



枯草菌の二次代謝制御機構に関する研究

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 主任研究員 稲岡 隆史

はじめに

枯草菌は、納豆製造に用いられるほか、アミラーゼやプロテアーゼなどの分泌酵素や複数の抗生物質を生産するなど、産業界で広く用いられる有用な細菌である。また、内生胞子を形成することや自然形質転換能を有するなど、学術的にも重要な細菌として古くから研究が行われてきた。1997年には枯草菌ゲノムの全塩基配列が決定され、大腸菌と並ぶモデル微生物として、その後のポストゲノム解析で先導的役割を担っている。しかしながら、抗生物質生産に代表される二次代謝研究では、放線菌がその主役として脚光を浴び続けており、枯草菌の二次代謝研究は比較的軽視されてきた。このような背景から、筆者らは枯草菌の二次代謝に焦点をあてて研究を進め、幸運にも新規な二次代謝制御機構を発見することができた。以下に、その概要を紹介する。

1. 定常期遺伝子発現における緊縮制御機構の役割

微生物は、アミノ酸欠乏により翻訳が阻害されると、リボソームに結合している RelA タンパク質がグアノシン-3'-二リン酸-5'-二リン酸 (ppGpp) を合成することによってリボソーム RNA の発現を抑制する“緊縮制御”を行う。ppGpp は GMP 合成経路の最初の酵素である IMP 脱水素酵素を阻害するので、ppGpp の増加は細胞内 GTP 濃度の低下につながる事が知られている。ppGpp 合成能を欠く *relA* 変異株では二次代謝産物の生産能が著しく低下することから、筆者らは二次代謝誘発における緊縮制御の重要性を以前から指摘してきた。そこで、枯草菌の抗生物質生産における緊縮制御の影響を検討した結果、アミノ酸欠乏や、GMP 合成酵素阻害剤であるデコイニンの添加、GTP 結合タンパク質である CodY 遺伝子の破壊などによって枯草菌の抗生物質生産が誘導されることが判明した。CodY タンパク質は細胞内に GTP が高濃度で存在するような富栄養環境下で胞子形成遺伝子やコンピテンス遺伝子などの定常期遺伝子群を抑制する転写因子である。すなわち、リボソーム上でアミノ酸枯渇を感知した RelA タンパク質は ppGpp を

合成することによって緊縮制御を発動させるとともに、細胞内 GTP 濃度を低下させることにより CodY による転写抑制を解除し、二次代謝や自然形質転換能、胞子形成を誘導しているのである。このように、細胞内 ppGpp 濃度の増加や GTP 濃度の低下が枯草菌の定常期シグナルとして作用しているものと考えられることができる (図 1)。

2. ジペプチド抗生物質バシリシン生産制御

前述したように、枯草菌の抗生物質生産は細胞内 GTP 濃度によって制御されている。そこで、GTP によって制御される抗生物質を同定したところ、L-anticapsin と L-アラニンからなるジペプチド抗生物質バシリシンであることがわかった (図 2A)。この抗生物質は 1960 年代に発見され、芳香族アミノ酸の原料となるプレフェン酸から合成されることが予想されていたが、その生合成遺伝子は同定されていなかった。そこで、枯草菌ゲノム情報を活用し、プレフェン酸を基質とする可能性のある酵素を探索した結果、バシリシン生合成遺伝子として有望なオペロン *ywfBCDEFG* を発見することができた (図 2B)。実際、バシリシン合成活性 (L-anticapsin と L-アラニンを結合するアミノ酸リガーゼ活性) を欠く変異株は、*ywfE* 遺伝子内に変異を有しており、この変異がバシリシン合成能欠損の原因であることが証明された。予想したとおり、このオペロンのプロ

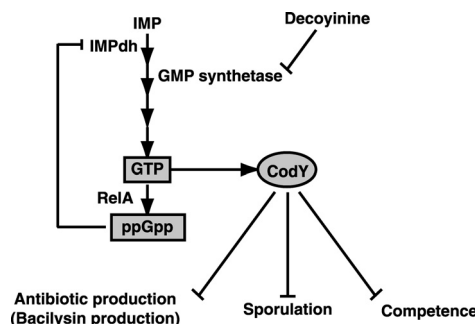


図 1 枯草菌における定常期遺伝子の制御

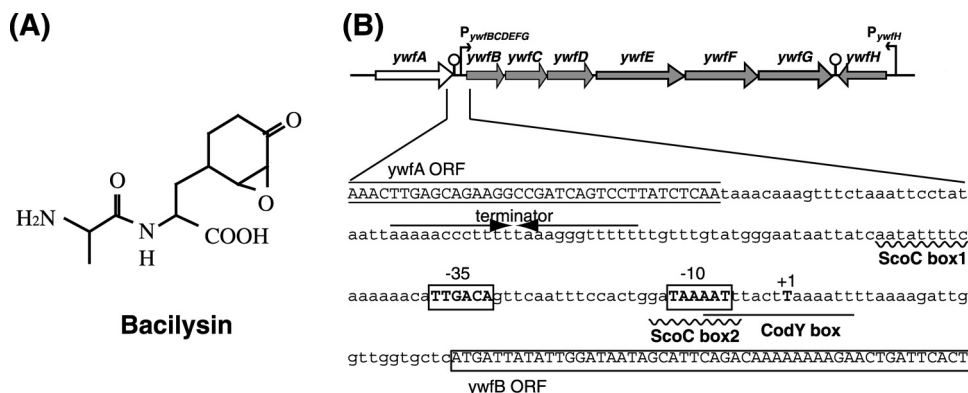


図 2 バシリシン (A) とその生合成遺伝子 (B)

