J S M *Mycotoxins*

www.jstage.jst.go.jp/browse/myco

Regulatory mechanisms for production of secondary metabolites by *Streptomyces* hormones

Shigeru Kitani, Takuya Nihira

JSM Mycotoxins, **66**(1):73-79 (2016)
<http://dx.doi.org/10.2520/myco.66.73>

JSM Mycotoxins is issued twice a year, one volume a year, by the Japanese Society of Mycotoxicology and the purpose of the journal is to publish results and technical information regarding mycotoxins. *JSM Mycotoxins* publishes Reviews, original results (Research Papers, Technical Notes, Notes, and Letters), Proceedings of special lectures, symposia, and workshops of the meeting of Japanese Society of Mycotoxicology

放線菌ホルモンによる二次代謝制御メカニズムと有用物質生産への応用

木谷 茂¹, 仁平 卓也¹

¹大阪大学生物工学国際交流センター (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

キーワード

エバノライド; ゲノム潜在有用物質; 二次代謝産物; 放線菌; 放線菌ホルモン

連絡先

木谷 茂, 大阪大学生物工学国際交流センター, 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1

電子メール: kitani@icb.osaka-u.ac.jp

(2015年12月25日受付,
2016年1月18日受理)

要旨

放線菌は、抗生物質などの有用生理活性物質を二次代謝産物として生産する重要な産業微生物である。放線菌二次代謝を制御する分子メカニズムの解明は、微生物シグナル経路に関する基礎的情報を集積するのみならず、有用物質の高生産化など多くの産業的恩恵をもたらす。ここでは、放線菌二次代謝を制御する放線菌ホルモンを紹介するとともに、有用物質の高生産化とゲノム潜在物質の顕在化に向けた筆者らの分子育種について解説する。

はじめに

カビ毒として知られるマイコトキシンは、糸状菌の二次代謝産物として産生される物質であり、アフラトキシンやトリコテセンに示されるように、ヒトや家畜に発がんや食中毒などの深刻な健康被害を及ぼしている。一方、糸状菌の二次代謝産物には、抗菌薬ペニシリンや高コレステロール血症治療薬ロバスタチンなどの有用物質も含まれることから、功罪をなしている糸状菌二次代謝に関する研究は盛んである。この糸状菌とならび微生物二次代謝の中心に据えられるのが、土壌細菌として知られる放線菌である。放線菌は糸状菌に似た複雑な形態分化を示し、真核生物に近い原核生物として捉えられている。微生物由来の生理活性物質は33,000種を越えるが、その4割以上の13,700種が放線菌に由来し、10,000種以上が*Streptomyces*属放線菌により生産されている¹⁾。近年、放線菌に由来する新規生理活性物質の報告例は、糸状菌に比べ減少傾向にある。しかし、これらの生理活性物質の医農薬資源としての有用性から、放線菌は創薬リードを創出する産業微生物として確固とした地位を築いてきた。

放線菌二次代謝に関する研究は糸状菌よりも歴史が古く、さまざまな遺伝子解析ツールが多大な努力により整備されてきた。つまり、有用物質の生

成や生産制御などのメカニズムが遺伝子レベルにて解明できるようになってきたのである。蓄積しつつある放線菌二次代謝の分子情報は、新たな医農薬リードを産み出すパラダイムシフトを起こしつつある。そこで、本稿では、筆者らの研究を中心に、*Streptomyces*属放線菌の二次代謝をコントロールする低分子シグナル（“放線菌ホルモン”と称される）に焦点を当て、放線菌ホルモンによる二次代謝制御メカニズムを解説するとともに、有用物質の探索法へと繋がる休眠生成成遺伝子群の活性化などの応用例を紹介する。

1. 二次代謝産物の生産を誘導する放線菌ホルモン

微生物ホルモンとは聞き慣れない言葉であるかもしれないが、ホルモン産生微生物以外の異種微生物に影響を与えず、自分自身の細胞に種々の生理作用を極微量で与える化合物として定義される。この微生物ホルモンの一種である放線菌ホルモンは、放線菌の二次代謝をnMオーダーで誘導する低分子シグナル物質である。放線菌ホルモンの最もよく研究されている例として、アミノグリコシド系抗生物質ストレプトマイシン生産菌*Streptomyces griseus*のA-ファクターがある²⁾ (図1A)。A-ファクターは1967年に単離された最初の放線菌ホルモンであり、ストレプトマイシン生産と形態分化を調節する。こ

図1 放線菌の二次代謝を誘導する低分子シグナル

- A. 代表的な γ ブチロラクトン型放線菌ホルモンの化学構造.
 B. フラン環を有する二次代謝誘導シグナルの化学構造.
 C. プテノライド型放線菌ホルモンの化学構造.

