

DNA マイクロアレイを用いた放線菌の二次代謝・形態分化制御機構の解析

大西 康夫

(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

研究の目的

放線菌は原核生物でありながら菌糸状に生育し、栄養増殖菌糸から空中に向かって伸長した気中菌糸に孢子を着生するという複雑な形態分化能を有するため、細胞分化のモデル微生物として重要な研究対象である。また、放線菌は抗生物質をはじめとした様々な生理活性物質を生産することでも知られ、産業微生物としても有用である。ストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus* では、自己調節因子A-ファクターによって、放線菌の二大特徴ともいえる二次代謝・形態分化が誘導されるが、筆者らはこれまで、A-ファクターによるストレプトマイシン生産誘導を分子レベルで明らかにするなど、『A-ファクター制御カスケード』の解明に取り組んできた^{1,2)}。さらに最近、筆者らは *S. griseus* の全ゲノム配列を決定することに成功したが³⁾、今回の研究では全ゲノム配列をもとに作製したDNAマイクロアレイを用いてA-ファクターによって引き起こされる遺伝子発現変化を網羅的に解析した⁴⁾。A-ファクター制御は、*S. griseus* の二次代謝・形態分化に関する制御ヒエラルキーの最上位に位置しているため、本研究により放線菌の二次代謝・形態分化の制御に関する新たな知見が得られるものと期待される。例えば、A-ファクターによって誘導される遺伝子の中には、二次代謝・形態分化に重要な機能をもつ新規遺伝子が含まれていると考えられる。このように、本研究には、(i) A-ファクターによってどれくらいの数の遺伝子が転写誘導されるかを調べA-ファクター制御カスケードの全体像を明らかにすること、(ii) DNAマイクロアレイ解析を一種の「スクリーニング」として捉え二次代謝・形態分化に関与する新たな遺伝子を探索すること、という2つの目的がある。

方法

afsA はA-ファクター生合成の鍵酵素をコードするため⁵⁾、*afsA* 遺伝子破壊株はA-ファクターを生産できず形態分化やストレプトマイシン生産を行えないが、培養にA-ファクターを添加することによって、野生株と同様の表現型を示す。つまり、*afsA* 遺伝子破壊株の培養にA-ファクターを加えることによって、野生株においてA-ファクターにより引き起こされる遺伝子変化を人為的に再現できるわけである。*afsA* 遺伝子破壊株をYMPD液体培地で培養し、対数増殖中期にA-ファクターを終濃度50 ng/mlで加えた。A-ファクター添加後、5分、15分、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間の8点で菌体をサンプリングしRNAを回収した。一方、A-ファクターではなく、A-ファクター溶液(エタノール)と同量のエタノールを加えた*afsA* 遺伝子破壊株の培養から同様にRNAサンプルを調製した。各時間での両株のトランスクリプトームについて、カスタムオリゴDNAマイクロアレイを用いた競合的ハイブリダイゼーション³⁾によって比較解析した。3回の独立した実験から得られた結果について統計的解析を行い、A-ファク

ターによって引き起こされる遺伝子発現変化のうち統計的に有意なものを抽出した。(各時間での解析では、転写量の違いが2倍以上かつ t 検定の p 値が0.05以下を有意とした。また、経時変化では、ANOVAの p 値が0.05以下を有意とした。)

一方、2つのAdpA結合DNA断片(*sgiA*プロモーター上流および*sgmA*プロモーター上流)をプローブに用いたゲルシフトアッセイにおいて、AdpAのプローブDNAへの結合が競争的に阻害されるかどうかを調べることによって、新たに取得したDNA断片にAdpAが結合するか否かを調べた。

結果

A-ファクターの添加後すぐに*adpA*の転写活性化が見られた A-ファクター非存在下では*adpA*プロモーターにA-ファクターレセプタータンパク質(ArpA)が結合し、*adpA*の転写を抑制している。A-ファクターの結合による構造変化によってArpAが*adpA*プロモーターから解離し、*adpA*の転写が開始されることがA-ファクターによる遺伝子発現の第1ステップである。本実験において、*adpA*の転写量はA-ファクター添加5分後に、コントロール株の3.5倍に上昇し、その後の12時間、測定したすべての時間で、2.8倍から4.2倍の活性化が観察された。また、A-ファクター添加後の3点(5分、15分、30分)において2点以上で共通して転写活性化が見られる遺伝子は*adpA*だけであった。この結果は、ArpAの標的遺伝子が*adpA*だけであるというこれまでの解析結果⁶⁾を支持するものであった。

