分化誘発の初期反応—Metabolic Initiation—†

越 智 幸 三

(藤沢薬品探索研究所)

原核微生物のうち、*Bacillus*, *Myxococcus*, *Streptomyces*, *Clostridium* および *Sarcina* の各属は孢子形成を行う。これら孢子形成は、単細胞生物における比較的単純化された形態分化のモデルとして、研究者の興味を引いてきた。*Streptomyces* を代表とする放線菌は、以下の2つの点で特異な位置を占める。1) 抗生物質など二次代謝産物の大半は放線菌で生産され、応用面での重要性が高い。2) *Bacillus* の内生孢子形成とちがって、放線菌のプレート上での分化は二段構成(基底菌糸→空中菌糸→孢子)をなしており、原核生物中、最も進化した分化形態と考えられる。この分化に関して、経験的によく知られていることは、それが生育後期の栄養源欠乏下に誘発されるらしいという点であろう。二次代謝は通常この形態分化と同時に開始され、形態分化能の消失が二次代謝能の消失を招くという遺伝的連関も強い。したがって、形態分化と二次代謝の誘発には、その機構上かなりの共通性があると予想されるわけで、ここに二次代謝誘発を“代謝分化”として捉える理由がある。いずれの分化も栄養源欠乏により誘発されるならば、細胞はどのようにしてこのストレスを感知し、おのおのの分化遺伝子の特異的発現に結びつけてゆくのであろうか？ 当然そこには精巧な情報伝達系があるはずであり、このような細胞内でのごく初期の応答を、分化誘発における“metabolic initiation”と名付けることができる。ところで、放線菌を含む多くの(おそらくすべての)原核生物は、栄養源欠乏を素早く感知して、秒単位の早さで細胞内生理を調節する仕組みを持っている。“緊縮制御”(stringent response)と呼ばれるものがそれで、アミノ酸欠乏に呼応してリボソーム上で生成される ppGpp (グアノシン-5'-ニリン酸-3'-ニリン酸)が、この制御の中心的役割を

担っている⁽¹⁾。ppGpp を生成できなくなった変異株(*rel* 変異株)は、緊縮制御ができなくなる。したがって、栄養欠乏状態にある細胞の生理研究では、ppGpp はきわめて重要な問題となる。本稿では、metabolic initiation を中心に、最近の成果と話題を拾ってみた。全般的には Chater らのレビュー⁽²⁻⁴⁾によく解説されており、ことに文献2はイギリスの研究者らしく大変知性に富んだものなので、一読を勧めたい。

1. Physiological approach

Bacillus の分化誘発では、栄養源欠乏による細胞内 GTP レベルの低下が、その決定的な引き金となることが多くの実験手法により示されてきた⁽⁵⁾。放線菌の場合も同様であることは、以下の4つの事実からうかがえる⁽⁶⁾。1) プレート培養において、気菌糸形成に先立ち GTP の著しい低下がある。2) *S. griseus* の液体培養において、栄養源除去によるシフトダウンによって顕著な孢子形成が誘発されるが、この操作により GTP レベルは急激に低下している。3) 多量のカザミノ酸を含む栄養豊富な培地上では気菌糸形成が抑制されるが、デコイニン(GMP 合成阻害剤)の添加で脱抑制される。4) *rel* 変異を導入すると、ppGpp 蓄積能の消失のため GTP レベルの低下が弱められるが、同時に *rel* 株の気菌糸形成は著しく遅延かつ微弱化する。それでは、GTP の低下はどのようにして起きるのか？ おそらく GTP 生合成における基質(アミノ酸、リン酸)の低下が、その直接原因になりうるであろう。さらに、ppGpp は GTP 合成に関与する IMP デヒドロゲナーゼを強力に阻害するので、緊縮制御は間接的ではあるが分化誘発に寄与することになる⁽⁶⁾。堀之内(本シリーズ)が詳述しているように、ある種の放線菌の分化と二次代謝の誘発には、A-factor と呼ばれるホルモン様物質が1つのカギを握っている。デコイニンとちがって、A-factor 自身は抑制状態にある分化を誘発できないが、デコイニンと共存すると孢子形成能を著しく高める。しかも、A-factor の蓄積は

† Metabolic Initiation of *Streptomyces* Differentiation.

