放線菌の二次代謝・形態分化に関する分子遺伝学的研究

(2003 年度農芸化学奨励賞受賞)

大西 康 夫

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Key words: *Streptomyces*; secondary metabolism; morphological differentiation; regulation; A-factor

土壌微生物である放線菌は抗生物質をはじめとする多種多様な二次代謝産物を生産することで知られるグラム陽性細菌であり、発酵工業や医薬産業的に重要な菌群である。一方、放線菌はその形態も非常に特徴的であり、一般にカビに似た菌糸状の生育形態を示す(図1)。放線菌のなかでも代表的な一属である *Streptomyces* においては、胞子から出芽した菌糸は栄養増殖細胞である基底菌糸として、枝分かれしながら土壤中に伸長していく。基底菌糸ではほとんど隔壁形成が起こらず、1本の菌糸中には複数の染色体が存在する。ある時期になると基底菌糸から一斉に空中に向かって気中菌糸を伸ばすが、その後、気中菌糸には隔壁が等間隔に形成され、染色体1本1本が分配されたコン

パートメントが成熟して胞子となる。原核生物であるにもかかわらずこのような複雑な形態分化を行うため、放線菌は生物の形態分化に関する基礎的研究の格好の材料にもなっており、基礎・応用の両面から非常に重要な研究対象と言える。

筆者の所属する醗酵学研究室では、これまでさまざまな有用微生物の研究が行われてきているが、放線菌は重要な研究対象の一つである。筆者は大学院博士課程修了後の1996年4月より醗酵学研究室の放線菌研究グループに加わり、その後多くの学生・大学院生あるいは博士研究員とともに研究を行ってきた。受賞総説ということであるので、本稿においてはこの7年間の筆者らの研究成果をまとめてみたい。

1. *Streptomyces griseus* の二次代謝・形態分化を誘導する A-ファクター制御カスケードに関する研究

今から約35年前、旧ソ連の Khokhlov 博士らは *S. griseus* 自身が生産しストレプトマイシン(Sm)生産および形態分化を誘導する物質を同定し、A-ファクター(autoregulating factor)と命名した。この興味深い研究はなぜか他の研究グループに確認されることなく長い年月が経過したが、醗酵学研究室では約20年前にA-ファクターを再発見し、以後、A-ファクターの作用機構の解明に取り組んできた^{1)~6)}。A-ファクターは 10^{-9} Mのごく低濃度で *S. griseus* の複数の二次代謝産物の生産および形態分化を誘導する“微生物ホルモン”であり、特異的レセプタータンパク質(ArpA)を介してその機能を発揮する。ArpAに関しては、筆者が本研究課題に取り組む以前に遺伝子がクローニングされ、その機能について以下のことが明らかにされていた^{7), 8)}。(1) ArpA はリプレッサー型のDNA結合タンパク質であり、A-ファクター非存在下においてはDNAに結合し、二次代謝・形態分化の開始に重要な遺伝子(遺伝子X)の発現を抑制している。(2) ArpA はA-ファクターと結合することによって速やかにDNAから解離

図1 放線菌 *Streptomyces griseus* の生活環
S. griseus において、基底菌糸から気中菌糸への分化ならびに二次代謝産物の生産はA-ファクターによって誘導される。このため、A-ファクター欠損株は図中の下段のステージに進むことができない。

Molecular genetics of *Streptomyces*—Regulation of secondary metabolism and morphological differentiation
Yasuo OHNISHI (Department of Biotechnology, Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo)

し、遺伝子 *X* の発現抑制が解除される。では、二次代謝・形態分化開始の鍵を握る ArpA の標的遺伝子、遺伝子 *X* とはいかなる遺伝子なのか？これが筆者の放線菌研究のスタート地点であった。

