

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成22年度博士課程 進学
氏名 中村 一成
指導教員名 大西 康夫

論文題目

放線菌 *Streptomyces griseus* における黄色色素の生産制御機構に関する研究

Streptomyces 属をはじめとした放線菌は、多種多様な二次代謝産物を生産することで知られている。今日の抗生物質の約 7 割が放線菌由来であるなど有用化合物を数多く生産するため、放線菌は産業的にも関心の高い菌群である。過去の様々な研究により、これら二次代謝に関わる生合成遺伝子群や生合成経路は数多く報告されているが、その制御機構については不明な点も多い。また昨今のゲノム情報の蓄積やオーム解析の発展により、放線菌ゲノム中に含まれる生合成遺伝子群は数十にのぼり、かつ通常の培養条件においてそれらの多くは発現していないことが明らかにされた。二次代謝の制御機構を理解することで、通常発現していない生合成遺伝子群を活性化することも可能になると思われる。有用物質の増産や新規化合物の取得に向けて、二次代謝の制御機構の解明は今後益々重要になると考えられる。

所属研究室では長年に渡り、*Streptomyces griseus* の二次代謝制御に関して研究が行われてきた。*S. griseus* は抗生物質ストレプトマイシンをはじめ様々な二次代謝産物を生産するが、その 1 つに黄色色素グリキサゾン (GX) が含まれる。GX はフェノキサジノン骨格を有する分泌性の化合物で、生合成遺伝子群や生合成経路は所属研究室における過去の研究によって明らかにされている。また生産の有無を目視で確認できることから二次代謝制御研究のモデルとして解析が進められ、GX の生産制御機構は部分的に解明されていた。

GX 生合成遺伝子群に含まれ SARP 型経路特異的転写活性化因子をコードする *griR* は、リン酸飢餓の刺激とグローバル転写因子 AdpA のシグナルとを受けて発現し、GriR が生合成酵素をコードする遺伝子の転写を活性化することで GX が生産される。一方、GX 生産能を失った UV 変異株の解析から *griZ* 遺伝子が発見された。*griZ* はゲノム上で GX 生合成遺伝子群から離れた位置に存在し、TetR 型転写抑制因子をコードしている。UV 変異株では GriZ の 40 番目のセリンがアラニンに置換する点変異が生じており、DNA 結合活性に影響することが予想された。GriZ は自身の遺伝子の上流反対向きに存在するオペロン *griUVW* の発現を抑制しているが、*griZ* 破壊株ではこのオペロンが過剰発現することで GX 生産が抑制されると考えられた。しかし、*griR* の上流の制御機構や *griUVW* による GX 生産抑制メカニズム、またこれらがいかに関係し合うかなどは不明であった。

さらに、GX 生産制御の解析に用いられている株は研究室で長年継代を重ねた野生株 (ADYP 株) であり GX 生産能を持つが、近年ゲノム解析に用いた野生株 (ゲノム株) は GX をほとんど生産しない。両者はもともと同一の株であるため、植え継いでいく中で ADYP 株に生じた何らかの変異のために表現型が変化したと考えられる。GX 生合成遺伝子群や *griZ* 付近の領域に変異は見出されなかったため、GX 生産制御に関わる未知の因子に変異が生じていることが予想された。

このように、GX 生産制御機構に関しては未解明の部分が多い。本研究では、二次代謝制御機構の 1 つのモデルとして GX の生産制御機構の全体像を明らかにすることを目的とした。

1. GriR に関する解析

SARP 型転写因子は、標的遺伝子のプロモーター領域に存在する複数回の直列反復配列へ結合し、RNA ポリメラーゼ (RNAP) をリクルートすることで標的遺伝子の転写を活性化することが知られており、GriR も同様に標的遺伝子 *griC* および *griJ* の上流へ結合することが示され、結合配列も推定されていた。DNase I フットプリント実験によって GriR の結合位置を正確に決定し、*griJ* 上流にはこれまで予想されていた数よりも多い 5 個の GriR が結合することを明らかにした。

2. GriZ に関する解析

GriZ は、*griUVW* オペロンを介して GX 生産制御に関与すると推測されていたが、どの遺伝子がどのような機構で作用しているのか等、詳細は分かっていた。 *griZ* 破壊株では *griUVW* が過剰発現することで GX 生産能が失われることから、*griUVW* いずれかの

遺伝子の破壊によって GX 生産能が回復すると推測された。*griZU* 二重破壊株を作製したところ、GX 生産能が回復し、GriZ は *griU* を介してグリキサゾン生産を抑制していると考えられた。また組換え GriZ タンパク質を用いたゲルシフト実験の結果、S40A 型 GriZ について DNA 結合活性が大幅に低下していることが分かった。さらに他の TetR 型転写因子と同様に GriZ がリガンドと結合し DNA から解離することを予想したが、GX や中間産物等はリガンドとして機能しなかった。

