

微生物ホルモン A-ファクターによる放線菌の二次代謝と 形態分化の調節機構

Regulation of Secondary Metabolism and Cell Differentiation in *Streptomyces*

by a Microbial Hormone A-factor

堀之内末治、吉田 稔、西山 真

Sueharu Horinouchi, Minoru Yoshida, Makoto Nishiyama

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命工学専攻

Department of Biotechnology, The University of Tokyo

In *Streptomyces griseus*, A-factor (2-isocaprolyl-3R-hydroxymethyl- γ -butyrolactone) at an extremely low concentration triggers streptomycin biosynthesis and cell differentiation by binding a repressor-type receptor protein (ArpA) and dissociating it from DNA. Genetic and biochemical studies revealed all the major steps for the A-factor signal transduction leading to streptomycin biosynthesis: from AfsA encoding a key enzyme for A-factor biosynthesis to A-factor to ArpA to AdpA to StrR to streptomycin production genes. In addition, several genes involved in morphogenesis were identified to be in the A-factor signal cascade. Also identified were genes that controlled or tuned the activities of proteins involved in the regulatory steps in the cascade; these include an AfsK/AfsR protein phosphorylation system, cAMP and *cyaA* encoding an adenylate cyclase, and protein tyrosine phosphatase. On the basis of these findings, we here propose a model for regulation of secondary metabolism and cell differentiation in the bacterial genus *Streptomyces*.

1. 研究目的

原核微生物である放線菌は驚くほど種の多様性に富み、抗生物質や生理活性物質などの多種多様な二次代謝産物の供給源として医学的、醸酵工業的に重要であるとともに、カビ状に生育して珠玉状の胞子を着生する複雑な形態分化を行い、基礎生物学的にも興味深い研究対象である。我々は、放線菌の二次代謝と気中菌糸・胞子への分化のスイッチとして機能する微生物ホルモンとも呼ぶべき低分子化学調節物質 A-ファクターを発見し、A-ファクターをめぐる複雑な調節ネットワークを提唱してきた。A-ファクター特異的レセプターの発見とその遺伝子のクローニングや原核生物では初めての Ser/Thr/Tyr キナーゼとそのターゲットの発見は、この分野のみならず微生物学的研究全体に大きなインパクトを与えた。A-ファクターによる二次代謝・分化の制御系の全貌を解明することが我々の大きな目標であるが、本研究では最も重要なステップを担う A-ファクターレセプターについて、そのターゲット遺伝子の同定と A-ファクターによる本遺伝子の発現調節様式を明らかにする。なお、本レセプターは、遺伝学的に生育初期には二次代謝・分化のレプレッサーとして機能することと塩基配列から予想されるアミノ酸配列内に DNA 結合モチーフを持つことが判明してい

る。従って、本研究ではレセプターの X 線結晶構造解析による三次元構造の決定および A-ファクターの解離、結合によるレセプターの構造変化と DNA への結合能も明らかにする。

2. 研究経過

ストレプトマイシン (Sm) 生産菌である *Streptomyces griseus* の Sm 生産、耐性、気中菌糸・胞子の着生を極低濃度でポジティブに制御する A-ファクターの調節ネットワークを明らかにすべく、遺伝学的、生化学的手法を駆使した。本研究では特に、A-ファクター特異的レセプターの DNA 結合特性と X 線結晶構造解析に焦点を合わせた (図 1)。本研究の過程で、A-ファクター制御カスケードと併立して二次代謝、形態分化を調節する他の系も明らかにすることができた。

3. 研究成果

(1) A-ファクターレセプターの (ArpA) の DNA 結合特性 ArpA はその N 末側にヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフを持ち、DNA 結合蛋白であることが予想された。ArpA の DNA 結合能についてミックスプローブを用いて *in vitro* で解析した。ArpA 蛋白と 24 bp のランダム領域を持つ合成オリゴ DNA を

混合した後、ArpA 抗体を使って免疫沈殿を行い、ArpA と共沈してくる DNA を PCR を用いて回収するという方法で、ArpA と特異的に結合する DNA を取得した。この配列は 22 bp のパンドローム構造をとっており、片側半分のコンセンサ配列は 5' -GG (T/C)CGGT(A/T)(T/C)G(T/G)-3' であった。また ArpA と DNA との複合体は微量の A-ファクターの添加によって速やかに解離し、A-ファクターの存在時には、ArpA と DNA の結合は阻害された。以上の結果、ArpA は *S. griseus* において、二次代謝と形態分化のある制御蛋白遺伝子の転写を A-ファクター依存的に調節しているというモデルが提出でき