1. 遺伝子 *X* の取得とストレプトマイシン生成に至る A-ファクター制御カスケードの解明

遺伝子 *X* 取得の糸口となる以下の観察がすでになされていた。(1) Sm 生合成遺伝子クラスター中の経路特異的制御タンパク質をコードする *strR* は A-ファクター依存的に転写される⁹⁾。(2) A-ファクター存在下においてのみ *strR* プロモーター上流に結合するタンパク質が存在する¹⁰⁾。このタンパク質は Sm 生合成遺伝子クラスターのマスタースイッチである StrR に A-ファクターシグナルを伝えるタンパク質であると予想され、AdpA (A-factor-dependent protein A) と命名されていた。このような状況の下、筆者は AdpA の精製に着手した。

すでに AdpA と結合する約 100 bp の DNA 断片が同定されていたため、AdpA の検出には本 DNA 断片をプローブとしたゲルシフトアッセイを用いた。ジャー培養した菌体(約 15 L 培養分)より得られた細胞質画分を硫酸分画後、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーおよび特異的結合配列を有する DNA を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供し、AdpA を SDS-PAGE 上でほぼ単一バンドにまで精製した。さらに SDS-PAGE ゲルからの溶出を行い、精製タンパク質(約 30 μg)を得た¹¹⁾。精製タンパク質の N 末端および内部アミノ酸配列を決定し、定法により *adpA* 遺伝子をクローニングし塩基配列を決定した¹¹⁾。AdpA は中央やや C 末端より HTH モチーフの DNA 結合配列を有し、AraC タイプの転写活性化因子と相同性があった。また、大腸菌において生産した組換え AdpA は *strR* プロモーター上流領域に結合することを確認した。

AdpA は A-ファクター存在下においてのみ検出されるタンパク質であったが、予想どおり *adpA* の転写は A-ファクター依存的に起こっていた¹¹⁾。では、*adpA* 転写の A-ファクター依存性は何によってもたらされているのか？この答えは実に簡単に得られた。*adpA* のプロモーター領域とオーバーラップして ArpA の結合コンセンサス配列が存在し、ここに ArpA が結合することが示されたのである¹¹⁾。つまり、*adpA* は ArpA の直接の標的遺伝子、すなわち遺伝子 *X* そのものであった。

adpA 破壊株においては、*strR* プロモーターからの転写が全く起こらず Sm も生産されなかった¹¹⁾。一方、*adpA* 過剰発現株においては Sm の生産が 1 日早く開始され生産量も約 10 倍になった¹¹⁾。以上の結果より、クローニン

図2 いかにして A-ファクターは Sm 生産の引き金を引くか？

培養後期において、ある一定濃度にまで生産された A-ファクターは、ArpA による *adpA* の転写抑制を解除する。このようにして発現誘導された AdpA は、*strR* ならびに *aphD* の転写を活性化す。StrR は Sm 生合成遺伝子群の発現を一斉に促し Sm が生合成される。AphD は Sm 耐性を賦与する。

グした *adpA* が確かに *strR* の転写活性化因子をコードすることが示され、Sm 生産に至る A-ファクター信号伝達経路 (A-ファクター/ArpA→AdpA→StrR→Sm 生合成遺伝子群) が初めて明らかとなった(図2)。

一方、染色体上で *adpA* のすぐ下流に存在する *ornA* は自身のプロモーターから恒常的に転写されるとともに、*adpA* と同一転写単位でも転写されることから、*ornA* も A-ファクターによってその転写が活性化される遺伝子であることが明らかになった¹²⁾。*ornA* はオリゴリボヌクレアーゼをコードし、mRNA のターンオーバーに関与していると考えられる¹²⁾。*ornA* 破壊株では生育の遅れが観察されたが、これは *ornA* の破壊によってスムーズな mRNA のターンオーバーが阻害されたためであると推測される¹²⁾。二次代謝・形態分化の開始時期においては、遺伝子発現様式の劇的な変化が起これと考えられ、この際、多くの mRNA のスムーズなターンオーバーが要求されると思われる。このため *ornA* の発現が A-ファクターによって著しく増強されることは合理的であると考えている。

2. AdpA の新たな標的遺伝子の取得と形態分化に向かう A-ファクター制御カスケードの解析

adpA 破壊株では *strR* の転写が起こらず Sm が生産されないことは予想通りの結果であったが、驚いたことに *adpA* 破壊株は形態分化能および A-ファクター依存性の黄色色素（グリキサゾン）生産能を完全に失っていた^{11), 13)}。*strR* は Sm 生合成遺伝子クラスター中に存在し Sm 生合成のみに関与することから、*strR* 以外の複数の遺伝子が AdpA により制御されていることが考えられた。

