

放線菌の抗生物質生産を司るマスタースイッチ

——特異的転写制御モデルと物質生産系への応用——

市瀬浩志

多段階酵素反応を経る天然有機化合物の生合成では、生合成酵素遺伝子群の協調的な発現制御が必要だが、放線菌抗生物質生合成遺伝子クラスター中に続々と経路特異的転写活性化遺伝子が見つかった。OmpR型の生合成遺伝子の特異的制御機構の存在が示唆され、それに立脚した新たな人為的有用物質生産系が構築されている。

Key words 【放線菌ポリケタイド生合成遺伝子】【転写活性化因子】
【OmpR ファミリー】【有用物質生産】

はじめに 土壌細菌である放線菌は通常、その特定の生育環境下で獲得した特異な2次代謝能力を有しており、この2次代謝の多様性こそが人類に抗生物質供給という福音を与えた原因である。放線菌は2次代謝産物生産以外にもさまざまな特徴をもつ。

放線菌類(Actinomycetes)には、*Streptomyces* 属などの主要属のほかに稀少放線菌属があり、菌学的に興味深い¹⁾ ほか、遺伝子構造も多様であることがわかってきた。放線菌には巨大線状プラスミドが存在し、また染色体自身が線状でしかも両末端の欠失や環状化も生じる動的な構造をもつことが示された²⁾。さらに放線菌類では初めて、結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)のゲノムDNAの全配列が昨年決定され³⁾、*Streptomyces* 属でも初のゲノムプロジェクトが進行中(次節)である。

放線菌は、菌糸伸長から孢子形成に至る複雑な形態分化を示し、その現象は2次代謝産物生産とも連動する。これらの調節機構としては、微生物ホルモン様の

化学調節物質を介したシグナル伝達系の解明が *Streptomyces griseus* などを材料として進んでいる⁴⁾(本号、大西らの総説参照)。

抗生物質についてはその生合成に関与する遺伝子の研究が急速に進んだ。なかでもポリケタイド(PK)系化合物^{*1}では、PK合成酵素(PKS)遺伝子のクローニングと初のハイブリッド抗生物質生産の報告⁵⁾を皮切りに、最近では“生合成工学”を指向した研究が展開されている^{6,7)}。

一方、多段階酵素反応を必要とする天然有機化合物の生合成では、生合成酵素遺伝子群の協調的な発現制御が必要と考えられるが、近年これに関与する制御遺伝子が生合成遺伝子クラスター中に続々と発見され、生合成遺伝子の特異的な転写活性化を説明するモデルが提出された⁸⁾。本稿ではこの研究発展の端緒になった *Streptomyces coelicolor* の話題から入り、筆者らが研究しているPK化合物の生合成を例に経路特異的^{*2}転写活性化機構を解説し、その物質生産系への応用例にふ

Koji Ichinose, 東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室(〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1) [Department of Natural Product Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan] E-mail: ichinose@mol.f.u-tokyo.ac.jp <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~tennen/head.htm>
Pathway-specific Activator for Antibiotic Biosynthesis in Streptomyces spp.: A Model for Transcriptional Control and Applications to Metabolic Engineering

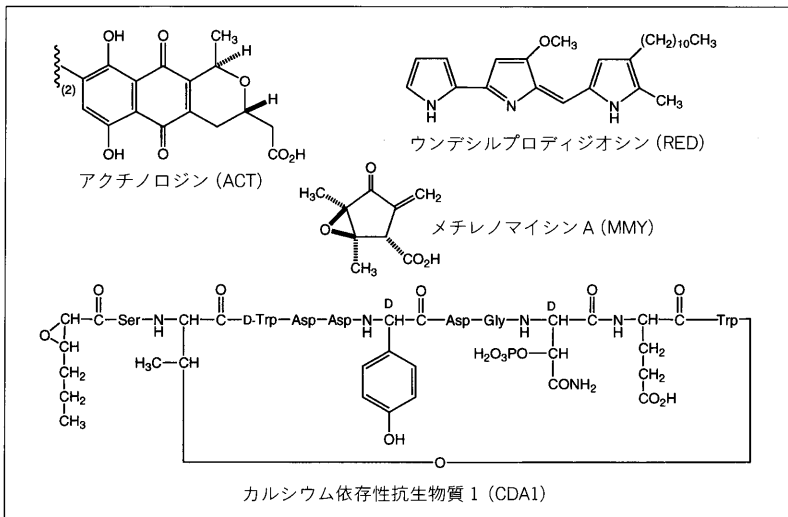


図 1 *Streptomyces coelicolor* が生産する 4 種類の異なる骨格をもつ抗生物質
CDA は単離された類縁体の一つを示し、D 型立体配置をとるアミノ酸残基は個々に記号を付記した。

れる。

I. *S. coelicolor* A3(2) をめぐる話題

放線菌の実質的な遺伝学的研究は、英国の D. A. Hopwood が *S. coelicolor* の遺伝的な組換え研究を 1950 年代半ばに開始したことに始まる。Hopwood の言葉によれば「医薬品資源として重要な位置を占めていたものの、遺伝学の研究対象としての放線菌は当時まったく未知の細菌であった」ということである。*S. coelicolor* が生産する抗生物質としては 4 種類が知られている (図 1)。なかでもアクチノロジン (ACT) は、共役ベンゾキノン 2 量体という特異な部分構造をもつため特徴的な色調を示し、ACT 生産性の有無が視覚的に容易に検知できたことが、抗生物質合成をはじめとする放線菌の遺伝子レベルでの研究発展の鍵となった。Hopwood ら英国 John Innes 研究所のグループを中心に編集された、*S. coelicolor* を主とした放線菌遺伝子操作の実験書⁹⁾ は世界中で汎用され、放線菌の遺伝子工学系も確立してきた¹⁰⁾。

*1 脂肪酸合成に代表される酢酸-マロン酸経路と同様に低級脂肪酸が縮合して生成する一連の 2 次代謝産物をさし、微生物や植物から多く生産される。抗生物質をはじめ放線菌由来の多くの生理活性物質 (テトラサイクリン、エリスロマイシン、エバメクシン、FK-506 など) が含まれる。

*2 本稿では特定の 2 次代謝経路で機能することをさす。

S. coelicolor を使った最近の研究としては、① 整理化されたゲノムコスミドライブラリー¹¹⁾ を使ったゲノムシークエンスが進行中 (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor/) であること、② 胞子形成を制御する遺伝子座である *whi* 遺伝子群¹²⁾ について、 σ 因子 (後述) を介する転写制御の存在が示されたこと^{13,14)}、③ 先にふれた *S. griseus* でのシグナル伝達系に類するものが *S. coelicolor* にも存在すること¹⁵⁾ (本号、大西らの総説参照) などがある。ACT 以外の抗生物質であるウンデシルプロディ