る。A-ファクター欠損変異株より胞子形成・Sm 生産能の回復を指標に UV 照射処理で取得した *S. griseus* HO1 では ArpA の 115 番の Pro が Ser に置換される変異 (P115S) が導入されていることをつきつめ、このために A-ファクター結合能が保持されているにも関わらず、二次代謝・形態分化に対する抑制機能が消失されていることを明らかにした。これらの結果から、P115S は DNA 結合能のみを消失した変異型 ArpA であり、ArpA は A-ファクター結合ドメイン (センサードメイン) と DNA 結合ドメイン (制御ドメイン) の独立した 2 つの機能ドメインから成り立っていることが示唆された。

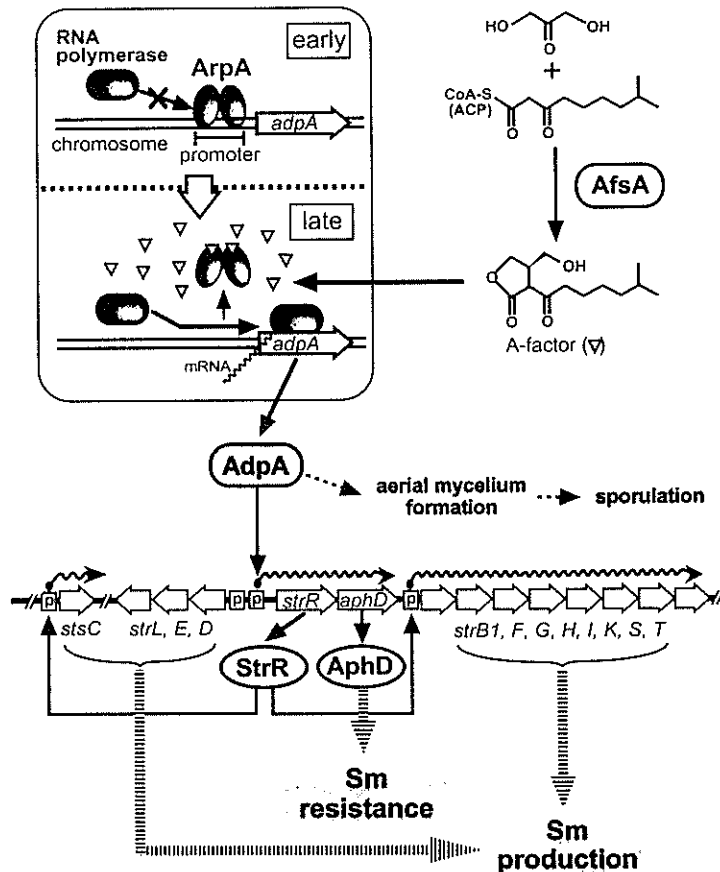


図1. A-ファクター制御カスケード。A-ファクター合成酵素 AfsA は、C3単位のグリセロール誘導体と C10単位のβ-ケト酸から A-ファクターを合成する。培養が進むにつれ徐々に蓄積する A-ファクターは、転写因子 AdpA 遺伝子のプロモーターに結合してその発現を抑制している A-ファクターレセプター ArpA に結合して DNA から解離させ、*adpA* の転写を開始させる。AdpA は、ストレプトマイシン生合成遺伝子群の転写因子である StrR のプロモーターに結合してその転写を開始させる。このようにして誘導合成された StrR は他のストレプトマイシン生合成遺伝子群を活性化し、グルコースからストレプトマイシンの合成が開始される。AdpA は、空中菌糸、胞子形成への重要な一ステップである。

(2) *Streptomyces coelicolor* A3(2) の A-ファクターレセプターの類似遺伝子のクローニングおよび機能解析
S. coelicolor A3(2)では、数種の A-ファクター類似物質の存在が知られているが、これらの機能は不明であった。本菌のホルモン調節制御機構を解明するため、*S. griseus* の A-ファクターレセプター遺伝子 (*arpA*) と相同な 2 つの遺伝子をクローニングした。共に 216 アミノ酸からなる蛋白をコードしており、ArpA とではアミノ酸配列で 36% の相同性があった。また、この 2 つの遺伝子の破壊株、及び野生、破壊株への形質転換株を作成し、その形質を検討した結果、色素性抗生物質であるアクチノロージンとウンデシルプロディギオシンの生産に、それぞれの遺伝子が正負に関与していることがわかった。一方、孢子形成開始時期、生育速度に対してもそれぞれの遺伝子が影響していることが確認された。

