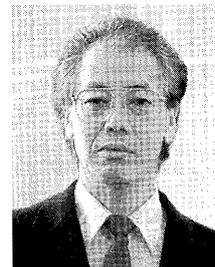


## 微生物における有用生理活性物質合成と制御機構の解明

仁平 卓也



### Deciphering On-Off Mechanism of Microbial Secondary Metabolism

Takuya Nihira (*International Center for Biotechnology, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871*) *Seibutsu-kogaku* **86**: 109-116, 2008.

抗生物質をはじめとする天然生理活性物質は、人間社会になくてはならないものであり、1929年フレミングが *Penicillium* 属糸状菌によるペニシリン生産を報告したことを契機として、数多くの有用化合物が微生物より発見されてきている。

表1は、新規化合物生産菌の分布を示すもので、1947-1997年の50年間に *Journal of Antibiotics* に発表された新規

化合物について、その活性と生産微生物を八木澤がまとめたものである。原核微生物である放線菌が新規生理活性物質の生産菌としては圧倒的多数(69.4%)を占め、次いで真核微生物である糸状菌が19.1%を占める。

表2は、いままでに微生物から知られている生理活性物質の総数を Bérdyら<sup>2)</sup>が報告したもので、微生物由来の生理活性物質のうち約45%が放線菌によって生産さ

表1. 新規生理活性物質が示す生理活性とその生産菌の分布 (文献1より改変)

活性	放線菌	真菌	その他 (細菌, 担子菌など)	合計
抗菌, 抗寄生虫, 抗ウイルス活性	1,177	109	246	1,532
抗真菌活性	277	160	91	528
抗腫瘍活性	801	116	72	989
各種生物活性	410	344	52	806
その他	315	93	31	439
計	2,980 (69.4%)	822 (19.1%)	492	4,294

表2. 微生物に由来する生理活性物質

生産菌	抗生物質	その他活性	計
放線菌	8,700	1,400	10,100 (44.9%)
糸状菌	4,900	3,700	8,600 (38.2%)
その他微生物	2,900	900	3,800
計	16,500	6,000	22,500

著者紹介 大阪大学生物工学国際交流センター (教授) E-mail: nihira@icb.osaka-u.ac.jp

れ、また38.2%が糸状菌によって生産されることが判る。このように、まとめる人間により、またその観点により、数字の上で若干の相違があるものの、天然生理活性物質の生産菌としては、原核微生物中の放線菌と真核微生物中の糸状菌とが圧倒的に優秀な能力を秘め、両者を合わせると83～88%の多数を占めるという傾向は変わらない。したがって、天然の生理活性物質を扱う研究者は、必然的に放線菌か糸状菌のどちらか、あるいは両者を扱う運命にあり、逆に放線菌と糸状菌を対象としていれば、生理活性物質生産菌の主要なところは押さえていることを担保できる。

図1に、代表的な微生物由来生理活性物質の構造を示すが、いずれもきわめて複雑な構造を有していることが特徴で、工業規模での実生産を考えると、有機化学的な純然たる合成法では到底採算が合わず、微生物を用いた発酵法が唯一の実際的な生産法となる。ここで注意しておきたいことは、生産菌にとってこれらの生理活性物質は生育や菌体維持には必ずしも必要ではない、いわゆる二次代謝産物にあたることである。これら二次代謝産物生産プロセスは多量のATPやNADPHなどを消費するプロセスであり、不必要なエネルギー消費を抑えるという観点から、生産菌は必要最小限の量しか作らないです

むよう。また生産した化合物によって自身が害を被らないように、菌体外排出系や生合成系を巧みに制御する何段階にもわたる複雑な機構を備えている。一方、これらの化合物を利用する立場の人間側からみれば、高い生産能力を持った菌ほど望ましいわけであるが、野生株の生産能力以上に高い生産力を発揮させるためには、菌が備えている制御系をうまくいかくぐり、あるいは操って望みの二次代謝産物を多量に作らせることが必要となってくる。従来このような高生産菌の育種には、ペニシリン高生産菌の育種の場合のように、ランダム変異法が用いられ、種々の変異処理の後に高生産株を選別するという過程を何度も繰り返し、培地組成や培養法の改良を組み合わせて、高生産を達成していることは周知の事実である。しかし、制御系が多重で複雑であれば、単純なランダム変異法では高生産株を得られる可能性はきわめて低く、高生産株の育種に膨大な時間と手間がかかるのが最大の欠点であり、より合理的な育種法が望ましい。幸いなことに、放線菌や糸状菌においては、二次代謝産物の生産に関わる生合成系遺伝子、制御遺伝子および耐性遺伝子はゲノム中の一定の部位に固まって存在し、クラスターとして機能しているケースが多いため、現在のように塩基配列決定が安価・迅速に行える状態では、まず関

