

「リボゾーム工学」とその活用 —新たな育種技術の構築に向けて—

越智 幸三^{1*}・田中 幸徳¹・笠原 堅²

はじめに

リボゾームに薬剤耐性変異を導入すると、不思議なことにバクテリアの細胞内生理が一変する。そのメカニズムはきわめて複雑であるが、技術としてはすでに完成の域に達しており、これを「リボゾーム工学」と呼んでいる¹⁻³⁾。一方、転写酵素であるRNAポリメラーゼにリファンピシン耐性変異を導入した場合も、いずれ劣らぬ生理変化が起きる⁴⁾。後者は厳密には「転写工学」の範疇にはいるが、広義のリボゾーム工学と呼ぶこともある。

育種のみならず、休眠遺伝子活性化による新物質探索にも適用できるのがリボゾーム工学の利点である。他の育種技法と異なり以下の点で特徴づけられる。①ストレプトマイシン、リファンピシンなど薬剤耐性を付与するという簡便な技法なので、土壌から分離した菌にただちに適用できる。②薬剤耐性は選択形質なので、頻度の低い自然突然変異で十分対応可能であり、そのため変異剤使用に付随してくる有害変異を避けることができる。③多数の薬剤耐性付与による逐次的生産力増強（たとえば8段育種）が可能であり、比較的短期間で目標生産力に到達できる。④遺伝子組換えを行わないので、高度の研究設備を要せず、また食品微生物にも適用できる。

リボゾーム工学は、とりわけ抗生物質生産を代表とする「二次代謝」の活性化においてその力を発揮するが、図1に二次代謝を模式的に示した。概念として、遺伝子発現を中心とした「誘発」と、それに続く各種生合成酵素による「生合成」から成る。アミノ酸発酵、有機酸発酵など一次代謝とは対照的に、二次代謝の誘発は一般に微弱で、場合によってはほとんど発現しない（いわゆる休眠状態）。したがって二次代謝における育種では第一義的にこの「誘発」の強化が重要である。二次代謝の誘発は各種の刺激、たとえば栄養源欠乏により引き金がひかれるが、そのような貧栄養下では基質供給が弱められ、生合成は強力にはなりえない。逆に生合成を有利ならしめる富栄養下では栄養源欠乏が起きにくくなるため誘発の引き金に不利となる。すなわち遺伝子発現が起きない（これにはバクテリア・アラーム ppGpp の富栄養下における合成不能化が原因している）。この相反する要求

を、遺伝学的にあるいは培養工学的にいかにもうまくだし抜くかが二次代謝育種の鍵といえるかもしれない。ちなみに生合成部分は、目下一次代謝の育種で注目されているメタボリックエンジニアリングが適用できる領域であり、二次代謝においても活発な研究が開始されている。

本稿ではごく最近の成果と、今後の育種および休眠遺伝子覚醒においてヒントとなりうる成果に焦点をあてて解説したい。

リボゾーム工学の最新成果

以下に最近の成果をあげておく。

1) カスガマイシンは現在でもイネいもち病に対する農業抗生物質として使用されているが、*rif*変異と*gen*変異を導入することにより、ごく短期間でその生産力を3.7倍に増強した(図2)。

2) ビタミンB₁₂はプロピオン酸菌によって工業的に発酵生産されているが、*rif*、*gen*、*ery*の3変異を逐次的に導入することにより、細胞あたりの生産力を5倍に増強した(図3)。リボゾーム工学技法が一次代謝産物の生産育種にも有効であることを示した好例である。なお、他グループのゲノムシャッフリング法では1.6倍の向上

