

《日本農芸化学会功績賞》

枯草菌代謝ネットワークのカタボライト制御の分子機作



福山大学生命工学部生物工学科 教授 藤田 泰 太 郎

筆者は、過去 30 年以上の間、分泌酵素、ヌクレオシドなどの生産に用いられる有用な細菌である枯草菌のカタボライト制御研究中核した代謝制御研究を展開してきた。カタボライト抑制とは、外界に炭素源としてグルコースが存在する限りは、解糖系を働かせることにより他の炭素源の分解系の酵素合成を抑制するという制御系であるが、1995 年、サイクリック AMP (cAMP) をもたず大腸菌のカタボライト抑制機構が適応されえない、枯草菌のカタボライト抑制がカタボライト制御タンパク質 (catabolite control protein; CcpA) の関与する負の制御機構で説明できることを明らかにした。1997 年、筆者も参画した枯草菌ゲノムプロジェクトにより、この菌の全塩基配列が決定され、ポストゲノムシーケンス時代に入った。筆者は、枯草菌の DNA マイクロアレイ解析技術を駆使した、転写制御ネットワーク研究を展開した結果、CcpA の関与するカタボライト制御を基軸とする代謝制御ネットワークを明らかにするに至った。以下筆者の研究業績を時系列で記載する。

1. 枯草菌の糖異化系オペロンの分子遺伝学的研究

1980 年代初頭、大腸菌のラクトースオペロンのカタボライト抑制を対象に、カタボライト抑制機構は cAMP とその受容タンパク質である CRP による遺伝子発現の正の制御系と結論された。しかし、枯草菌などのグラム陽性菌の多くは cAMP をもたないこともあり、この正の制御系が多くの生物系に当てはめられるかどうか疑問視されていた。

枯草菌にはこのラクトースオペロンのような、カタボライト抑制の分子機作研究の対象にできる、分子レベルで解明された異化系オペロンが皆無であったので、グルコン酸資化系を対象として詳細な分子レベルでの研究を開始した。グルコン酸資化系の遺伝子群は一つのオペロンを構成しており、その誘導系に Jacob-Monod のオペロン説が適用できることを、大腸菌などの腸内細菌以外の系では初めて実験的に立証した。このグルコ

ン酸オペロンの先頭の遺伝子とそのリプレッサー遺伝子であり、この産物 (GntR) のタンパク質機能研究の展開により、細菌の DNA 結合制御タンパク質中の一群が、GntR ファミリーと呼ばれ、その呼称が国際的に広く使用されるに至っている。

2. 枯草菌カタボライト抑制の分子機作の解明

1970 年代後半、筆者は枯草菌のカタボライト抑制には解糖系の中間産物であるフルクトース-ビスリン酸 (FBP) が関与していることを明らかにした。その後、上述の枯草菌のグルコン酸オペロンを対象にカタボライト抑制の分子機作の解明研究を開始した。1995 年、図 1 に示す枯草菌 (おそらく、グラム陽性菌全般) のカタボライト抑制の制御機作を明らかにした¹⁾。すなわち、「培地中にグルコースが存在すると菌体内に取り込まれ解糖系により FBP の濃度を上昇させる。FBP は、HPr タンパク質のセリン残基を特異的にリン酸化する ATP 依存性のプロテインキナーゼの賦活剤であり、FBP の濃度上昇により細胞内の P-Ser-HPr タンパク質の濃度も上昇する。そして、転写制御因子である CcpA タンパク質が P-Ser-HPr タンパク質と複合体を形成しカタボライト応答配列 (CRE) に結合し、転写制御を引き起こす。」というものであった。その後、筆者らが提唱したこのカタボライト抑制機作が定説化され、大腸菌のカタボライト抑制を説明する正の制御系より、この負の制御系のほうが、真核生物を含むカタボライト抑制機構により普遍的に適用しようと考えられている。

3. 代謝制御ネットワークのカタボライト制御研究

1997 年、筆者が参画した日欧の国際協力プロジェクトにより、枯草菌ゲノムの全塩基配列が決定された。それ以来、枯草菌研究はポストゲノムシーケンス時代に入った。筆者は、枯草菌の DNA チップを作製し、それを用いた DNA マイクロアレイ解析技術を確認し、枯草菌のトランスクリプトーム解析を可能とした。カタボライト抑制研究もゲノムレベルでの展開が可能となり、まず、CcpA と P-Ser-HP の複合体が認識して結合

