

新規シグナル物質による抗生物質生産制御メカニズムの解明

木谷 茂

(大阪大学 生物工学国際交流センター)

研究の目的

産業微生物である放線菌は、実用化抗生物質の7割以上を二次代謝産物として生産する。その放線菌の二次代謝は、低分子シグナル物質である放線菌ホルモンにより制御されており、 γ -ブチロラクトン型の放線菌ホルモンが6割の放線菌に存在すると推測されている。しかしながら、残り4割の放線菌では、二次代謝を制御する低分子シグナル物質がそもそも存在するのか？存在するならば、どのようなシグナル物質であるかは大きな謎であった。

γ -ブチロラクトン型ホルモンによる二次代謝誘導メカニズムにおいて、その受容認識機構は重要なステップである。放線菌ホルモンが転写制御因子の機能をもつホルモン受容体に結合すると、受容体のDNA結合能が変化し、標的遺伝子の発現が活性化される。この発現誘導シグナルが放線菌ホルモン制御系の下流へと伝達され、最終的に二次代謝産物の生産に至る。この一連の制御系において、ホルモン受容認識機構は放線菌に共通であることが示唆されているが、それ以降の二次代謝活性化メカニズムについては不明な点が多い。

本研究では、抗感染症治療薬の原料であるエバメクチンを生産する放線菌 *Streptomyces avermitilis* を対象とし、その放線菌ホルモン制御系を明らかにすることを目的とした。また、放線菌ホルモンの予備精製から、本菌の放線菌ホルモンは γ -ブチロラクトン型ではないと予想していたため、新規放線菌ホルモンの構造決定もめざした。

方法

放線菌ホルモンの化学構造を決定するために、*S. avermitilis* の培養液 2,000 リットルを調製した。放線菌ホルモンの精製には、吸着剤として HP-20、またシリカゲルクロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーを使用した。精製の指標として、大腸菌で発現させた AvaR1 タンパク質の DNA 結合能を用いた。化学構造を推定するために、MS 解析と ^1H -または ^{13}C -NMR 解析を行った。エバノライドの有機化学合成は、北里大学薬学部・長光亨教授に依頼した。*avaR3* 遺伝子破壊株の構築では、DNA 相同組換え法を利用した。

結果

1. エバメクチン生産を誘導する放線菌ホルモン (エバノライド) の発見と同定⁽¹⁾

ゲノム情報を検索したところ、*S. avermitilis* では3つの放線菌ホルモン受容体遺伝子 (*avaR1/avaR2/avaR3*) が密集して座乗していた。また、その隣接領域には、アシル CoA 酸化酵素 (Aco) 遺伝子があるが、エバメクチンの生合成機構には関与していない。放

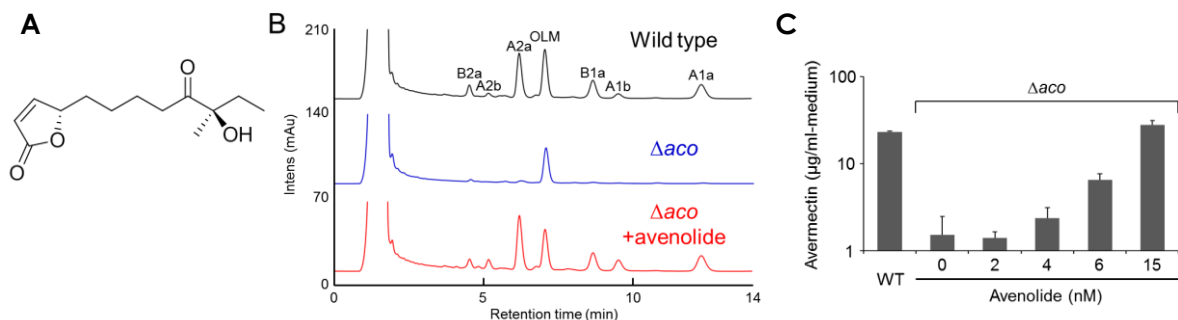
線菌の二次代謝関連遺伝子は、通常、遺伝子クラスターをなしていることが多い。そこで、Aco 変異株を解析すると、エバメクチン生産が低下し、AvaR1 の DNA 結合能を変化させる物質が著しく減少していた。γ-ブチロラクトン型ホルモンまたは Aco 変異株の培養抽出物を Aco 破壊株に加えても、なんら変化はないが、野生型株の培養抽出物を添加するとエバメクチンの生産は回復した。したがって、*S. avermitilis* にはエバメクチンの生産を誘導する放線菌ホルモンがあり、その構造はγ-ブチロラクトン型ホルモンとは異なることが示唆された。