の両方の形質を調節する放線菌ホルモンは少なく、ほとんどの放線菌ホルモンは二次代謝物質生産のみを誘導する。筆者らの研究室では、ストレプトグラミン系抗生物質バージニアマイシン生産誘導因子であるバージニアブタノライド (VB) と青色色素インジゴイジン生産誘導因子IM-2の単離同定に、1987年と1989年に相次いで成功した^{3),4)} (図1A)。前述したように、放線菌ホルモンは極低濃度で有効であるだけに実質の生産量が極めて少なく、単離・構造決定は困難を極める。事実、構造決定に必要なmgオーダーの精製品を確保するためには、トン単位の培養が必要となる。したがって、IM-2の報告以降、2001年に筆者らが遺伝学的基準放線菌*S. coelicolor* A3 (2) におけるSCB1を単離同定するまで⁵⁾、放線菌ホルモンの絶対構造は報告されていない。また、近年の質量分析装置の著しい性能向上により、微量の化合物でも構造解析が可能となり、SCB1類縁体であるSCB2とSCB3を2009年に報告した⁶⁾ (図1A)。

これらの放線菌ホルモンは、 γ ブチロラクトン環を含む3-ヒドロキシメチルブタノライドを共通骨格として有しており、 γ ブチロラクトン型放線菌ホルモンと呼ばれる。筆者らが γ ブチロラクトン型放線菌ホルモンの分布を検討したところ、調査した放線菌の60%が同型ホルモンの産生能を示したことより⁷⁾、残り40%の放線菌において機能する放線菌ホ

ルモンについて興味が集まっていた。このような中、フラン環を有するメチレノマイシンフラン (MMF) が、*S. coelicolor* A3 (2) の線状プラスミドSCP1にコードされた抗菌剤メチレノマイシンの生産を誘導するシグナル分子として2008年に報告された⁸⁾ (図1B)。しかし、その作用濃度についての詳細な記述はなく、メチレノマイシン生産を μ Mオーダーにて誘導するとされているため、MMFを放線菌ホルモンとして分類することはやや困難である。このように二次代謝を誘導するシグナル分子が次第に明らかにされるようになり、放線菌ホルモンの構造多様性がさらに期待されるようになってきた。

2. 放線菌ホルモンによる二次代謝制御の分子メカニズム

γ ブチロラクトン型放線菌ホルモンが制御する二次代謝系では、最初に、放線菌ホルモンが受容体タンパク質に特異的に認識される。筆者らの研究室では、放線菌ホルモン受容体とその遺伝子を、放射能ラベルした放線菌ホルモンを駆使して、世界で最初に同定した⁹⁾。受容体遺伝子破壊株の表現型解析や組換え受容体タンパク質の機能解析などにより、VB受容体であるBarAはDNA結合性の転写制御因子であり、バージニアマイシン生産に対し負の効果を示すことを明らかにした^{10),11)}。BarAは、VBが

生産されていない対数増殖初期までは標的遺伝子のプロモーター領域に結合することにより、RNAポリメラーゼの結合を阻害し、標的遺伝子の転写を抑制している。VBが対数増殖中期以降に生産されると、VBが結合したBarAはDNA結合能を失い、VB-BarA複合体が標的プロモーター領域から解離する。したがって、RNAポリメラーゼのプロモーター領域へのアクセスが可能となり、標的遺伝子の転写が活性化される。この転写活性化ステップを起点にして、バージニアマイシン生産の制御遺伝子群やバージニアマイシン生合成／耐性遺伝子群の発現が誘導され、バージニアマイシンの生産が開始する¹²⁾。barA以外のホルモン受容体遺伝子の機能解析により、多くの場合において、放線菌ホルモン受容体は二次代謝産物生産に対して負の制御因子として機能する、つまり受容体遺伝子の機能破壊は有用物質の生産量増加をもたらすことがわかった(表1)。これらの受容体遺伝子の網羅的な機能解析により、有用物質の生産増強へのアプローチとして、放線菌ホルモン受容体が有効なターゲットとなりうることを示された。