(3) Sm 生合成遺伝子群の制御遺伝子 *strR* の転写活性化因子である A-ファクター依存性 DNA 結合蛋白

StrR は *S. griseus* の Sm 生合成遺伝子群の制御蛋白であるが、既に *strR* 遺伝子の転写が A-ファクター依存的に起こること、および A-ファクター存在下のみ *strR* 遺伝子のプロモーター上流領域に結合する蛋白が存在することを明らかにしている。本蛋白 (AdpA) は *strR* の転写活性化因子であり、A-ファクターシグナルを Sm 生合成遺伝子群に伝達すると考えられる。AdpA 活性の検出には AdpA の結合配列を含む 97 bp の DNA 断片をプローブとしたゲルシフトアッセイを用いた。*S. griseus* (15 L 培養) の菌体破碎上清から DNA アフィニティクロマト等により精製した蛋白のアミノ酸配列情報をもとに、プライマーを作製し、*S. griseus* の染色体 DNA を鋳型とした PCR により、約 500 bp の DNA 断片を取得した。これをプローブとして定法により *adpA* 遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。AdpA は 405 アミノ酸からなり、ほぼ中央付近にヘリックス-ターン-ヘリックス DNA 結合コンセンサス配列を有していた。また、*adpA* のプロモーターの -35 および -10 領域は ArpA 結合コンセンサス配列を有していた。実際、ArpA は *adpA* のこの配列に結合し、A-ファクターの添加で速やかに解離した。即ち、*adpA* 遺伝子が ArpA の標的遺伝子であることが判明した。したがって、Sm 生産に関与する A-ファクター制御カスケードの主要経路 (AfsA→A-ファクター→AdpA→StrR→Sm 生合成遺伝子群) を明らかにすることができた (図 1)。

(4) *S. griseus* の二次代謝と形態分化に及ぼす cAMP のプ

レイオトロピックな効果

cAMP は細胞内セカンドメッセンジャーとしてその機能がよく知られているが、放線菌での cAMP の機能については不明であった。*S. griseus* の 1 変異株の形態分化と二次代謝を制御する遺伝子として、cAMP 合成酵素である adenylate cyclase 遺伝子 (*cyaA*) を取得した。A-ファクター非依存的に Sm 生産と孢子形成を行う A-ファクターレセプター (ArpA) 変異株 (*S. griseus* HO2) を宿主に、野生株の染色体をハイコピーベクターに載せ、導入することで、両方の形質を制御することを指標にした。*cyaA* の過剰発現によって cAMP が大量に生産され、さらに、*cyaA* の破壊株では cAMP の生産が認められなかった。*cyaA* は ArpA 変異株の場合は気中菌糸形成と Sm 生産を抑制したが、野生株には何の影響も示さなかったため、おそらく ArpA を介して形態分化と二次代謝を調節すると推定される。種々の濃度の cAMP をしみこませたペーパーディスクをおいたプレート上に生育させた HO2 株の観察により、高濃度の cAMP は形態分化と二次代謝を抑制することが明らかになった。また低濃度の cAMP は形態分化と二次代謝を促進した。cAMP は stringent response factor である ppGpp の生産を抑制した。また、*cyaA* 遺伝子の導入は HO2 株の phosphotyrosine 蛋白の培養時期特異的なリン酸化様式にも影響を及ぼした。以上の結果は放線菌においても cAMP を介した制御ネットワークが存在し、それが形態分化と二次代謝に pleiotropic に機能していることを示唆している。

4. 今後の課題と発展

A-ファクター制御カスケードについて、Sm 生合成に至る主要ステップの全貌を明らかにできたが、形態分化に至るシグナル経路については未だ不明な点が残る。また、ArpA についての X 線結晶構造解析は、現在重原子置換の解析像をコンピュータ処理している段階であり、あと数カ月で三次元構造を解くことができる。本研究によって得られた基礎知見は、放線菌による抗生物質の増産や新規化合物の生産という応用面に役立つと期待される。

発表論文

- [1] S. Horinouchi. (1996) *Streptomyces* genes involved in aerial mycelium formation. FEMS Microbiol. Lett. 141: 1-9.
- [2] T. Umeyama, Y. Tanabe, B. D. Aigle and S. Horinouchi. (1996) Expression of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) *ptaA* gene encoding a phosphotyrosine protein phosphatase leads to overproduction of secondary metabolites in *S. lividans*. FEMS Microbiol. Lett. 144:

177-184.

