

《日本農芸化学会賞》

放線菌の二次代謝，形態分化の制御機構の解明



東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻 教授 堀之内 末 治

グラム陽性細菌である放線菌は、原核生物の中で最も高度な形態分化を行う。かび状の長い枝分かれした菌糸として生育し、気中菌糸を着生して種々の孢子、孢子嚢などの特殊構造体を形成する微生物群であり、基礎生物学的に形態分化のモデル生物となっている。放線菌は一方では、「地球上の有機化合物の天然の保存庫」と称され、抗生物質、免疫抑制剤など多様な生理活性を示す二次代謝産物のスクリーニング源となってきた。したがって、放線菌は我が国が世界に誇れる発酵工業の隆盛をもたらした菌群の一つである。二次代謝産物の生産は生理的分化と考えられ、「二次代謝は形態分化の化学的表現」と見なされる。放線菌の二大特徴である二次代謝，形態分化は、A-ファクターに代表される低分子化学調節物質やセリン/スレオニンキナーゼによる「真核生物型」と考えられていた制御系によって厳密に調節されている。放線菌は、このような基礎研究としての興味深い材料であるばかりでなく、ものづくりにとって「宝の山」ともいえる二次代謝酵素の保存庫でもある。本講演は、放線菌機能の発掘，制御，応用を目指して、講演者らが長年にわたり継続している研究をまとめたものである。

A-ファクター制御系の解明

Streptomyces griseus において、ストレプトマイシンをはじめとする二次代謝産物の生産と気菌糸・孢子を形成する形態分化は、自身の生産する極低濃度の A-ファクターによって誘導される(図参照)。AfsA により β -ケト酸とグリセロール誘導体から生合成される A-ファクターの菌体内濃度が徐々に上昇すると、*adpA* 遺伝子のプロモーターに結合して発現を抑制していた A-ファクター受容体 (ArpA) に結合して DNA から解離させ、*adpA* の転写をオンにする。X 線結晶構造解析により、A-ファクター (ボールモデルで示す) は、二量体 ArpA のサブユニットの C 末側のそれぞれに埋め込まれるように結合すると、C 末側の DNA 結合ドメインが外側に開く構造になって DNA から解離させることが推定された。このように誘導された転写因子 AdpA は、AdpA レギュロンを構成する二次代謝，形態分化に必要な多くの遺伝子の転写を一斉にオンにし、秩序だった生理的，形態的分化が進む。本制御系を動かすのに必要な A-ファクター濃度は、1 nM である。A-ファクターはまさにホルモンと呼べる制御を司る。なお、AdpA 自身が *adpA* のプロモーターに濃度依存的に DNA ループを形成して転写抑制をすることによって、細胞内 AdpA 濃度は厳密に制御されている。このようなシグナル伝達によって誘導された AdpA は、たとえばストレプトマイシン生合成遺伝子クラスター内の転写因子 *strR* のプロモーターに 2 カ所結合することによって転写を活性化し、次いで StrR はクラスター内のすべての生合成遺伝子の転写を活性化し、ストレプトマイシン生合成が開始される。A-ファクターに代表される γ -ブチロラクトン型ホルモンおよ

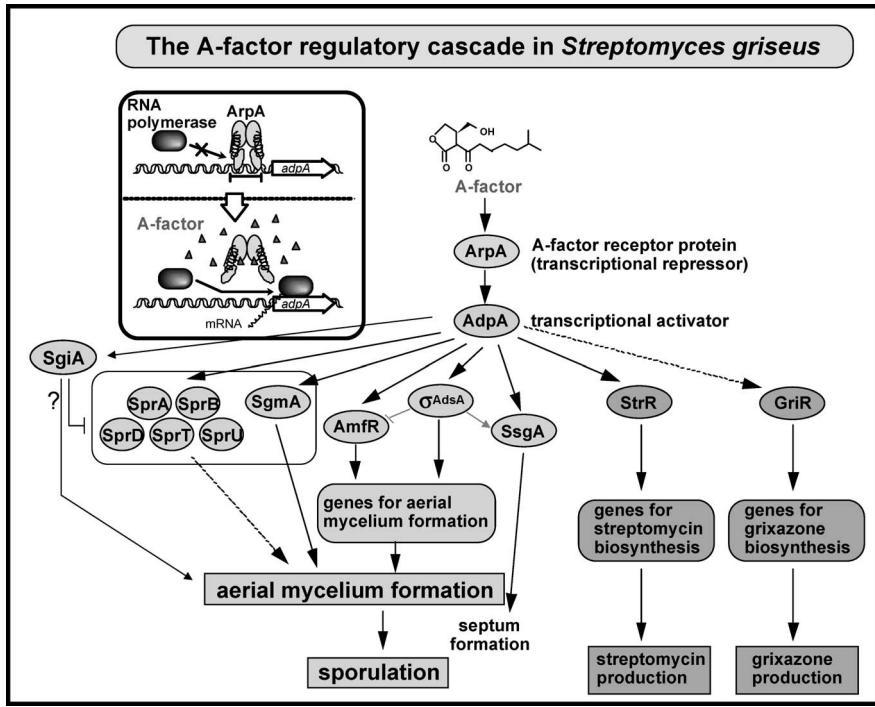
び ArpA ホモログは多くの放線菌に見いだされ、このタイプの制御系の一般性を物語る。