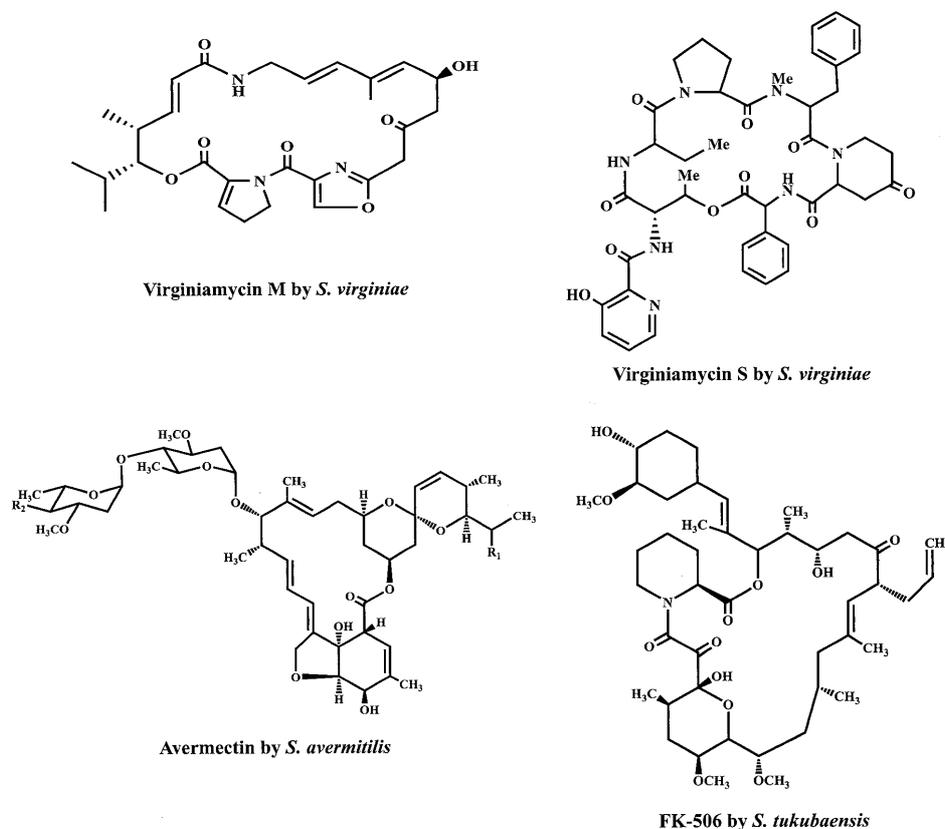


図1. 放線菌が生産する各種の有用生理活性物質

連する遺伝子領域を取得・解析し、その解析に基づいて、制御系の回避や不足する生合成系の補充など、合理的・合目的に高生産株を育種することが可能となっている。以下、我々が *Streptomyces virginiae* を題材にして、抗生物質 virginiamycin の生産性を高めてきた例を述べ、読者が高生産菌を育種する戦略を立てる一助としたい。

### *S. virginiae* における放線菌ホルモンを介した virginiamycin 生産制御

*S. virginiae* による virginiamycin 生産プロファイルを図2に示すが、本菌が生産する virginiamycin は実は virginiamycin M (VM) と virginiamycin S (VS) (図1) という構造のまったく異なる2種類の混合物である<sup>3)</sup>。VS は、アミノ酸のみが縮合した環状ペプチド系の抗生物質であるのに対して、VM は、ポリケチド系とペプチド系とが混ざって生成するハイブリッド型のマクロライド系抗生物質である。これらは単独に存在する場合には静菌的のみ働くが、共存すると殺菌的に働き、また有効濃度が10分の1以下になるなど、synergistic に働く抗生物質の典型例で、生産菌である *S. virginiae* は奇妙なことに VM と VS の両者を同時に生産し、また最も効果の高い比率を保って両者を生産するという非常に合理的な生産プロファイルを示す<sup>4)</sup>。生合成経路としては、VS はポリペプチド型の抗生物質であるため、non-ribosomal peptide synthase (NRPS) によって、また VM は NRPS と polyketide synthase (PKS) とが混ざった状態で存在するハイブリッド型の type I NRPS-PKS によって生合成されると予想されるが、各々 100–200 kbp はあるであろう生合成遺伝子クラスターよりなると考えられ、複数の遺伝子クラスターをいかにして制御し同時生産を達成しているかが興味深い。