3. GriU に関する解析

前述の通り、破壊株の表現型解析から、*griZ* は *griU* を介してグリキサゾンの生産制御を行っていると考えられた。GriU は脱水素酵素とアノテーションされているが、相同性の高いタンパク質で実験的に解析された例はなく、N 末端側が脱水素酵素の NAD 結合領域と高い相同性を持つのみであり、実際にどのような機能を担っているか全く予想が出来なかった。*griZ* 破壊株、*griU* 破壊株、*griUZ* 二重破壊株を用いて転写解析を行ったところ、*griZ* 破壊株では生合成酵素をコードする *griCDEFG*、*griJIH* の転写が失われていたが、*griUZ* 二重破壊株では回復していた。一方、*griR* の転写は常に検出されており、GriU の作用点は *griR* が転写されてから GriR が標的遺伝子を転写活性化するまでの間にあると推測された。

GriU の機能についてさらなる解析を行うため、大腸菌を用いて組換え GriU タンパク質を取得した。まずゲル濾過クロマトグラフィーによって溶液中で二量体化することを示した。次に、GriU と GriR を用いて *griC* および *griJ* 上流域についてゲルシフト実験を行った。GriR のみを用いた場合では単一のシフトバンドが検出され、GriU のみを用いた場合ではシフトバンドは観察されなかったが、GriU と GriR を同時に用いた場合では GriR の結合に由来するバンドよりも泳動の遅れたスーパーシフトバンドが新たに観察された。この結果は DNA-GriR-GriU の 3 者複合体の存在を示唆している。さらに *S. griseus* より RNAP を粗精製し、GriR、GriU と共にゲルシフト実験に供した。RNAP と GriR のみを加えた場合には、GriR 単独の場合よりも泳動度の遅れたスーパーシフトバンドが観察され、GriR が RNAP と結合していることが示唆された。しかし RNAP、GriR、GriU 全てを加えた場合にはスーパーシフトはキャンセルされ、GriR 単独の場合と近い位置にバンドが検出された。この結果、GriR は RNAP をリクルートするが、GriU が GriR と結合することで GriR-RNAP 間の相互作用が阻害されることが示唆された。よって、GriU は GriR の転写活性化能の阻害を通して GX の生産を抑制していることが明らかになった (図 1)。

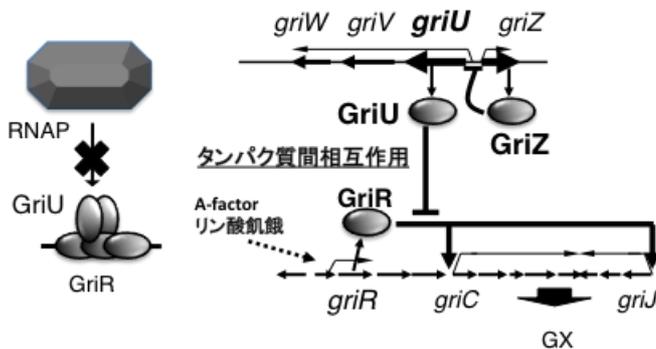


図1 GX生産制御機構のモデル

GriZが何らかの刺激を受けてDNAから解離するとGriUが発現し、GriUがGriRと結合することでGriR-RNAP間の相互作用を阻害し、GX生産を抑制する。

4. ADYP株におけるGX過剰生産の原因遺伝子の同定

GX生産能の高いADYP株とGXをほとんど生産しないゲノム株との間でゲノム配列を比較し変異点を解析することで、GX生産制御に関わる新規な遺伝子を発見できると考えた。両株からゲノムDNAを抽出し、Genome Analyzerを用いて野生株ゲノムのリシーケンスおよびADYP株ゲノムのシーケンスを行ったところ、ADYP株において12ヶ所の変異候補が見出された。このうちORF内に存在しアミノ酸配列を変化させる変異候補は8ヶ所(7遺伝子)であった。これらについてキャピラリーシーケンサーを用いて塩基配列を決定したところ全てに変異が確認されたことから、ADYP株の表現型の原因遺伝子候補をこの7個とした。次に、それぞれの変異点を野生型へ戻したADYP株を作製し、表現型の観察を行った。6遺伝子については変異点を野生型に戻してもグリキサゾン生産能、形態分化能ともにADYP株と同様であったが、*SGR1728*遺伝子上に生じていた1塩基挿入変異を野生型に戻した株では、グリキサゾン生産能が著しく低下するとともに形態分化能が上昇し、ゲノム株と同様の表現型となった。この結果はADYP株の表現型が*SGR1728*遺伝子上の変異によるものであることを強く示唆している。*SGR1728*遺伝子は機能未知の膜タンパク質をコードしているが、ADYP株では1塩基挿入変異によるフレームシフトのため、翻訳産物のC末端側3分の1以降が異常なアミノ酸配列となる。アミノ酸配列からは*SGR1728*の機能は予測できないが、新規な機構によって二次代謝制御に関わっていると考えられる。

総括

本研究によって、二次代謝における重要な転写活性化因子SARPの活性を阻害するタンパク質が発見された。GriUのホモログは他の放線菌ゲノム中にも広く存在するため、二次代謝制御に関わるタンパク質として普遍的である可能性がある。また*griZ*、*SGR1728*などGX合成遺伝子群に含まれない遺伝子がGX生産制御に関わっていることが分かり、GX生産制御機構の全容解明の一助となるのみならず、二次代謝制御に関する知見を広げる研究成果であるといえる。