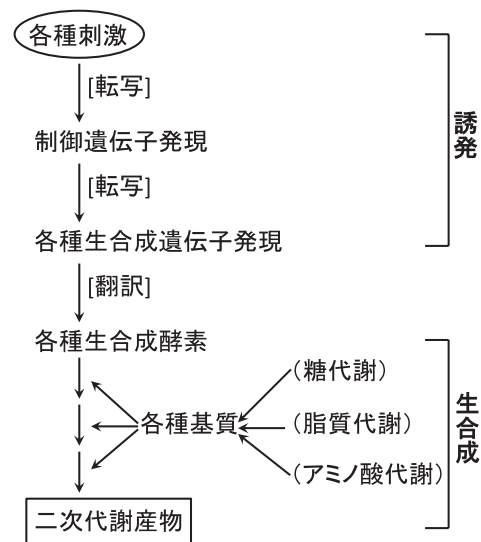


図1. 二次代謝における「誘発」と「生合成」の概念図

* 著者紹介 広島工業大学生命学部食品生命科学科（教授） E-mail: k.ochi.bz@it-hiroshima.ac.jp

¹ 広島工業大学生命学部 ² 株式会社ネオ・モルガン研究所

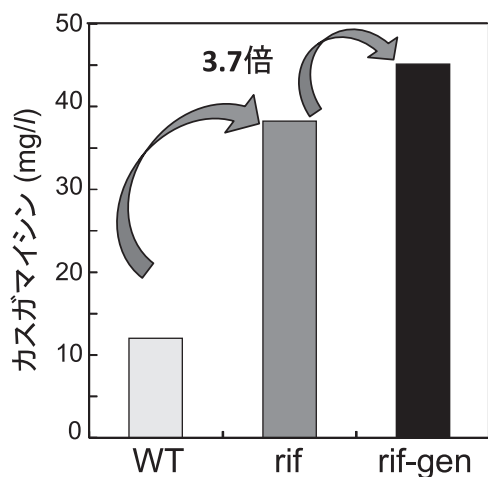


図2. リボゾーム工学による *Streptomyces kasugaensis* のカスガマイシン生産力増強. *rif*, リファンピシン耐性 (*rpoB*) 変異; *gen*, ゲンタミシン耐性変異.

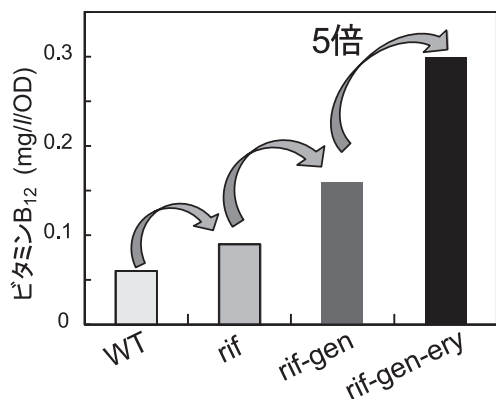


図3. リボゾーム工学による *Propionibacterium shermanii* のビタミンB₁₂生産力増強. *rif*, *gen*, *ery*はそれぞれリファンピシン, ゲンタミシン, エリスロマイシンに対する耐性変異.

が報告されているにすぎない.

3) リボゾーム工学による酵素生産の育種例を図4に示した. *Paenibacillus* によるサイクロデキストラン合成酵素の生産力は, *rsmG*, *rpsL*, *rpoB*の3つの薬剤耐性変異の導入により, 実に1000倍超の生産力増強に成功した(図4). 本酵素は生育終了後に生産が開始されるという二次代謝様の特徴をもつ. リボゾーム工学はその原理上, 生育後期の事象に効果を現すので, 二次代謝類似の挙動を示す酵素生産にはリボゾーム工学はしばしば有効かもしれない.