Virginiamycin 生産の最初の制御ポイントは、図2で

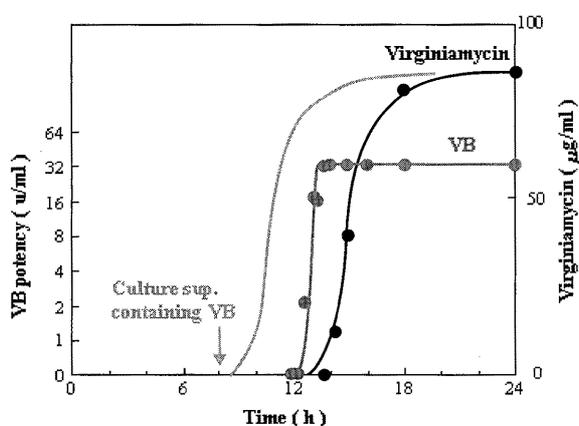


図2. 放線菌 *Streptomyces virginiae* による抗生物質 virginiamycin の生産挙動

virginiae butanolide (VB) として示した放線菌ホルモンの生産である。VB は *S. griseus* の A-factor と同じくブチロラクトン骨格を持つ  $\gamma$ -butyrolactone autoregulator の一種で、0.6 ng/ml という極低濃度で *S. virginiae* における virginiamycin 生産の引き金を引く働きをしている<sup>5)</sup>。

通常 virginiamycin 生産は、培養14時間目頃より始まるが、これに先立つ1~2時間前に VB の生産が始まり、培養14時間で最大値となり、virginiamycin 生産につながる。Virginiamycin 生産開始が VB 依存的事であることは、VB を含む後期の培養上清を培養8時間目に添加すると、virginiamycin 生産が早く開始されることから明らかである。このような  $\gamma$ -butyrolactone autoregulator は、*Streptomyces* 属放線菌に広く分布し<sup>6)</sup>、多くの場合、抗生物質の生産誘導に関わっていることが知られているが、極低濃度で有効であるだけに実質の生産量が少なく、構造決定に必要な mg オーダーの精製品を確保するにはトン単位の培養が必須ということもあり、現在7菌株より12種類(構造が同一と考えられるものを考慮すると10種類)が単離・構造決定(図3)されているに留まる<sup>7-9)</sup>。

構造上の特徴は、いずれの autoregulator も 3-hydroxy-methylbutanolide 骨格を有することで、2位測鎖の構造の違いからケト基を持つ A-factor 型、 $\beta$ -水酸基を持つ IM-2 型、 $\alpha$ -水酸基を持つ VB 型の3種に分類している<sup>10)</sup>。このように微妙な構造上の違いを基に分類する意味があるのかと疑問を呈する向きもあろうが、実は個々の生産菌は、これらの微妙な構造上の差を見分けて、自らが生産するホルモンと特異的に反応する機構を有している。たとえば VB の生産菌である *S. virginiae* は 0.6 ng/ml の VB-A を人為的に加えてやれば virginiamycin 生産を誘導することができるが、A-factor や IM-2 では 16,000 倍以上の高濃度を加えないと同様の効果を得られない。同様に A-factor の生産菌である *S. griseus* は A-factor のみに反応し、VB や IM-2 にはまったく反応しない。

*S. virginiae* において、放線菌ホルモンである VB を介した virginiamycin 生産制御がいかになされているかを解明するにあたって、我々は VB 特異的なリセプタータンパク質が存在することを想定して検討を進めた。微量であるホルモンの、さらに微量であろうリセプタータンパク質を取得するにあたっては、放射能ラベル VB の合成とこれを用いた binding assay の開発など、種々のステップを経て、BarA と呼ぶ VB 特異的なリセプタータンパク質とその遺伝子を得るに至っている(図4)<sup>11)</sup>。この時点まで、放線菌ホルモンという信号を菌体内に伝達する機構はまったく不明の状態、世界で初めてこの機構解明の第一歩を記したことになる。