A-ファクターの添加により引き起こされる遺伝子発現変化 サンプルングした8点のいずれかの時間で2倍以上の有意な転写変化が観察された遺伝子の総数は492個であった。この492遺伝子はクロモソームDNA上の様々な部位にコードされていた。この492個の遺伝子をQTクラスタリング解析したところ、A-ファクター添加後2時間以降から転写量の増加が見られる遺伝子が288個抽出された。また、A-ファクター添加後、培養が進むにつれて転写量が減少していく遺伝子が65個抽出された。この65個の遺伝子は、二次代謝・形態分化の進行とともに転写が減少する遺伝子と考えられ、その3分の1強がパーミアゼやABCトランスポーターなど輸送関連のタンパク質をコードする遺伝子であった点は興味深い。

A-ファクターによって誘導される遺伝子 A-ファクターによって誘導される288個の遺伝子は、二次代謝・形態分化に重要であると考えられるため、個々の遺伝子をさらに吟味した。まず、周辺の遺伝子と同一転写単位をなすと予想される場合は、周辺遺伝子のデータを考慮した。さらに「活性化」の基準をより厳しくした。最終的には、周辺遺伝子のデータと整合性があり、基本的に2点で4倍以上あるいは3点で3倍以上の活性化が観察される遺伝子を「ほぼ確からしい」A-ファクター誘導性遺伝子として絞り込んだ。その結果、74の転写単位からなる151遺伝子が抽出されたが、その中には次に述べるような遺伝子が含まれていた。

- ・二次代謝関連：ストレプトマイシン生合成遺伝子クラスター、非リボソーム型ペプチド化合物の生合成遺伝子クラスター2個、lantibiotics生合成遺伝子クラスター、メラニン生合成酵素(チロシナーゼ)遺伝子オペロン、セスキテルペン合成酵素遺伝子。

- ・形態分化関連: ORF1590として知られる形態分化関連遺伝子、WhiBホモログ遺伝子、枯草菌の孢子形成に関与するSpo0Mのオルソログ。
- ・制御タンパク質: 2個のconservon、8個のDNA結合タンパク質遺伝子。
- ・酵素: 加水分解酵素や転移酵素などをコードする遺伝子8個。
- ・その他: ABCトランスポーターオペロン、Hsp90ファミリータンパク質遺伝子、機能不明のオペロン9個、機能不明の遺伝子23個。なお、機能不明の遺伝子のうち、*Streptomyces*属放線菌で高く保存されているものは8個。

74の転写単位のうち半数 (37個) のプロモーター上流付近にAdpAが結合する 上述した「ほぼ確からしい」A-ファクター誘導性遺伝子は74個の転写単位に属すると考えられるが、各プロモーター上流を含むDNA断片にAdpAが結合するかどうかを調べた。その結果、37個のプロモーター上流領域にAdpAが結合することが示唆された。より詳細な解析が必要であるが、予想通り、AdpAは数多くの遺伝子の転写を直接活性化していると思われる。

結論

本研究により、A-ファクターの添加によって引き起こされるゲノムワイドな遺伝子発現変化を初めて明らかにすることができた。また、A-ファクターによって誘導される151個の遺伝子を明らかにした。そこに含まれる多くの機能未知遺伝子は今後の重要な解析対象であり、新たな研究の発展が期待できる。

参考文献

1. Ohnishi Y., Kameyama S., Onaka H. and Horinouchi S. (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.* **34**, 102-111.
2. Ohnishi Y., Yamazaki H., Kato J., Tomono A. and Horinouchi S. (2005) AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 431-439.
3. Ohnishi Y., Ishikawa J., Hara H., Suzuki H., Ikenoya M., Ikeda H., Yamashita A., Hattori M. and Horinouchi S. (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **190**, 4050-4060.
4. Hara H., Ohnishi Y. and Horinouchi S. (2009) DNA microarray analysis of global gene regulation by A-factor in *Streptomyces griseus*. *Microbiology* (in press)
5. Kato J., Funa N., Watanabe H., Ohnishi Y. and Horinouchi S. (2007) Biosynthesis of gamma-butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 2378-2383.
6. Kato J., Miyahisa I., Mashiko M., Ohnishi Y. and Horinouchi S. (2004) A single target is sufficient to account for the biological effects of the A-factor receptor protein of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **186**, 2206-2211.