

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻

平成 18 年度 博士課程 進学

氏名 丸島 和也

指導教員名 堀之内 末治

論文題目 放線菌のグルコースカタボライト抑制機構に関する研究

1. 序論

放線菌 *Streptomyces* 属は、複雑な形態分化と多様な二次代謝産物の生産を行うことで知られており、基礎・応用の両面から盛んに研究されてきた菌群である。固体培地上で観察される *Streptomyces* 属の生活環は以下の通りである。孢子から発芽すると、まず多核の基底菌糸を培地表面に張り巡らせる。続いて上空に向かい、気中菌糸を立ち上げる。この気中菌糸はその後隔壁により等間隔に分割され、1 細胞に 1 コピーの染色体を含む数珠状の成熟孢子が完成する。真核生物であるカビに似たこの複雑な形態分化は、生育環境に存在する栄養源により強く影響される。例えば基底菌糸から気中菌糸への分化ができない変異株(その外見より bald (無毛の) 株群と命名されている)が複数分離され研究されているが、その多くは生育培地に添加する糖源の種類を変更すると気中菌糸形成に至ることが知られている。また bald 株の多くは、その生育環境中により利用しやすい糖が存在する場合に利用しにくい糖に対する酵素群を転写レベルで抑制する、いわゆるカタボライト抑制能を失うことが観察されている。これらの観察は、形態分化シグナルと栄養シグナルは何らかの形で相互作用していることを示している。形態分化シグナルについては上述の bald 株群を初めとした各種変異株の解析により多くの知見が得られているが、栄養シグナルについてはその重要性が認識されながら今日までほとんど解析がなされていない。著者は栄養感知シグナルの代表としてカタボライト抑制に着目し、*Streptomyces* 属ではほとんど明らかにされていないこの現象の機構解明を目的として研究を開始した。

上述の目的に従い、3 方面からアプローチを行った。研究題材としては、著者の所属研究室で長年にわたり解析され、近年その全ゲノム情報が解読された streptomycin 生産菌 *Streptomyces griseus* を用いた。*S. griseus* では形態分化が AdpA(自己調節因子 A-factor に依存したグローバル転写因子)により一元的に制御されていることから、本研究の格好の題材であると判断した。

2. 本論

(1) 高コピー導入で高濃度グルコース存在下での *S. griseus* 形態分化を促進する DNA 断片の解析¹⁾

著者は修士論文研究で、*S. griseus* 野生株が形態分化を行いきくい高濃度(4%)グルコース含有培地上において、高コピーでの導入により形態分化と二次代謝を促進する DNA 断片を取得した。当該断片は、銅シャペロン(CopZ)ならびに銅排出型 P 型 ATPase(CopA1)をオペロンとしてコードすることがわかった。本項でこれらについて精査した結果を記述する。

高コピー導入での形態分化促進には上記のうち *copA1* のみ必要であった。CopZ, CopA1, ならびに CopA1 パラログである CopA2 は協調的に細胞内の過剰な銅の排出を行っていることを証明した。またこれらをコードする遺伝子は、近年 *Mycobacterium tuberculosis* より見出された銅排出遺伝子の制御因子である CsoR の *S. griseus* 内オルソログによって制御されていることを示した。

copA1 の高コピー発現が形態分化を促進する直接的な機構は不明であるが、*csor* 破壊株(当該株では *copZ-copA1* ならびに *copA2* が恒常的に発現している)において生育が悪化したことから、細胞内 CopA1 の増加が菌体にとってストレスとなり、これが形態分化に正の影響を与えている可能性が示唆された。

(2) 内在β-galactosidase に対しグルコースカタボライト抑制能を失う *S. griseus* 変異株の解析²⁾

著者は修士論文研究で、*S. griseus* に内在するβ-galactosidase(β-gal)が野生株においてグルコースカタボライト抑制(グルコース抑制)を受けるといふ観察のもと、この抑制が解除された変異株をコロニーの青色呈色で判別する系を構築し、UV 変異株群から目的の株を実際に分離した。これらの株ではβ-gal 活性だけでなくペプチドグリカン分解活性や形態分化に対してもグルコース抑制の解除が見られた。しかしその変異点は未知であった。そこで、当該変異点を同定し、放線菌のグルコース抑制に関わる未知因子を明らかにすることを目指した。