「転写・生合成相乗効果」へのアプローチ

抗生物質の大半はポリケチド系とリボゾーム非依存的に合成されるペプチド系で占められる. このうちポリケ

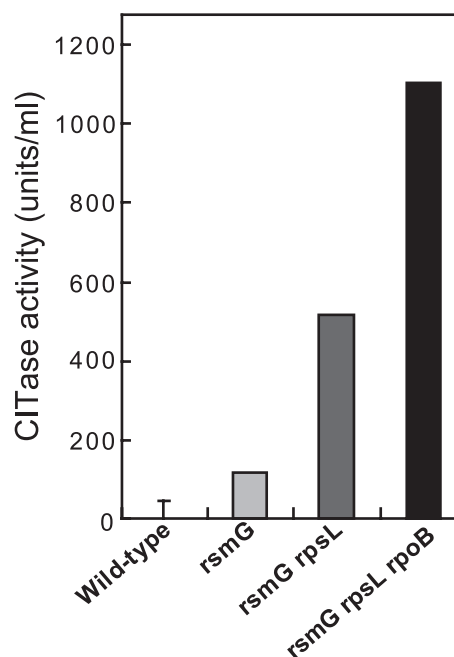


図4. リボゾーム工学による *Paenibacillus agaridevorans* のサイクロデキストラン合成酵素生産力増強. *rsmG*, *rpsL*, *rpoB*はそれぞれ低レベルストレプトマイシン耐性変異, 高レベルストレプトマイシン耐性変異, リファンピシン耐性変異.

チド系抗生物質は脂肪酸合成とともにアセチルCoAとマロニルCoAを前駆体として共有している. カナダのNodwellらはこの事実に着想を得て, 脂肪酸合成を部分的に阻害すればアセチルCoAが優先的に二次代謝にまわされ, 活性化につながるであろうと考えた(図5)^{5,6}. 3万以上に及ぶストック化合物をしらみつぶしにスクリーニングした結果, 首尾よくARC2と名付けた脂肪酸合成阻害剤(トリクロサンに類似)を見いだしている. ARC2は期待通り放線菌の抗生物質生産力を著しく増強した. 彼らはこれを「メタボリズム・リモデリング」と表現している. 論理的に考えれば, この技法は誘発がすでに増強されている菌に特に有効なはずである(転写・生合成相乗効果; 図1参照). 我々のこの考え方を裏づけるかのように, RNAポリメラーゼ変異により誘発が強化された *S. coelicolor* では, 微量のトリクロサンの添加によりポリケチド抗生物質アクチノロージンの生産力は2.5倍に増強された(図6)⁷. すでに高力価となっている生産力の2.5倍の意味は大きい. 変異と併用すべき優れた技法であり, 初期育種にはとりわけ有効かもしれない. また, このような手法がペプチド系抗生物質やアミノグリコシド系抗生物質の生産にも適用できるよう, 新たな技術開発が待たれる.

特 集

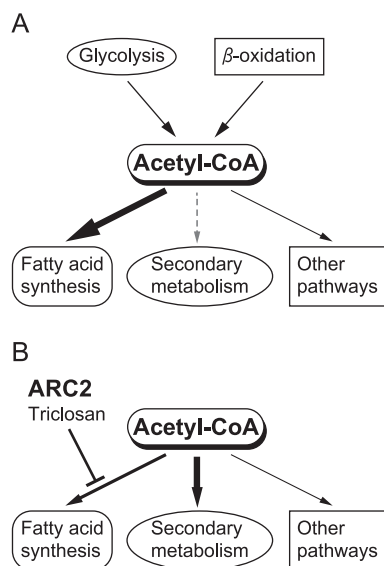


図5. メタボリズム・リモデリングの概念図. (A) 通常のアセチル CoA の利用, (B) ARC2 またはトリクロサン添加による二次代謝への優先利用.