そこで AdpA が結合する DNA 断片を染色体 DNA ライブラリーより直接取得することにより、AdpA の新たな標的遺伝子を明らかにすることを目指した。まず *S. griseus* 染色体 DNA を制限酵素で部分分解して得られる 300~500 bp の DNA 断片の両末端にアダプター配列を付加した。このライブラリー DNA と組換え AdpA タンパク質をインキュベートし、AdpA-DNA 複合体を形成させた後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により AdpA-DNA 複合体をフリーの DNA と分離し、AdpA が結合した DNA を回収した。次に両末端のアダプター配列をプライマーとした PCR によりこの DNA を増幅し、再び組換え AdpA タンパク質とインキュベートし、同様の操作を行った。この一連のサイクルを数回繰り返すことによって AdpA と結合する DNA 断片を濃縮した後、アダプター中に設計した制限酵素部位を利用して大腸菌ベクターにクローニングした。このようにして、*in vitro* において AdpA が結合する DNA 断片を *S. griseus* 染色体 DNA より 60 種類取得した^{13), 14)}。しかしながら、この中には AdpA 結合部位が ORF の内部に存在するものや、互いに向かい合った ORF 間にあるものも含まれていた。また、AdpA がある遺伝子のプロモーター近辺に結合すると思われる場合でも、その転写への影響が確認できないものも多数あった。AdpA の DNA 認識は比較的寛容なものであることから、*in vitro* で結合できる DNA 配列のすべてが *in vivo* において実際に意味のあるものだというわけではなさそうである。しかしながら、この“ゲルシフト-PCR 法”によって、以下のようなタンパク質をコードする遺伝子を AdpA の新たな標的遺伝子として同定できた。

(1) 気中菌糸形成に必須な新規 ECF σ 因子 AdsA¹³⁾

この方法において最も高頻度で取得された DNA 断片は、ECF ファミリーの置換型 RNA ポリメラーゼ σ 因子と相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子 (*adsA* と命名) のプロモーター領域を含んでいた。*adsA* の転写は A-ファクター非生産株や *adpA* 破壊株においてはほとんど検出されず、AdpA により活性化されることが示された。ECF ファミリーの置換型 RNA ポリメラーゼ σ 因子は、通

常、外界のシグナルを受けて発現あるいは活性化し主要 σ 因子と入れ替わることによって、ある特異的な配列をもつプロモーターからの転写が可能な RNA ポリメラーゼホロ酵素を形成する。*adsA* 破壊株は Sm 生産やグリキサゾン生産といった二次代謝は正常であったが、気中菌糸形成能を失っていたことから、 σ^{AdsA} は気中菌糸形成に必須な遺伝子の転写を活性化していることが示された。放線菌において気中菌糸形成に関与する σ 因子の存在は以前から予想されていたが、本 σ 因子は同時に報告された *Streptomyces coelicolor* A3(2) の σ^{BldN} (*S. coelicolor* A3(2) における σ^{AdsA} のカウンターパート)¹⁵⁾ とともに初めての発見であった。