Shot-gun cloning 法により、獲得された変異株の 1 つ(GRD1 と命名した)は LacI 型転写因子をコードする遺伝子に変異点を有することを見出した。本遺伝子の翻訳産物は、高いセルロース分解活性を持つ放線菌 *Thermobifida fusca* および *Streptomyces reticuli* においてセルロースやセロビオースの代謝系遺伝子を制御すると報告されている転写因子(*T. fusca* では CelR, *S. reticuli* では CebR と命名されている)と高い相同性を有することから、本遺伝子を *cebR* と命名した。β-gal 活性とペプチドグリカン分解活性に対するグルコース抑制の解除は *S. griseus* Δ*cebR* 株でも観察されたことから、GRD1 のグルコース抑制解除原因遺伝子は *cebR* であることが確認された。

CebR の解析を行った結果、当該蛋白は上記 2 つのホモログと同じ 14 bp 反復繰り返し DNA 配列(CebR-box)に結合し、その結合はエフェクター糖の存在によって阻害されることがわかった。*T. fusca* の CelR はセロビオース(グルコースがβ(1→4)結合で 2 個重合したものを)、*S. reticuli* の CebR はセロペンタオース(同 5 個)を各々エフェクターとして認識すると報告されているが、*S. griseus* の CebR はセロビオース、セロトリオース、セロテトラオース、セロペンタオース、セロヘキサオースと、試行したすべてのセロオリゴ糖をエフェクター分子として認識する点で新規であった。*S. griseus* ゲノム中、上記 CebR-box は *cebR* 自身やセロビオース取り込み遺伝子、セルロース利用遺伝子を含む計 8 遺伝子の上流に見出された。*in vitro* 解析により CebR がこれらす

べてに結合することが証明された。また定量 RT-PCR により, *in vivo* でこれらが実際に CebR に抑制されていることが示された。すなわち *S. griseus* において CebR はセルロース / セロビオース代謝系遺伝子をグローバルに制御していることがわかった(図 1)。しかしながら以上の情報からは Δ cebR 株がグルコース抑制不全に至る原因は説明できなかった。

続く解析の結果, Δ cebR は糖源特異的に bald 形態を示すことがわかった。培地中へのラクトース添加(1.5%)により形態分化の部分的不全が生じ, ラクトースとグルコース両方の添加(それぞれ 0.5%と 1.0%)ではほぼ完全な bald 形態となった。その他の糖の添加では形態分化不全は観察されなかった。GRD1 株分離の際に用いた培地は 0.5%ラクトースと 1.0%グルコースを糖源として含有するものであった。序論にて述べた通り bald 変異株の多くはカタボライト抑制能を失う。よって, Δ cebR がグルコース抑制能を失ったのは形態分化不全による間接的な結果であると考えられる。

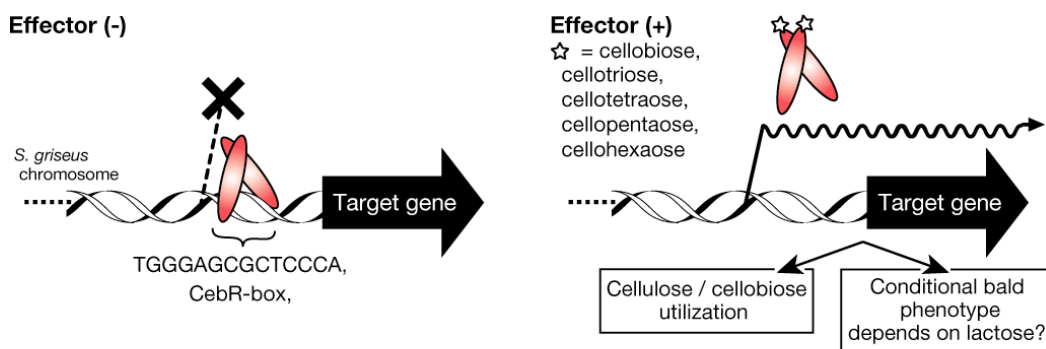


図 1. 本研究で明らかとなった *S. griseus* CebR の機能。エフェクター分子の非存在時には、CebR-box に CebR が結合することで転写が抑制されている(左)。エフェクター分子であるセルロース分解産物が細胞内に存在すると CebR の CebR-box への結合が阻害され、標的遺伝子の転写が生じる(右)。