- [3] K. Ueda, T. Umeyama, T. Beppu and S. Horinouchi. (1996) The aerial mycelium-defective phenotype of *Streptomyces griseus* resulting from A-factor deficiency is suppressed by a Ser/Thr kinase of *S. coelicolor* A3(2). *Gene* 169:91-95.
- [4] S. Horinouchi. (1997). Regulation of antibiotic production: protein serine/threonine kinases and autoregulators. *Dynamic Aspects of Natural Products Chemistry: Molecular Biological Approaches*. (Kodansha and Harwood Academic Publishers, Tokyo and Amsterdam), pp 165-186.
- [5] A. Lezhava, D. Kameoka, H. Sugino, K. Goshi, H. Shinkawa, O. Nimi, S. Horinouchi, T. Beppu and H. Kinashi. (1997) Chromosomal deletions in *Streptomyces griseus* that remove the *afsA* locus. *Mol. Gen. Genet.* 253:478-483.
- [6] H. Onaka and S. Horinouchi. (1997) DNA-binding activity of the A-factor receptor protein and its recognition DNA sequences. *Mol. Microbiol.* 24:991-1000.
- [7] H. Onaka, M. Sugiyama and S. Horinouchi. (1997) A mutation at proline-115 in the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus* abolishes DNA-binding ability but not ligand-binding ability. *J. Bacteriol.* 179:2748-2752.
- [8] N. Ando, N. Matsumori, S. Sakuda, T. Beppu and S. Horinouchi. (1997) Involvement of AfsA in A-factor biosynthesis as a key enzyme. *J. Antibiot.* 50:847-852.
- [9] N. Ando, K. Ueda and S. Horinouchi. (1997) A *Streptomyces griseus* gene (*sgaA*) suppresses the growth disturbance caused by high osmolality and a high concentration of A-factor during early growth. *Microbiology* 143:2715-2723.
- [10] N. Ando, T. Umeyama, K. Ueda and S. Horinouchi. (1998) Gene organization in a 12-kilobase region covering *afsA* encoding an A-factor biosynthetic enzyme. *Actinomycetologica* 12:40-45.
- [11] S.-K. Hong and S. Horinouchi. (1998) Effects of protein kinase inhibitors on in vitro protein phosphorylation and on secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Microbiol. Biotechnol.* 8:325-332.
- [12] S. Horinouchi, Y. Ohnishi and H. Onaka. (1998) How A-factor triggers streptomycin production in *Streptomyces griseus*. *Proceedings of the International Symposium on Bioactive Compounds and Strain Development*. (The Korean Society for Applied Microbiology, Seoul), pp 66-72.
- [13] H. Onaka, T. Nakagawa and S. Horinouchi. (1998) Involvement of two A-factor receptor homologues in *Streptomyces coelicolor* A3(2) in the regulation of secondary metabolism and morphogenesis. *Mol. Microbiol.* 28:743-753.
- [14] M. Sugiyama, H. Onaka, T. Nakagawa and S. Horinouchi. (1998) Site-directed mutagenesis of the A-factor receptor protein: Val-41 important for DNA-binding and Trp-119 important for ligand-binding. *Gene* 222:133-144.
- [15] K. Ueda, C.-W. Hsheh, T. Tosaki, H. Shinkawa, T. Beppu and S. Horinouchi. (1998) Characterization of an A-factor-responsive repressor for *anfR* essential for onset of aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 180:5085-5093.
- [16] N. Funa, Y. Ohnishi, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka and S. Horinouchi. (1999) A new pathway of polyketide synthesis in microorganisms. *Nature* (in press).
- [17] S. Horinouchi. (1999). γ -Butyrolactones that control secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*. *Cell-Cell Signaling in Bacteria*. (American Society for Microbiology, Washington, D. C.), pp. 193-207.
- [18] S. Horinouchi, Y. Ohnishi and D.-K. Kang. (1999) The A-factor regulatory cascade and cAMP in the regulation of physiological and morphological development in *Streptomyces griseus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (in press).
- [19] D.-K. Kang, X.-M. Li, K. Ochi and S. Horinouchi. (1999) Possible involvement of cAMP in aerial mycelium formation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 145:1161-1172.
- [20] Y. Ohnishi, S. Kameyama, H. Onaka and S. Horinouchi. (1999) The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* (in press).
- [21] T. Umeyama, P.-C. Lee, K. Ueda and S. Horinouchi. (1999) An AfsK/AfsR system involved in the response of aerial mycelium formation to glucose in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 145:2281-2293.
- [22] T. Yonekawa, Y. Ohnishi and S. Horinouchi. (1999) Involvement of *anfC* in physiological and morphological development in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 145:2273-2280.