ジオシン (RED)¹⁶⁾、カルシウム依存性抗生物質 (CDA)¹⁷⁾、メチレノマイシン A (MMY)¹⁸⁾ のすべてについて生合成遺伝子の同定がなされた。また CDA¹⁹⁾ と孢子色素²⁰⁾ については未確定だった化学構造が決定された。

II. 放線菌 PK 生合成の概観：反応・酵素・遺伝子

1. 生合成の諸段階

PK 化合物基本骨格の生合成が脂肪酸合成と類似していることが遺伝子レベルの研究でも確認された。PK 生合成を触媒する PKS 遺伝子の構造も脂肪酸合成遺伝子にならって、I 型 (多機能型酵素：複数の機能ドメインが 1 本のポリペプチド鎖に連続して存在) と II 型 (サブユニット型：個々の機能を有する酵素サブユニットの複合体) に分けられている。これまでクローン化された放線菌 PKS 遺伝子の例⁶⁾ では、I 型はマクロライド化合物を、II 型は芳香族化合物を与えることがわかっている (図 2 a)。PKS の触媒機構の詳細⁷⁾ は省略するが、PK 化合物の構造多様性の源は、PKS の

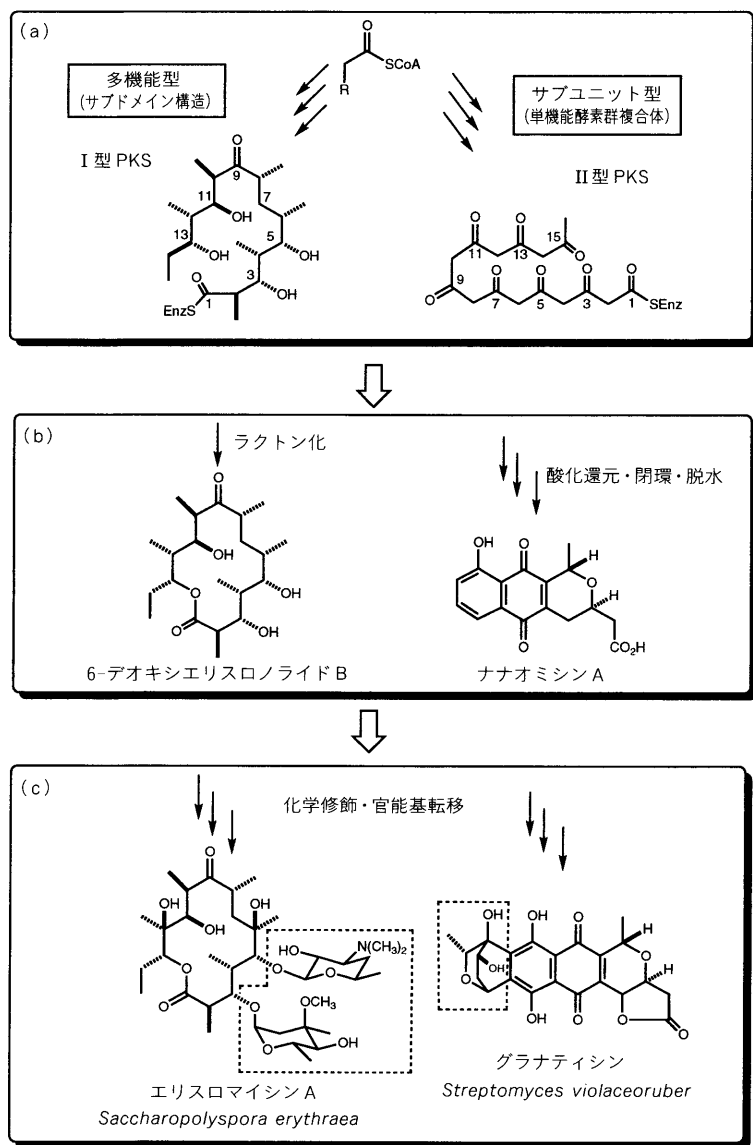


図 2 放線菌ポリケタイド化合物の段階的生合成の例

(a) 既知のポリケタイド合成酵素 (PKS) のうち、I 型 (R: メチル基) では側鎖をもった炭素鎖が生成し、II 型 (R: 水素) では直鎖状のポリケタイド鎖を生成する。生成物の主鎖上で縮合原料のアシル CoA のケトン基に由来する炭素に番号を付した。(b) PKS 反応以後の化学修飾 (テールリング) 過程 (ラクトン化・酸化還元・閉環・脱水) で非糖部分 (アグリコン) が生成する。(c) さらなる化学修飾と官能基 (例ではデオキシ糖) 転移が生じ、生成物 (配糖体) となる。糖転移に由来する部分を点線枠で示した。

触媒機能の選択の幅、具体的には、縮合出発単位 (スターター) の選択と 5 つの基本触媒反応 (アシル基転移・縮合・ケト還元・脱水・エノイル還元) の回数や有無の組合せにある。

PKS による基本炭素骨格の形成後、生産する最終生成物に対応した特異な化学修飾 (テールリング) 経路 (図 2 b)、さらには別の主代謝系由来の官能基の転移 (図 2 c) を経て複雑な PK 化合物は生成される。

2. 放線菌 PK 生合成遺伝子クラスター

微生物 2 次代謝に特異的にかかわる遺伝子群は通常、生産菌の染色体上でクラスターを形成している。放線菌抗生物質では、生合成酵素をコードする構造遺伝子、自己耐性遺伝子、構造遺伝子の機能制御を行なう制御遺伝子などがクラスター中で見つかったりする。

ACT 生合成遺伝子クラスター (act クラスター) のほか、ACT と同じベンゾイソクロマンキノン (BIQ) 系骨格を有する抗生物質の生合成遺伝子クラスターのいくつかがすでにクローニングされている²¹⁾。ACT とグラナティシン (GRA, 構造式は図 2 c 参照) は基本骨格が類似 (双方とも炭素 16 個からなる直鎖状 PK に由来する BIQ 骨格をもつ) し、生産菌も分類学上で近いこと²²⁾ から両者の生合成遺伝子クラスター全体の構造に高い相同性が期待された。両者を比較する (図 3) と、確かに両クラ

スターで相同性の高い遺伝子が存在し²³⁾ 共通の機能をもつことが推定されたが、遺伝子構造全体をみると II 型最小 PKS*³, KR のひとつ, ARO の、クラスター中の総体的配置は類似しているものの、そのほかの遺