(3) 構造情報に基づいたグルコース抑制の鍵因子とされる Glk の生理機能解析

先にも述べた通り *Streptomyces* 属のカタボライト抑制についての知見は非常に乏しい。少ない知見のうち具体的なものとしては、既にそのグルコース抑制機構の解析が進んでいる大腸菌等と異なり、解糖系初発酵素グルコキナーゼ(Glk)が鍵因子であることが複数の報告から示唆されている。すなわち, *Streptomyces* の Glk はグルコースをグルコース-6-リン酸に変換する『触媒機能』だけでなく、いわばグルコースセンサーとして作用し、カタボライト抑制を司る『制御機能』を有すると予想される。本研究科食品工学研究室との共同研究により *S. griseus* 由来 Glk (SgGlk) 結晶構造解析が解像度 2.50 Å にて決定された(図 2)。

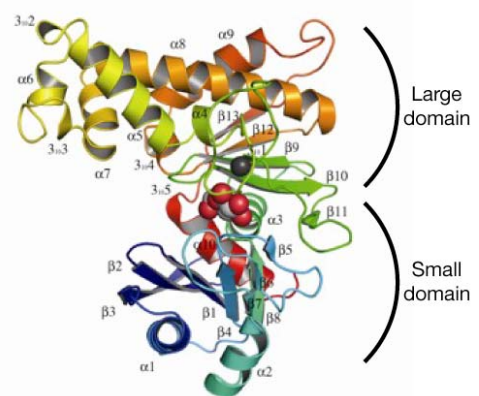


図2. SgGlkの結晶構造。本研究科食品工学研究室 宮園健一博士により提供。

その単量体構造は過去に構造決定の報告されている種々の Glk と類似していた。過去に、SgGlk とアミノ酸配列上ほとんど相同性を持たない *Zymomonas mobilis* Cp4 株由来 Glk を *Streptomyces coelicolor* A3(2) Δ glk 株にて生産させたところ、触媒機能は回復したが制御機能は回復しなかったという報告がなされている。この報告を元に著者は、SgGlk とアミノ酸配列上高い相同性を持つ異種由来 Glk (立体構造上も高い相同性を持つと予想される) を *S. griseus* Δ glk 株に

生産させ、その触媒活性と制御活性を観察した。異種 Glk としては非 *Streptomyces* 属放線菌である *Rhodococcus* sp. RHA1 株由来 Glk (RhGlk) を用いた。SgGlk と RhGlk は 54% の相同性、68% の相似性を有する。この結果、RhGlk 生産 *S. griseus* Δ glk 株は、グルコースを唯一の炭素源とする寒天最少培地上での生育については回復したが、 β -galactosidase に対するグルコース抑制については回復しなかった。すなわち、触媒活性は回復したが制御活性は回復しなかった。この結果は、SgGlk – RhGlk 間で保存されていない数少ない領域が、グルコース抑制シグナルに対し何らかの役割を担うことを強く示唆する。SgGlk に DNA 結合ドメインは見出されないことから、SgGlk は DNA に直接結合するのではなく、例えば他の蛋白との相互作用を経てグルコース抑制シグナルを発揮しているのかもしれない。

3. 結論と今後の展望

本研究では、*S. griseus* のカタボライト抑制機構解明を目的とし、遺伝学的、蛋白工学的側面から計 3 方向からのアプローチを行った。

本論(2)で得られた「 Δ cebR 株では糖源特異的な bald 形態が生じる」という結果は、カタボライト抑制機構に直接の知見を与えるものではないものの、糖源と形態分化を結びつける知見の蓄積として重要である。グルコース以外の糖に応答して bald 表現型が生じる変異株の報告は本研究が初めてである。今後 CebR レギュロンの精査によりラクトースに応答した形態分化シグナルの一端が明らかになると期待される。

本論(3)における「RhGlk を導入した *S. griseus* Δ glk 株ではグルコース資化はなされるにもかかわらずグルコース抑制は生じない」という発見は、「*Streptomyces* 属の Glk は触媒機能の他に制御機能も有する」という仮説を強く支持するものである。今後、SgGlk と RhGlk の構造/機能相関研究を通じて SgGlk の制御機能に重要なアミノ酸残基を同定することが、*Streptomyces* 属カタボライト抑制機構解明に通ずると考えられる。

< 投稿論文 >

1. Marushima K., Ohnishi Y., Horinouchi S. “Overexpression of a copper exporter system enhances morphological development and streptomycin production in *Streptomyces griseus*” (投稿準備中)
2. Marushima K., Ohnishi Y., Horinouchi S. “The global regulator for celooligosaccharides metabolism is involved in morphological development in *Streptomyces griseus*” (投稿準備中)