その後、構造の異なる autoregulator である IM-2 型

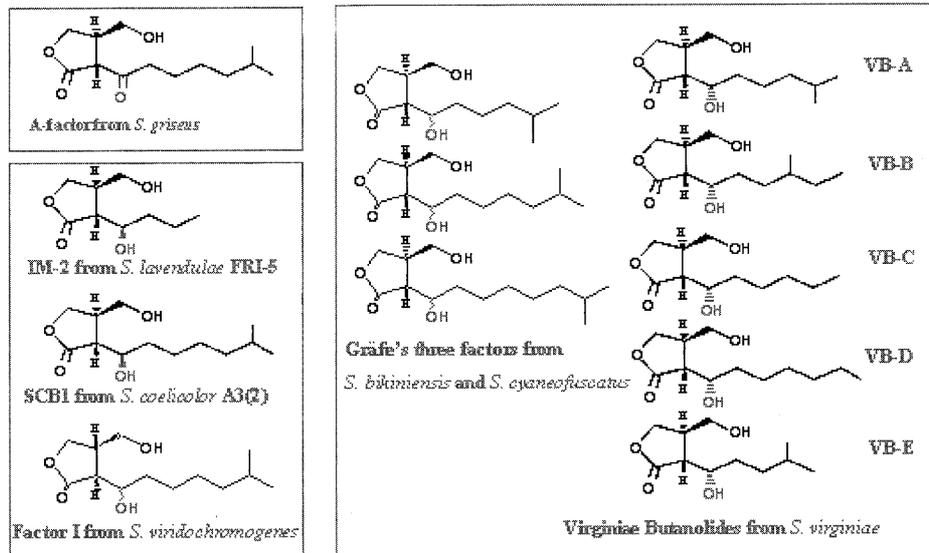


図3. 放線菌ホルモン $\gamma$ -butyrolactone autoregulatorの由来と構造

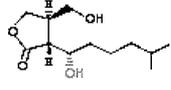
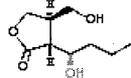
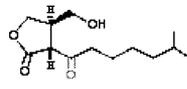
<p>I) VB type</p> <p>7 autoregulators</p>		<p>BarA protein, 25.0 kDa [<i>S. virginiae</i>]  <b>Dimer</b>, <math>K_d=1.1</math> nM, 1:1 binding  <b>Helix-turn-helix motif</b>  <b>DNA binding repressor</b></p>
<p>II) IM-2 type</p> <p>3 autoregulators</p>		<p>FarA protein, 24.2 kDa [<i>S. lavendulae</i>]  <b>Dimer</b>, <math>K_d=1.3</math> nM, 1:1 binding  <b>Helix-turn-helix motif</b>  <b>DNA binding repressor</b>  <b>ScbR protein</b> [<i>S. coelicolor</i> A3(2)]</p>
<p>III) A-factor type</p> <p>1 autoregulator</p>		<p>ArpA protein, 29.1 kDa [<i>S. griseus</i>]  <b>Dimer</b>  <b>Helix-turn-helix motif</b>  <b>DNA binding</b></p>

図4. A-factor型, VB型ならびにIM-2型autoregulatorに対応するリセプタータンパク質

autoregulatorのリセプターとして*S. lavendulae*からFarAタンパク質とその遺伝子<sup>12)</sup> および*S. coelicolor* A3(2)からScbRタンパク質とその遺伝子<sup>13)</sup>を, さらにA-factor型autoregulatorのリセプターとして*S. griseus*からArpAタンパク質とその遺伝子<sup>14)</sup>が, 我々単独あるいは英国John Innes研究所, 東大・堀之内らとの共同研究で得られており, 特異的リセプタータンパク質を介した信号伝達経路は, 放線菌のautoregulator制御系では共通であることが明確になっている。

上記の表中にも記したが, autoregulatorリセプターは, リガンドであるautoregulatorの結合部位以外に, helix-turn-helixモチーフというDNA結合モチーフを持ち, autoregulatorが結合しているか否かによってDNA結合能が変化する転写抑制制御因子である(図5)。すな

わち, autoregulatorが存在しない状態では, *S. virginiae*のBarAタンパク質は, 標的遺伝子プロモーター部位に結合しているため, 標的遺伝子の転写が抑制された状態となっている。ここでautoregulatorであるVBが生産されると, VBはBarAに結合しそのDNA結合能を失わせるため, BarAタンパク質は標的遺伝子プロモーター部位より解離し, 標的遺伝子の転写が開始され, 最終的にvirginiamycin生産へとつながることとなる<sup>15-17)</sup>。

以上のことから, *S. virginiae*において, autoregulatorリセプターであるBarAは, 負の制御因子として機能していることが明らかとなったわけであり, ここでvirginiamycin生産を制御するカスケードの中で, BarAが唯一の負の制御因子であれば, 本制御因子を破壊してやることによりvirginiamycin生産を抑制する因子がなくなり, 高