伝子は必ずしも機能に対応した部分クラスターを形成していない。

III. 抗生物質生成遺伝子の転写活性化因子

1. 抗生物質生産制御にかかわる要因

形態分化のほかにも抗生物質(2次代謝産物)生産に及ぼす要因は多様に存在する¹⁵⁾。遺伝子転写一般に直接かかわる因子としては、細菌型RNAポリメラーゼのプロモーター配列の認識に関与する σ 因子があげられる。*S. coelicolor*では少なくとも8種類の σ 因子が見いだされ、抗生物質生成の経路特異的転写因子(後述)の転写を制御するものもあることから¹⁵⁾、 σ 因子の多様性²⁴⁾が抗生物質生産に関与することは明らかである。*Streptomyces*属のプロモーター配列についても大腸菌 σ^{70} 型のものと同様のもののほか、これとは異なるプロモーターも実験的に多数見いだされており、放線菌 σ 因子の多様性を反映したものと思われる²⁵⁾。

2. 放線菌抗生物質生産制御蛋白質(SARP)

A. 多機能型と経路特異型

放線菌によっては基本構造の異なる抗生物質を同時に生産するので、複数の2次代謝系を総合的に制御する機構が必要である。*S. coelicolor* A3(2)は基本骨格が異なる4種の抗生物質(図1)を生産するが、このうちACT・RED両生成の制御と形態分化調節の双方

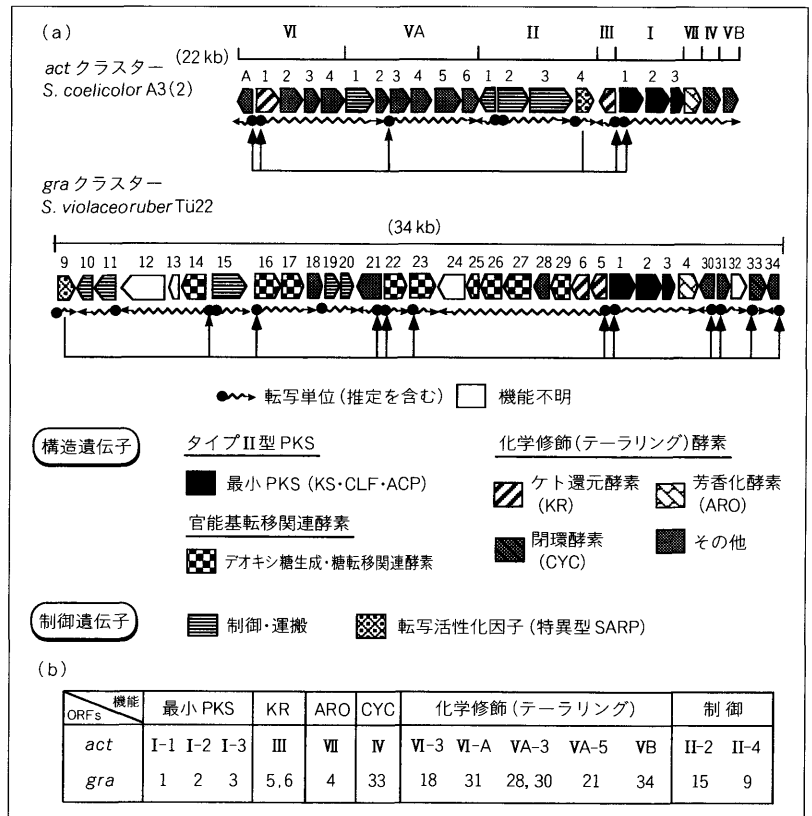


図3 放線菌芳香族ポリケタイド抗生物質生成遺伝子クラスターの構造と転写制御 (a) ベンゾイソクロマンキノン (BIQ) 系化合物のアクチノロジン (*act* クラスター) とグラナティシン (*gra* クラスター) のものを示す。 *act* クラスターでは、遺伝子領域を *act* I~*act* VII までに分け、各領域に複数の読み取り枠 (ORF) がある場合には独立した番号を付している。 II型最小 PKS の構成単位は、KS (β -ケトアシル合成酵素)・CLF (鎖長決定因子)・ACP (アシルキャリアー蛋白質) である。転写活性化因子 (特異型 SARP) が制御すると考えられる構造遺伝子に特異型 SARP から矢印を付した (特異型 SARP の詳細は本文の III 節 3 項を参照)。 (b) 両遺伝子クラスターの遺伝子で有意な相同性のあるものの機能別比較。 *gra* クラスター中 15 個の ORF の相同遺伝子が *act* クラスターに存在している。

を行なうセリン/スレオニンキナーゼの存在が明らかになった⁴⁾。また、原核微生物に特徴的な二成分制御系の応答蛋白質による抗生物質生産制御の存在⁴⁾も示されている。

以上の制御因子は2次代謝生産と生産菌の生理を全体的に制御する“多機能型因子”であり、抗生物質生産開始に関していえば“グローバルなスイッチ”⁴⁾である。一方、ある抗生物質生成経路に特異的な制御因子をコードする遺伝子は、それぞれ生成遺伝子クラ

*3 サブユニット型 (II型) PKS でポリケタイド鎖を形成するのに最小限必要な蛋白質群 (KS, CLF, ACP) をさす。生成したポリケタイド鎖から生成物への変換には、さらにケト還元酵素 (KR)、芳香化酵素 (ARO)、閉環酵素 (CYC) などの触媒が必要である。

スター内に見いだされている。抗生物質生産を制御する蛋白質⁹⁾ (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein; SARP)として機能することからみれば両者は同類であるが、経路特異的であることから本稿では“特異型 SARP”として以下の議論を進める。

B. OmpR ファミリーとの類似性

PK 生合成に関与する特異型 SARP 遺伝子は、*act* クラスタ中に見いだされた *act* II-ORF⁴²⁶⁾ を皮切りに、ほかの芳香族系抗生物質生合成 (II型 PKS が関与) 遺伝子クラスター内で続々と類縁体が見いだされている^{6,21)}。マクロライド系 PK の生合成遺伝子クラスターの中にも制御遺伝子は見つがっているが³²⁷⁻³⁰⁾、II型ほどの互いの相同性は見られない。PK 以外の抗生物質では、*S. coelicolor* の RED 生産に関与する *redD*³¹⁾ および *redZ*³²⁾ と、*S. griseus* のストレプトマイシン生産に関与する *strR*³³⁾ (本号、大西らの総説参照) がそれぞれの生合成遺伝子クラスター内で見いだされている。