放線菌ホルモン制御系の分子メカニズムを多くの研究グループが解明してきた結果、放線菌ホルモン受容体の基本的な機能は共通ではあるが、ホルモ

ン受容以降の制御系活性化メカニズムは菌株によって異なることが明らかとなってきた。大西ら(東京大学)によりほぼ解明されたA-ファクター制御系では、A-ファクター受容体ArpAがストレプトマイシン生産と形態分化のマスタースイッチであるAdpAの発現制御を調節する¹³⁾。一方、VB制御系やIM-2制御系では、ホルモン受容体であるBarAやFarAが受容体遺伝子近傍に位置する複数の制御遺伝子の発現を巧妙に調節することにより、有用物質生産を多層制御によりコントロールしている^{14),15),16)}。このような複雑な二次代謝制御系を丹念に解明していくことが、有用物質の生産増強に繋がる分子育種を可能にすると考えられる。

3. 抗寄生虫薬エバーメクチンを生産誘導する新規放線菌ホルモン

抗寄生虫薬エバーメクチンは熱帯病オンコセルカ症を治療する特効薬の原料であり、放線菌*Streptomyces avermitilis*が生産する二次代謝産物である。大村(北里大学)は、このエバーメクチンを発見し、感染症治療薬の開発に貢献したとして、「線虫感染症の新しい治療法の発見」を受賞理由に、ノーベル生理学・医学賞を2015年に受賞した。産業放線菌として初めてゲノム解析された*S. avermitilis*に

表1 放線菌ホルモン受容体遺伝子の機能解析

放線菌	放線菌 ホルモン	受容体 遺伝子	受容体に生産制御 される物質	受容体遺伝子破壊 による代謝物変化	参考 文献
<i>S. griseus</i>	A-ファクター	arpA	ストレプトマイシン	増加	24)
<i>S. virginiae</i>	VB	barA	バージニアマイシン	早期減少	11)
<i>S. lavendulae</i> FRI-5	IM-2	farA	D-サイクロセリン	増加	25)
			ショードマイシン	増加	
			インジゴイジン	早期減少	
<i>S. coelicolor</i> A3(2)	SCB1	scbR	アクチノロージン	遅延減少	26)
	SCB2/SCB3	ND	ウンデシルプロジギオシン	遅延減少	6)
<i>S. natalensis</i>	ND	sngR	ピマリシン	増加	27)
<i>S. scabies</i> NBRC12914	ND	sscR	未同定化合物	増加	28)
<i>S. avermitilis</i>	エバノライド	avaR1	エバーメクチン	変化なし	18)
	ND	avaR3	エバーメクチン	減少	17)
		ksbA	バフィロマイシン	早期増加	21)
<i>Kitasatospora setae</i>	ND	ksbC	バフィロマイシン	減少	22)
			キタセタリン	増加	
<i>S. clavuligerus</i>	ND	scaR (brp)	クラブラン酸	増加	29),30)
			セファマイシンC	増加	

ND：未同定

は、5つの放線菌ホルモン受容体相同遺伝子 (*avaL* 遺伝子群と*avaR*遺伝子群) がゲノム上の2カ所に位置していた。 γ -ブチロラクトン型放線菌ホルモンの生合成に必須な*afsA*型酵素遺伝子が*avaL*受容体相同遺伝子群に近接していたことから、当初、エバーメクチンの生産は γ -ブチロラクトン型放線菌ホルモンにより調節されているのではないかと考えた。しかし、この酵素遺伝子破壊株においてもエバーメクチンの生産が維持されていたことから、 γ -ブチロラクトン型ではない放線菌ホルモンの存在を疑った。詳細は割愛するが、*avaR*遺伝子群に含まれる受容体相同遺伝子と機能未知の酵素遺伝子がエバーメクチンの生産に関与すること¹⁷⁾、また酵素遺伝子破壊株の形質が野生型株の培養抽出液で回復するが、 γ -ブチロラクトン型放線菌ホルモンでは回復しないことなどから、 γ -ブチロラクトン型放線菌ホルモンとは異なる化学構造をもつシグナル分子がエバーメクチンの生産制御に関与することを確信した。