Kozo OCHI (Exploratory Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., 5-2-3 Tokodai, Tsukuba, Ibaraki 300-26)

生育初期から始まっており、GTP の低下に先立っている。これらのことから推して、分化誘発の引き金 (GTP の低下) を細胞が有効と判定できるよう、生理調整または情報伝達系のセットアップを行うことに、A-factor の役割の一端があるのだろう⁽⁶⁾。 *Bacillus* では、いくつかの GTP 結合タンパクの存在がすでに報告されており⁽⁷⁾、このようなタンパクのなかには分化誘発のための GTP センサーとしての役割を持つものと予想される。

Factor C⁽⁸⁾ は、多くの放線菌の膜部分に存在する 34 kDa のタンパクで、A-factor と同じく分化に必須である。膜の機能調節にかかわるようであるが、遺伝研究はなされていない。シトルリン、バリン、オルニチノリピッドはいずれも放線菌の分化に影響を及ぼすが、膜の機能にかかわるものと思われる。このような現象は、内生孢子形成菌である *Bacillus* にはみられないものであり、放線菌の分化の複雑さを示すと同時に、本菌の分化誘発における膜機能の重要性を示すものであろう。

ADP-リボシル化によるタンパクの機能調節は、動物細胞で多くの研究がなされ、その重要性は確立されている⁽⁹⁾。NAD の分解により生成した ADP-リボースが、ADP-リボシルトランスフェラーゼによってタンパクの特定部位に結合されるタンパク修飾反応である。微生物でもわずかの報告が散見されるが、最近、放線菌 (*S. griseus*) の分化と二次代謝の両面に、この ADP-リボシル化が深くかかわっていることが示された⁽¹⁰⁾。すなわち、*S. griseus* も ADP-リボシルトランスフェラーゼ活性を持っているが、変異によって活性を失うと、分化も二次代謝も起きなくなる。親株では 44 kDa タンパクの ADP-リボシル化が認められたが、変異株では ADP-リボシル化が起きていなかった。これらの事実は、リン酸化によるタンパク機能の調節とともに、微生物の生活環境において ADP-リボシル化が重要であることを示唆している。今後 NAD の生合成および代謝、本酵素の enzymology、さらに ADP-リボシル化されるタンパクの実体を究明していく必要がある。post-translational control として、分化研究における新しい局面も期待できよう。

放線菌の生理面における分化研究には、従来大きな困難が積み重なってきた。一部の放線菌 (たとえば *S. griseus*) を除き、大半は液体培養で孢子を形成せず、プレート培養でのみ孢子形成を行うからである。遺伝研究

に重宝される *S. coelicolor* は後者の例であるが、最近 Puglia ら⁽¹¹⁾はこの困難をおして、本菌の分化の生理学的解析を試みていることは評価される。最近、別の観点からのアプローチも行われるようになった。Vining ら⁽¹²⁾は、*S. venezuelae* の液体培養において炭素源、チッ素源をうまく調節することにより、80% の高率で孢子形成がみられることを報告した。Martin ら⁽¹³⁾は、シフトダウンによって、いくつかの *Streptomyces* 属で効率よく液体培養による孢子形成を行わせた。さらに、*S. coelicolor* と *S. lividans* の場合も、高濃度のカルシウムイオン (20 mM) とプロリン (40 mM) の存在下で培養すると、孢子類似体 (孢子とみなせるか否か不明) を作るという事実は注目に値する。ちなみに Natsume ら⁽¹⁴⁾は、プレート培養における気菌糸形成に、カルシウムイオンが重要な役割を持っていることを示唆している。リン酸による *S. griseus* の孢子形成抑制は、高濃度カルシウムイオンの存在で脱抑制されるし⁽¹⁵⁾、リン酸カルシウム (とくに di および tri-basic) は水に難溶である。したがって細胞内外のリン酸の不溶化が、GTP を含むヌクレオチドの低下をもたらし、これが孢子および気菌糸形成の誘発につながった可能性も考えられる。カルシウムイオンの動物細胞におけるセカンドメッセンジャーとしての重要性を考えると、より複雑な機能を果たしている可能性もあり、今後の進展が期待される。なお、放線菌の一種 *Saccharopolyspora erythraea* で、カルシウム結合タンパクの存在が報告されている⁽¹⁵⁾。従来、放線菌の遺伝研究のほとんどが *S. coelicolor* で、一方生理研究はおもに *S. griseus* でなされてきた。その結果、遺伝と生理の結合がなされにくい欠点があったが、上記の方法論の開発はこの問題を解消するだろう。