(2) 気中菌糸形成に関与する菌体外分泌金属プロテアーゼ SgmA (SGMPPII)¹⁶⁾

次に解析した AdpA 結合断片には、すでに全アミノ酸配列が決定されていた菌体外分泌金属プロテアーゼ SGMPPII¹⁷⁾ をコードする遺伝子 (*sgmA* と命名) のプロモーター領域が含まれていた。*adpA* 破壊株においては *sgmA* の転写は全く検出されなかった。AdpA は *sgmA* プロモーターの上流 2 カ所 (-60 付近; A 部位, -260 付近; B 部位) に結合したため、それぞれの部位への AdpA 結合が *sgmA* の転写に及ぼす影響について解析した結果、AdpA の A 部位への結合は *sgmA* の転写に必須であることが明らかになった。一方、B 部位の変異により、培養後期における *sgmA* 転写量の急激な増加が認められなくなったことから、AdpA が B 部位にも結合することで、より効果的に *sgmA* の転写を活性化していることが示唆された。*sgmA* 破壊株では気中菌糸の形成時期が約半日遅れることより、SgmA は形態分化に関与していることが明らかになった。また、SGMPPII はその遺伝子構造より、成熟酵素 (334 アミノ酸) の N 末側に分泌シグナル配列 (30 アミノ酸) およびプロ配列 (203 アミノ酸) を有するとともに C 末側にもプロ配列 (114 アミノ酸) を有する前駆体タンパク質として合成されることが明らかになり、翻訳後のプロセッシングによっても活性発現が制御されていることが示唆された。

(3) 隔壁形成に関与する SsgA タンパク質¹⁸⁾

すでに気中菌糸における隔壁形成に必須な遺伝子として報告されていた *ssgA*^{19), 20)} のプロモーター領域を含む DNA 断片も、AdpA が結合する断片として取得された。A-ファクター非生産株および *adpA* 破壊株においては *ssgA* の転写はほとんど検出されなかった。AdpA は *ssgA* のプロモーター周辺の 3 カ所 (-235 付近, -110 付近, +60 付近) に結合するが、各結合部位に変異を導入した実験より、プロモーター上流の 2 カ所 (-235 付近, -110

付近)への *AdpA* の結合は *ssgA* の転写活性化に必須であることが明らかになった。また, *ssgA* 破壊株を取得しその表現型を解析したが, *ssgA* 破壊株では, 従来の報告どおり, 気中菌糸における隔壁形成が全く観察されなかった。一方, *ssgA* 破壊株の気中菌糸形成開始時期は野生株と全く同じであった。気中菌糸における隔壁形成に必須な役割をもつ *ssgA* の転写が *AdpA* に直接制御されていることが明らかになったことにより, A-ファクターは気中菌糸形成の開始だけでなく, その後の分化プロセスにも直接関与していることが初めて示された。

これら以外に, 遺伝子破壊によっても表現型が変化しなかった機能不明の遺伝子三つが, *AdpA* の標的遺伝子として“ゲルシフト-PCR法”により取得されている。一方, 個々の遺伝子に着目して解析した結果, 次に述べるタンパク質をコードする遺伝子が *AdpA* の標的遺伝子であることが明らかになった。

(4) 気中菌糸形成に必須な制御タンパク質 *AmfR*²¹⁾

AmfR は2成分制御系の応答制御因子と相同性を示すタンパク質であり, 形態分化の開始に必須であることがすでに明らかにされていた^{22), 23)}。*AmfR* は隣接する *amf* オペロン (*amfTSBA*) の転写を活性化すると考えられるが, *AmfS* ペプチドは *AmfAB* トランスポーターによって菌体外に分泌され, 形態分化を誘導するシグナル分子として機能することが明らかになっている²⁴⁾。*AdpA* は *amfR* プロモーターの上流2カ所(−200付近, −60付近)に結合した。*adpA* 破壊株においては *amfR* の転写がほとんど検出されないのに対して, *amfR* プロモーター上流の二つの *AdpA* 結合部位に変異を導入した株においては, *amfR* の転写は野生株に比べてやや弱くなるとともにその転写時期が遅れ, 気中菌糸形成開始時期が遅れることが観察された。この結果より, *amfR* は *AdpA* 支配下にある他の因子によっても制御されていること, および *AdpA* が *amfR* プロモーターに直接結合することによって *amfR* の転写を活性化し, その転写時期を早めていることが示された。

(5) 菌体外分泌セリンプロテアーゼ群

放線菌では, 基底菌糸から気中菌糸への分化過程において基底菌糸の溶菌が起こり, 基底菌糸中の高分子は分解されて気中菌糸生育の栄養源に使われることが知られている。菌体外分泌プロテアーゼのいくつかは基底菌糸中のタンパク質分解に関与していると考えられる。菌体外分泌金属プロテアーゼをコードする *sgmA* が *AdpA* の標的遺伝子であり形態分化に関与していることが明らかになったため, 他の菌体外分泌プロテアーゼ遺伝子についても調べた。その結果, 少なくとも4種の菌体外分泌セリンプロテアーゼ遺伝子(*sprA*, *sprB*, *sprD*, *sprT*)が *AdpA* の標的遺

