「リボゾーム工学」による放線菌利用の新展開

New development to utilize *Streptomyces* by “Ribosome Engineering”

独立行政法人 食品総合研究所

越智 幸三 Kozo OCHI

岡本 晋 Susumu OKAMOTO

Key words: ribosome engineering; combined drug-resistant mutation; secondary metabolism; silent genes

はじめに

抗生物質をはじめとし、多くの有用物質の生産を担う放線菌が工業上最も重要な微生物の一つであることは疑いの余地もない。一方、放線菌由来の新規生理活性物質の発見の機会は低下しており、一部では「放線菌（ひいては微生物）の限界」といったことがささやかれているのも事実である。しかしながら、後述するように放線菌は計り知れない潜在能力を秘めており、これらの有用潜在機能を発現させ、その能力を余すことなく引き出してやることは、応用微生物学に携わる者の使命の一つである。筆者らは、「タンパク質合成装置であるリボゾームを操作することにより微生物の潜在遺伝子を活性化できる」という着想のもとに研究を進めてきた。その結果、タンパク質合成阻害をその作用機作とする抗生物質の使用によるリボゾームへの選択的な変異導入法（薬剤耐性選抜法）を開発し、変異型リボゾームによる潜在機能活性化技術「リボゾーム工学」を構築した¹⁾。リボゾーム工学の手法は放線菌に限らずあらゆるバクテリアに適用できるが、レビューの性質上、放線菌での研究・応用例に絞って述べる。

1. ゲノム情報から見た放線菌の潜在能力

2002～3年に2種の放線菌（*Streptomyces coelicolor* A(3)2 および *Streptomyces avermitilis*）の全ゲノム配列が相次いで報告された^{2), 3)}。放線菌のゲノムサイズは8 Mb 強とバクテリアとしては異常に大きく、そこから読み取れる情報は放線菌群の多彩な潜在能力を暗示するものであり、未知の可能性を十分感じさせるものであった。例えば、これらの菌には2次代謝産物の生合成に関与していると考えられる遺伝子クラスターが予想以上に多く存在することが明らかとなっている（*S. coelicolor* では22、*S. avermitilis* では30 クラスター）。これらの2次代謝遺伝子クラスターの中には通常の培養条件下では発現していないもの

のも少なからずあると考えられ、したがってそれらの効率的な発現により、新規有用化合物の発見も十分期待できる。また、放線菌にはその豊富な2次代謝に関連して、多数のシトクロム P450 遺伝子が存在すること（*S. coelicolor* で18種類、*S. avermitilis* で33種類）も特筆すべき点である。これらのシトクロム P450 はさまざまな化合物の酵素変換を行う際の重要なツールになると期待されており、放線菌のもつ重要な潜在能力の一つと言える。さらに、多種多様な物質代謝経路の存在も予想されており、そのため環境修復微生物としての放線菌の可能性も十分に期待できる。

2. 潜在機能発現のための効率的なリボゾーム改良技術「薬剤耐性選抜法」の構築

抗生物質の中には、タンパク質合成阻害剤、すなわちリボゾーム攻撃性の薬剤が多数存在する。このような抗生物質を利用することにより、リボゾームを構成する特定の成分（タンパク質あるいはRNA）に選択的に変異を導入することができる。筆者らは、放線菌 *Streptomyces lividans* および *S. coelicolor* A3(2)における青色抗生物質「アクチノロージン」の生産を放線菌潜在機能のモデルとし、その活性化（生産性の増大）に適した変異導入法の確立を試みた。（*S. lividans* においてはアクチノロージン生合成遺伝子はほとんど発現しておらず、真の意味での潜在機能とみなせる。一方、*S. coelicolor* ではその生産は普通に認められ、既知能力のさらなる活性化を調べるモデルとした。）

アクチノロージンの生産活性化に有効な変異を与える薬剤の一つは有名な抗生物質ストレプトマイシンであった⁴⁾。試験菌からストレプトマイシン耐性変異株を取得すると、その大半はリボゾームタンパク質 S12 の数カ所の特定部位に変異を生じている。ここで得られたさまざまな S12 変異の中でも、88番目のリジンがグルタミン酸に変化した変異（K88E）がアクチノロージン生産の活性化にとりわけ有効であった。また、パロモマイシンに対する耐性変異の導入も S12 タンパク質の改変に有効であり、その場合の高生産変異はパロモマイシンに特有の P91S であっ

