

微生物機能を誘発する環境因子群とその作用機構に関する研究

高野 英晃（日本大学 生物資源科学部）

takano.hideaki@nihon-u.ac.jp

はじめに

地球上の多様な環境に生息する細菌群は、ストレスをはじめとする種々の環境因子によって引き起こされる環境変化に対する多彩な応答・適応システムを有している。このように細菌の生理に大きな影響を及ぼす環境因子は、地球環境に広く存在する普遍的因子および微生物代謝産物のような局所的な分布を示す特異的因子に大別される。我々は独自に見いだした環境因子が誘発する生物現象を対象として、微生物の有用な潜在的機能を引き出す可能性をもった環境因子群およびその作用機構に関する研究を展開した。それにより、非光合成細菌に広く共通する光感知機構および微生物間相互作用に基づき抗生物質生産を誘導する化学因子群を明らかにした。

1. 普遍的因子“光”によって誘発されるカロテノイド生産の分子機構

光に応答して起こる生物現象は真核生物や光合成細菌で広く研究され、その光センサーも明らかにされてきた。一方、光合成能をもたない細菌（以下、一般細菌）が示す光応答現象は粘液細菌におけるカロテノイド生産の光誘導に限られ、我々が本研究を始めた当時、その光感知に関する知見は乏しいのが現状であった。我々は多様な生理活性物質を生産する放線菌の分子遺伝学的な研究を進めている過程において、そのモデル株 *Streptomyces coelicolor* A3(2)のカロテノイド生産が光によって著しく促進されることを独自に見いだした¹。我々の遺伝学的な解析によって、カロテノイド生合成遺伝子クラスターに隣接して存在する2つの転写制御関連蛋白質 MerR ファミリー LitR と RNA ポリメラーゼシグマ因子 LitS が光誘導制御において中心的な役割を果たすことが明らかになった¹。これまでに予想されている制御モデルを図1に示した。暗条件における LitR は活性型リプレッサーとして働くことによって LitS の転写は抑制されるため、

発現スイッチはオフ状態となる。一方、光照射された LitR は何らかの機構によってアクチベーター型となり、*litS* の転写を誘導する。発現した σ^{LitS} を含む RNA ポリメラーゼホロ酵素は2つの *crt* プロモーターからの転写を開始することで、カロテノイド合成を担う一連の酵素が発現する。ここで見いだした LitR は DNA 結合ドメインとビタミン B12(Cbl)結合

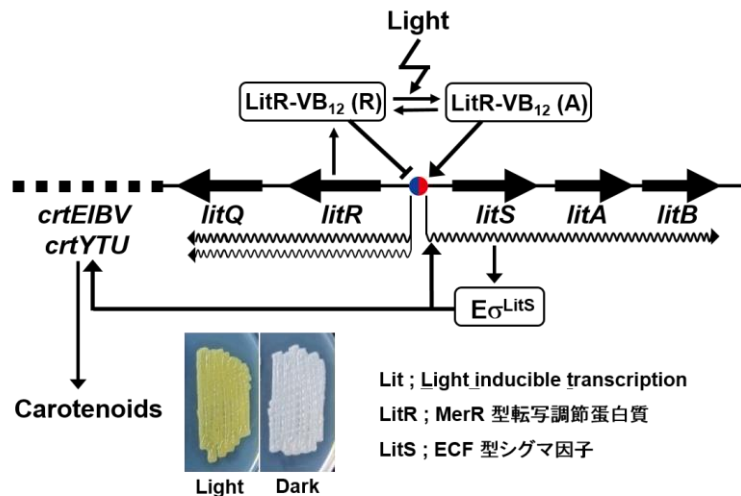


図1 放線菌のカロテノイド生産の光誘導機構

ドメインを有していた。一般的に MerR ファミリーはリガンドによって DNA 結合活性が調節されることから、青色から緑色光を吸収する Cbl と複合体を形成した LitR が光センサーとして作用することが予想された。実際に、Cbl 遺伝子破壊が構成的かつ低レベルのカロテノイド生産を引きこしたことは、Cbl が光感知分子として機能することを示している^{9,11}。

放線菌より見いだした LitR ホモログはきわめて広範な細菌種ゲノムにコードされており、グラム陽性・陰性を問わない約 30% の細菌属にその存在が認められた^{3,4}。また、LitR ホモログの周辺領域には、カロテノイド合成遺伝子のほかに、光に関連する蛋白質群がコードされていた。すなわち、多様な細菌における光回復酵素 DNA photolyase (*phr*)、*Pseudomonas* 属細菌における青色光受容体ホモログ LOV、*Thermus* 属細菌におけるバクテリオロドプシンなどである。このように光関連蛋白質の機能は多様であった一方、LitR が唯一共通する転写制御蛋白質であったことは、LitR が光センサー機能を有することを強く示唆していた。