伝子であることが明らかになった。現在, 遺伝子破壊株を作製し, 各遺伝子の形態分化への関与について解析している。

3. *ArpA* 変異株の解析と A-ファクター制御カスケードにおける *AdpA* の重要性

W119A 変異 *ArpA* は DNA 結合能を保持しているものの A-ファクター結合能を失うため A-ファクター存在下においても DNA から解離しないことが *in vitro* において示され, 119 番 Trp が A-ファクター結合に重要であることがすでに明らかになっていた²⁵⁾。最近, 筆者らは *S. coelicolor* A3(2) より取得した *ArpA* ホモログ (*CprB*) の X 線結晶構造解析に成功し, *ArpA* の 119 番 Trp に相当する *CprB* の 127 番 Trp がリガンド結合ポケット内に位置していることを明らかにしている。この W119A 変異を染色体上の *arpA* に導入した株 (*ArpA*-W119A 株) および *arpA* 破壊株を作製し, その表現型を解析した。*arpA* 破壊株では予想どおり, 二次代謝および形態分化が野生株より早まり, *ArpA* が二次代謝・形態分化に抑制的に働いていることが改めて示された。一方, *ArpA*-W119A 株においては二次代謝・形態分化が完全に抑制され, *in vivo* においても変異型 *ArpA* が *adpA* の転写を抑えていることが示唆された。さらに, この *ArpA*-W119A 株において *lac* プロモーターを用いて *adpA* を強制発現させたところ, 二次代謝・形態分化が野生株レベルにまで回復した。この結果は, *ArpA* の標的遺伝子は *adpA* のみであり, *adpA* が発現すれば以降の A-ファクター制御カスケードが正常に機

図3 *S. griseus* における A-ファクター制御カスケード
A-ファクターシグナルは *AdpA* を起点に分岐し増幅される。*AdpA* は二次代謝, 形態分化の両方を制御するグローバルな制御タンパク質である。

能し、二次代謝・形態分化が正常に行われることを示している。

以上述べたように ArpA の標的遺伝子 *adpA* の同定および AdpA の新たな標的遺伝子の取得および解析により、まさにカスケードと呼ぶにふさわしい A-ファクターによる遺伝子発現制御機構を明らかにできた (図 3)。A-ファクターと同様の γ -ブチロラク톤を有する低分子化合物による制御は放線菌に普遍的に存在するため、その制御メカニズムの解明には大きな関心がもたれてきたが、筆者らの研究は放線菌の γ -ブチロラク톤制御研究をリードするものであると自負している。

2. 放線菌の二次代謝産物生合成酵素に関する研究

上述した A-ファクター制御カスケードの解明とともに、放線菌の二次代謝産物生合成酵素に関する研究を行ってきた。そのうちのいくつかについて紹介させていただきたい。

1. 放線菌の新規ポリケタイド合成酵素 RppA

以前醗酵学研究室において、放線菌に赤茶色素生産を賦与する遺伝子として、植物のカルコン合成酵素 (CHS) に相同なタンパク質をコードする遺伝子 *rppA* が *S. griseus* より取得されていた²⁶⁾。これは、植物界以外から CHS ホモログが見つかった初めての例であった。当時、RppA の触媒反応を明らかにするには至らなかったが、筆者らはこの興味深い酵素に関する研究を再開し、本酵素が 5 分子のマロニル CoA から 1,3,6,8-テトラヒドロキシナフタレンを合成する新規なポリケタイド合成酵素であることを明らかにした²⁷⁾ (図 4)。また、遺伝子破壊株の解析より、本酵素が放線菌のメラニン様色素の生産に必須な遺伝子であることを明らかにした²⁷⁾。