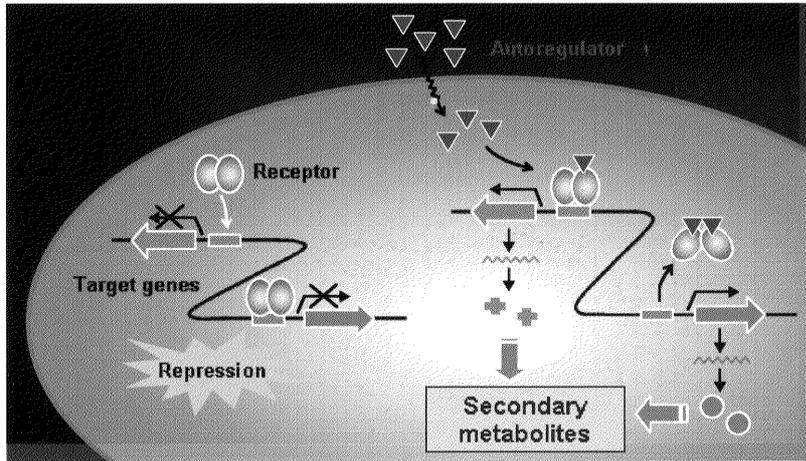


図5. Autoregulatorとautoregulatorリセプターを介した二次代謝制御の初発段階

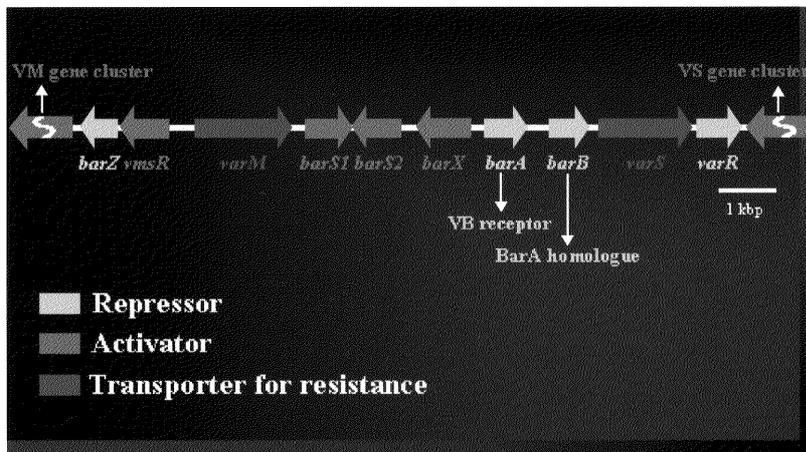


図6. *Streptomyces virginiae*における制御因子群密集領域 (regulator island)

生産株が得られるはずであると予想された。そこで、*barA* 遺伝子を破壊した株を作製したが、予想に反して virginiamycin の生産がほぼゼロになるという結果となった<sup>18)</sup>。この時点で初めて *S. virginiae* の virginiamycin 生産制御系には複数の抑制因子が存在していることが判明したわけで、初発段階である autoregulator リセプターの除去は、かえって下流の抑制因子による制御を強め、virginiamycin 生産という目的には逆に働くことが明らかとなった。

前述したように、放線菌の二次代謝系では、制御因子も含めて関連する遺伝子はクラスターを形成している可能性が高く、BarAタンパク質の支配下にある制御因子群が近傍にあると想定されたため、取得した *barA* 遺伝子の近傍をクローニングし解析したところ、VMの生合成構造遺伝子群とVSの生合成構造遺伝子群に挟まれた形で、10 kbのなかに6個の制御因子遺伝子が密集する regulator island と呼ぶべき領域が見いだされた(図6)<sup>19)</sup>。

この領域中、抑制因子として働く可能性のある制御因子をホモロジー検索でピックアップすると、*barA*の隣に位置する *barB*、ならびに5'側に少し離れた位置にある *barZ* 遺伝子が浮かび上がってくる。

この時点では、これら2個の遺伝子が何をしているかはまったく不明の状態であるが、クラスター内にあることと、負の制御遺伝子らしいということに頼りに、virginiamycin 生産を上昇させるべく破壊株を作製した(図7、8)。その結果、BarBは virginiamycin 生産の初期過程<sup>20)</sup>を、また BarZは後期過程を抑制していることが判明し、特に *barZ* 遺伝子の破壊により virginiamycin の生産量を顕著に増加させることが可能となった(未発表)。