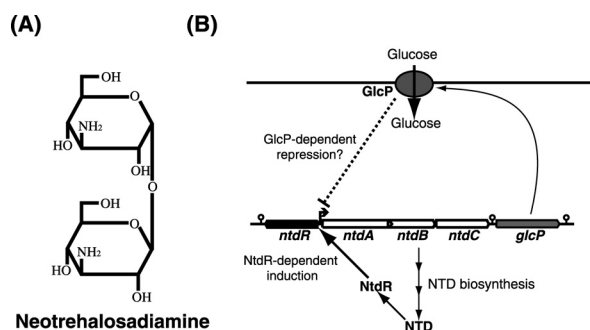


図3 ネオトレハロサジアミン (A) とその生合成遺伝子の制御 (B)

モーター領域には CodY 結合配列が存在しており、その発現はアミノ酸欠乏やデコニン添加、CodY 遺伝子の破壊によって誘導された。さらに、このオペロンの発現は、CodY のほかに ScoC や AbrB によっても抑制されていることが判明した。

3. RNA ポリメラーゼ変異による潜在的二次代謝経路の活性化

バシリシン研究の過程で、筆者らは「RNA ポリメラーゼに適切な変異を導入すれば、二次代謝遺伝子などの有用遺伝子発現を活性化できるのではないか？」という着想を得るに至った。そこで、抗結核薬であるリファンピシンの耐性変異が RNA ポリメラーゼに起こることを利用して、枯草菌にさまざまなリファンピシン耐性変異を導入し、抗生物質生産能を比較した。その結果、RNA ポリメラーゼ β サブユニットの 487 番目のセリンがロイシンに置換された変異株が抗生物質生産能を活性化することを発見した。この変異はバシリシン合成能欠損株でも抗生物質生産を活性化することから、バシリシンとは異なる抗生物質生産経路を活性化したことは明らかである。そこで、この変異株の培養液から抗生物質を単離・精製し、構造決定したところ、アミノ糖抗生物質ネオトレハロサジアミン (3,3'-ジアミノ- α,β -トレハロース) であることがわかった (図 3 A)。この抗生物質は *Bacillus pumilus* や *Bacillus circulans* が生産することは知られていたが、枯草菌は通常培養条件では、この抗生物質を生産することはない。すなわち、リファンピシン耐性変異によって生じた RNA ポリメラーゼの機能変化が潜在的な抗生物質生産経路であるネオトレハロサジアミン合成経路を活性化したことになる。リファンピシン耐性変異による二次代謝経路の活性化メカニズムを明らかにするため、トランスポゾンを用いてネオトレハロサジアミン生合成オペロン

ntdABC とその転写アクチベーター NtdR をコードする遺伝子 *ntdR* を同定した。驚くべきことに、ネオトレハロサジアミン生合成オペロンの発現は、最終産物であるネオトレハロサジアミン自身が転写アクチベーター NtdR に結合することによってネオトレハロサジアミン生合成オペロンの発現を誘導するオートインダクション機構によって制御されていることが判明した。さらに、ネオトレハロサジアミン生合成オペロン下流に存在するグルコーストランスポーター GlcP をコードする *glcP* 遺伝子の発現はネオトレハロサジアミン生合成オペロンと共発現していることや GlcP がグルコースの取り込みに応じてネオトレハロサジアミン生合成遺伝子の発現を抑制していることなどを明らかにした (図 3B)。また、リファンピシン耐性株を用いた解析から、リファンピシン耐性変異が RNA ポリメラーゼのプロモーター認識能を増大させることや転写終結効率を向上させることなども明らかにしており、リファンピシン耐性変異による潜在機能活性化メカニズムも徐々に解明されつつある。

おわりに

筆者らは、枯草菌の二次代謝研究を通して、バシリシン生産が細胞内 GTP 濃度によって制御されていることやリファンピシン耐性変異が潜在的二次代謝経路を活性化することなどを発見した。特に有用微生物へのリファンピシン耐性変異の導入は、アミラーゼやプロテアーゼなどの酵素生産や放線菌の抗生物質生産においても有効性が確認されており、微生物の有用機能活性化手法として極めて有望である。さらに本手法は、煩雑な操作を必要とせず、ほとんどの微生物に適用でき、遺伝子組換えに伴う諸問題も発生しないという特筆すべきメリットがある。今後、このような有用機能活性化手法が、新規有用物質の探索や微生物育種などへ活用されることを期待している。

本研究は、(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所で行われたものです。本奨励賞にご推薦くださり、本研究をご指導、ご支援くださいました食品総合研究所の越智幸三先生に心より御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり、多くのご助言をいただきました立教大学の河村富士夫先生をはじめ、福山大学の藤田泰太郎先生、愛媛大学の戸澤 譲先生に深く感謝いたします。本研究は岡本 晋ユニット長をはじめ、多くの共同研究者ならびに研究室メンバーの皆様のご協力によって成り立っており、この場を借りて厚く御礼申し上げます。