

# 放線菌の細胞外シグナル応答～その分子メカニズムから環境動態へ

上田賢志（日本大学 生物資源科学部）

ueda@brs.nihon-u.ac.jp

放線菌の形態分化と二次代謝は種々の細胞外刺激に応答して開始する。自己調節因子 A-ファクターに関する知見をもとに、我々はその様々な刺激の本体と、関連する遺伝制御系の同定を様々な角度から行った。第 2 の自己調節因子に加え、フェノール酸化酵素により生成する分化誘導因子、さらには異種間の交信を介した制御など、その多様性は個別の応答機構から共生系へと広がりを見せている。

## 形態的・生理的に分化するバクテリア、放線菌

放線菌は、カビに似た複雑な形態分化を行うグラム陽性の細菌であり、土壌をその主な分布域とする。この菌群は、栄養細胞に相当する基底菌糸を伸長させた後、気中菌糸を分岐させ、さらに隔壁形成によってその先端部を孢子鎖に分化することによって生活環を完了する（図 1）。このことは、一連の細胞分化を正確に遂行するための高度にプログラム化された遺伝制御系がこのバクテリアに備わっていることを意味する。放線菌はまた、抗生物質に代表される産業上極めて重要な生理活性物質を豊富に生産する工業微生物であり、スクリーニングの格好の対象としてもよく知られる。つまり、この細菌群は天然生理活性物質の生合成に関する遺伝子資源の宝庫である。この生理活性物質の生産は二次代謝とよばれ、先の形態上の分化に対して菌の生理上の分化として位置づけられる。

放線菌の形態上および生理上の分化は遺伝的に密接に関連している。例えば、分化のスイッチとして機能する自己調節因子が両者に共通して作用することが知られる。そのもっとも先駆的な例は、東京大学の別府、堀之内らにより発見・解明がなされたストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus* の A-ファクターであり、この $\gamma$ -ラクトン化合物の作用を介して形態分化と二次代謝が開始する。この事実は、この菌がバクテリアでありながら高等生物でいうホルモンを使って細胞の発達段階を増殖から分化へと切り換えていると示している。

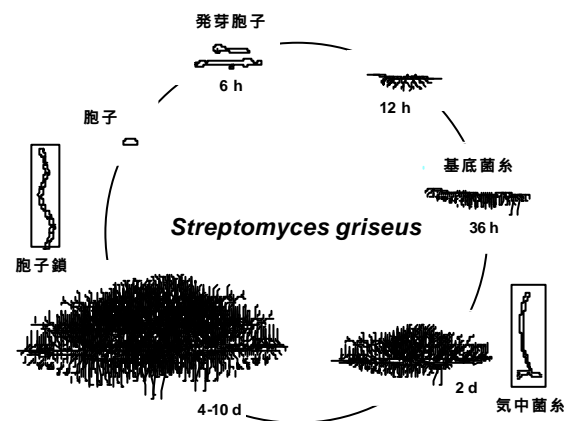


図 1 *S. griseus* の生活環

## 自己調節ペプチド AmfS

我々は、*S. griseus* において A-ファクターに続いて作用する第 2 の自己調節分子を発見した<sup>1)</sup>。AmfS と命名したその分子は特徴的な配列を有するペプチドで、かつて形態分化の制御に関わるとして同定した遺伝子クラスターの内部に他の制御蛋白質と共にコードされていた<sup>2,3)</sup>。AmfS の作用機構

に関する現段階での作業仮説を図 2 に示す。AmfS は前駆体として翻訳された後、膜排出ポンプである AmfA / AmfB の機能により菌体外に分泌される。その後オリゴペプチド透過系を介して改めて細胞内に取り込まれ、受容体と結合することで分化開始に参与する下流の制御遺伝子群の発現を誘導する。この分泌・取り込みの過程において AmfS は何らかの修飾/切断を受けることで活性型となる。

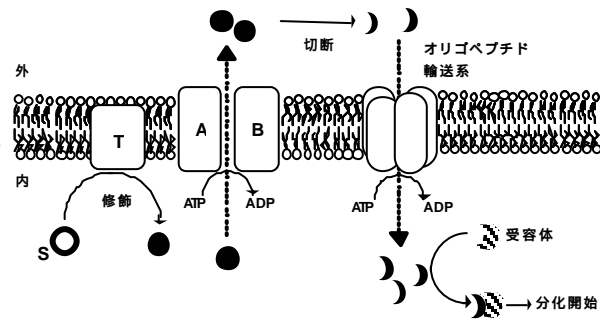


図 2 AmfS の作用機序 (作業仮説)