放線菌ホルモン受容体と高い相同性を示すAvaR1タンパク質のDNA結合能阻害活性を指標にして、1,000 L培養液相当分の粗抽出物から1.2 mgのAvaR1結合物質エバノライドを単離し、その平面構造を決定した¹⁸⁾。平面構造から推定されるエバノライドの立体化学は、最終的に化学合成により確認を行い¹⁹⁾、DNA結合能阻害活性により決定した(図1C)。このエバノライドはエバーメクチン生産を4 nMの最小有効濃度で誘導したことから、メチレノマイシン生産誘導因子であるMMFとは異なり、放線菌ホルモンの定義にも当てはまる。同定したエバノライドには、 γ -ブチロラクトン環ではなく、ブテノライド環が含まれていた。ブテノライド環を含む放線菌ホルモンとして、荒川ら(広島大学)がSRB1とSRB2を2012年に報告した²⁰⁾(図1C)。したがって、 γ -ブチロラクトン型ホルモンに続く、第二の放線菌ホルモンはブテノライド型放線菌ホルモンである可能性が強く示唆されている。今後、筆者らは、このブテノライド型放線菌ホルモン制御系の分布と詳細な分子メカニズムを明らかにし、低分子シグナルを介する放線菌二次代謝制御系の全貌に迫っていきたいと考えている。

4. 放線菌ホルモン制御系を活用した潜在有用物質の生産覚醒化

放線菌の二次代謝生合成遺伝子とその制御遺伝子は、糸状菌と比較して、近接して位置することが多い。放線菌ホルモンの受容体遺伝子も例外ではなく、VB受容体遺伝子*barA*の隣接領域には、多数のBarA制御遺伝子と共にバージニアマイシン生合成

遺伝子群が存在する。このような遺伝子配置は他の放線菌でも認められるが、A-ファクターやエバノライドなどの二次代謝制御系では、ホルモン受容体遺伝子の近傍にストレプトマイシンやエバーメクチンなどの二次代謝生合成遺伝子はない。つまり、放線菌ホルモン受容体がゲノム上の遠位にある二次代謝生合成遺伝子を転写調節しているわけである。このような二次代謝制御系が解明されるようになり、筆者らは、二次代謝生合成遺伝子を近傍に持たない受容体遺伝子が、研究対象ではない代謝物を生産コントロールする可能性を疑った。

*Kitasatospora setae*は液胞型プロトンATPase阻害物質バフィロマイシンを生産するnon-*Streptomyces*属放線菌である。筆者らは、ゲノム解析される以前に、ホルモン受容体と推定されるKsbAがバフィロマイシン生産抑制因子であることを明らかにしていた²¹⁾。本ゲノムには、放線菌ホルモン受容体遺伝子が3コピー存在し、いずれもその近傍には二次代謝生合成遺伝子をもたない。そこで、残りの受容体遺伝子の一つである*ksbC*を機能解析したところ、KsbCはバフィロマイシンの生産を促進すると同時に形態分化も調節する多面的制御因子であることがわかった²²⁾。*ksbA*と*ksbC*、いずれの遺伝子もバフィロマイシン生合成遺伝子から遠く離れていたため、KsbCがバフィロマイシン以外の代謝物生産に関与する可能性を調査した。詳細な代謝物解析の結果、*ksbC*破壊株にて生産が顕著に増加する代謝物ピークを見出し、その化学構造を決定したところ、*ksbC*破壊により生産誘導される化合物は β -カルボリン骨格を含む新規物質(キタセタリンと命名)であることがわかった²³⁾(図2)。様々な生理活性を示す β -カルボリン化合物ではあるが、その95%以上が植物と海生動物に由来するのに対し、微生物由来 β -カルボリン化合物の報告例は希である。そこで、異種放線菌発現システムを利用して、キタセタリンの生合成に関わる遺伝子を探索したところ、既知の β -カルボリン生合成系とは異なる酵素遺伝子群を取得することに成功した。また、キタセタリン異種発現株の代謝物解析により、複数のキタセタリン類縁体を新規物質として獲得した(図2B)。このようにKsbCはバフィロマイシンだけではなく、新規 β -カルボリン化合物キタセタリンの生産にも関与していた。*ksbC*破壊によるキタセタリン生産の顕在化は、KsbCの直接的な制御によるものか、バフィロマイシン生産低下の影響による間接的な制御であるかは現段階では明らかではない。しかし、放線菌ホルモン受容体の遺伝子破壊が通常培養時では検出困難であったキタセタリンの生産を顕著に増大さ