RppA はそれまで知られていたタイプ III 型 (CHS 型) ポリケタイド合成酵素とは異なり、伸長基質であるマロニル CoA がスターター基質としても使われるという興味深い性質を有している。さらに、その反応における伸長回数は 4 回であるが、これはタイプ III 型ポリケタイド合成酵素の中では最も多い回数である。筆者らはこの RppA の特異な反応機構の解明および RppA の“ものづくり”への

図 4 RppA の触媒反応

RppA は 5 分子のマロニル CoA から 1,3,6,8-テトラヒドロキシナフタレン (THN) を合成する。

応用を目指して研究を続け、RppA の基質特異性の詳細を解明する²⁸⁾とともに、マロニル CoA がスターター基質となるためには 224 番アミノ酸側鎖の芳香環が必須であること²⁹⁾などを明らかにしている。

2. 放線菌の 4-クマロイル CoA リガーゼホモログの取得とフラボノイド発酵生産への応用

4-クマロイル CoA リガーゼ (4CL) は植物のフラボノイド合成に関与するフェニルプロパノイド経路の鍵酵素であり、4-クマリン酸に CoA を結合する反応を触媒する。フラボノイドはさまざまな生理活性を有しているため有用な化合物であり、筆者らは植物でしか生産されないフラボノイドを微生物において発酵生産させることを目指して研究を行ってきた。筆者らはこの研究の過程で、それまで植物にしか存在しないと考えられてきた 4CL とアミノ酸レベルで 40% 以上の相同性を有する遺伝子をゲノム解読が進行中であった *S. coelicolor* A3(2)に見いだした。そこで、本遺伝子をクローニングし、大腸菌で生産させた酵素を用い

図 5 植物および組換え大腸菌におけるフラボノイド生合成経路

植物でのフラボノイド生合成経路を灰色矢印、PAL, ScCCL, CHS を導入した組換え大腸菌におけるフラボノイド生合成経路を黒色矢印で示した。

て、その基質特異性について解析した³⁰⁾。本酵素は植物 4CL と比べて遜色のない 4CL 活性を有していたが、驚いたことにその基質特異性は植物 4CL とは異なっており、植物 4CL ではほとんど基質とならないシナモン酸を非常に良い基質とすることが明らかになった。このため筆者らはこの酵素を ScCCL (*S. coelicolor* Cinnamoyl-CoA Ligase) と命名した。ScCCL の放線菌での機能は不明であるが、本酵素は微生物でのフラボノイド発酵生産に非常に有用であった。ScCCL は 4-クマリン酸だけでなくシナモン酸も基質として利用できるため、チロシアンモニアリアーゼ活性を有するフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) およびカルコン合成酵素 (CHS) と組み合わせて用いることによって、チロシン、フェニルアラニンからそれぞれナリンジェニンカルコン、ピノセンプリンカルコンを生産できる (図 5 参照)。筆者らはこれらの酵素遺伝子を導入した組換え大腸菌を用いて、世界で初めてフラボノイドの発酵生産に成功した³¹⁾。

3. グリキサゾン生合成遺伝子群の解析および 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸の発酵生産

すでに述べたように *S. griseus* は A-ファクターに応答して黄色色素を生産する。本黄色色素は複数の類縁化合物からなるが、そのうちの主要化合物二つの化学構造を決定し、グリキサゾンと命名した (図 6A 参照)。次に、グリキサゾン非生産株を UV 変異により取得し、この株を宿主としたショットガンクローニングによって、グリキサゾン生合成遺伝子群 (13 遺伝子, 約 15 kb) を取得した。グリキサゾン生合成遺伝子群の転写制御および各遺伝子の機能に

図 6 予想されるグリキサゾン生合成経路 (A) と 3,4-AHBA からのポリ-2,5-ベンズオキサゾールの合成 (B) (A) グリキサゾンの生合成中間体は 3,4-AHBA であると考えられる。(B) 3,4-AHBA は強度・耐熱性に非常に優れた性質を示すスーパー繊維, ポリ-2,5-ベンズオキサゾールの合成原料として有用な化合物である。

