

# 異属間相互作用により誘導される放線菌の特殊代謝

浅水 俊平\*・尾仲 宏康

*Streptomyces*属に代表される放線菌は、一般的に土壌に棲息し、菌糸状に生育するグラム陽性細菌であり、臨床的に重要な創薬源となる生物活性二次代謝産物の生産者としてよく知られている。近年のゲノム解析は、*Streptomyces*属一株につき20–40個もの「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在することを明らかにし、実験室における培養では放線菌がもつ多種多数の二次代謝能力の極限られた一部分しか実際には見いだされていないことを示した。

## 放線菌の特殊代謝の活性化

二次代謝は、実験室環境における純粋培養ではその生育に必須でないことから、これまで一次代謝に対し「二次的」代謝としてとらえられてきたが、実は自然環境中における環境適合などにおいて重要な役割を果たすことから、特に生態学的な側面に注目した研究では「特殊代謝 (specialized metabolism)」と言われることが多くなってきている<sup>1)</sup>。典型的な例では、微生物は生育に必須な鉄を、これが枯渇した環境中から積極的に獲得するために鉄イオン ( $\text{Fe}^{3+}$ ) をキレートする低分子化合物であるシデロフォアを生産し、環境適合する<sup>2)</sup>。

放線菌二次代謝の活性化には、ホルモン様の低分子化合物を利用した制御や環境ストレスに対する応答機構が存在する。*Streptomyces*属の微生物ホルモン様物質として知られる $\gamma$ -ブチロラクトン系低分子化合物 (A-factor など) は、形態分化および二次代謝調節に関与することが知られている<sup>3)</sup>。*Streptomyces coelicolor* A3(2)は、色素性二次代謝産物であるウンデシルプロディジオシン (RED) やアクチノロージン (ACT) を生産する能力を有するが、それらの化合物を生合成する遺伝子クラスターの活性化につながる他の因子についても、過去にいくつか研究例が存在する。たとえば、培養条件によっては無機リン酸を制限すると*S. coelicolor* A3(2)におけるREDおよびACTの産生は活性化される<sup>4)</sup>。また細胞膜ペプチドグリカン構成成分であるN-アセチルグルコサミンは最小培地条件下で*S. coelicolor* A3(2)におけるREDおよびACTの産生を活性化する<sup>5)</sup>。低分子化合物では、PI因子、goadsporin、hormaomycinなどもまた*Streptomyces*属細菌の二次代謝に影響を及ぼすことが報

告されている<sup>6)</sup>。

## 微生物間相互作用と特殊代謝

微生物間相互作用における二次代謝産物の役割についての研究例も近年増えてきており、細菌-細菌または細菌-真菌間の相互作用と二次代謝産物の役割がより注目されている。*Bacillus subtilis*は、*S. coelicolor* A3(2)の気中菌糸形成を阻害する界面活性剤様の低分子サーファクチンを分泌し、*Streptomyces* sp. Mg1株はこのサーファクチンを特異的に分解する酵素を分泌し、対抗している<sup>7)</sup>。*B. subtilis*との未知の相互作用に対して、*S. coelicolor* A3(2) (または*S. lividans*) はREDを生産するが、*B. subtilis*がバシラエンを生産すると、そのRED生産は阻害される<sup>8)</sup>。*S. coelicolor* A3(2)と他の放線菌間の相互作用ではまた、シデロフォアであるデスフェリオキサミンアシル化誘導体の特異的生産による環境中の $\text{Fe}^{3+}$ の競合なども知られている<sup>9)</sup>。

物質の添加やリボソーム工学など潜在的二次代謝産物の活性化のさまざまな方法についてこれまで報告されているが<sup>10)</sup>、物理的な接触相互作用が微生物における二次代謝の活性化に関与することを提唱する例は依然として数が少ない。Brakhageらは、*Streptomyces rapamycinicus*が*Aspergillus nidulans*によるポリケチド抗生物質生合成の活性化の間に*A. nidulans*菌糸に直接付着しているSEM画像を示した<sup>11)</sup>。この*A. nidulans*によるポリケチド抗生物質生合成遺伝子の発現活性化は、Saga/Adaを介するヒストンアセチル化を介して起こることが明らかにされている<sup>12)</sup>。これらの結果は、ケミカルコミュニケーション以外にも、直接的な物理的相互作用が微生物間のコミュニケーション手段として普遍的に存在していることを暗示している。しかしながら、物理的付着によってどのようなシグナルが生成し、どのように最終的に二次代謝の活性化に伝達されるかは未解明である。