2. Genetic approach

誘発機構を解明していくための、もう1つの有力な方法は、とりあえず分化または二次代謝能の欠落した変異株をとり、これを解析していく方法である。変異の性格があらかじめわかっている場合 (ADP-リボシル化の変異はこれに属する) はもちろん、変異遺伝子の性格が全く不明であっても重要な出発点となりうる。最近のクローニングシステムの進歩により、変異遺伝子の特徴づけが可能になり、その機能をも予測しうるようになったからである。*S. coelicolor* の場合、*bldA*~*H* (*bld*: bald; 気菌糸形成に関与)、*whiA*~*I* (*whi*: white; 孢子形成に関与)、*afsR* (二次代謝に関与) および *relC* (緊縮制

御に關与)の19種の遺伝子が知られている^(2,16)。*S. griseus*での歴史は浅く、Babcockらの***bldI*~IV⁽¹⁷⁾**、堀之内、別府らの***afsA*と*afsB***(A-factor生成に關与)および筆者の***relC*と*sup⁽¹⁸⁾***が挙げられる。これらの遺伝子発現はカスケードをなしていることがわかってきており、図1に簡略に示した。図からわかるように、A-factorの分化および二次代謝誘発における位置づけ(重要性)は、*griseus*と*coelicolor*の間で全く異なっている。放線菌の遺伝、生理両面での多様性を如実に示した例であろう。クローニングの結果得られた興味ある事実として、*coelicolor*のカスケードの始発点である***bldA***は、ロイシンのためのコドンUUAを翻訳するためのtRNAそのものであった⁽²⁾。GC含量の高いことで知られる放線菌では、DNA上にTTAコドンはめったに現れず、実際、生育にかかわる遺伝子には見つからない。分化と二次代謝の誘発に關与する遺伝子がTTAコドンを持っていれば都合なわけで、ここに遺伝子発現制御の仕掛けがあるのだらう。同様に***whiG***もクローニングされ、*Bacillus*のシグマ因子の1つである σ^{28} に非常に類似していることから、*whiG*がシグマ因子遺伝子であることはまず確かである⁽²⁾。なお、*whiG*を多コピープラスミドにクローニングして、*S. coelicolor*に導入すると、プレート培養における基底菌糸中にも顕著な孢子形成がみられるようになること^(2,4)は特筆に値する(前記したように、本来*S. coelicolor*は液体中、寒天中で孢子形成できない)。このことは、おのおのの放線菌の液体培養における孢子形成能は、*whiG*の発現の仕方、発現の程度によって決定されている可能性を示すものである。*afsA*、*afsB*、*afsR*については堀之内が述べる。今後、*bldA*、*whiG*に対応する遺伝子が*S. griseus*にもあるのか否か、あるとすればカスケードの中でどのような位置を占めるのか、さらに、*S. coelicolor*もautoregula-

