential for spore septum formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 185, 1273-1283 (2003)
20. 0402271425
K. F. Chater and S. Horinouchi: Signalling early developmental events in two highly diverged *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol.* 48, 9-15 (2003)
21. 0402271656
S. Horinouchi: AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 462-467 (2003)
22. 0402271710
E. I. Hwang, M. Kaneko, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 100-105 (2003)

Microbiol. 69, 2699-2706 (2003)

23. 0402271720

M. Kaneko, E. I. Hwang, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: Heterologous production of flavanones in *Escherichia coli*: potential for combinatorial biosynthesis of flavonoids in bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 456-461 (2003)

24. 0402271728

R. Natsume, R. Takeshita, M. Sugiyama, Y. Ohnishi, T. Senda and S. Horinouchi: Crystallization of CprB, an autoregulator-receptor protein from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Acta Crystallogr. Sect. D* 59, 2313-2315 (2003)

25. 0402271738

H. Yamazaki, Y. Takano, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: *amfR*, an essential gene for aerial mycelium formation, is a member of the AdpA regulon in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* 50, 1173-1187 (2003)

26. 0402271748

R. Natsume, Y. Ohnishi, T. Senda and S. Horinouchi: Crystal structure of a γ -butyrolactone autoregulator receptor protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Mol. Biol.* 336, 409-419 (2004)

27. 0403261416

J. Kato, I. Miyahisa, M. Mashiko, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: A single target is sufficient to account for the biological effects of the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 186, 2206-2211 (2004)

28. 0408231417

R. Sawai, A. Suzuki, Y. Takano, P.-C. Lee and S. Horinouchi: Phosphorylation of AfsR by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* 334, 53-61 (2004)

29. 0408231404

H. Yamazaki, A. Tomono, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: DNA-binding specificity of AdpA, a transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Mol. Microbiol.* 53, 555-572 (2004)

30. 0408231428

Y. Ohnishi, Y. Furusho, T. Higashi, H.-K. Chun, K. Furihata, S. Sakuda and S. Horinouchi: Structures of grixazone A and B, A-factor-dependent yellow pigments produced under phosphate depletion by *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.* 57, 218-223 (2004)