2. 光センサー型転写調節蛋白質 LitR の機能

LitR ホモログの広範な分布に基づいて、我々は温泉に生息するグラム陰性の好熱性細菌 *Thermus thermophilus* HB27 株と土壤に生息するグラム陽性の内生孢子形成細菌 *Bacillus megaterium* QM B1551 株のカロテノイド生産が光によって顕著に促進されることをはじめて明らかにした^{6,8,10}。そこで、全く異なる生理的諸性質と生息環境を示すこれら細菌を対象とした LitR ホモログの生化学的な機能解析を進め、*litR* がカロテノイド合成遺伝子の光誘導において中心的な役割を果たすことを明らかにした。両者由来の LitR 組み換え蛋白質は役割のみならず機能面において多くの共通性を有していた。すなわち、LitR は Cbl の一種であるアデノシル B12(AdoB12)と相互作用し、標的遺伝子からの転写を抑制するリプレッサーとして機能する(図 2A)。一方、光照射は LitR-AdoB12 複合体のホモオリゴマーの解離を誘導することでそれを不活性化する。

それに伴い、下流の制御下にあるアクチベーター LdrP (*Thermus* の場合) の発現が許可されることでカロテノイド合成遺伝子などの転写が活性化される。また、*Thermus* 由来の LitR 光感知ドメイン-ヒドロキソ B12 複合体(明状態)の光感知ドメインの立体構造を決定した(PDB code:3WHP、図 2C)。さらに、最小構成蛋白質群を用いた *In vitro* 転写実験系により、LitR-AdoB12 を介した光誘導性の mRNA 合成を再現することに成功した。

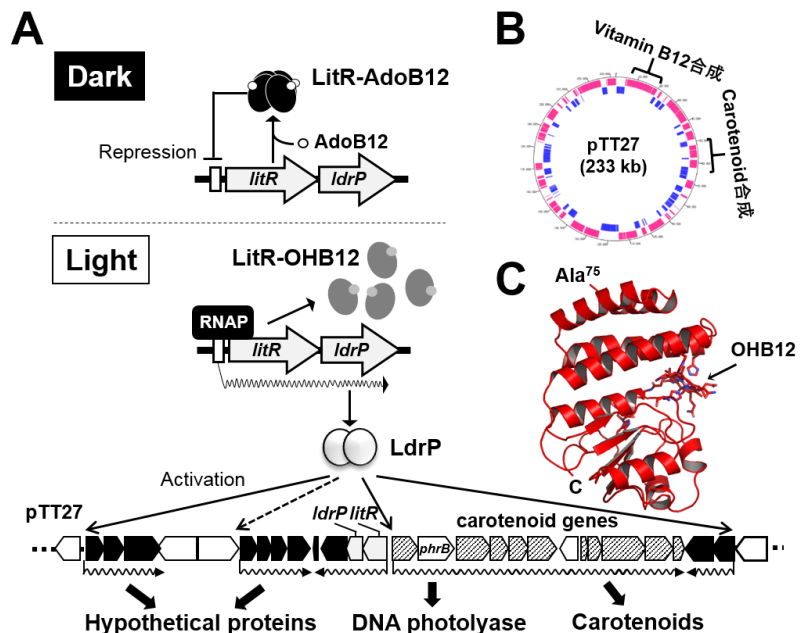


図2 *T. thermophilus*におけるカロテノイド生産の光誘導の分子メカニズム (AdoB12, アデノシルB12; OHB12, ヒドロキソB12; pTT27, 巨大プラスミド; 立体構造, LitR光感知ドメインとOHB12複合体)

3. 特異的因子による放線菌の二次代謝産物生産の誘導

我々は、ある種の放線菌が近傍に存在する別種放線菌の抗生物質生産を著しく促進するというユニークな生物現象を独自に見いだしていた。本現象を仲介する化学因子の同定を目的として、供与菌である放線菌 *S. griseus* によって作られ、受容菌である別の放線菌 *S. tanashiensis* の抗生物質生産と増殖を強く促進する化学因子の単離・精製・構造決定を行った。その結果、それは放線菌が一般的に生産する鉄包摂化合物シデロフォア Desferrioxamine E であることが判明した² (図3左)。さらに、Desferrioxamine E に応答する土壌細菌を広く探索したところ、グラム陰性細菌 *Chromobacterium violaceum* の青色抗生物質 Violacein の生産が著しく促進されることを見いだした⁷。別の事例として、放線菌 *S. scabrisporus* が生産する新規なイオノフォア系抗生物質 Promomycin が別の放線菌 *S. griseorubiginosus* の抗生物質生産を強く促進することを明らかにした⁵ (図3右)。さらに、一次代謝産物であるビタミン B12 (Cobalamin) が放線菌 *S. coelicolor* の分化と二次代謝産物生産にシグナル分子として正に作用することを見いだした^{9,11}。これらの結果は、“シデロフォア、抗生物質、ビタミンが二次代謝産物生産の誘導因子として作用する”ことを示しており、微生物代謝産物の役割に新たな知見をもたすとともに、化学因子を介した微生物間コミュニケーションの一端を明らかにした。