図2 放線菌ホルモン受容体KsbCの遺伝子破壊による新規 β -カルボリン化合物キタセタリンの生産覚醒

- A. *ksbC* 破壊株 ($\Delta ksbC$) と野生型株におけるキタセタリン生産量の比較. 黒矢印はキタセタリンのHPLCピークを示す.
 B. キタセタリンとその類縁体の化学構造 (JBIR-133とJBIR-134).

せ, 新規物質と新奇遺伝子の取得に繋がったのは疑いのない事実である. したがって, 二次代謝生成遺伝子を近接領域に持たない放線菌ホルモン受容体遺伝子を機能破壊する本アプローチは, 潜在的二次代謝を覚醒させる有効な手段の一つであると考えられ, 多数の有用生理活性物質が今後, 獲得されることが期待される.

おわりに

本稿では, 筆者らが取り組んでいる放線菌ホルモンによる二次代謝制御系について概説し, ゲノム潜在物質を含む有用生理活性物質の生産に対する分子育種例を示した. 放線菌の複雑な二次代謝制御系を解明するに際し, γ -ブチロラクトン型とブテノライド型の放線菌ホルモンが鍵となるシグナル分子であることはいうまでもない. 放線菌ホルモン制御系の分子メカニズムのより一層の理解が, 有用物質の高生産化に向けた合理的な遺伝子デザインを可能にすると考えている. また, 放線菌ホルモン受容体の遺伝子破壊が潜在的二次代謝の覚醒を偶然にも可能にした. これまでに構築した多数の受容体遺伝子破壊株または各種制御遺伝子破壊株を代謝物レベルでもう一度精査することにより, 新規生理活性物質だけではなく, 予測不可能な新奇遺伝子を獲得できるのではないかと考えている.

謝辞

本研究の一部は, 池田治生博士 (北里大学北里生命科学研究所), 長光亨博士 (北里大学薬学部), 新家一男博士 (産業技術総合研究所) ら, 多くの研究者と共同でなされたものであり, ここに感謝申し上げます.

引用文献

- 1) Berdy, J.: Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot*, **65**, 385-395 (2012)
- 2) Khokhlov, A.S., Tovarova, I.I., Borisova, L.N., Pliner, S.A., Shevchenko, L.N., Kornitskaia, E.I., Ivkina, N.S., Rapoport, I.A.: The A-factor, responsible for streptomycin biosynthesis by mutant strains of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl Akad Nauk SSSR*, **177**, 232-235 (1967)
- 3) Yamada, Y., Sugamura, K., Kondo, K., Yanagimoto, M., Okada, H.: The structure of inducing factors for virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J Antibiot*, **40**, 496-504 (1987)
- 4) Sato, K., Nihira, T., Sakuda, S., Yanagimoto, M., Yamada, Y.: Isolation and structure of a new butyrolactone autoregulator from *Streptomyces* sp. FRI-5. *J Ferment Bioeng*, **68**, 170-173. (1989)
- 5) Takano, E., Nihira, T., Hara, Y., Jones, J.J., Gershater, C.J., Yamada, Y., Bibb, M.: Purification and structural determination of SCB1, a γ -butyrolactone that elicits antibiotic production in *Strepto-*