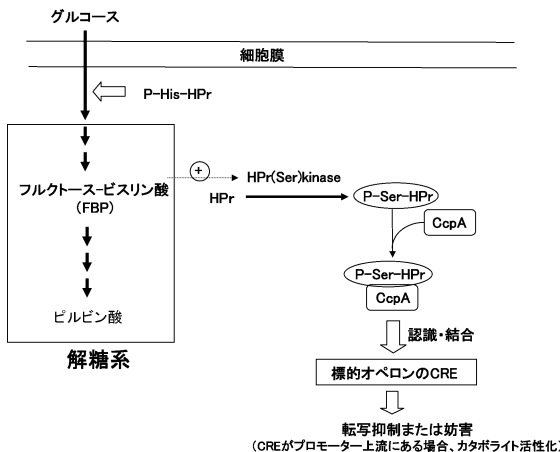


図 1 枯草菌などグラム陽性低 GC 細菌のカタボライト抑制の制御機構¹⁾

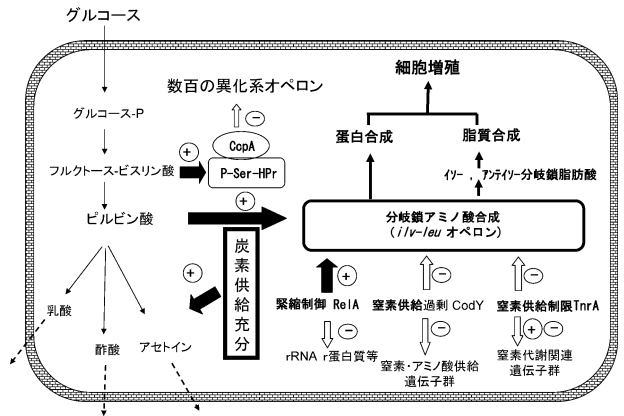


図 2 カタボライト制御を介した異化代謝 (catabolism) と同化代謝 (anabolism) の結節³⁾

する CRE 配列の詳細な解析を行い、そのコンセンサス配列を導き出した。このコンセンサス配列を利用したゲノムレベルでの解析で、140 個のカタボライト制御を受ける遺伝子を見いだした。また、イノシトールオペロンの CRE 配列の研究により、CRE 配列はそのコンセンサス配列の特徴より 2 種類に区別できることを明らかにした。さらに、DNA マイクロアレイ解析とプロテオーム解析により、新規のカタボライト抑制を受ける遺伝子を多数同定した。この枯草菌のカタボライト抑制のゲノムレベルでの研究²⁾は、わが国の細菌のトランスクリプトーム解析研究公表の先駆けともなった。

DNA マイクロアレイ解析を用いた、代謝制御に関与する因子の支配するレギュロン解析とそれに続く分子生物学的解析により、図 2 に示す、代謝制御の基幹を構成すると思われるネットワークを提示できるようになった³⁾。すなわち、「炭素すなわちエネルギーの供給状態は FBP 量に反映され、炭素代謝のグローバルな転写制御タンパク質である CcpA の機能を制御する。グルコースの存在するなど炭素供給が十分なときは、CcpA と P-Ser-HPr の複合体による正の制御により、解糖を可能限り促進させ、生成したピルビン酸をアセトイン、酢酸、乳酸などに変換し、さらにピルビン酸からの分岐鎖アミノ酸合成に与る *ilv-leu* オペロンの転写を高める。このことは、タンパク質合成および枯草菌の脂肪酸の大部分を占める分岐鎖脂肪酸合成を促進し、ひいては細胞増殖の促進につながる。この際、アミノ酸などの窒素源が過剰に供給されていれば、細胞内の GTP と分岐鎖アミノ酸の上昇を感知するグローバルな転写代謝制御因子である CodY により *ilv-leu* オペロンの発現が抑えられ、また窒素源の供給が不十分なときは、グルタミン量の低下を感知できる、グローバルな窒素供給制御因子である TnrA によって負に制御されて、増殖を抑制する。」という代謝制御ネットワークである、つまり CcpA と P-Ser-HPr の複合体によるカタボライト制御に基づく細胞総体としてバランスのとれた代謝制御ネットワークが作動しているということが明確になった。

筆者の長年にわたる研究で明らかになった、カタボライト制御を中核に据える、CcpA などのグローバル制御因子が関与する本基幹代謝制御ネットワークが、グラム陽性の低 GC 細菌で作動しているはオルソログ解析より明らかであり、さらに類似

のネットワークが生物全般で機能していると考えら、今後の代謝制御ネットワーク研究の基盤知見を提供すると思われる。また、グラム陽性低 GC 細菌には、枯草菌や乳酸菌をはじめ多くの有用細菌が含まれ、これらの細菌を用いて効率よく有用物質を産生させるには、炭素源としての炭水化物を如何に効率よく有用物質に変換させるかが肝要である。本基幹代謝制御のネットワークの分子機作の解明は、有用物質産生系の効率化のためのネットワークの有効な改変方策を提示する。さらに、病原菌の多くはグラム陽性低 GC 細菌であり、それらの毒素産生機作にも、これらのグローバルな制御因子 CcpA や CodY が関与していると指摘され始めており、本基幹代謝制御ネットワークの解明は病原菌対策にも寄与すると期待される。

おわりに

本研究は、京都大学農学博士号を取得後、米国立衛生研究所 (NIH: National Institutes of Health) に赴き、Ernst Freese 博士のもとでの枯草菌糖代謝の酵素学および生理学的研究を端緒とする。4 年余りの滞米の後、浜松医科大学で枯草菌代謝の分子遺伝学的研究に着手し、藤田民枝氏、二橋純一博士、三輪泰彦博士 (現 福山大学教授) らとグルコン酸オペロンの分子レベルでの解明研究を遂行した。1987 年、福山大学に赴任後、三輪博士らと枯草菌のカタボライト抑制の分子レベルでの研究を進めるとともに、吉田健一博士 (現 神戸大学農学部) らとの枯草菌ゲノムの塩基配列決定、ゲノムの機能解析および転写制御ネットワーク研究を進め、さらに広岡和丈博士、東條繁郎博士らの協力を得て本研究を完成させるに至った。これら諸氏の共同研究に深謝するとともに、本研究をともにした博士研究員 (C. Kang, 山口弘毅, 里村武範博士) や研究協力者、大学院生や学部学生に謝意を表します。

文 献

- 1) Y. Fujita, Y. Miwa, A. Galinier, and J. Deutscher: *Mol. Microbiol.*, **17**, 953–960 (1995).
- 2) K. Yoshida, K. Kobayashi, Y. Miwa, C.-M. Kang, M. Matsunaga, H. Yamaguchi, S. Tojo, M. Yamamoto, R. Nishi, N. Ogasawara, T. Nakayama, and Y. Fujita: *Nucleic Acids Res.*, **29**, 683–692 (2001).
- 3) S. Tojo, T. Satomura, K. Morisaki, J. Deutscher, K. Hirooka, and Y. Fujita: *Mol. Microbiol.*, **56**, 1560–1573 (2005).