については現在解析中のため詳述は控えるが、二つの遺伝子 (*griH*, *griI*) を放線菌で過剰発現させると 3-アミノ-4-ヒドロキシ安息香酸 (3,4-AHBA) が培地中に大量に生産されたことなどから、3,4-AHBA がグリキサゾンの生合成中間体であると考えている (図 6A)。生物においてベンゼン環を生合成する経路としてはシキミ酸経路がよく知られているが、*griH*, *griI* が関与する 3,4-AHBA の生合成経路は、シキミ酸経路とは異なった新規な経路であると考えられ、現在その解明に取り組んでいる。一方、3,4-AHBA は強度・耐熱性に極めて優れた性質を示すスーパー繊維 (ポリ-2,5-ベンズオキサゾール) の合成原料である (図 6B)。3,4-AHBA の安価な製造法の開発は、ポリ-2,5-ベンズオキサゾールの実用化において非常に重要な課題である。筆者らが期せずして見いだした 3,4-AHBA の放線菌での発酵生産系は、環境低負荷型プロセスであるうえ、原料を石油に依存しない点において画期的であり、3,4-AHBA の安価な製造法としてたいへん有望であると期待し研究を行っている。

おわりに

以上のように放線菌の二次代謝・形態分化について、主に分子生物学的手法を用いて解析を行ってきた。二次代謝に関しては上述した以外に、*S. griseus* のカロチノイド生合成遺伝子群のクローニングも行った³²⁾。また、形態分化に関しては、気中菌糸形成を経ずに基底菌糸から直接胞子を形成する変異株やそのような形質を引き起こす遺伝子についての解析なども行ってきた^{33), 34)}。一方、組換え放線菌を用いたバイオコンバージョンに関する研究も行ってきた^{35), 36)}。このようにさまざまな角度から放線菌研究に取り組んできたわけであるが、改めて放線菌の潜在能力の高さを痛感している。放線菌は基礎と応用の両面から研究に取り組む“農芸化学”にはうってつけの研究材料である。今後“農芸化学”の精神を大切にして研究に精進していきたいと思う次第である。

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科醗酵学研究室で行われたものであります。研究の機会を与えていただき、終始ご指導ご鞭撻をいただきました東京大学教授・堀之内末治先生に心より感謝いたします。東京大学名誉教授、日本大学教授・別府輝彦先生には、研究者としての基礎をご指導していただいたばかりでなく、折に触れ暖かい励ましのお言葉を頂戴いたしました。心より御礼申し上げます。また、ご指導いただきました吉田 稔先生、西山 真先生をはじめとする醗酵学研究室の諸先生ならびに先輩諸氏に心より御礼申し上げます。本研究は醗酵学研究室の多くの学生・大学院生、博士研究員の協力により成し遂げ

られたものであり、共同研究者である皆様に深く感謝いたします。また、さまざまな形で共同研究をさせていただきました学内外の先生方に心より御礼申し上げます。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦下さいました日本農芸化学会関東支部長・北原 武先生ならびにご支援賜りました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