特異型 SARP の転写活性化の実験的証明が進む¹⁵⁾ 一方

で、そのアミノ酸配列の相同性から転写活性化を説明できるモデルが提唱された⁸⁾。転写活性化因子の多くが DNA 結合蛋白であり、SARP 配列中にも特異的な DNA 認識部位があることが予測される。これらの SARP 配列には、大腸菌 OmpR に代表される細菌の二成分制御系の転写因子中に存在する DNA 認識構造と類似した部分が見つかった。OmpR の DNA 認識にかかわる C 末端側の X 線結晶構造解析³⁴⁻³⁶⁾ によると、リ

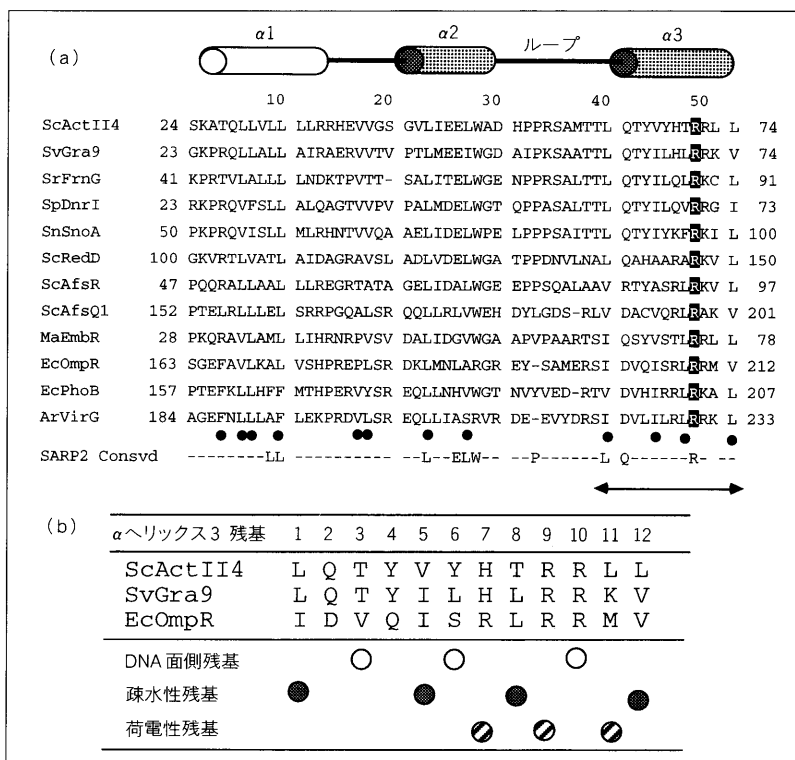


図 4 OmpR 型転写活性化因子中に存在する DNA 認識部位のアミノ酸配列比較

(a) これまで放線菌では N 末端、それ以外では C 末端に見いだされている。3つの αヘリックスのうち、2番目と3番目をつなぐ長いループ構造を特徴とする。既知の OmpR ファミリー蛋白質中で保存されている疎水性残基位置をドット表示し、その下に特異的 SARP (ScActII~ScRedD) での保存残基を示した。白抜き表示のアルギニンは既知のすべての OmpR ファミリーで保存されている。(b) DNA 認識にかかわると考えられる 3番目の αヘリックス (両矢印) について、放線菌特異的 SARP のうちアクチノロンおよびグラナティシン生合成に関与するものと OmpR を比較すると、ヘリックスの片方の側面に疎水性残基 (1, 5, 8, 12 番目) が配置して蛋白質側に向き、反対の側面の残基 (3, 6, 10 番目) が特異的な DNA 認識にかかわると考えられる。荷電性アミノ酸残基 (7, 9, 11 番目) が負に荷電した DNA 鎖骨格と相互作用すると推定される。比較配列: ScActII4 (*S. coelicolor*, *act* クラスタ *actII* ORF4 産物), SvGra9 (*S. violaceoruber*, *gra* クラスタ ORF9 産物), SrFrnG (*S. roseofulvus*, *frn* クラスタ FrnG), SpDnrI (*S. peucetius*, *dnr* クラスタ DnrI), SnoA (*S. nogalater*, *sno* クラスタ SnoA), ScAfsR (*S. coelicolor*, AfsR), ScAfsQ1 (*S. coelicolor*, AfsQ1), MaEmbR (*Mycobacterium avium*, EmbR), EcOmpR (*E. coli*, OmpR), EcPhoB (*E. coli*, PhoB), ArVirG (*Agrobacterium rhizogenes* pRi4, VirG)。各配列の先頭と末尾の数字は、アミノ酸残基番号を示す。

プレッサーなどの DNA 結合蛋白質に見られるヘリックス-ターン-ヘリックス構造 (HTH 構造) とは異なる、約 11 アミノ酸残基のループを挟むヘリックス構造 (HLH 構造) が発見された*4。

これと相同な配列が特異型 SARP の中では N 末端近傍に見いだされ (図 4 a), さらに特異型 SARP 中の HLH を構成する αヘリックス 3 の 12 アミノ酸残基については、疎水性および荷電性の残基の相対的位置が

被制御遺伝子	反復配列3	スペース (塩基対数)	反復配列2	スペース (塩基対数)	反復配列1	プロモーター配列(-10) からの距離 (塩基対数)
(a) <i>act</i> 遺伝子						
<i>actI</i> ORF1	TCGAGGG	15	TCGAGCC	4	TCGAGCC	8
<i>actIII</i>	TCCAGCG	15	TCGACCG	4	TCGAGCC	8
<i>actVI</i> ORF1	TCCAGCG	4	TCGAGCC	4	TCGAGTG	8
<i>actVI</i> ORFA	TCGAAGT	4	TCGAGGG	4	TCGAGGC	8
<i>actVA</i> ORF3	TCGACTC	4	TCGAGCG	4	TCGACGC	8
(b) <i>gra</i> 遺伝子						
<i>gra</i> ORF14	TCCAGC	5	TCCAGG	5	TCGACC	10
<i>gra</i> ORF16					TCGAGC	21
<i>gra</i> ORF21			TCCAGG	16	TCCAGC	10
<i>gra</i> ORF22			TCGAGC	5	TACAGG	10
<i>gra</i> ORF23			TCCAGC	5	TCTAGT	21
<i>gra</i> ORF 5	TCCATC	5	TCCAGC	5	TCGAGG	10
<i>gra</i> ORF 1					TCGAGC	10
<i>gra</i> ORF30			TCGAAG	5	TCCACT	21
<i>gra</i> ORF31	TCAAGC	5	TGGAGG	5	TCGAGC	10
<i>gra</i> ORF33			TCGAGC	5	TCCAGC	10
<i>gra</i> ORF34	TCCAGT	5	TCCAGG	5	TCCAGA	10
(c) <i>vir</i> 遺伝子						
<i>virA</i>			TGAAAC	16	TGTGAT	33
<i>virC</i>	TGCAAC	5	TATAAC	5	TGAAAT	10
<i>virG</i>	TGTAGC	16	TGTCAT	5	TGAAAC	10
<i>virE</i>					TGAAAC	33