## MACBによる放線菌二次代謝の活性化

1種類の放線菌が20–40個のもの二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを保持し、しかも種間で多く異なる理由について未だ明確な答えは得られていない。一つには生育する環境において、生存競争や環境適合のために

\*著者紹介 東京大学大学院農学生命科学研究科 (特任助教) E-mail: asamizu@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

進化・発達させてきたと考えられる。そのことから複雑な微生物群からなる自然生育環境を模倣することにより、微生物間相互作用に起因する、これまでに知られていないような放線菌の環境適合の仕組みが発見し、放線菌の「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子クラスターがコードする化合物を得られると考えられる。

2種類の色素性抗生物質 (REDおよびACT) の生合成遺伝子をゲノム中に有するが、普段は発現していない *Streptomyces lividans* TK23 を二次代謝誘導細菌株スクリーニングのための指標株として使用したところ、土壌から分離されたミコール酸含有細菌 (以下MACB) である *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 が、*S. lividans* の色素生産を強く誘導することを発見した<sup>13)</sup>。興味深いことに、この効果は他の属種のMACBによっても誘導された。さらに *T. pulmonis* などのMACBは広範囲の放線菌「潜在的」二次代謝の生産を活性化し、新規天然物として、alchivemycin A, arcyriaflavin E, chojalactone A-C, niizalactam A-C, dracolactam A-B<sup>14)</sup>, umezawamide A-B<sup>15)</sup>, 5-alkyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline 類,

streptoaminal 類<sup>16)</sup>などが単離された<sup>17)</sup> (図1)。このような放線菌とMACBの共培養による潜在的二次代謝の活性化法を「複合培養 (combined culture)」と呼んでいる。また最近では本方法に着想を得て、放線菌とMACBの組み合わせから、Bachmannらはciromicin類<sup>18)</sup>を、Bugniらはkeyicin<sup>19)</sup>を発見している (図1)。

MACBはコリネバクテリウム亜属に属し、病原菌である *Mycobacterium tuberculosis*, 工業的グルタミン酸生産株 *Corynebacterium glutamicum*, および有機汚染物質の分解者である *Rhodococcus* 属を含むグラム陽性桿菌の一群に属する。MACBの細胞外膜は、脂質に富む構造を有し、*Mycobacterium* 属細菌の外膜は、glycopeptidolipid, triacylglycerol, diacylglycerol, trehalose 6,6'-dimycolate, およびmycolic acidなどを主成分とする<sup>20)</sup>。これらの外膜脂質のうち、ミコール酸はMACBに特異的に保存された成分である。