torと呼べるものを作っているのか否か(A-factorは本菌の分化に關与しない)、などが重要な問題となる。

それでは、カスケードを始動させるキッカケは何か? 分化の場合は、*Bacillus*と*Streptomyces*両面での研究から、細胞内GTPレベルがそのシグナルの1つであることはほぼ確かであろう。一方、二次代謝の場合は、不確定要素を多く残しながらも、ppGppがシグナルの1つである可能性が十分にある(図1)⁽⁶⁾。すなわち、1)5種の異なった*Streptomyces*に*relC*変異を導入してppGpp蓄積能を1/10に低下させると、対応する抗生物質生産能は劇的に低下する。2)抗生物質生産開始時期と菌体内ppGppの上昇時期は完全に一致する。3)シフトダウンによりppGpp蓄積能を高めると、フォルマイシン生産能は8倍に上昇する。4)工業レベルにまで育種されたビコザマイシン高生産株は、高いppGpp蓄積能を付与されている。5)*S. lavendulae*の*relC*株は炭素源シフトダウンによりppGppを蓄積できるが、同時にフォルマイシン生産能が回復する。ppGppの重要性は、とりわけ1)の事実に基づいているが、なんといっても*relC*変異はリボソームに起きた変異であり、生育も多少悪くなっているのだから、結果の解釈には慎重を要する。ppGppは細胞内に取り込まれないので添加実験はできず、しかもその生成原理から考えて、細胞にショックを与えることなく細胞内ppGppレベルを変化させることはきわめて難しい。ここに、緊縮制御研究の難しさがあり、生理的研究のみでは到底最終結論を得ることはできない。たとえば、最近Bibbら⁽¹⁹⁾は*S. coelicolor*の*relC*株を得ているが、筆者の*relC*株とは逆に、抗生物質生産能は正常であった。彼らの*relC*株は親株の1/4程度のppGpp蓄積能を保持しており、生育速度も低下していないので、“leaky”な*relC*変異と思われる。したがって結果の食い違いを説明するためには、培地中に

図1 *S. griseus*と*S. coelicolor*の分化と二次代謝誘発における遺伝子発現のカスケード(HopwoodらおよびBeppuらの知見から想定されるものである)。

存在するであろう抑制因子による抑制効果の解析と、誘発のための ppGpp の必要濃度（たとえば合成培地と天然培地では大幅に異なるかもしれない）の解析が必要である。このような解析が困難を極めるのは必至で、むしろ遺伝手法により積極的に ppGpp の情報伝達系における位置付けを確定してゆくのが賢明であろう。この意味で *sup* 変異は希望が持てる。

sup 変異⁽¹⁸⁾は、*relC* 変異の表現型を抑制する変異で、*S. griseus* の *relC* 株を長期保存すると高率（5～30%）で出現するが、他の放線菌の *relC* 株ではこの現象はみられない。*relC* 変異により生じたストレプトマイシン生産能の消失は、この *sup* 変異によって完全に回復する。*relC sup* の二重変異株では、リボゾーム蛋白 L11 は消失したままであるし、ppGpp 蓄積能も全く回復していない。しかも、遺伝解析の結果は *relC* と *sup* が異なった位置にあることを示しており、*sup* 変異が *relC* 変異に対する抑制変異であることは明白である。*relC sup afs* の三重変異株ではストレプトマイシン生産能はふたたび消失するので、*afs* 変異の表現型を抑制することはできない。*sup* 遺伝子産物の性格については全く不明である。*E. coli* の RNA ポリメラーゼはコア酵素（ $\alpha, \alpha', \beta, \beta'$ ）と各種のシグマ因子およびオメガ因子から成り、シグマ因子の変換によってプロモーター認識に違いが現れ、これが各種ストレスに対する重要な応答反応の1つになっている⁽²⁰⁾。オメガ因子はシグマ因子に比べ比較的強固に RNA ポリメラーゼに結合しているが、転写自体に不可欠のものではない。最近 Ishihama らは、ppGpp による緊縮制御の発現にはオメガ因子が必須であること、そしてオメガ因子が ppGpp のセンサーとしての役割を果たしているであろうことを報告している⁽²¹⁾。すなわち、オメガ因子を除去した RNA ポリメラーゼは、本来緊縮制御下にあるべき遺伝子の転写を ppGpp 存在下でも行ってしまう（つまり ppGpp に非感受性になる）ことを *in vitro* で示した。先に述べた *sup* 変異は、このオメガ因子（あるいはベータ因子）の遺伝子上に起きた変異である可能性がある。