S-アデノシルメチオニンと育種

S-アデノシルメチオニン (SAM) は生体内でさまざまな物質のメチル化において重要な働きをするが、以前我々は SAM が放線菌の二次代謝誘発に決定的な機能を果たしている可能性を提示してきた^{8,9)}。ごく最近、枯草菌の二次代謝も SAM によって制御されていることを明らかにした¹⁰⁾。したがってバクテリア全般を通じて SAM は二次代謝誘発に深く関わっていると思われる。放線菌では *rsmG* 変異により、一方枯草菌では *mthA* 変異により細胞内の SAM レベルが2倍程度に上昇し、これが起因となって二次代謝が活性化される (図7A)。休眠遺伝子さえも目覚めてくる。*rsmG* 変異、*mthA* 変異ともに低レベルストレプトマイシン耐性を付与するので、容易にこれら自然突然変異株を選択することができる。面白いのは、細胞内 SAM レベルが上昇するメカニズムは *rsmG* 変異と *mthA* 変異でまったく異なることである (図7A)。図7Bに枯草菌の *mthA* 変異株からスタートして、三段変異により抗生物質バシリシン生産力を増強した例を示した。一方、SAM の作用メカニズムについては二次代謝の誘発 (図1参照)に関わることが判明しているものの、その詳細はまったく不明である。何かのメチル化かもしれないし、あるいは SAM そのものがレギュレーターとして働いている可能性もある。ちなみに、わずか2倍の SAM レベルの差で形態・生理に劇的な変化が起きるという事実は、逆に考えれば SAM の代謝における

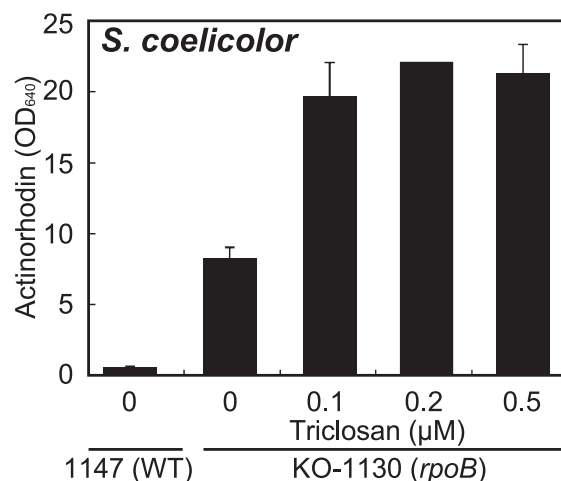


図6. 脂肪酸合成阻害剤トリクロサンによる *Streptomyces coelicolor* のポリケチド抗生物質生産力増強.

重要性を示すものであり、野生株ではよほど巧妙に SAM レベルが調節されていることを意味している。真菌と異なりバクテリアでの SAM の研究は少ないので、これを切り口として代謝制御の新たな地平線がみえてくることを期待できる。

RNAポリメラーゼ変異と休眠遺伝子覚醒

休眠遺伝子覚醒技術とその重要性については、最近和文、英文いずれでも解説してあるので^{7,11)}、そちらを参照されたい。我々の成果に限って述べれば、最新の成果として8種の放線菌を用いたリアルタイムPCRによる網羅的転写解析があげられる。これは各放線菌に多様な *rif* 変異 (RNA ポリメラーゼ変異) を導入し、既知抗生物質の生産力がいか程上昇するかに加え、*S. coelicolor*、*S. griseus* および *S. erythraea* における最適 *rif* 変異株を用いて、各々が有する数多くの休眠遺伝子の発現レベルを徹底的に解析したものである⁴⁾。試験したほぼすべての菌で、既知抗生物質生産力は *rif* 変異単独で3~50倍という著効がみられた。H437Y 変異 (His437→Tyr) と H437R 変異 (His437→Arg) がしばしば有効であるという一般則も見いだしている。

注意すべきは、転写レベルにおける休眠遺伝子覚醒は依然として培地依存的な側面を有する点である。たとえば、*S. griseus* の H437Y 変異株では、ある種の休眠遺伝子は50倍以上という超高発現に到るが、別の培地を用いるとまったく発現してこない。すなわち、*rif* 変異株を用いて新物質探索を行う場合、少なくとも3種類程度の異なった培地を用いることが肝要と思われる。この事実は二次代謝遺伝子の発現が単に RNA ポリメラーゼの