- myces coelicolor* A3(2). *J Biol Chem*, **275**, 11010-11016 (2000)
- 6) Hsiao, N.H., Nakayama, S., Merlo, M.E., de, Vries M., Bunet, R., Kitani, S., Nihira, T., Takano, E.: Analysis of two additional signaling molecules in *Streptomyces coelicolor* and the development of a butyrolactone-specific reporter system. *Chem Biol*, **16**, 951-960 (2009)
 - 7) Yamada, Y.: Butyrolactone autoregulators, inducers of secondary metabolites, in *Streptomyces*. *Actinomycetologica*, **9**, 57-65 (1995)
 - 8) Corre, C., Song, L., O'Rourke, S., Chater, K.F., Challis, G.L.: 2-Alkyl-4-hydroxymethylfuran-3-carboxylic acids, antibiotic production inducers discovered by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 17510-17515 (2008)
 - 9) Okamoto, S., Nakamura, K., Nihira, T., Yamada, Y.: Virginiae butanolide binding protein from *Streptomyces virginiae*. Evidence that VbrA is not the virginiae butanolide binding protein and reidentification of the true binding protein. *J Biol Chem*, **270**, 12319-12326 (1995)
 - 10) Kinoshita, H., Ipposhi, H., Okamoto, S., Nakano, H., Nihira, T., Yamada, Y.: Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol*, **179**, 6986-6993 (1997)
 - 11) Nakano, H., Takehara, E., Nihira, T., Yamada, Y.: Gene replacement analysis of the *Streptomyces virginiae* barA gene encoding the butyrolactone autoregulator receptor reveals that BarA acts as a repressor in virginiamycin biosynthesis. *J Bacteriol*, **180**, 3317-3322 (1998)
 - 12) Pulsawat, N., Kitani, S., Nihira, T.: Characterization of biosynthetic gene cluster for the production of virginiamycin M, a streptogramin type A antibiotic, in *Streptomyces virginiae*. *Gene*, **393**, 31-42 (2007)
 - 13) Horinouchi, S.: Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci Biotechnol Biochem*, **71**, 283-299 (2007)
 - 14) Pulsawat, N., Kitani, S., Fukushima, E., Nihira, T.: Hierarchical control of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae* by three pathway-specific regulators: VmsS, VmsT and VmsR. *Microbiology*, **155**, 1250-1259 (2009)
 - 15) Kurniawan, Y.N., Kitani, S., Maeda, A., Nihira, T.: Differential contributions of two SARP family regulatory genes to indigoidine biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *Appl Microbiol Biotechnol*, **98**, 9713-9721 (2014)
 - 16) Kurniawan, Y.N., Kitani, S., Iida, A., Maeda, A., A, Nijeholt J.L., Lee, Y.J., Nihira, T.: Regulation of production of the blue pigment indigoidine by the pseudo γ -butyrolactone receptor FarR2 in *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J Biosci Bioeng*, doi:10.1016/j.jbiosc.2015.08.013 (2015)
 - 17) Miyamoto, K.T., Kitani, S., Komatsu, M., Ikeda, H., Nihira, T.: The autoregulator-receptor homologue AvaR3 plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *Streptomyces avermitilis*. *Microbiology*, **157**, 2266-2275 (2011)
 - 18) Kitani, S., Miyamoto, K.T., Takamatsu, S., Herawati, E., Iguchi, H., Nishitomi, K., Uchida, M., Nagamitsu, T., Omura, S., Ikeda, H., Nihira, T.: Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 16410-16415 (2011)
 - 19) Uchida, M., Takamatsu, S., Arima, S., Miyamoto, K.T., Kitani, S., Nihira, T., Ikeda, H., Nagamitsu, T.: Total synthesis and absolute configuration of avenolide, extracellular factor in *Streptomyces avermitilis*. *J Antibiot*, **64**, 781-787 (2011)
 - 20) Arakawa, K., Tsuda, N., Taniguchi, A., Kinashi, H.: The butenolide signaling molecules SRB1 and SRB2 induce lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*. *Chembiochem*, **13**, 1447-1457 (2012)
 - 21) Choi, S.U., Lee, C.K., Hwang, Y.I., Kinoshita, H., Nihira, T.: Cloning and functional analysis by gene disruption of a gene encoding a γ -butyrolactone autoregulator receptor from *Kitasatospora setae*. *J Bacteriol*, **186**, 3423-3430 (2004)
 - 22) Aroonsri, A., Kitani, S., Hashimoto, J., Kosone, I., Izumikawa, M., Komatsu, M., Fujita, N., Takahashi, Y., Shin-ya, K., Ikeda, H., Nihira, T.: Pleiotropic control of secondary metabolism and morphological development by KsbC, a butyrolactone autoregulator receptor homologue in *Kitasatospora setae*. *Appl Environ Microbiol*, **78**, 8015-8024 (2012)
 - 23) Aroonsri, A., Kitani, S., Ikeda, H., Nihira, T.: Kitasetaline, a novel β -carboline alkaloid from *Kitasatospora setae* NBRC 14216^T. *J Biosci Bioeng*, **114**, 56-58 (2012)
 - 24) Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T., Horinouchi, S.: Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J Bacteriol*, **177**, 6083-6092 (1995)
 - 25) Kitani, S., Yamada, Y., Nihira, T.: Gene replacement analysis of the butyrolactone autoregulator receptor (FarA) reveals that FarA acts as a novel regulator in secondary metabolism of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J Bacteriol*, **183**, 4357-4363 (2001)
 - 26) Takano, E., Chakraborty, R., Nihira, T., Yamada, Y., Bibb, M.J.: A complex role for the γ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in