図1 「リボゾーム工学」の概念図

リボゾーム本体の改変(左辺)と ppGpp の標的である RNA ポリメラーゼの改変(右辺)を示している。

た⁵⁾。

ストレプトマイシン以外にも、ゲンタミシン、フシジン酸あるいはチオストレプトンといった薬剤によるリボゾームの改変(変異の導入)が放線菌の潜在機能の活性化に有効であること、これらの変異とストレプトマイシン耐性変異が相乗作用を示すことを明らかにしている。リボゾームの改変とは別に、転写にかかわる酵素である RNA ポリメラーゼの薬剤耐性(リファンピシン耐性)による改変もアクチノロージン生産の活性化に有効であり、さらには本変異がリボゾーム変異と相乗的に働くことも実証した^{6)~9)}。すなわち、これら特定の薬剤に対する耐性変異を逐次的に導入し(薬剤耐性選抜法)、翻訳にかかわるリボゾームおよび転写にかかわる RNA ポリメラーゼを改変することによ

り潜在能力を著しく活性化することが可能となる(図1)。このようなアプローチを筆者らは「リボゾーム工学」と名づけている。

3. リボゾーム改変による潜在機能活性化のメカニズム

S12 タンパク質に K88E 変異を導入したリボゾームは、生育の活発な対数増殖期よりも定常期(アクチノロージンの生産が開始される時期)に、より高いタンパク質合成活性を発揮するという特異能力を獲得しており、このことが潜在機能活性化の直接原因であることを突き止めた。これは、生育終了時にはタンパク質合成活性は低下する、という従来のリボゾーム学の常識を覆す発見であった。さらに

は、この K88E 変異型リボゾームの特異能力は、30S と 50S のサブユニットからなる活性型リボゾーム粒子 (70S 粒子) の構造的安定性および定常期の細胞内における翻訳因子の異常蓄積の 2 点に起因していることを明らかにした^{10)~12)}。ちなみに、定常期におけるタンパク質合成能の活性化は、特定のフシジン酸、チオストレプトンあるいはゲンタミシン耐性変異を導入したリボゾームでも見られる。この事実は、潜在機能の活性化に際して、これら異なった耐性変異をさらに逐次導入していくという道を拓くものである。

4. 「リボゾーム工学」技法の有効性

本手法を実用菌株に応用した例として、動物用抗生物質「サリノマイシン」の工業生産株 (*Streptomyces albus* SAM-X 株) の育種がある¹³⁾。この高生産株 (10 g/L) をスタートに、ストレプトマイシン耐性およびゲンタミシン耐性変異、さらにはリファンピシン耐性変異を逐次的に導入することにより、サリノマイシン生産性を倍増 (23 g/L) することに成功した。野生株において生産力を 2 倍に増強することはたやすいが、高度に育種された工業株での 2 倍アップは困難であり、リボゾーム工学の有効性を示すものと言える。ちなみにこの育種操作に要した期間はわずか 3 カ月であった。

放線菌に限らず多くの微生物の潜在能力を高めることができる。放線菌の場合であれば抗生物質生産能を S12 変異によって 5~20 倍に上昇できる。枯草菌ではアミラーゼ生産力を著しく高めることができた。そのような高力価株を薬剤耐性株の中から高頻度 (3~30%) で見いだせる点に最大の特色がある。したがって、スクリーニングのための微生物改造 (図 2) あるいはスクリーニングによって得られた有望株の初期育種に極めて有効と思われる。物質生産のみでなく、シュードモナスの毒性物質 (芳香族化合物) に対する耐性度も 2 倍に上昇した¹⁴⁾。このことは環境改善微生物の創出にも利用できることを示唆している。

図 2 土壌分離放線菌からのストレプトマイシン耐性 (str) 付与による抗生物質生産能の出現
ここに示した土壌分離放線菌 (野生株, 未同定) は抗生物質生産能を有していないが、特定の str 変異を導入した株 (Str-1 株) は抗生物質を生産できるようになっている。抗生物質生産能が発揮されるか否かは、使用した生産培地 (この場合は培地 E と F) にも依存することがわかる。

5. おわりに

本稿では、リボゾームを操作することにより放線菌における潜在能力 (ここでは物質生産) を効率的に活性化できること、すなわちリボゾーム工学の有効性を示してきた。先に述べたリボゾーム工学の原理からして、生育後期の事象すなわち 2 次代謝がその操作対象となるものであり、したがって抗生物質・生理活性物質の宝庫である放線菌は正に格好のターゲットとなる。最後に示した応用例 (サリノマイシン) は、潜在能力の活性化ではない、と考える向きもあるかもしれない。しかし、放線菌のもつ生産能力 (ポテンシャル) を最大限に引き出してやる、という意味でこれもまた潜在能力の活性化の範疇とみなせる。当面の急ぐべき課題は rRNA サイドに生じていると予想される変異を確定させることであろう。これが解明できればリボゾームタンパク質と rRNA という二面作戦が可能になり、次の飛躍を期待できる。