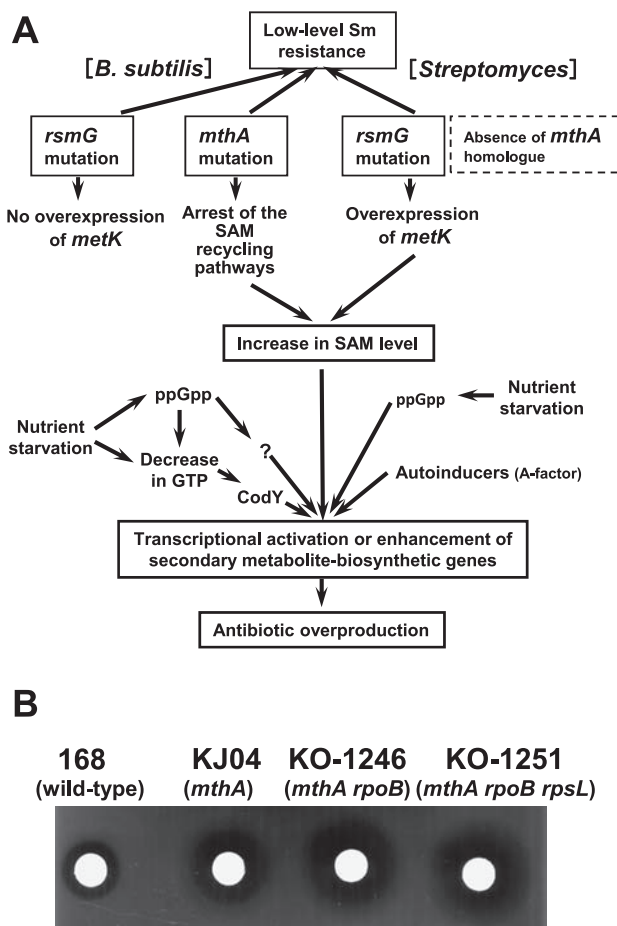


図7. (A) SAMレベルからみた放線菌と枯草菌における二次代謝誘発の模式図, (B) 三段変異による枯草菌のバシリシン生産力増強. *rsmG*, 低レベルストレプトマイシン耐性変異; *mthA*, SAM-リサイクリング酵素の変異; *metK*, SAM合成酵素遺伝子.

問題に帰せられるものではなく(培養条件次第ではそうなるが), より多岐にわたる因子によって複雑に決定されていることを示している. ちなみに, これら休眠遺伝子は, 野生株では試験した30を超える通常のストレス条件下でもまったく発現しなかった. 「休眠遺伝子」と呼ぶにふさわしいことを実感できる. これら一連の仕事は膨大な労力と経費を要したが, それだけに多くの研究者から注目され, このような研究を「ドスコイ型」と呼ぶこととした.

リボゾーム工学と不均衡変異導入法の融合

株式会社ネオ・モルガン研究所の不均衡変異導入法は, DNA複製における複製エラーの発生頻度に複製鎖間で差が生じるような人為的制御を特徴とする突然変異導入技術である¹²⁾. 一般的な変異導入試薬であるアルキル化剤(NTGなど)では生起する変異のほとんどが

GC→ATのトランジション変異に偏るのに対し, 不均衡変異導入法ではさまざまなタイプの点変異体を効率的に取得できる. 前述したように, 薬剤耐性変異は選択的形質なので 10^{-8} 程度の出現率ならば容易に取得できるが, 10^{-10} 以下となるとやはり労力を要する(高レベルストレプトマイシン耐性を付与するリボゾームタンパク質S12の変異はこれにあたる). そこで生研機構の支援を受けて実施された「リボゾーム工学と不均衡変異導入技術による微生物育種法の開発」では, この点にも焦点を当て, 日本発の独自技術を開発した.