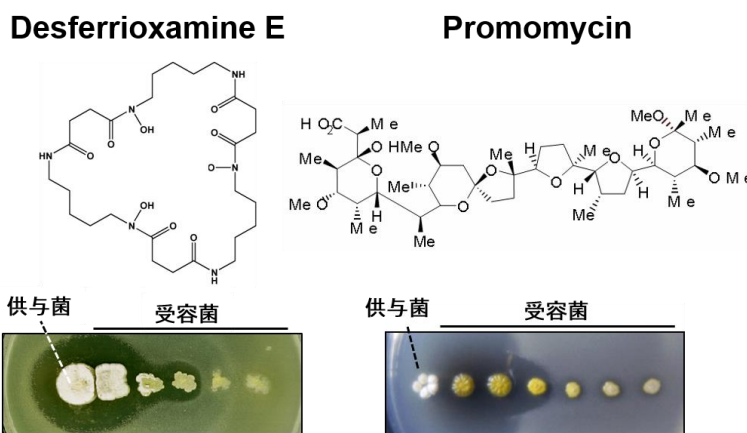


図3 特異的因子を介した抗生物質生産の誘導

おわりに

我々は独自に見いだした生物現象から出発した研究を多角的に展開してきた。それにより、一般細菌のカロテノイド生産の光誘導において、LitR が光感知と転写調節の2機能を担う普遍的な転写調節蛋白質であることを明らかにした。細菌ゲノムにおける LitR の広範な分布は、真核生物や光合成生物などと同じく、一般細菌が光に対する感知・応答システムを広く備えているという新事実を示している。さらに、微生物間相互作用を担う化学因子に着目した研究により、二次代謝産物代謝がもつ新しい役割の提示をもたらした。現在では、微生物の有用遺伝子の大半が休眠状態にあることが知られており、その覚醒方法の確立が重要な課題となっている。本研究は、微生物のもつ有用な潜在機能を発掘していく上で、環境因子の効果的な利用がその強力な手段であることを示している。

謝辞

本研究は日本大学生物資源科学部・生命工学研究室（応用生物科学科/生命科学研究センター）で行われたものです。終始ご指導とご鞭撻を賜りました東京大学名誉教授・別府輝彦先生（元日本大学・教授）および日本大学教授・上田賢志先生に心より深甚な謝意を表します。研究全体を通して、多大なるご協力とご助言をくださいました東京大学・（故）堀之内末治先

生、同大学・大西康夫先生、北里大学・池田治生先生、理化学研究所・新海暁男先生、東京大学・作田庄平先生、筑波大学・中村颯先生、東京大学・野尻秀昭先生に感謝いたします。