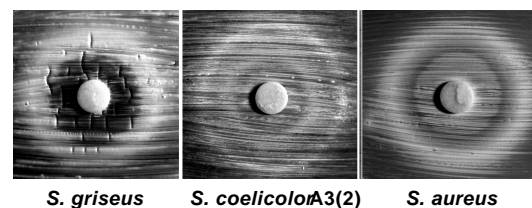
これら一連の Amf 蛋白群をコードする amfTSBA オペロンの転写は転写調節蛋白である AmfR によって正に制御される。一度細胞外に放出され、再び細胞に作用して信号伝達を司る AmfS は、環境プローブとしての役割を持った信号分子といえるかもしれない。S. griseus の amfS 破壊株が分化を行えないことと、この制御遺伝子群が種を越えて保存されていることは、ここに予想される制御機構が放線菌群の分化の開始に極めて重要な役割を果たしていることを強く示唆している。

### フェノール酸化酵素によって生成する分化誘導物質

放線菌の分化を誘導する細胞外刺激を探索する試みにおいて、我々は微量の銅イオンにその強い活性があることを見出した<sup>4)</sup>。S. tanashiensis の形態分化および抗生物質生産能を欠損した変異株 CR1 は、培地に 10 nM 以上の銅を添加することで野生株同様の孢子形成と抗生物質生産を行った。この銅の添加効果は極めて普遍的で、多くの放線菌の形態分化と二次代謝産物の生産性を促進した。我々は、この銅による促進効果が、銅酵素であるフェノール酸化酵素に対する阻害剤を添加することで解消されたことなどから、当該酵素群に分化誘導活性があることを予想した。

フェノール酸化酵素は、様々な生物においてチロシンなどのフェノール性基質からメラニン色素が合成される際の鍵酵素として知られるが、我々は、その酸化反応時に副生成する無色の低分子物質に放線菌の分化誘導活性が存在することを見出した<sup>5)</sup>。DOPA を基質とした酵素反応液を透析分画して得られた分子量 500-1,000 の無色の画分は、それを培地に添加することで S. griseus において図 3 に示すような顕著な分化誘導活性を示した。同様の誘導現象は種々の放線菌株においても観察された。

これまでに我々は S. griseus に 2 種のチロシナーゼおよび 1 種のラッカーゼ様新規酵素を同定し、そのいずれもが前記の誘導物質の生産性を有する可能性を示した。これらのフェノール酸化酵素はいずれも菌体外に分泌される菌体外酵素であることから、ここで検出された低分子物質は、フェノール酸化酵素群によって



S. griseus S. coelicolor A3(2) S. aureus

図 3 フェノール酸化酵素による反応生成物(中央の濾紙に添加されている)の気中菌糸誘導活性

菌体外で共通に合成され、細胞分化を誘導するシグナルとして機能していると考えられる。

### 異種放線菌間のクロストーク

A-ファクターは *S. griseus* において自己調節的に働く制御因子であり、一連の研究はそれが種に特異的に作用することを明らかにしている。そこで我々は、同じ作用様式でも、異なった菌株どうしの間で起こる現象に着目し、その存在を明らかにすることを目的として網羅的なクロスフィード実験を行った。すわなち、互いに異なる2つの菌株を同一の固体培地上に植菌し、隣接して生育させた場合に顕著な分化の促進が起こる現象(図4の例を参照)の有無を、保存菌株76種 新規分離株33種 新規分離株46種の各グループ内における全ての組み合わせについて検証した<sup>6)</sup>。その結果は意外にも非常に高い頻度を示し、特に土壌から新規に分離した菌株群において顕著であることが観察された。促進が認められた組み合わせのうちのいくつかについては、促進側の菌株の培養上清を有機溶媒抽出し、その濃縮画分に応答側の菌株の分化を誘導する活性を検出した。以上の事実は、環境中の放線菌群において種を越えた相互作用体系が存在し、その中には拡散性の化学物質を介した信号伝達システムが含まれていることを強く示唆している。これらは情報分子を介した一種の共生系ととらえることができる。