最近 Jones と筆者⁽²²⁾は、*S. antibioticus* の *relC* 株は、アクチノマイシン生合成に関与するある種の酵素（フェノキサジノンシンターゼ）の mRNA を生成できなくなっていることを示した。したがって、もし ppGpp が本当に二次代謝誘発のシグナルならば、それは転写レベルで機能している。

3. おわりに

GTP と ppGpp を中心に述べたが、記載した以外の多くの因子および構造物が誘発に関与し、その総合結果として誘発が成り立っていることは容易に想像できる。分化および二次代謝は、炭素源、チッ素源、リン酸によるカタボライトリプレッションを受けることは、もはや古典的事実にまでなったが、誘発機構の十分な理解のためには、これら逆作用としてのメカニズムの分子レベルでの解明も必須であることを強調しておきたい。本文では述べなかったが、*S. coelicolor* のプレート培養では全生育期間を通じて ppGpp の蓄積はほとんどないにもかかわらず、分化も二次代謝も顕著に起きる。このとき、ppGpp の蓄積に代わってアデノシンポリリン酸と思われる未知物質が誘発時に蓄積されている。*relC* 株ではこの蓄積はみられない⁽⁶⁾。これらの事実を現時点で統括的に説明することはできないが、metabolic initiation に限ってみても予想以上に複雑な仕組みになっていることがうかがわれる。

- (1) M. Cashel and K. E. Rudd: "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology," ed. by F. C. Neidhardt *et al.*, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1987, p. 1410.
- (2) K. F. Chater: "Regulation of Prokaryotic Development," ed. by I. Smith *et al.*, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1989, p. 277.
- (3) K. F. Chater and D. A. Hopwood: "Genetics of Bacterial Diversity," ed. by D. A. Hopwood and K. F. Chater, Academic Press, London, 1989, p. 129.
- (4) K. F. Chater: *Trends Genet.*, **5**, 372 (1989).
- (5) E. Freese: "Sporulation and Germination," ed. by H. S. Levinson *et al.*, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1982, p. 1.
- (6) 越智幸三:「放線菌の分化と抗生物質生産に関する遺伝生理学的研究」, 日本放線菌学会誌, **3**, 127 (1989).
- (7) C. Mitchell and J. C. Vary: *J. Bacteriol.*, **171**, 2915 (1989).
- (8) G. Szabo, S. Szezak, S. Vitalis and F. Toth: "Biology of Actinomycetes '88," ed. by Y. Okami *et al.*, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1988, p. 324.
- (9) K. Ueda and O. Hayaishi: *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 73 (1985).
- (10) K. Ochi, A. Penyige and G. Barabas: *J. Bacteriol.*, in press.

- (11) C. Granozzi, R. Belletta, R. Passantino, M. Sollazzo and A. M. Puglia : *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 713 (1990).
 - (12) M. A. Glazebrook, J. L. Doull, C. Stuttard and L. C. Vining : *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 581 (1990).
 - (13) A. Daza, J. F. Martin, A. Dominguez and J. A. Gill : *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 2483 (1989).
 - (14) M. Natsume, K. Yasui and S. Marumo : *J. Antibiot.*, **42**, 440 (1989).
 - (15) D. G. Swan, R. S. Hale, N. Dhillon and P. F. Leadlay : *Nature*, **329**, 84 (1987).
 - (16) K. Ochi : *J. Gen. Microbiol.*, **136**, 2405 (1990).
 - (17) M. J. Babcock and K. F. Kendrick : *J. Bacteriol.*, **170**, 2802 (1988).
 - (18) K. Ochi : *J. Bacteriol.*, **172**, 4008 (1990).
 - (19) M. J. Bibb : Personal Commun.
 - (20) A. Ishihama : *Trends Genet.*, **4**, 282 (1988).
 - (21) K. Igarashi, N. Fujita and A. Ishihama : *Nucleic Acids Res.*, **17**, 8755 (1989).
 - (22) K. S. Kelly, K. Ochi and G. H. Jones : *J. Bacteriol.* in press.
-