引用文献

- 1) **H Takano**, Obitsu S, Beppu T, Ueda K., Light-induced carotenogenesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2): Identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. *J Bacteriol.* 2005; 187(5):1825-1832.
- 2) Yamanaka K, Oikawa H, Ogawa HO, Hosono K, Shinmachi F, **Takano H**, Sakuda S, Beppu T, Ueda K. Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology.* 2005;151(9):2899-2905.
- 3) **H Takano**, Beppu T, Ueda K., The CarA/LitR-family transcriptional regulator: Its possible role as a photosensor and wide distribution in non-phototrophic bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006; 70(9):2320-2324.
- 4) **H Takano**, Asker D, Beppu T, Ueda K., Genetic control for light-induced carotenoid production in non-phototrophic bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2006; 33(2):88-93.
- 5) Amano S, Morota T, Kano YK, Narita H, Hashidzume T, Yamamoto S, Mizutani K, Sakuda S, Furihata K, Takano-Shiratori H, **Takano H**, Beppu T, Ueda K. Promomycin, a polyether promoting antibiotic production in *Streptomyces* spp. *J Antibiot.* 2010; 63(8):486-491.
- 6) **H Takano**, Kondo M, Usui N, Usui T, Ohzeki H, Yamazaki R, Washioka M, Nakamura A, Hoshino T, Hakamata W, Beppu T, Ueda K., Involvement of CarA/LitR and CRP/FNR family transcriptional regulators in light-induced carotenoid production in *Thermus thermophilus*. *J Bacteriol.* 2011; 193(10):2451-2459.
- 7) Eto D, Watanabe K, Saeki H, Oinuma K, Otani K, Nobukuni M, Shiratori-Takano H, **Takano H**, Beppu T, Ueda K. Divergent effects of desferrioxamine on bacterial growth and characteristics. *J Antibiot.* 2013; 66(4):199-203.
- 8) **H. Takano**, Y. Agari, K. Hagiwara, R. Watanabe, R. Yamazaki, T. Beppu, A. Shinkai and K. Ueda, LdrP, a CRP/FNR family transcriptional regulator serves as a positive regulator for the light-inducible gene cluster in a megaplasmid of *Thermus thermophilus*. *Microbiology.* 2014; 160(12), 2650-2660.
- 9) **H. Takano**, K. Hagiwara, K. Ueda, Fundamental role of cobalamin biosynthesis in the developmental growth of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99(5):2329-2337.
- 10) **H. Takano**, K. Mise, K. Hagiwara, N. Hirata, S. Watanabe, M. Toriyabe, H. Shiratori-Takano and K. Ueda., The role and function of LitR, an AdoB₁₂-bound light-sensitive regulator of *Bacillus megaterium* QM B1551, in the regulation of carotenoid production, *J Bacteriol.* 2015; 197(14): 2301-2315.
- 11) **H. Takano**, T. Nishiyama, S. Amano, T. Beppu, M. Kobayashi and K. Ueda, *Streptomyces* metabolites in divergent microbial interactions. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2015; *In press*; DOI:10.1007/s10295-015-1680-z.

Studies on environmental factors affecting microbial functions and their mode of action

Hideaki Takano (College of Bioresource Sciences, Nihon University)
takano.hideaki@nihon-u.ac.jp

Abstract

The production of secondary metabolites including diverse bioactive compounds from microorganisms is largely affected by environmental factors such as stress and starvation. In the present study, we found that light and microbial metabolites result in the induction of useful microbial functions, and also revealed the molecular mechanism underlying the phenomena induced by these environmental factors.

(i) Molecular mechanism underlying light-inducible carotenoid production in non-phototrophic bacteria¹⁻². We first found that *Streptomyces coelicolor* exhibits light-inducible carotenoid production.

Genetic analysis aimed at elucidating the control of light-inducible carotenoid production revealed that a MerR family transcriptional regulator, LitR, adjacently encoding in the carotenoid biosynthesis gene cluster, plays a central role in light-induced transcription. Genomic search showed that a LitR homolog is encoded in the phylogenetically diverged bacteria including not only gram-positive bacteria but also gram-negative bacteria. Our biochemical studies on LitR proteins derived from a gram-negative bacterium, *Thermus thermophilus*, and a gram-positive bacterium, *Bacillus megaterium*, revealed that LitR is a transcriptional regulator with photo-sensory function, based on the evidence that LitR associates with a light-sensing molecule Adenosyl B12 to form a LitR-AdoB12 complex, which exhibits light-sensitive DNA-binding activity and shows light-inducible subunit dissociation. The presence of LitR in bacteria with carotenoid genes indicates that LitR serves as a general photosensitive transcriptional regulator, and non-phototrophic bacteria generally have an ability to sense light and thus produce carotenoids upon exposure to light.

(ii) Chemical factors inducing cryptic antibiotic production based on microbial interaction³. We first found a unique biological phenomenon wherein *Streptomyces griseus* remarkably promotes antibiotic production in *Streptomyces tanashiensis*. Further studies identified siderophore desferrioxamine E as the antibiotic inducer in this process. Screening of the bacterial response to desferrioxamine E revealed that this compound remarkably promoted the production of a purple-pigmented antibiotic violacein in *Chromobacterium violaceum*. In another case, a polyether antibiotic promomycin produced by *Streptomyces scabrissporus* strongly induced the production of antibiotics in *Streptomyces griseorubiginosus*. These results indicate that siderophores and antibiotics serve as signaling compounds that induce the production of cryptic secondary metabolites.

[Reference]

- 1) H. Takano *et al.*, *Journal of Bacteriology*. 2011; 193(10):2451-2459.
- 2) H. Takano *et al.*, *Journal of Bacteriology*. 2015; 197(14): 2301-2315.
- 3) S. Amano *et al.*, *The Journal of Antibiotics*. 2010; 63(8):486-491.