- 1) S. Horinouchi and T. Beppu: *Annu. Rev. Microbiol.*, **46**, 377-398 (1992).
- 2) S. Horinouchi and T. Beppu: *Mol. Microbiol.*, **12**, 859-864 (1994).
- 3) S. Horinouchi: *Front. Biosci.*, **7**, d2045-d2057 (2002).
- 4) 大西康夫, 堀之内末治: 蛋白質・核酸・酵素, **44**, 1552-1561 (1999).
- 5) 大西康夫, 堀之内末治: 化学と生物, **40**, 185-190 (2002).
- 6) Y. Ohnishi: *Actinomycetologica*, **17**, 23-27 (2003).
- 7) H. Onaka, N. Ando, T. Nihira, Y. Yamada, T. Beppu, and S. Horinouchi: *J. Bacteriol.*, **177**, 6083-6092 (1995).
- 8) H. Onaka and S. Horinouchi: *Mol. Microbiol.*, **24**, 991-1000 (1997).
- 9) D. Vujaklija, K. Ueda, S.-K. Hong, T. Beppu, and S. Horinouchi: *Mol. Gen. Genet.*, **229**, 119-128 (1991).
- 10) D. Vujaklija, S. Horinouchi, and T. Beppu: *J. Bacteriol.*, **175**, 2652-2661 (1993).
- 11) Y. Ohnishi, S. Kameyama, H. Onaka, and S. Horinouchi: *Mol. Microbiol.*, **34**, 102-111 (1999).
- 12) Y. Ohnishi, Y. Nishiyama, R. Sato, S. Kameyama, and S. Horinouchi: *J. Bacteriol.*, **182**, 4647-4653 (2000).
- 13) H. Yamazaki, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi: *J. Bacteriol.*, **182**, 4596-4605 (2000).
- 14) S. Horinouchi, H. Onaka, H. Yamazaki, S. Kameyama, and Y. Ohnishi: *Actinomycetologica*, **14**, 37-42 (2000).
- 15) M. J. Bibb, V. Molle, and M. J. Buttner: *J. Bacteriol.*, **182**, 4606-4616 (2000).
- 16) J. Kato, A. Suzuki, H. Yamazaki, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi: *J. Bacteriol.*, **184**, 6016-6025 (2002).
- 17) S. Kojima, T. Kumazaki, S. Ishii, and K. Miura: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1392-1398 (1998).
- 18) H. Yamazaki, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi: *J. Bacteriol.*, **185**, 1273-1283 (2003).
- 19) S. Kawamoto, H. Watanabe, A. Hesketh, J. C. Ensign, and K. Ochi: *Microbiology*, **143**, 1077-1086 (1997).
- 20) H. Jiang and K. E. Kendrick: *J. Bacteriol.*, **182**, 5521-5529 (2000).
- 21) H. Yamazaki, Y. Takano, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi: (submitted).
- 22) K. Ueda, K. Miyake, S. Horinouchi, and T. Beppu: *J. Bacteriol.*, **175**, 2006-2016 (1993).
- 23) K. Ueda, C. W. Hsueh, T. Tosaki, H. Shinkawa, T. Beppu, and S. Horinouchi: *J. Bacteriol.*, **180**, 5085-5093 (1998).
- 24) K. Ueda, K. Oinuma, G. Ikeda, K. Hosono, Y. Ohnishi, S. Horinouchi, and T. Beppu: *J. Bacteriol.*, **184**, 1488-1492 (2002).
- 25) M. Sugiyama, H. Onaka, T. Nakagawa, and S. Horinouchi: *Gene*, **222**, 133-144 (1998).
- 26) K. Ueda, K. M. Kim, T. Beppu, and S. Horinouchi: *J. Antibiot.*, **48**, 638-646 (1995).
- 27) N. Funa, Y. Ohnishi, I. Fujii, M. Shibuya, Y. Ebizuka, and S. Horinouchi: *Nature*, **400**, 897-899 (1999).
- 28) N. Funa, Y. Ohnishi, Y. Ebizuka, and S. Horinouchi: *J. Biol. Chem.*, **277**, 4628-4635 (2002).
- 29) N. Funa, Y. Ohnishi, Y. Ebizuka, and S. Horinouchi: *Biochem. J.*, **367**, 781-789 (2002).
- 30) M. Kaneko, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi: *J. Bacteriol.*, **185**, 20-27 (2003).
- 31) E. I. Hwang, M. Kaneko, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 2699-2706 (2003).
- 32) H.-S. Lee, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi: *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 95-101 (2001).
- 33) J.-W. Seo, Y. Ohnishi, A. Hirata, and S. Horinouchi: *J. Bacteriol.*, **184**, 91-103 (2002).
- 34) Y. Ohnishi, J.-W. Seo, and S. Horinouchi: *FEMS Microbiol. Lett.*, **216**, 1-7 (2002).
- 35) H.-K. Chun, Y. Ohnishi, N. Misawa, K. Shindo, M. Hayaishi, S. Harayama, and S. Horinouchi: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1774-1781 (2001).
- 36) H.-K. Chun, Y. Ohnishi, K. Shindo, N. Misawa, K. Furukawa, and S. Horinouchi: *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **21**, 113-121 (2003).