#### 生合成構造遺伝子の改変による virginiamycin M の生産増強

VM 生合成の構造遺伝子群は、先に述べた 10 kb の regulatory island の左側に約 60 kb の範囲で存在する。

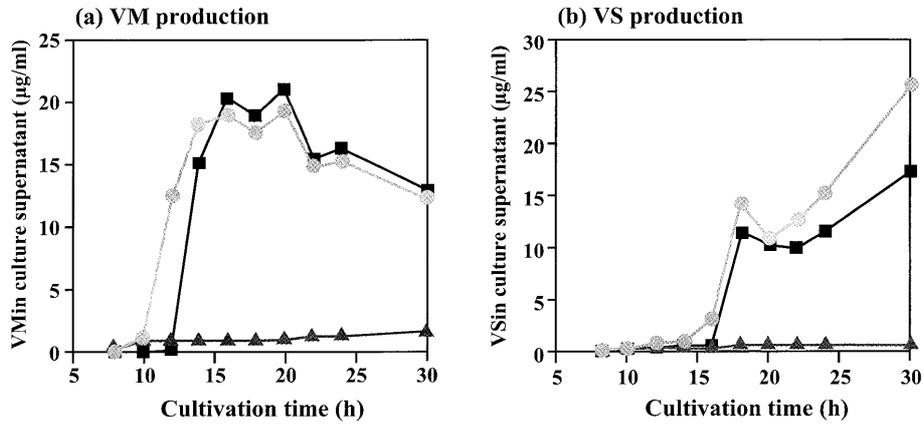


図7. 抑制性制御遺伝子 *barB* 破壊株における viginiamycin 生産の変化. ■, W.T.; ▲,  $\Delta barA$ ; ●,  $\Delta barB$ .

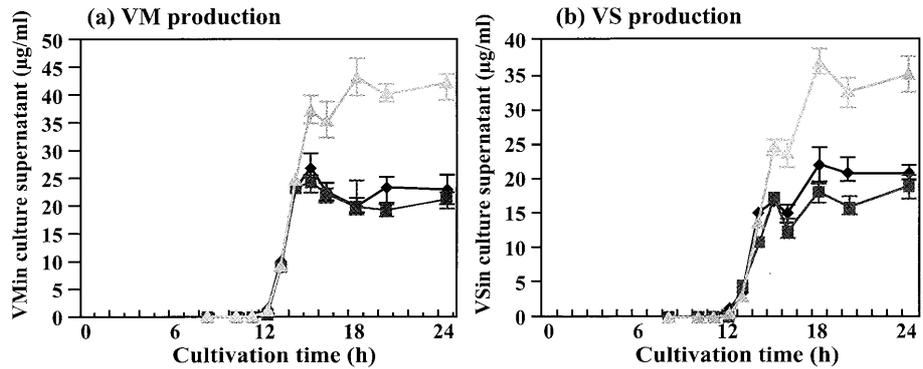


図8. 抑制性制御遺伝子 *barZ* 破壊株における viginiamycin の生産増加. ◆, W.T.; ■, W.T. revertant; ▲,  $\Delta barZ$ .

### Function of BCDH complex

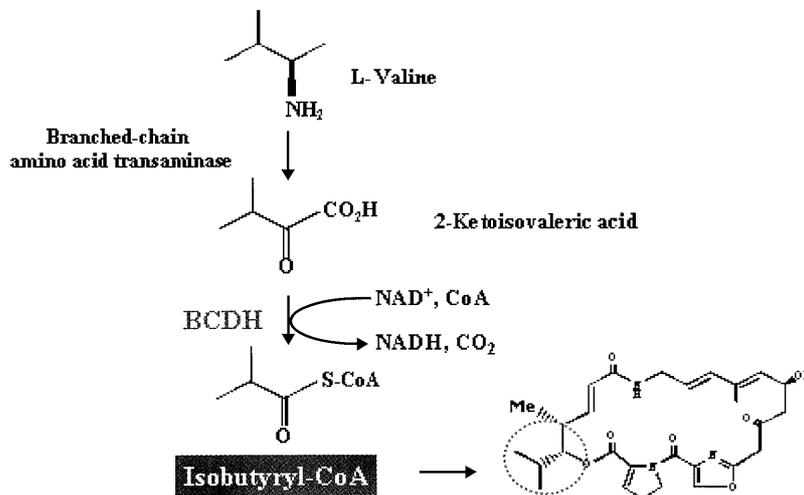
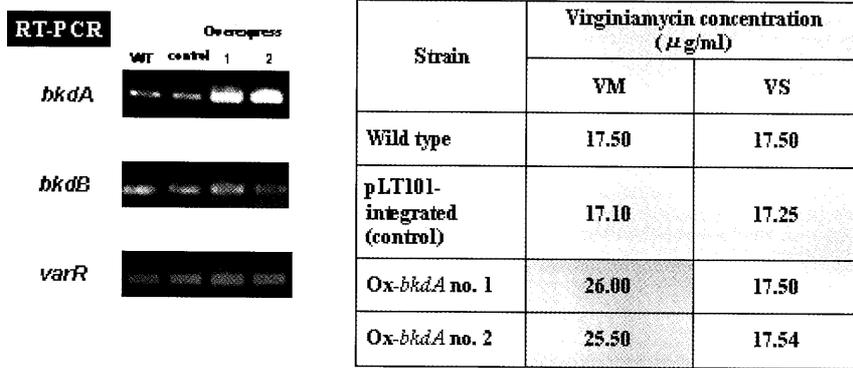


