

一般細菌が示す多様な環境応答の分子メカニズムに関する研究



日本大学生物資源科学部応用生物科学科 助教 高野 英 晃

はじめに

地球環境を支えている細菌群の活動はさまざまな適応・応答によって調節されている。細菌群の生理および生態を理解するためには、その調節の鍵となる環境因子とその応答機構の解明が必要不可欠である。環境因子は、光のような環境に広く存在する普遍的な因子と、生物によって作り出される代謝産物のような局所的に存在する特異的な因子に大別される。本研究では、光合成能をもたない一般細菌の活動を調節する(1) 普遍的因子と(2) 特異的な因子の多様性とその作用メカニズムについて、独自に見いだしたユニークな現象をもとに多角的な研究を推進した。すなわち、光をはじめとする普遍的因子群が特異的な遺伝制御メカニズムを介して多様な適応応答を引き起こしている実態の解明を進めた。また、多様な生理活性物質を生産する放線菌の代謝産物を中心に特異的な因子を探索し、異種細菌間の相互作用を仲介する因子の同定に取り組んだ。

1. 普遍的因子に対する応答制御の分子メカニズム

地球に普遍的に存在する環境因子のひとつである光が抗酸化活性を有するカロテノイド(Crt)の生産を誘導する現象は、真核生物のみならず光合成能をもたない一般細菌においても知られていた。本研究の発端は放線菌の遺伝学的なモデル株 *Streptomyces coelicolor* において、Crt合成が光照射によって著しく促進される現象を独自に見いだしたことにある。一般細菌において広く作用する光センサーの実態は知られていなかったことから、筆者らは本菌の遺伝学的な解析を進めた。それにより、*crt*合成遺伝子クラスターに隣接してコードされる LitR と命名した MerR 型転写調節蛋白質が光誘導性転写制御において中心的な役割を果たすことを明らかにした。すなわち、LitR は隣接する ECF 型シグマ因子 LitS の転写を光照射下において特異的に誘導し、 σ^{LitS} を含む RNA ポリメラーゼが *crt* 遺伝子群の mRNA 合成を開始する。

興味深いことに、放線菌より見いだした LitR 類似蛋白質はグラム陰性・陽性の双方に渡り、およそ3割のゲノム解読細菌群にコードされていた。また、それらの多くは、近傍にコードされる *crt* 合成遺伝子のローカルスイッチとして働くことが予想された。そこで光受容の分子メカニズムを解明するため、高度好熱性グラム陰性細菌 *Thermus thermophilus* およびグラム陽性土壌細菌 *Bacillus megaterium* が保有する LitR をモデルとして取り上げて、詳細な遺伝生化学的解析を進めた。これまでに LitR にリガンドとして結合するビタミン B12 が光アンテナとして機能すること、それが光を吸収すると暗条件で転写抑制蛋白質として機能していた LitR の多量体構造に変化が誘起され、対象遺伝子の転写が誘導されることを明らかにした(図1)。その過程において、LitR 組み換え蛋白質と RNA ポリメラーゼのみから構成される *In vitro* 反応系において、光依存的な mRNA 合成を再現することに成功した。また、本ファミ

リーではじめての例となる LitR 光感知ドメインとビタミン B12 複合体の立体構造を決定した(図1)。これらのことは、異なる性質をもった細菌群に由来する LitR が共通した光スイッチとして働くことを示しており、LitR は一般細菌が示す Crt 生産に対する普遍的な光センサー型転写調節蛋白質であることが明らかになった。