新しい真核生物型制御系の発見

S. coelicolor A3(2) において、抗生物質でもある青色色素アクチノロージンの生産を活性化する遺伝子として *afsR* を見いだした。本遺伝子は、「休眠」状態にある二次代謝遺伝子を「目覚めさせる」点で分化制御の本質的特性を備えているが、それが真核生物に見られるセリン/スレオニン型プロテインキナーゼである AfsK によってリン酸化される転写制御因子であることを明らかにした。AfsK は Thr-168 を自己リン酸化し、キナーゼ活性を上昇させる。AfsK によるリン酸化によって DNA 結合能が上昇した AfsR は、*afsS* プロモーター直上に結合し、RNA ポリメラーゼをリクルートし、さらに自身の ATPase 活性によって開鎖複合体を形成させることによって本遺伝子の転写を活性化する。AfsK-AfsR およびその下流ステップにある *afsS* よりなる制御系は、真核型キナーゼを介する信号伝達系が原核生物から発見された初めての例であり、他の微生物における類似の制御系研究の引き金となった。そのほかにも、ホルモン制御系の調節因子として知られる cAMP やカルシウム結合蛋白として真核細胞の機能を調節しているカルモジュリンが、放線菌の二次代謝，分化の制御に関与していることを見いだした。A-ファクターも含め、このような制御系が機能していることは、真核生物の特徴を併せ持った「境界生物」(boundary microorganism) というべき放線菌の特性を浮き彫りにしている。

微生物によるフラボノイド化合物の発酵生産

独自に決定した *S. griseus* の全ゲノム配列に基づいて、A-ファクター制御カスケードの下流に位置する二次代謝酵素遺伝子を探索する過程において、いくつかの新規酵素を見だし、その反応機構を解明した。例えば、芳香族化合物へのモノオキシゲナーゼやフェノキサジノン骨格を形成する *o*-アミノフェノールオキシダーゼなどの新規酵素は、コンビナトリアル生合成によるものづくりの際の構成員として利用できる。また、褐色色素の著しい生産を引き起こす遺伝子として見いだした *rppA* がコードするタンパク質が、それまで植物にのみ知られたフラボノイド生合成経路の一員であるカルコン合成酵素と相同性を有し、5 分子のマロニル CoA を一気に縮合・環化させてナフトレン誘導体を生成する III 型ポリケタイド合成酵素であることを明らかにした。さらに、やはりフラボノイド生合成に利用できるクマリン酸/シナモン酸: CoA リガーゼを放線菌から発見した。これら遺伝子を大腸菌、放線菌などの微生物宿主中で組み合わせて「人工的生合成遺伝子クラスター」を発現させるという新しい概念を提唱し、実際に naringenin, pinocembrin,



図

flavonol, flavone, isoflavone などの植物由来フラボノイドを発酵生産させたばかりでなく、非天然型フラボノイドの生産をも達成した。これらの成果は、いわゆるコンビナトリアル生合成と称される二次代謝産物生産の実用技術に新しい突破口を開くものといえる。

放線菌の制御機構に関する研究は、別府輝彦先生が東京大学醗酵学研究室を主宰されていた当時に開始されたものであり、以来ご指導、ご鞭撻を賜りました。また、研究室スタッフの吉田 稔（現 理研）、大西康夫、鮎 信学をはじめ、本研究に携わった多くの学生、留学生の頑張りを誇りに思います。