図9. Viginiamycin M 生合成遺伝子クラスター中に存在する分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ(BCDH)

この構造遺伝子群の中には、*bkdAB* 遺伝子が存在し、branched chain  $\alpha$ -ketoacid dehydrogenase (BCDH) complex をコードすると予想されたため、VM 生合成の出発分子である *iso*-butyryl CoA を供給する役割であろう

と推定された (図9) <sup>21</sup>。

VM の生産量が生合成出発分子の量に依存する可能性が大であったため、出発分子の量を増やすべく構成的発現プロモーター下流に *bkdA* を挿入し、野生株に導入した



**BkdA was driven by strong and constitutive promoter *ermEp*\***

図10. 分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ(BCDH)をコードする *bkdA* 遺伝子の補充による virginiamycin M 生産の増加

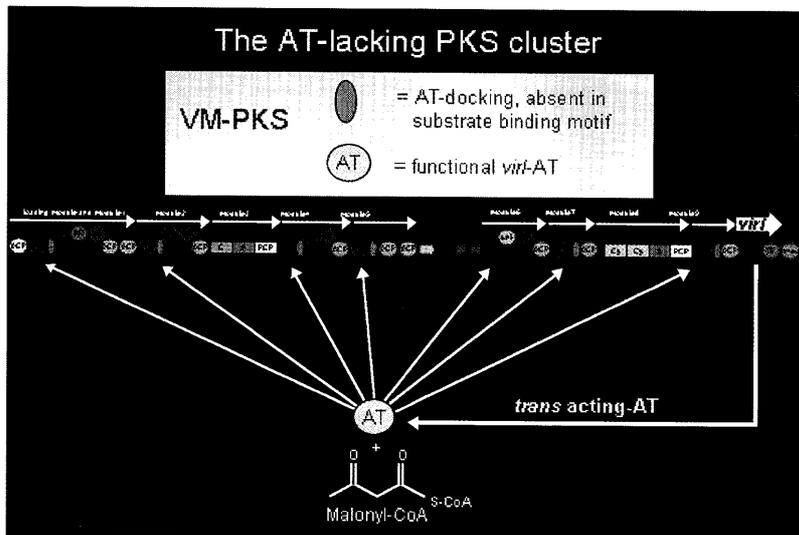


図11. アシル基転移酵素ドメイン欠損型 virginiamycin M 生合成 PKS

ところ、予想通り VM 生産量が増加する結果につながった。

また、VM の基本骨格生成に関わるハイブリッド型 PKS-NRPS 遺伝子を詳細に解析したところ (図 10) <sup>22)</sup>、この生合成遺伝子では、PKS 部分のモジュールにアシル基転移 (AT) ドメインがなく、外部に独立して存在するアシル基転移酵素 (VirI) が個々のモジュールに結合して生合成を行っている AT- 欠損型生合成酵素であることが予想された。これだけ多数のモジュールにアシル基転移機能を与える必要があることから、アシル基転移酵素 (VirI) の量が不足している可能性が大であったため、先ほどと同じく構造的発現プロモーター下流に *virI* 遺伝子をつなぎ、野生株に導入した (図 11) 結果、予想通り VM 生産量を増加させることに成功している (図 12)。

以上、近年の塩基配列決定の低価格化と迅速さを頼りに、ランダム変異を行うことなく、合目的的に二次代謝

産物の生産増強を試みてきた成果の一部を紹介した。糸状菌の例は誌面の都合から割愛したが、放線菌の場合と同じく二次代謝産物の生合成系はクラスターを形成しているので手法的には同様である。放線菌であれ糸状菌であれ、個々の遺伝子の機能解明などは一時的に脇に置き、第一段階ではとにかく目的とする産物の生合成クラスターを大きく取得・解析することが重要であると考えている。塩基配列に基づいて予想した各遺伝子の機能は確実なものではなく、予想に反した結果になることもあり得るが、ともかく解析結果に基づいて出発物質供給や生合成サイクルで弱い部分など、生産上のボトルネックになっていそうなステップを増強するか、あるいは抑制型制御因子の除去、または活性型制御因子の増強を行うのが、高生産株の育種に至る最短の道であろう。