図8は, *S. coelicolor*を不均衡変異導入法, ニトロソグアニジン(NTG)処理, 自然突然変異の各々による方法で処理し, その形態の多様性(A)と変異の多様性(B)を比較検討したものである. あきらかに, NTGを使用する従来法に比較して, 不均衡変異導入法では各変異株の形態に多様性がみられ, これを裏づけるかのようにNTG処理では単一の*rpoB*変異(D427N)のみが出現したのに対し, 多様な*rpoB*変異が観察された. なお, 取得に労力を要することの多いリボゾームタンパク質S12の変異株も, 不均衡変異導入法を利用すれば変異株の出現率は100倍以上に上昇し, 容易に目的株を得ることができた. このように不均衡変異導入法を用いることで, 薬剤耐性株取得の作業効率が著しく改善され, リボゾーム工学と不均衡変異導入法の技術融合のメリットが示された. 因みに, 前述のカスガマイシン生産育種はこの融合技術を利用したものである.

新たな研究の切り口

リボゾーム工学は技術としては完成されてはいるものの¹³⁻¹⁵⁾, その構築過程で未だ解決をみないミステリーが続出した. たとえば, 低レベルストレプトマイシン耐性を付与する*rsmG*変異は, 高レベル耐性変異である*rpsL*変異を100~1000倍の高頻度で引き起こし, さらに不思議なことにSAM合成酵素遺伝子*metK*を30倍の高発現に到らしめる^{9,16)}. しかも, *rsmG*変異はリボゾームの要の部位に異常を生ぜしめるにもかかわらず, fitness(適応力)には全く悪影響を与えない. また, 特定のチオストレプトン耐性変異はppGppの異常蓄積を引き起こす¹⁴⁾. これらの事象はNodwell教授がコメントした如く不可解そのものであるが¹⁷⁾, それだけリボゾームには未だ解明されざる機能が多く存在することを意味している. これらはいずれもリボゾーム工学のカラクリ基盤をなすものであり, 春秋の筆法をもってすれば「ミステリーがリボゾーム工学を創出した」となるのであろう. 技術と学問いづれにも関わるのがリボゾームであり, それ故

特 集

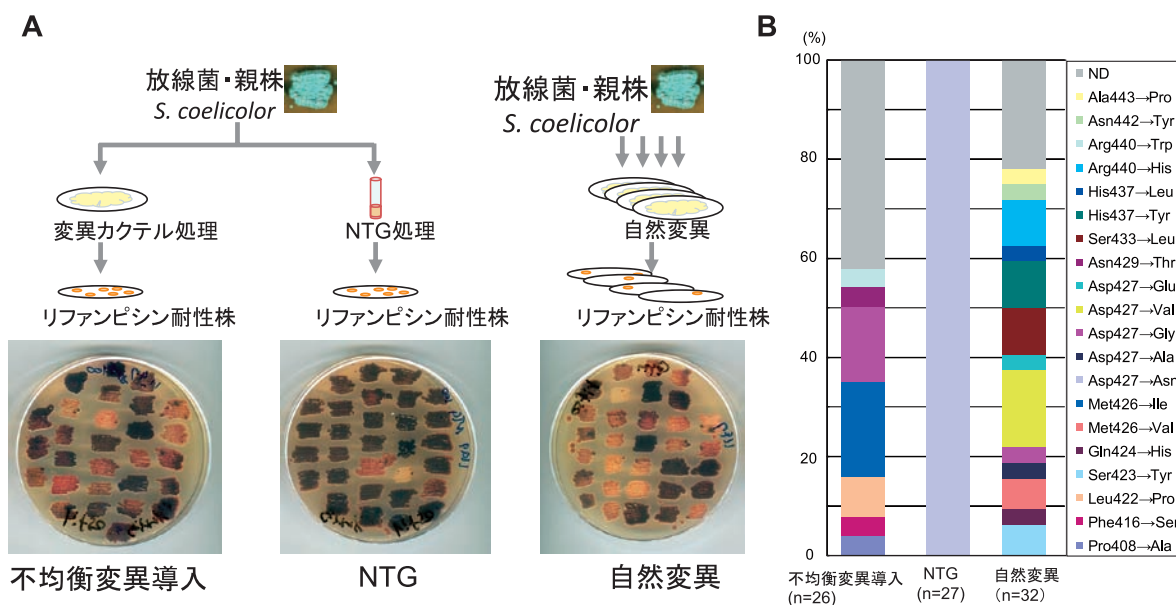


図8. (A) 各技法で得られるリファンピシ耐性変異株の形態多様性, (B) *rpoB* 遺伝子の変異パターン.