図 5 OmpR 型転写活性化因子が制御する遺伝子群のプロモーター領域に存在する直接反復配列

(a) *S. coelicolor* A3(2) アクチノロジン合成 (*act*) 遺伝子, (b) *S. violaceoruber* Tü22 グラナティシン生成 (*gra*) 遺伝子, (c) *Agrobacterium rhizogenes* pRi4 のウィルレンス (*vir*) 遺伝子。プロモーター領域 (-10) から一定の距離に直接反復 (DR) 配列 (6 または 7 塩基対) が存在し、それらのスペースは DR 配列の先頭塩基から次の DR 配列のそれまで 11 または 22bp, すなわち B 型 DNA のらせんピッチ数で 1 または 2 個分に相当している。

OmpR 型のそれと完全に一致した (図 4 b)。

以上の結果から、放線菌の抗生物質生合成遺伝子の特異的転写活性化の機構として、OmpR 型の DNA 認識機構が存在することが強く示唆された。

3. 抗生物質生合成遺伝子の転写活性化モデル

OmpR 型転写活性化因子の標的 DNA 側については、実験的に示された蛋白質結合領域の遺伝子配列と既知の OmpR 型転写因子の標的遺伝子のプロモーター領域の配列解析により、RNA ポリメラーゼとの協調的な複合体形成による転写活性化のモデル³⁸⁾が提唱された。このモデルによれば、標的 DNA のプロモーター領域に 6 塩基からなる直接反復配列 (DR 配列) が存在し、それらのスペースは DR 配列の先頭塩基から次の DR 配列のそれまで 11 または 22bp, すなわち B 型 DNA のらせんピッチ数で 1 または 2 個分に相当する。筆者らが

研究している^{21,23)} BIQ 生合成遺伝子クラスターに含まれる構造遺伝子のプロモーター領域の配列を解析したところ、プロモーターから一定の距離に DR 配列 (6 または 7 塩基) が存在し、しかもそれらのスペースも 11 または 22bp であった (図 5)。また、ほかの放線菌の例では *Streptomyces pucetius* 中のダウノルビシン生合成 (*dnr*) クラスターでも 7 塩基 (5'-TCGAGCG/C-3')⁸⁾, *S. coelicolor* の RED 生合成クラスターでも 7 塩基 (5'-GTCAGCG-3') (M. J. Bibb: 私信) の DR 配列が見いだされている。*dnr* クラスターの特異型 SARP である DnrI については、実際に DNA フットプリント法で、5'-TCGAG-3' が標的 DNA 配列として同定されている³⁹⁾。

以上の結果と前節の蛋白質側の知見を総合すると、特異型 SARP による放線菌抗生物質生合成遺伝子の特異的転写活性化の機構は OmpR 型のモデル³⁸⁾でうまく説明できる (図 6)。放線菌の抗生物質生合成遺伝子クラスター内の各遺伝子は転写方向がさまざまで、転写単位もオペロンを形成するものとししないものが混在しているが、それらを特異的 SARP が見事に制御している (図 3 矢印参照) “マスタースイッチ”であることがわかる。

IV. SARP 遺伝子を利用した物質生産系の構築

1. 生産システムの概要

最後に特異的 SARP 遺伝子の物質生産系への応用例を紹介する。放線菌遺伝子を発現させる場合はその特徴と多様性を考慮した工夫が必要である。放線菌遺伝

*4 実験的に示された OmpR (239 アミノ酸) の C 末端側に存在する DNA 結合領域と相同な構造が、細菌由来の 50 種類以上の二成分制御系の転写因子に見つかっており、OmpR ファミリーとよばれる (文献 36, 37 参照)。本稿では、OmpR 中に見いだされたこの HLH 構造を特徴とする DNA 結合領域をもつ転写因子を “OmpR 型” として取り扱う。

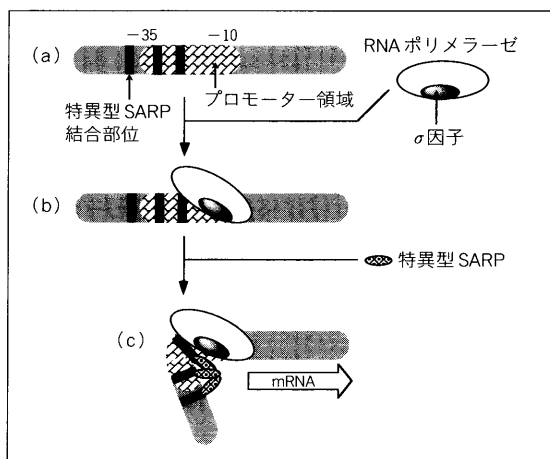


図 6 特異型 SARP による放線菌抗生物質生成遺伝子の特異的転写開始のモデル

(a) 鋳型 DNA のプロモーター配列から上流にかけて存在する反復配列 (特異型 SARP 結合部位)。 (b) RNA ポリメラーゼホロ酵素がプロモーター配列を認識して鋳型 DNA と複合体を形成するとき。 (c) 複数の特異型 SARP が DNA 鎖の反対側から SARP 結合部位を介して会合し、折れ曲がり DNA を形成することにより特異的な転写開始を促す。

子は G/C 含量が著しく高くコドンの使用頻度に偏りがある⁴⁰⁾。うえ、翻訳開始コドンとして ATG のほかに GTG (通常はバリンをコード) を頻用する。たとえば放線菌遺伝子の⁴¹⁾大腸菌での効率的発現を試みる場合に対象遺伝子の一部 (とくに N 末端近傍) を改変することが行なわれるが、多数の生合成酵素の同時発現が必要な 2 次代謝産物生産を考えると、この方法は実用的ではない。放線菌を発現宿主として使用すればよいわけだが、放線菌は遺伝的な多様性から遺伝子工学系が適用できない場合があり、遺伝子の取得はできても遺伝子破壊や形質転換による機能解析が困難である状況が多々ある。現在、発現宿主として最も使われるのが *S. coelicolor* とその近縁の *Streptomyces lividans* であり、これらを用いたベクターが多く開発⁹⁾されている。

S. coelicolor の *act* クラスター全体を、遺伝子乗換えを利用した遺伝子交換 (gene replacement)⁴¹⁾ によって欠損させた株 (CH99) が作製された (図 7)⁴²⁾。これを宿主として、改めて特異的 SARP 遺伝子 (*actII-ORF4*)・SARP 結合部位・プロモーター・構造遺伝子