次に、2,000 リットル培養液より AvaR1 の DNA 結合能に影響を与える物質を精製し、種々の分析から、その化学構造を同定した (図 1 A)。その推定構造をもとに有機合成した物質を Aco 破壊株に加えたところ、エバメクチン生産の回復が観察されたため (図 1 B)、この物質が放線菌ホルモンであることを確信し、エバノライドと命名した。エバノライドはブテノライド骨格を有し、その側鎖の配位と構造はγ-ブチロラクトン型ホルモンには見られないものであった。また、エバノライドはエバメクチン生産を 4 nM の最小有効濃度で誘導した (図 1 C)。

2. 放線菌ホルモン受容体様タンパク質 AvaR3 による抗生物質制御機構の解明⁽²⁾

AvaR3 は放線菌ホルモン受容体と相同性を示すものの、DNA 結合ドメインとホルモン認識ドメインの間に、他の受容体には見られない機能未知ドメインを有していた。したがって、AvaR3 がどのように二次代謝に関わるかに興味を持たれた。

そこで、AvaR3 変異株を解析したところ、エバメクチンの生産が消失するとともに、抗生物質フィリピンの早期過剰生産が観察された。次に、各生合成遺伝子の転写パターンを調べたところ、エバメクチン生合成遺伝子の転写が変化する一方、フィリピン生合成遺伝子の転写プロファイルには変化が確認できなかった。したがって、AvaR3 はエバメクチン生合成遺伝子の転写を調節して、エバメクチンの生産を制御し、またフィリピンの生産も間接的に制御することが明らかになった。また、固体培養時の形態分化と液体培養時におけるペレット形成にも AvaR3 が関与していることがわかった。



(図 1 A) 新規放線菌ホルモン、エバノライドの化学構造

(図 1 B) エバノライドによるエバメクチン生産の回復

(図 1 C) エバノライドのエバメクチン生産に対する最小有効濃度

結論

放線菌ホルモンは、抗生物質生産を考える上で重要なシグナル物質である。*S. avermitilis* の放線菌ホルモンを同定した結果、放線菌の6割が有すると考えられる γ -ブチロラクトン型ホルモンではなく、新たなタイプの放線菌ホルモン（エバノライド）であった。エバノライド生合成遺伝子の分布を調査したところ、複数の放線菌にその相同遺伝子が認められることから、エバノライド型放線菌ホルモンが今まで謎であった放線菌ホルモンである可能性が高い。エバノライドの発見は、エバメクチンの生産性改良だけではなく、 γ -ブチロラクトン型ホルモンの情報と合わせて抗生物質の生産制御メカニズムの理解を急速に進展させるものである。一方、受容体様タンパク質 AvaR3 は抗生物質の生産制御に加えて、形態分化および菌糸の凝集をコントロールするグローバルな制御因子として機能していた。放線菌の菌糸凝集に関する遺伝子情報は少なく、AvaR3の機能をさらに解明することにより、新たな知見が得られると予想される。今後、本研究成果をもとに、抗生物質の選択的生産、または医薬品開発へと繋がる化合物の発見がより一層加速することが期待される。

文献

- 1) Kitani, S., Miyamoto, K. T., Takamatsu, S., Herawati, E., Iguchi, H., Nishitomi, K., Uchida, M., Nagamitsu, T., Omura, S., Ikeda, H., and Nihira, T. (2011) Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 16410-16415
- 2) Miyamoto, K. T., Kitani, S., Komatsu, M., Ikeda, H., and Nihira, T. (2011) The autoregulator receptor homologue AvaR3 plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *Streptomyces avermitilis*. *Microbiology* **157**: 2266-2275.