- Streptomyces coelicolor* A3(2). Mol Microbiol, **41**, 1015-1028 (2001)
- 27) Lee, K.M., Lee, C.K., Choi, S.U., Park, H.R., Kitani, S., Nihira, T., Hwang, Y.I.: Cloning and *in vivo* functional analysis by disruption of a gene encoding the γ -butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces natalensis*. Arch Microbiol, **184**, 249-257 (2005)
- 28) Kitani, S., Hoshika, M., Nihira, T.: Disruption of *sscR* encoding a γ -butyrolactone autoregulator receptor in *Streptomyces scabies* NBRC 12914 affects production of secondary metabolites. Folia Microbiol, **53**, 115-124 (2008)
- 29) Kim, H.S., Lee, Y.J., Lee, C.K., Choi, S.U., Yeo, S.H., Hwang, Y.I., Yu, T.S., Kinoshita, H., Nihira, T.: Cloning and characterization of a gene encoding the γ -butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces clavuligerus*. Arch Microbiol, **182**, 44-50 (2004)
- 30) Santamarta, I., Perez-Redondo, R., Lorenzana, L.M., Martin, J.F., Liras, P.: Different proteins bind to the butyrolactone receptor protein ARE sequence located upstream of the regulatory *ccaR* gene of *Streptomyces clavuligerus*. Mol Microbiol, **56**, 824-835 (2005)

Regulatory mechanisms for production of secondary metabolites by *Streptomyces* hormones

Shigeru Kitani¹, Takuya Nihira¹

¹International Center for Biotechnology, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

Actinomycetes produce an array of natural compounds in the form of secondary metabolites including antibiotics, and are currently the most useful microorganisms for this purpose. Within actinomycetes, members of the genus *Streptomyces* have been extensively studied due to their ability to synthesize a vast array of important secondary metabolites. Understanding of *Streptomyces* secondary metabolism could lead not only to achieve a high-yield production of antibiotics but also to awaken silent gene clusters for the discovery of novel natural compounds. *Streptomyces* hormones, exemplified by γ -butyrolactone-type autoregulators and butenolide-type autoregulators, and their cognate receptors could provide a clue to decipher the complicated regulatory mechanism for such secondary metabolism. In this mini-review, we describe our recent studies on the regulatory mechanism for actinomycetes secondary metabolism controlled by *Streptomyces* hormones and the application of our knowledge of the signaling cascades in the discovery of novel natural compounds.

Keywords: actinomycetes; avenolide; cryptic compounds; secondary metabolites; *Streptomyces* hormones