詳細は割愛したが、放線菌を含むバクテリアの 2 次代謝は、リボゾーム上で合成される ppGpp によって正の制御を受けている。すなわち、本文で触れた ppGpp の作用標的である RNA ポリメラーゼの改造も、広い意味での「リボゾーム工学」と考えうる¹⁵⁾。最近、理研・食総研共同で ppGpp の RNA ポリメラーゼ結合部位が決定された¹⁶⁾ので、近い将来 RNA ポリメラーゼを論理的に改造して潜在機能を発現させるための「転写工学」ともいえる研究領域が拓けるかもしれない。筆者らはまた、植物葉緑体にも ppGpp が存在することを見いだしており¹⁷⁾、このことは植物においてもリボゾーム工学の概念が適用できるのではないかという夢を抱かせてくれる。想像を越えたリボゾームの未知機能はまだ期待できる。現在筆者らは、企業と共同で、放線菌において眠っている遺伝子を「リボゾーム工学」により活性化し、新規薬剤の開発を目指すプロジェクトを進行中である。放線菌学がより発展するためには、単に物質生産だけでなく、放線菌まるごとの活用、例えば環境修復、作物生育制御、微生物農薬といった多様な方向からの力強いアプローチが必要かもしれない。筆者らの技法が新たな微生物資源の探索技術および斬新なアッセイ系の開発と相まって、放線菌の有用性がますます高まることを期待している。

- 1) 越智幸三, 川本伸一, 岡本(細谷)仁子: 化学と生物, **37**, 731-737 (1999).
- 2) S. D. Bentley *et al.*: *Nature*, **417**, 141-147 (2002).
- 3) H. Ikeda, J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, and S. Omura: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 526-531 (2003).
- 4) J. Shima, A. Hesketh, S. Okamoto, S. Kawamoto, and K.

- Ochi: *J. Bacteriol.*, **178**, 7276–7284 (1996).
- 5) Y. Okamoto-Hosoya, T. A. Sato, and K. Ochi: *J. Antibiotics*, **53**, 1424–1427 (2000).
- 6) H. Hu and K. Ochi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 1885–1892 (2001).
- 7) H. Hu, Q. Zhang, and K. Ochi: *J. Bacteriol.*, **184**, 3984–3991 (2002).
- 8) J. Xu, Y. Tozawa, C. Lai, H. Hayashi, and K. Ochi: *Mol. Genet. Genomics*, **268**, 179–189 (2002).
- 9) C. Lai, J. Xu, Y. Tozawa, Y. Okamoto-Hosoya, X. Yao, and K. Ochi: *Microbiology*, **148**, 3365–3373 (2002).
- 10) Y. Okamoto-Hosoya, T. Hosaka, and K. Ochi: *Microbiology*, **149**, 3299–3309 (2003).
- 11) T. Hosaka, N. Tamehiro, N. Chumpolkulwong, C. Hori-Takemoto, M. Shirouzu, S. Yokoyama, and K. Ochi: *Mol. Genet. Genomics*, **271**, 317–324 (2004).
- 12) 越智幸三: 放線菌学会誌, **18**, 7–13 (2004).
- 13) N. Tamehiro, T. Hosaka, J. Xu, H. Hu, N. Otake, and K. Ochi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6412–6417 (2003).
- 14) K. Hosokawa, N-H. Park, T. Inaoka, Y. Itoh, and K. Ochi: *Environ. Microbiol.*, **4**, 703–712 (2002).
- 15) K. Ochi, S. Okamoto, Y. Tozawa, T. Inaoka, T. Hosaka, J. Xu, and K. Kurosawa: *Adv. Appl. Microbiol.* (Academic Press, London), **56**, 155–184 (2004).
- 16) I. Artsimovitch, V. Patlan, S. Sekine, M. N. Vassilyeva, T. Hosaka, K. Ochi, S. Yokoyama, and D. G. Vassilyev: *Cell*, **117**, 299–310 (2004).
- 17) K. Takahashi, K. Kasai, and K. Ochi: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 4320–4324 (2004).
-