本稿で述べた内容は、大部分が山田靖宙教授 (大阪大学名誉



Strain	Virginiamycin concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	
	VM	VS
Wild type	17.50	17.50
pLT101-integrated (control)	17.10	17.25
Ox- <i>virI</i> no. 1	24.50	16.25
Ox- <i>virI</i> no. 2	25.00	16.90

### VirI was driven by strong and constitutive promoter *ermEp*\*

図12. アシル基転移酵素(VirI)の補充による virginiamycin M生産の増加

教授, 現福山大学)の薫陶の下に行われた研究であり, 心より謝意を表します。同時に, 本稿の内容は, 現研究室のスタッフである木下浩博士, 木谷茂博士, 応用生物学専攻時代と生物学国際交流センターに移ってからの多数の卒業生, 在校生の奮闘の成果でもあり, 共に過ごした時間を懐かしく思い起こすと共に改めて感謝の意を表します。

### 文 献

- 1) 八木澤守正: バイオサイエンスとインダストリー, **58**, 89-94 (2000).
- 2) Bérdy, J.: *J. Antibiot.*, **58**, 1-26 (2005).
- 3) Nihira, T.: *Microbial Secondary Metabolites: Biosynthesis, Genetics and Regulation.*, (Fierro, F. and Martin, J. F.), 99-119, Research Signpost., Leon (2003).
- 4) Biot, A. M.: *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, (Vandamme, E. J.), 695-723 (1984).
- 5) Yamada, Y. and Nihira, T.: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, (Barton D. H. R. and Nakanishi, K.), **8**, 377-413, Elsevier Science (1998).
- 6) Ohashi, H., Zheng, Y-H., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Antibiotics*, **42**, 1191-1195 (1989).
- 7) Kleiner, E. M., Pliner, S. A., Soifer, V. S., Onoprienko, V. V., Blashova, T. A., Rosynov, B. V., and Khokhlov, A. S.: *Bioorganicheskaya Khimiya*, **2**, 1142-1147 (1976).
- 8) Sato, K., Nihira, T., Sakuda, S., Yanagimoto, M., and Yamada, Y.: *J. Ferment. Biotechnol.*, **68**, 170-173 (1989).
- 9) Takano, E., Nihira, T., Hara, Y., Jones, J. J., Gershtater, C. J. L., Yamada, Y., and Bibb, M.: *J. Biol. Chem.*, **275**, 11010-11016 (2000).
- 10) Yamada, Y., Nihira, T., and Sakuda, S.: *Biotechnology of Antibiotics*, (Strohl, W. R.), p.63-79, Marcel Dekker, Inc., New York (1997).
- 11) Okamoto, S., Nakamura, K., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Biol. Chem.*, **270**, 12319-12326 (1995).
- 12) Waki, M., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Bacteriol.*, **179**, 5131-5137 (1997).
- 13) Takano, E., Chakraborty, R., Yamada, Y., Nihira, T., and Bibb, M. J.: *Mol. Microbiol.*, **41**, 1015-1028 (2001).
- 14) Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T., and Horinouchi, S.: *J. Bacteriol.*, **177**, 6083-6092 (1995).
- 15) Kinoshita, H., Ipposhi, H., Okamoto, S., Nakano, H., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Bacteriol.*, **179**, 6986-6993 (1997).
- 16) Nakano, H., Takehara, E., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Bacteriol.*, **180**, 3317-3322 (1998).
- 17) Kinoshita, H., Tsuji, T., Ipposhi, H., Nihira, T., and Yamada, Y.: *J. Bacteriol.*, **181**, 5075-5080 (1999).
- 18) Nakano, N., Lee, C-K., Nihira, T. and Yamada, Y.: *J. Biosci. Biotechnol.*, **90**, 204-207 (2000).
- 19) Namwat, W., Lee, C-K., Kinoshita, H., Yamada, Y., and Nihira, T.: *J. Bacteriol.*, **183**, 2025-2031 (2001).
- 20) Matsuno, K., Lee, C-K., and Nihira, T.: *Arch. Microbiol.*, **181**, 52-59 (2004).
- 21) Pulsawat, N., Kitani, S., Kinoshita, H. Lee, C-K., and Nihira, T.: *Arch. Microbiol.* **187**, 459-466 (2007).
- 22) Pulsawat, N. Kitani, S., and Nihira, T.: *Gene*, **393**, 31-42 (2007).