上記の結果より、光によって誘発される多様な機能が一般細菌に潜在していることが示唆された。そこでトランスクリプトーム解析を実施したところ、*T. thermophilus* において光との関連性が知られていない複数の機能未知遺伝子群が見いだされた。また、LitR によって光依存的に発現が制御されている CRP/FNR ファミリーの LdrP が一連の光応答遺伝子群の発現を誘導するマスタースイッチとして働くことを明らかにした(図1)。ここで見つかった光感知・応答に関連する遺伝子群のすべてが巨大プラスミドに集約されていたという興味深い事実は、光ストレスに対する細胞防御という本プラスミドのユニークな役割を示している(図1)。この他にも *Pseudomonas* 属細菌を対象としたトランスクリプトーム解析を行い、互いに補完し合う関係性にある3つの LitR 類似蛋白質がゲノム上に散在する20余りの新規な光応答遺伝子群(葉酸合成・脂肪酸合成・細胞凝集因子・ヘム合成など)の発現制御に関与することを明らかにした。ここで明確になった LitR の広範な分布とその役割の多様性は、一方で細菌に存在する光感知・応答機構の一端に過ぎず、今後の進展により一般細菌の光生命科学が大きな広がりを見せていく可能性が考えられる。

筆者らはまた、普遍的因子としてのアンモニア、炭酸ガスおよびカタボライトに対する応答メカニズムについての解析も進

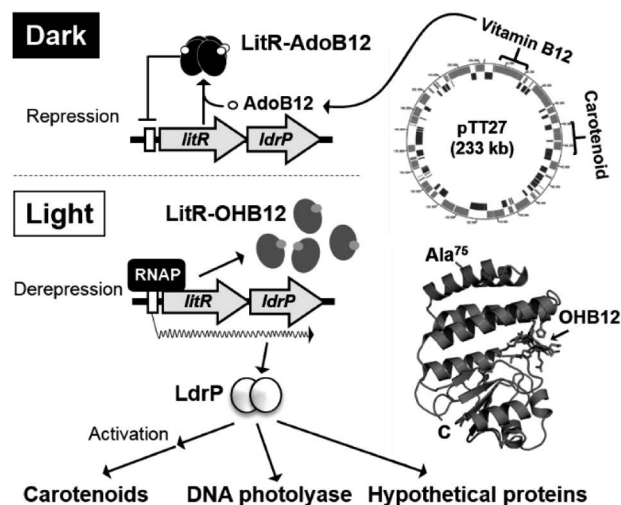


図1 光誘導性カロテノイド生産の分子機構
AdoB12, アデノシル B12; OHB12, ヒドロキソ B12; pTT27, 巨大プラスミド; 立体構造, LitR 光感知ドメインと OHB12 複合体

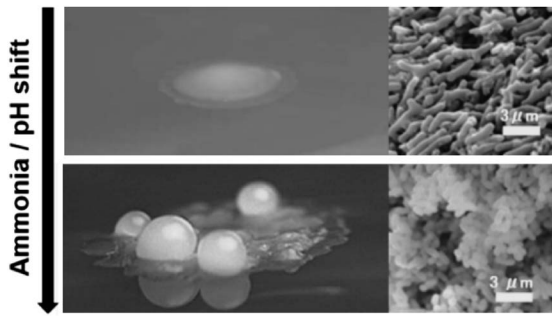


図2 *C. glutamicum* の環境依存的な細胞形態変化
(左：コロニー形態，右：細胞形態)

め、以下に示す成果を得た。アミノ酸生産菌 *Corynebacterium glutamicum* が環境依存的な細胞形態変化を起こすことを見だし(図2)、アンモニアあるいはpHシフトがその細胞分化を誘導する分子であること、ならびにそこに関与する窒素代謝のグローバルレギュレーターを同定した。また、共生細菌 *Symbiobacterium thermophilum* の共生特異的に発現するトリプトファンゼの発現が炭酸によって顕著に誘導されることを見だし、そこに関与する転写調節因子を同定した。加えて、炭酸によって増殖・運動性・二次代謝産物生産などが促進される土壌細菌の普遍的な存在を明らかにした。さらに、ストレプトマイシン生産性放線菌 *S. griseus* の形態分化と二次代謝の開始に対するカタボライト抑制に関する研究を推進した。それによりストレス応答性RNAポリメラーゼσ因子群が気中菌糸形成およびストレプトマイシン生産で見られるグルコース抑制に関与し、これらパラログσ因子群の活性がアンチσ因子RshAおよびその制御因子BldGによってクロストーク制御されることを見出した。その他にも、銅シャペロン蛋白質ScoCが放線菌で広く認められる銅イオンによる分化促進現象に深く関与することを明らかにした。