をセットとして導入すれば、導入した遺伝子の機能を選択的に解析することが可能となる。

2. 物質生産の実例

放線菌由来の生合成クラスター全体を、別の宿主を用いて発現させることが可能である。最初のハイブリッド抗生物質生産の例⁹⁾では、*act* クラスター全体を別の BIQ 系抗生物質生産菌に導入したものであった。この場合、導入した遺伝子と宿主が本来もっている生合成遺伝子が宿主内で相互にトランスに機能して生成した化合物が得られる。宿主として CH99 を用いることで、導入した遺伝子固有の代謝産物を得ることができる。GRA 生合成遺伝子クラスター全体を導入した例²³⁾では、GRA 生産菌の野生株と同様の

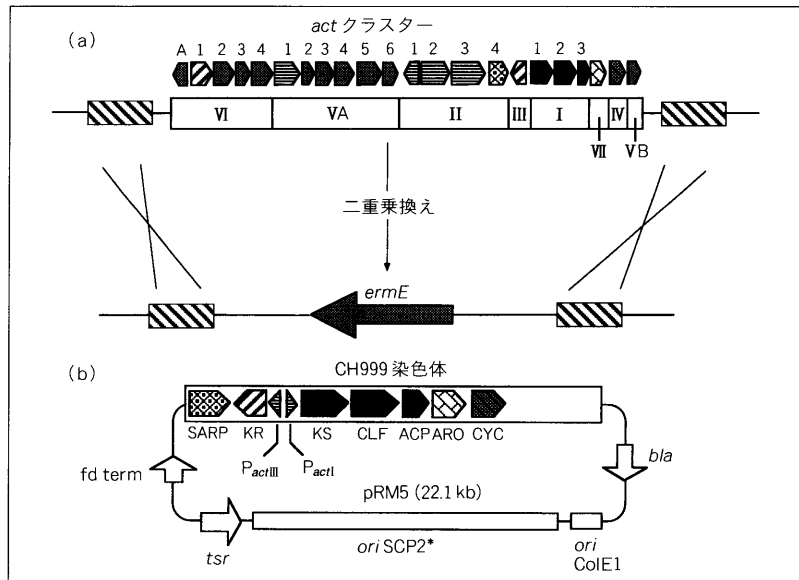


図 7 放線菌遺伝子発現宿主 *S. coelicolor* CH99 の作製と発現ベクター pRM5

(a) 二重乗換えによる *act* クラスターの欠損株の作製。欠損株はエリスロマイシン耐性を指標に行なう。 *ermE*: エリスロマイシン耐性遺伝子。 (b) 発現プラスミド pRM5。遺伝子操作を容易にするために制限酵素部位を導入しシャトルベクター化されている。 SARP は *act* クラスター由来で経路特異型に機能する *actII-ORF4*。 *ori ColE1*: 大腸菌 *ColE1* 複製起点, *ori SCP2**: 放線菌 *SCP 2** 複製起点 (低コピー数型), *bla*: アンピシリン耐性遺伝子 (大腸菌用), *tsr*: チオストレプトン耐性遺伝子 (放線菌用), *fd term*: 転写ターミネーター, *PactI*: *actI* プロモーター, *PactIII*: *actIII* プロモーター。

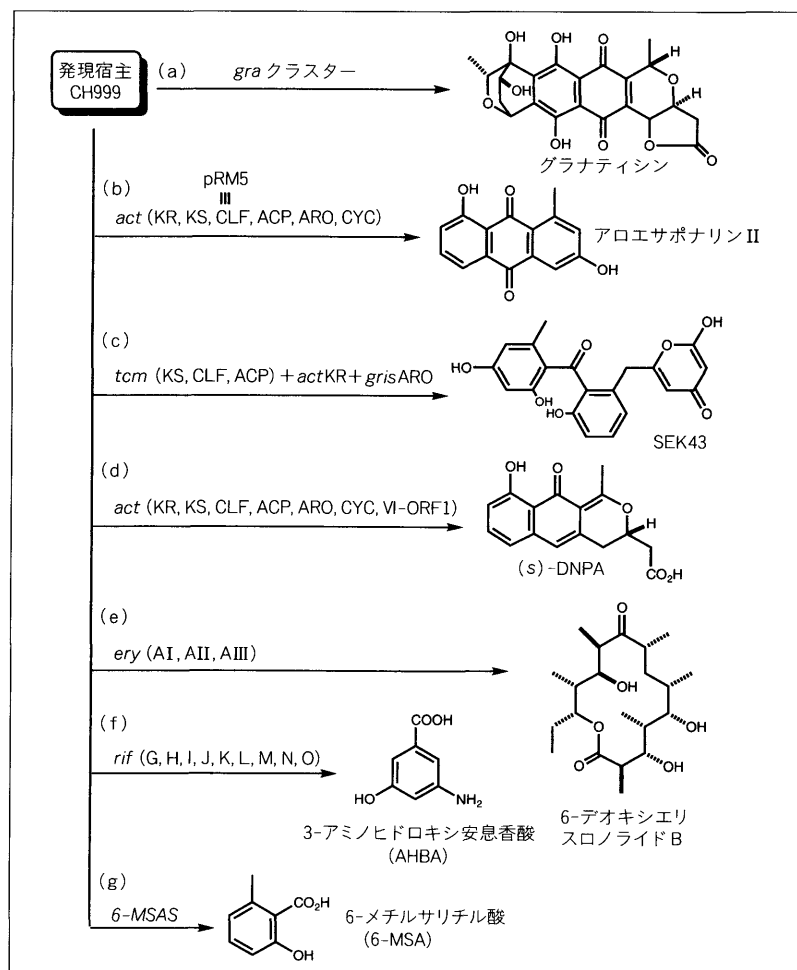


図 8 *S. coelicolor* CH999 と特異型 SARP を利用した物質生産の例

(a) 生合成遺伝子クラスター全体, (b) *act* クラスター上で特異型 SARP を含む領域, (c) pRM5 の構造遺伝子をほかの II 型 PKS 遺伝子クラスターの相同遺伝子と取り替えた例, (d) pRM5 に化学修飾 (ケト還元酵素) 遺伝子を加えた例, (e) I 型 PKS 遺伝子 (エリスロマイシン生産菌由来) によるマクロライド生産, (f) ポリケタイド生成に関連しない生合成遺伝子 (リファマイシン前駆体の AHBA 生合成関連酵素群) の例, 宿主として CH999 からの誘導株 Yu105 を用いている, (g) 糸状菌由来の I 型 PKS (6-メチルサリチル酸合成酵素) 遺伝子.

GRA 生産性を示した (図 8 a).