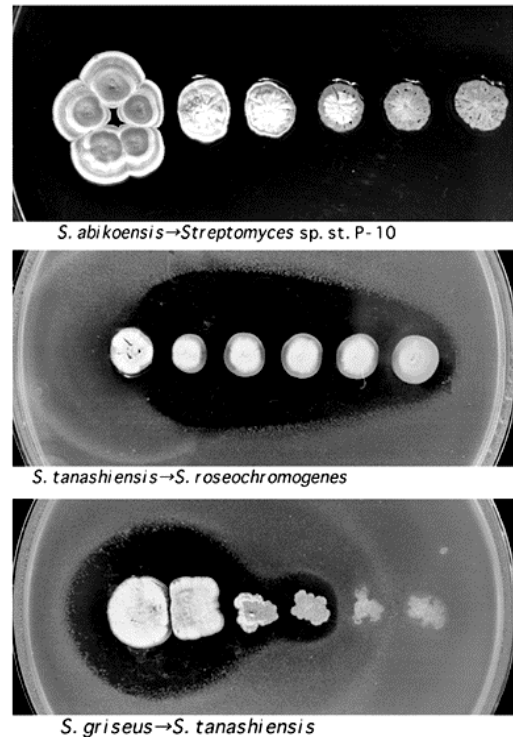


図4 異種間クロストークの実例。促進株(左端の1コロニー)と応答株(残り5つのコロニー)の固体培地上の様子。促進株に近い応答株のコロニーにおいて胞子形成(白色を呈する)や抗生物質生産(一面に重層された指示菌の生育阻止円で観察)の促進がみられる。

### 新しい「分子環境微生物学」

我々は放線菌に関する研究と同時に、共生細菌を対象とした微生物間共生現象に関する新しい基礎研究を推進し<sup>7,8)</sup>、従来の微生物学が見過ごしていた重要な事例を具体的に明らかにしつつある。昨今我々がうかがい知ようになった様々な分子メカニズムは、生物をとりまく種々の環境要因に適応して発達(進化)してきたものであり、寒天培地上での純粋培養の状態に基づいたものではないはずである。これはすなわち、個別の分子機構と微生物の環境動態には確実に何らかの接点が存在することを意味する。我々は、その融合点に微生物学上のつきない興味を抱くとともに、そこにこれからの環境調和型社会が求める新しいバイオテクノロジーの重要な基礎があると考え、さらに積極的な研究を展開していくつもりである。

## 謝辞

終始格別のご指導とご高配を賜りました別府輝彦先生、佐々木恵彦先生、中嶋睦安先生、堀之内末治先生に心から感謝いたします。本研究は、日本大学生物資源科学部生命科学研究センターおよび東京大学農学部醗酵学教室において共に過ごした室員の皆さんの惜しみない努力と、関連学会々員諸氏の温かいご支援とご助言の下で初めて進展したものであり、この場をお借りして厚くお礼申し上げます。

## 引用文献

1. Ueda, K., K. Oinuma, G Ikeda, K. Hosono, Y. Ohnishi, S. Horinouchi and T. Beppu. 2002. AmfS, an extracellular peptidic morphogen in *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol. 184:1488-1492.
2. Ueda, K., C. -W. Hsneh, T. Tosaki, H. Shinkawa, T. Beppu and S. Horinouchi. 1998. Characterization of an A-factor-responsive repressor for *amfR* essential for onset of aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus*. J. Bacteriol, 180:5085-93.
3. Ueda, K., K. Miyake, S. Horinouchi and T. Beppu. 1993. A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulators of two-component regulatory systems and membrane translocators. J. Bacteriol. 175:2006-2016.
4. Ueda, K., Y. Tomaru, K. Endoh and T. Beppu. 1997. Stimulatory effect of copper on antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces tanashiensis*. J. Antibiotics 50:693-695.
5. Endo, K., K. Hosono, T. Beppu and K. Ueda. 2002. A novel extracellular phenol oxidase of *Streptomyces*: its possible involvement in the onset of morphogenesis. Microbiology 148:1767-1776.
6. Ueda, K., S. Kawai, H. Ogawa, A. Kiyama, T. Kubota, H. Kawanobe and T. Beppu. 2000. Wide distribution of interspecific stimulatory events on antibiotic production and sporulation among *Streptomyces* species. J. Antibiotics 53:979-982.
7. Ueda, K., M. Ohno, K. Yamamoto, H. Nara, Y. Mori, M. Shimada, M. Hayashi, H. Oida, Y. Terashima, M. Nagata and T. Beppu. 2001. Distribution and diversity of symbiotic thermophiles, *Symbiobacterium thermophilum* and related bacteria, in natural environments. Appl. Environ. Microbiol. 67:3779-3784.
8. Ohno, M., H. Shiratori, M. Park, Y. Saitoh, Y. Kumon, N. Yamashita, A. Hirata, H. Nishida, K. Ueda and T. Beppu. 2000. *Symbiobacterium thermophilum* gen. nov., sp. nov., a symbiotic thermophile depending on coculture with a *Bacillus* strain for growth. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50:1829-1832.

## **Extracellular Signaling in *Streptomyces* from molecular biology to ecology**

Kenji Ueda (Nihon University, College of Bioresource Sciences)

ueda@brs.nihon-u.ac.jp