

# *Streptomyces* 属放線菌の新規微生物ホルモンの機能解析

高田 健太郎

東京大学大学院 農学生命科学研究科

## 研究の目的

Surugamides A-E ( SA-SE , 図 1 ) は、海洋放線菌 *Streptomyces* sp. JAMM992 から単離された環状オクタペプチドである。我々が持つ放線菌ライブラリを LC-MS により分析した結果、異なる海域の底泥から分離された複数の *Streptomyces* 属放線菌、および同属の陸上放線菌が SA を生産することを確認した。さらに我々の報告の後、地理的に離れ、異なる環境から分離された *Streptomyces* 属放線菌が、共通して SA を生産することが明らかになってきた。このことから、我々は SA が生産菌において重要な生理機能を持つと推測し、機能解析に着手した。SA の生理機能を解析するため、JAMM992 株の SA 非生産性変異株を作製し、野生株と変異株の表現型を比較することを企図した。変異株を作製するにあたり、SA-SE の生合成遺伝子を同定した結果、4 つの連続する非リボソームペプチド合成酵素 ( NRPS ) 遺伝子が、2 種の全く異なるペプチドを生産することが明らかになった。続いて大腸菌接合によるインフレーション欠損によって surugamide 非生産株を作製したところ、SA が気中菌糸形成を誘導する機能を持つことを明らかにした。このような背景のもと、本研究ではスルガマイドによる気中菌糸形成の誘導メカニズムを解明することを目的とした。

## 方法

### 1. スルガマイド関連ペプチドの非生産株の作製

スルガマイドは、同一の遺伝子クラスター上にコードされている非リボソーム性ペプチド合成酵素 ( NRPS ) SurA-D のうち、SurA と SurD によって生合成されている。一方で、SurB および SurC から生合成されるペプチド ( surugamide F ) の単離にも成功しており、そのアミノ酸配列は大きく異なる<sup>1)</sup>。surB の破壊株 (  $\Delta$ surB ) とともに、二重破壊株 (  $\Delta$ surA  $\Delta$ surB ) を作製することで、スルガマイド関連ペプチドの気中菌糸形成への関与を検討した。

### 2. surugamide 類の標的タンパク質 ( SJP ) の同定

JAMM992 株の培養上清から活性試験を指標に、SA によって活性が上昇する酵素を単離した。得られた酵素の N 末端配列をエドマン分解で解析し、ゲノム情報から酵素の全アミノ酸配列を決定した。さらに標的タンパク質 SJP のリコンビナントタンパク質を大腸菌作製した。発現後、リコンビナントタンパク質は His タグ精製によりおこなった。また、SJP の欠損株を大腸菌接合によるインフレーション欠損によって作製した。

### 3. スルガマイド生産放線菌、非生産放線菌における標的タンパク質の配列比較

スルガマイドを生産する *Streptomyces* 属放線菌の SJP と非生産菌の SJP ホモログへの SA による活性の差異を調べた。また、複数の SA 生産菌と非生産菌のゲノム解析をおこない、アミノ酸配列を比較した。

## 結果

ゲノム解析で得られた生合成遺伝子の配列情報をもとに、JAMM992株の *surA* 遺伝子を破壊し、SA-SEを生産しない変異株  $\Delta surA$  を作製したところ、 $\Delta surA$  は気中菌糸の形成速度が野生株と比べて顕著に遅いことが明らかとなった。また、SAを添加した培地上で  $\Delta surA$  を培養したところ、SAの濃度依存的に気中菌糸の形成速度が回復したことから、SAが気中菌糸の形成を促進することが明らかとなった。同一の生合成遺伝子クラスターによりSAとSFの両方が生合成されることを考慮すると、SFもSAと同様に、何らかの生理機能を持つ可能性があった。そこで  $\Delta surA$  に加え、 $\Delta surB$ 、および二重欠損株  $\Delta surA surB$  を用いて、SFを含めた surugamide 類の包括的な生理機能を解析した。その結果、 $\Delta surB$  は  $\Delta surA$  と同様に気中菌糸の形成が著しく遅れ、その遅延はSFによって回復することが明らかとなった。同様に、二重欠損株の気中菌糸の形成はSAによって部分的に回復し、SAおよびSFの同時投与によってほぼ野生株と同様の菌糸形成になることが明らかとなった。(Figure 1) これらの結果から、SAおよびSFそれぞれが放線菌の菌糸形成に関与するシグナル分子であることが示唆された。