S. coelicolor からいったん欠損させた *act* クラスター遺伝子のうち SARP 遺伝子である *actII-ORF4* から下流部分を用いてつくったプラスミド, pRM5⁽⁴²⁾ が構築された (図 7). 本プラスミドを CH999 に導入すると ACT 生合成中間体由来する代謝産物アロエサポナリン II を与え (図 8 b), 導入した遺伝子領域で構造遺伝子の正しい転写制御・発現・物質生産が行なわれていることがわかった. pRM5 の系を使ってほかの芳香族

PK 生合成に関与する相同遺伝子との交換を行なったところ, 炭素鎖や閉環様式の異なるさまざまな化合物⁽⁴³⁾ が得られ (図 8 c), 生合成後期で働く化学修飾酵素遺伝子と同じ転写単位で発現させる⁽⁴⁴⁾ ことも可能だった (図 8 d). さらに, pRM5 から構造遺伝子を除いた部分を遺伝子の発現ツールとして用い, I 型 PKS 生合成遺伝子⁽⁴⁵⁾ からのマクロライド (図 8 e) 生成やポリケタイド以外の生合成遺伝子⁽⁴⁶⁾ の複数同時発現 (H. G. Floss: 私信) も達成 (図 8 f) された. 放線菌類の枠をこえて糸状菌由来の遺伝子も, 発現用にコドンの変更を必要とするものの発現が確認⁽⁴⁷⁾ された (図 8 g). 前述の発現例では培地中に目的生産物に応じた基質を添加する (directed biosynthesis) 必要はなく, 放線菌宿主がもつ物質代謝の潜在能力を引き出した結果であり, 非常に実用性が高い.

おわりに 本稿ではポリケタイドに話を限定したが, このほかにもアミノグリコシドを代表とする糖質系の抗生物質

生合成研究などは進展が著しい. 多くの抗生物質が配糖体として単離され, デオキシ糖を主体とする特異な糖鎖とその非糖部分 (アグリコン) への結合様式が生物活性発現の鍵である. 本稿で紹介した GRA 生合成クラスターをみても明らかのように, ポリケタイドとデオキシ糖という個々の生合成からみれば無関係な代謝系の構造遺伝子であるにもかかわらず, これらが単一のクラスターを形成して, 共通の SARP による巧妙な転写制御を受けている. 放線菌の 2 次代謝産物の種類

は莫大であり、今後さまざまな主要2次代謝系合成遺伝子の構造と機能が解明され、本稿で解説した知見に立脚した物質生産への応用研究が展開されることが期待される。

筆者が放線菌研究を始める機会を与えていただいた、John Innes Centre, Sir David Hopwood 教授, SARP に関して有益な議論をいただいた同 Mervyn J. Bibb 教授, ならびに東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室 海老塚 豊教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Arai, T., Vobis, G., Uchida, K., Yokota, A., Miyadoh, S.: *in* Atlas of Actinomycetes (ed. the Society for Actinomycetes Japan), pp.176-199 (1997)
- 2) 木梨陽康: 蛋白質 核酸 酵素, **43**, 1453-1460 (1998)
- 3) Cole, S. T., Brosh, R. *et al.*: *Nature*, **393**, 537-544 (1998)
- 4) 堀之内末治: 蛋白質 核酸 酵素, **40**, 986-999 (1995)
- 5) Hopwood, D. A., Malpartida, F., Kieser, H. M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B. A. M., Floss, H. G., Ōmura, S.: *Nature*, **314**, 642-644 (1985)
- 6) Hopwood, D. A.: *Chem. Rev.*, **97**, 2465-2497 (1997)
- 7) 池田治生・大村 智: 蛋白質 核酸 酵素, **43**, 1265-1277 (1998)
- 8) Wietzorrek, A., Bibb, M. J.: *Mol. Microbiol.*, **25**, 1177-1184 (1997)
- 9) Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M., Schrepf, H.: Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual, The John Innes Foundation, Norwich, UK (1985)
- 10) 堀之内末治・別府輝彦: 蛋白質 核酸 酵素, **35**, 2567-2583 (1990)
- 11) Redenbach, M., Kieser, H. M., Denapaite, A., Eichner, J., Cullum, H., Kinashi, H., Hopwood, D. A.: *Mol. Microbiol.*, **21**, 77-96 (1996)
- 12) Chater, K. F.: *Microbiol.*, **144**, 1465-1478 (1998)
- 13) Ryding, N. J., Kelemen, G. H., Whatling, C. A., Flardh, K., Buttner, M. J., Chater, K. F.: *Mol. Microbiol.*, **29**, 343-357 (1998)
- 14) Kelemen, G. H., Brian, P., Flardh, K., Chamberlin, L., Chater, K. F., Buttner, M. J.: *J. Bacteriol.*, **180**, 2515-2521 (1998)
- 15) Bibb, M. J.: *Microbiol.*, **142**, 1335-1344 (1996)
- 16) Malpartida, F., Niemi, J., Navarrete, R., Hopwood, D. A.: *Gene*, **93**, 91-99 (1990)
- 17) Chong, P. P., Podmore, S. M., Kieser, H. M., Redenbach, M., Turgay, K., Marahiel, M., Hopwood, D. A., Smith, C. P.: *Microbiology*, **144**, 193-199 (1998)
- 18) Chater, K. F., Bruton, C. J.: *EMBO J.*, **4**, 1893-1897 (1985)
- 19) Kempter, C., Kaiser, S., Haag, G., Nicholson, V., Zäner, G., Jung, G., Metzger, J. W.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **36**, 498-501 (1997)
- 20) Yu, T.-W., Shen, Y., McDaniel, R., Floss, H. G., Khosla, C., Hopwood, D. A., Moore, B. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 7749-7759 (1998)
- 21) Ichinose, K., Taguchi, T., Ebizuka, Y., Hopwood, D. A.: *Actinomycetol.*, **12**, 99-109 (1998)
- 22) Hatano, K., Tamura, T., Nishi, T.: *Actinomycetol.*, **8**, 47-50 (1994)
- 23) Ichinose, K., Bedford, D. J., Tornus, D., Bechthold, A., Bibb, M. J., Revill, W. P., Floss, H. G., Hopwood, D. A.: *Chem. Biol.*, **5**, 647-659 (1998)
- 24) Buttner, M. J.: *Mol. Microbiol.*, **3**, 1653-1659 (1989)
- 25) Bourn, W. R., Babb, B.: *Nucl. Acid Res.*, **23**, 3696-3703 (1995)
- 26) Fernández-Moreno, M. A., Caballero, J., Hopwood, D. A., Malpartida, F.: *Cell*, **66**, 769-780 (1991)
- 27) Satunton, J., Wilkinson, B.: *Chem. Rev.*, **97**, 2611-2629 (1997)
- 28) Ikeda, H., Omura, S.: *Chem. Rev.*, **97**, 2591-2609 (1997)
- 29) Molnar, I., Aparicio, J. F., Haydock, S. F., Khaw, L. E., Schweske, T., Konig, A., Staunton, J., Leadlay, P. F.: *Gene*, **169**, 1-7 (1996)
- 30) Geistlich, M., Losick, R., Turner, J. R., Rao, R. N.: *Mol. Microbiol.*, **6**, 2019-2029 (1992)
- 31) Narva, K. E., Feitelson, J. S.: *J. Bacteriol.*, **172**, 326-333 (1990)
- 32) White, J., Bibb, M. J.: *J. Bacteriol.*, **179**, 627-633 (1997)
- 33) Retzlaff, L., Distler, J.: *Mol. Microbiol.*, **18**, 151-162 (1995)
- 34) Kondo, H., Nakagawa, A., Nishihira, J., Nishimura, Y., Mizuno, T., Tanaka, I.: *Nature Struct. Biol.*, **4**, 28-31 (1997)
- 35) Martínez-Hackert, E., Stock, A.: *Structure*, **5**, 109-124 (1997)
- 36) Martínez-Hackert, E., Stock, A.: *J. Mol. Biol.*, **269**, 301-312 (1997)
- 37) Mizuno, T., Tanaka, I.: *Mol. Microbiol.*, **24**, 665-670 (1997)
- 38) Aoyama, T., Oka, A.: *FEBS, Lett.*, **263**, 1-4 (1990)
- 39) Tang, L., Grimm, A., Zhang, Y.-X., Hutchinson, C. R.: *Mol. Microbiol.*, **22**, 801-813 (1996)