2. 特異的因子による二次代謝産物生産の誘導

筆者らは、かつて放線菌 *S. griseus* が隣接する別の放線菌 *S. tanashinesis* の増殖と抗生物質生産を著しく促進する現象を見だし、シデロフォア Desferrioxamine E がクロストークを仲介する化学因子の本体であることを明らかにした。筆者らは、あらたに本化合物に応答を示す細菌を土壌より広く探索した。その結果、グラム陰性細菌 *Chromobacterium violaceum* の青色抗生物質ビオラセインの生産が顕著に促進されることを見出した(図3左)。別の事例として、放線菌 *S. scabrisporus* (供与菌) によって生産される新規なイオノフォア系抗生物質 Promomycin が別の放線菌 *S. griseorubiginosus* (受容菌) の抗生物質生産を顕著に促進することを明らかにした(図3右)。また、ビタミンB12 (Cobalamin) が上述のCrt生産の光誘導に加えて、放線菌 *S. coelicolor* の細胞分化・抗生物質生産に関与する

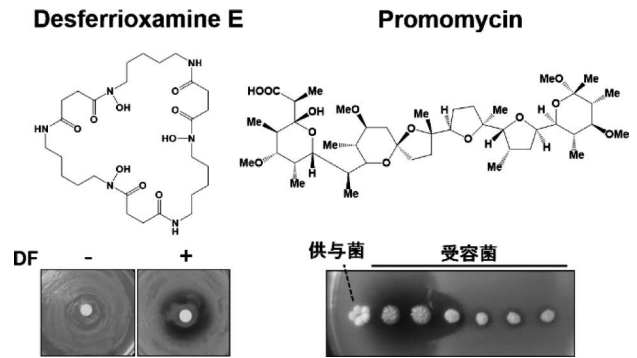


図3 特異的因子を介した抗生物質生産の誘導

ことを見だし、さらにその調節に関わると推測される蛋白質を同定した。これらの結果は、“シデロフォア、抗生物質、ビタミンが二次代謝産物生産の誘導因子として作用する”ことを示している。これらを通して、微生物の代謝産物の役割に新たな知見をもたらすと同時に、化学因子を介した微生物間コミュニケーションさらにはネットワークの一端を明らかにすることができた。

おわりに

本研究では2つのグループに大別される環境因子が細菌の増殖・分化・物質生産に大きな影響を及ぼすことを明らかにし、複数のユニークな制御メカニズムについて深い理解を得た。本研究で得られた成果は環境因子群の機能を介した個々の細菌およびその社会制御が環境中で広く作動しているという事実を示している。また、自然界にもともと存在する環境因子群の効果的かつ複合的な利用がまだまだ休眠状態で広く潜在する微生物資源を発掘する上での有効な手段となることを示している。

本研究は日本大学生物資源科学部・生命工学研究室(応用生物科学科/生命科学研究センター)で行われたものであります。学部生のときより、終始ご指導とご鞭撻を賜りました東京大学名誉教授・別府輝彦先生(元日本大学・教授)および日本大学教授・上田賢志先生に心より深甚な謝意を表します。研究全体を通して、多大なるご協力とご助言をいただきました東京大学教授・(故)堀之内末治先生、同大学教授・大西康夫先生に厚く御礼申し上げます。また、個別の研究遂行において多大なご協力・ご助言をいただきました北里大学・池田治生先生、東京大学・作田庄平先生、理化学研究所・新海暁男先生、筑波大学・中村顕先生、東京大学・野尻秀昭先生に感謝いたします。本受賞は本研究に関わった生命工学研究室の卒業生および学部学生諸氏の努力の賜物であり、改めて感謝の意を表します。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関東支部長・須貝威教授ならびに諸先生方に厚くお礼申し上げます。