続いてSAの菌糸形成に関わる作用機構の解明に着手した。SAがカテプシンBの阻害活性を示すことから、我々は、まずSAが生産菌自身のプロテアーゼに作用して気中菌糸形成を促進する可能性を考慮した。JAMM992株の培養上清から調製した粗酵素を用いて種々の酵素試験をおこなった結果、SAによって、粗酵素のプロテアーゼ活性が上昇することが明らかとなった。そこでJAMM992株の培養上清から調製した粗酵素を、ゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーで精製し、活性を示すプロテアーゼを得た。プロテインシーケンサーを用いて決定したSJPのN末端配列を、JAMM992株のゲノム配列に対して検索し、SJPをコードする全長960 bpの遺伝子 *sja* を同定した。*sja* 遺伝子のうち成熟SJPに相当する配列を大腸菌に導入し、6×Hisタグを付加した組み換えSJP (rSJP) を得たところ、SAで活性化されたことより、菌糸形成に関与するプロテアーゼSJPがSAによって活性化されることで、菌糸形成を促進していることが明らかとなった。

このように低分子化合物がプロテアーゼの活性化を通して菌糸形成を促進する、という報告例がこれまでになかったことから、SAによる活性化が *Streptomyces* の SJP ホモログに普遍的に生じているかどうかを調べることにした。surugamide を生産および非生産の *Streptomyces* をそれぞれ数株準備し、培養上清から粗酵素を調製し活性化試験をおこなった。その結果、生産株の SJP は活性化するものの、非生産株の酵素は活性化しないことが明らかとなった。(Figure 2) そこで、各株に対してゲノム解析をおこなうことで、SJP ホモログ間におけるアミノ酸配列の比較をおこなった。

その結果、生産株と非生産株では相同性が高いものの、明らかにクラスターが異なることが分かった。その詳細な活性化の機構は明らかになっておらず、SJP-SA 複合体の結晶構造解析による、詳細な機構の解明を試みている。

## 結論

分泌型プロテアーゼは、基底菌糸が気中菌糸へと分化する際に基底菌糸の分解に関与すると考えられている。したがって、我々は、SA が基底菌糸の分解に関与する SJP を活性化することで、気中菌糸形成を促進すると推定している。分泌型プロテアーゼに作用し形態分化を制御するシグナル分子として、leupeptin と SSI ( *Streptomyces subtilisin inhibitor* ) 様タンパク質が知られているが、いずれもプロテアーゼを阻害し形態分化を制御する。また、気中菌糸形成を促進する低分子化合物として hormaomycin と pamamycin が知られているが、これらの化合物の作用機構に関する知見は少ない。このように、SA が示す気中菌糸形成の促進における作用機構は、既知のシグナル分子とは異なっていることから、SA は新たな機構で形態分化を制御するシグナル分子であると考えている

## 文献

1. Ninomiya A, Katsuyama Y, Kuranaga T, Miyazaki M, Nogi Y, Okada S, Wakimoto T, Ohnishi Y, Matsunaga S\*, Takada K\* Biosynthetic Gene Cluster for Surugamide A Encompasses an Unrelated Decapeptide, Surugamide F. *ChemBiochem* **17**, 1709-1712. (2016)

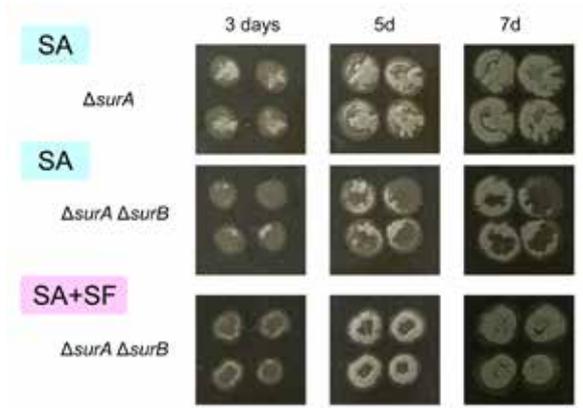


Figure 1. Recovery of sporulation in the mutants. (upper) addition of SA in *DsurA* (middle) addition of SA in *DsurA DsurB* (lower) addition of SA and SF in *DsurA DsurB*

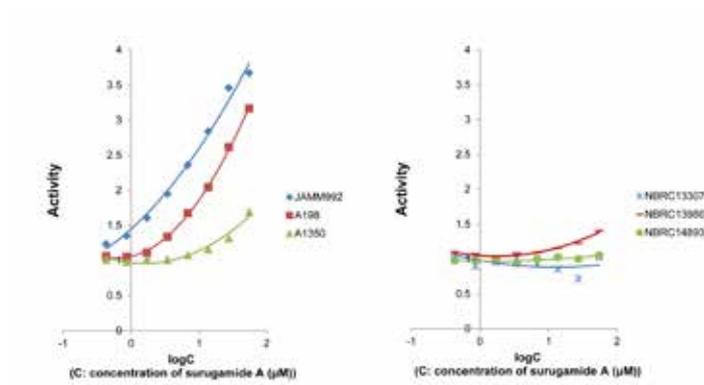


Figure 2. Enzyme activity of proteases after the treatment of SA. (left) proteases from *Streptomyces* producing surugamides (right) proteases from *Streptomyces* not producing surugamides