- 40) Wright, F., Bibb, M. J. : *Gene*, **113**, 55-65 (1992)
- 41) Khosla, C., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A. : *Mol. Microbiol.*, **6**, 3237-3249 (1992)
- 42) McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A., Khosla, C. : *Science*, **262**, 1546-1550 (1993)
- 43) McDaniel, R., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A., Khosla, C. : *Nature*, **375**, 549-554 (1995)
- 44) Ichinose, K., Surti, C., Taguchi, T., Malpartida, F., Booker-Milburn, K., Stephenson, G. R., Ebizuka, Y., Hopwood, D. A. : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 395-400 (1999)
- 45) Kao, C. M., Katz, L., Khosla, C. : *Science*, **265**, 509-512 (1994)
- 46) August, P., Tang, L., Yoon, Y. J., Ning, S., Müller, R., Yu, T.-W., Taylor, M., Hoffman, D., Kim, C.-G., Zhang, X., Hutchinson, C. R. H., Floss, H. G. : *Chem. Biol.*, **5**, 69-79 (1998)
- 47) Bedford, D. J., Schweizer, E., Hopwood, D. A., Khosla, C. : *J. Bacteriol.*, **177**, 4544-4548 (1995)

市瀬浩志

略歴：1991年 東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了，日本学術振興会特別研究員を経て同年ケンブリッジ大学化学科博士研究員，1993年 ジョン・イネスセンター遺伝学研究部博士研究員，1996年 東京大学薬学部助手，改組により1997年より現職（東京大学大学院薬学系研究科助手）。研究テーマ：天然2次代謝産物の生成と代謝工学的手法による有用物質生産系構築。抱負：2次代謝という観点から生命現象や生物進化の謎にせまりたい。

お知らせ

(財) 神奈川科学技術アカデミー平成11年度第III期 受講生募集

◆免疫・アレルギー疾患の免疫細胞生物学コースー分子的理解から臨床への展開

講義日：10月28, 29, 30, 11月19, 20日の5日間

おもなカリキュラム内容：免疫病理学概論／免疫応答の誘導における樹状細胞の機能・分化・動態／マクロファージ（抗原提示細胞による自己・非自己認識機構）／MHCとアレルギー／T細胞活性化の制御／アレルギー疾患とT細胞／自己免疫疾患とT細胞／B細胞活性の調節機構／B細胞分化とクラススイッチ／サイトカインとサイトカインレセプター／アレルギーのコンダクターとしてのマスト細胞／好酸球の生物学—up to date／マスト細胞と好塩基球の培養方法／好酸球と遅発型アレルギー反応／まとめ・ディスカッション

受講料：69,000円，KAST法人賛助会員（事業所単位）・神奈川県内中小企業 55,200円

◆21世紀の医療を変える遺伝子診断コースー遺伝診断に必要な基礎知識と進め方の基本を学ぶ

講義日：10月後半2日，11月後半2日，計4日

おもなカリキュラム内容：遺伝子検査の進め方／遺伝子病の遺伝子解析のアプローチ／遺伝子検査技術の最近の進歩／遺伝子検査のバイオハザードと情報管理（見学）／遺伝子診断各論（感染症／生活習慣病／悪性腫瘍／出生前診断）／遺伝子診断のELSI／総合討論・遺伝子診断の今後の展望，[施設見学]（株）エスアルエル遺伝子・染色体解析センター（東京都日野市新町）

受講料：57,000円，KAST法人賛助会員（事業所単位）・神奈川県内中小企業 45,600円

◆シグナル伝達研究とゲノム医科学の最先端と医薬品への応用コース

講義日：10月27, 28, 11月2, 10, 11, 17日の計6日間

講義場所：東京大学医科学研究所（東京都港区白金台）

おもなカリキュラム内容：シグナル伝達の分子生物学／受容体の構造と機能／チロシンキナーゼ／細胞膜リン脂質代謝／アラキドン酸カスケード／細胞生存とシグナル伝達／細胞複製の制御／免疫系のシグナル伝達／感染とシグナル伝達／神経系のシグナル伝達／幹細胞とシグナル伝達／肥満／糖尿病／遺伝子ノックアウトモデル／癌と血管／癌と転移／ゲノム解析と診断／疾患遺伝子の同定と解析／ゲノムデータベース／ゲノム機能解析／21世紀の分子医科学と先端医療／シグナル伝達と創薬研究，[施設見学] 東京大学医科学研究所

受講料：68,000円，KAST法人賛助会員（事業所単位）・神奈川県内中小企業 54,400円

※1日受講料 17,000円（応募者が定員をこえた場合，全日程を受講される方を優先し選考します。）

申込締切：平成11年10月4日（月）

問合せ先・おもな講義場所：〒213-0012 神奈川県川崎市高津区坂戸3-2-1 KSP西棟

(財) 神奈川科学技術アカデミー 教育交流部教育研修課

担当 横井 Tel. 044-819-2033 FAX 044-819-2097

E-mail: kast-ed@net.ksp.or.jp

http://home.ksp.or.jp/kast/