格好の研究対象と言える。

リボゾーム工学が、バクテリアのみならずカビにも適用できるなら素晴らしいことであるが、一般の抗生物質は真核微生物のリボゾーム (80S) にはアタックしないため、薬剤耐性変異株を作出することができない。これがリボゾーム工学の適用範囲を制限してきた要因である。しかし、ごく最近に到り、中国のCuiらのグループはさまざまな工夫を凝らして強引に高濃度の抗生物質をカビ細胞内に導入し、結果としてカビの薬剤耐性変異株の作出に成功している^{18,19)}。注目すべきは、これら耐性株では予期した通り休眠遺伝子が目覚めており、実際多くの新物質取得にも成功していることである。ただし、本当にリボゾームに変異が生じているか否かは未だ確証がとれていない。これに関連して我々は、バクテリア・アラモモン ppGpp を酵母細胞内で強制発現すると、酵母の耐塩性、耐酸性、耐アルコール性などの形質がおしなべて上昇することを見いだしている²⁰⁾。真核微生物にはもともと ppGpp は内在しないが、カビで ppGpp を強制発現すれば、あるいは休眠遺伝子の強力な覚醒をもたらすかもしれない。

紙面の都合上割愛するが、休眠遺伝子覚醒には他にも我々の開発しつつある「天然の変異型 *rpoB* 遺伝子利用技術」や「希土類元素利用技術」¹²⁾、東大の尾仲らになる「共培養技術」²¹⁾、オランダのWezelらの「エリシター利用技術」²²⁾などがある。もちろん、特定宿主菌を利用した遺伝子強制発現による方法もある。応用微生物学の繁栄は一にその利用価値の如何にかかっているであろうか

ら、これらの成果が多少なりともそれに貢献できることを強く願っている。

文 献

- Ochi, K. et al.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **56**, 155 (2004).
- Ochi, K.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 1373 (2007).
- Ochi, K. and Hosaka, T.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 87 (2013).
- Tanaka, Y. et al.: *J. Bacteriol.*, **195**, 2959 (2013).
- Craney, A. et al.: *Chem. Biol.*, **19**, 1020 (2012).
- Ochi, K. and Okamoto, S.: *Chem. Biol.*, **19**, 932 (2012).
- Ochi, K. et al.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 403 (2014).
- Okamoto, S. et al.: *J. Bacteriol.*, **185**, 601 (2003).
- Nishimura, K. et al.: *J. Bacteriol.*, **189**, 3876 (2007).
- Tojo, S. et al.: *J. Bacteriol.*, **196**, 1514 (2014).
- 越智幸三ら：バイオサイエンスとインダストリー, **67**, 413 (2009).
- Shiwa, Y. et al.: *Int. J. Evol. Biol.*, **2012**, 860797 (2012).
- Tamehiro, N. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6412 (2003).
- Wang, G. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 2834 (2008).
- Hosaka, T. et al.: *Nat. Biotechnol.*, **27**, 462 (2009).
- Okamoto, S. et al.: *Mol. Microbiol.*, **63**, 1096 (2007).
- Nodwell, J. R.: *J. Bacteriol.*, **189**, 3683 (2007).
- Chai, Y. J. et al.: *Mar. Drugs*, **10**, 559 (2012).
- Fang, S. M. et al.: *Mar. Drugs*, **12**, 1788 (2014).
- Ochi, K. et al.: *Microbiology*, **158**, 2213 (2012).
- Onaka, H. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 400 (2011).
- Zhu, H. et al.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 371 (2014).