### 放線菌二次代謝の活性化する因子は何か？

MACBによる放線菌に対する二次代謝誘導因子を同

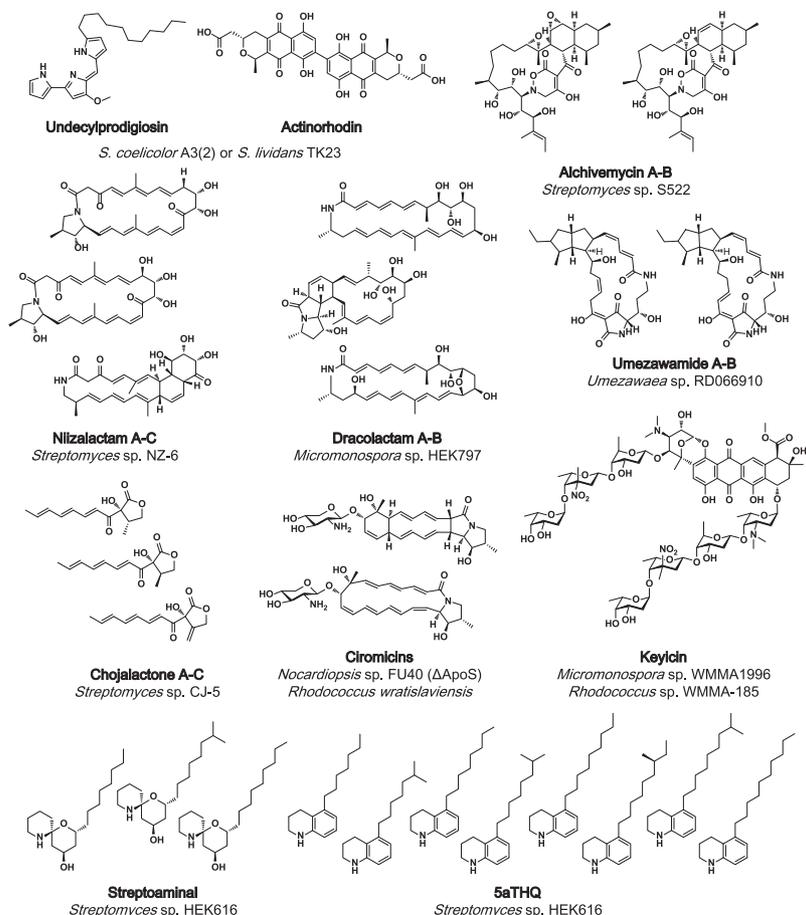


図1. *T. pulmonis* などMACBにより誘導生産される放線菌の二次 (特殊) 代謝産物

定する試みとして、*T. pulmonis*のミコール酸を含む脂質抽出物の添加実験が行われたが、ミコール酸のみでは放線菌の二次代謝を誘導しなかった<sup>13)</sup>。また*T. pulmonis*によって産生された拡散性の低分子化合物による活性化を検証するために、*T. pulmonis*培養液ブタノール抽出物およびフィルターろ過した培養上清の添加実験を行ったが、これらも誘導活性を示さなかった<sup>13)</sup>。さらに、*T. pulmonis*および*S. lividans*の二つの培養層を透析膜などで分割することができる二層式フラスコを用いた実験で、*T. pulmonis*の生育による培地状態の動的変化に起因する生産への影響を検証したが、*S. lividans*の色素生産は誘導されなかった<sup>13)</sup>。また、*Corynebacterium glutamicum*の細胞膜ミコール酸層を欠損した変異株 (*pks13 :: Km<sup>r</sup>*) がその誘導能を消失していることも明らかになっていた<sup>13)</sup>。つまり*S. lividans*の色素生産活性化現象は、これまで知られている放線菌二次代謝活性化因子とは異なる機構を有していることが考えられた。

#### MACB外膜の接触に応答するのか？

細胞外膜にミコール酸が存在するMACBの細胞構造が、*S. lividans*の潜在的二次代謝産物 (ACTおよびRED) 生産の誘導をできるかどうかを明らかにするために、細胞構造に損傷のないMACB死菌を、ホルムアルデヒド固定および<sup>60</sup>Coを用いたγ線照射によって調製した<sup>21)</sup>。MACB死菌体の細胞形状を、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて確認したところ死菌細胞に明確な損傷は見いだされなかった。次いで、死菌体中のミコール酸成分を、TLCおよびMALDI-TOF-MSによって分析した。死菌および生菌細胞から抽出した総脂質を、TLCを用いて比較した分析では、生菌または死菌の両試料中の脂肪酸成分に変化がなかった。さらに、ミコール酸のMALDI-TOF-MSを、死菌と生菌との間で比較したところ、死菌体においても生菌と同一のミコール酸成分が観察された。マススペクトル結果とTLC分析から、定性・定量的にミコール酸は死菌調製の処理前後で分解しておらず、ホルムアルデヒド固定およびγ線照射処理によってミコール酸成分の有意な変化は生じなかったことが明らかになった<sup>21)</sup>。

これらの無傷の死滅細胞を使用することにより、*S. lividans*によるREDおよびACTの誘導能を試験した。その結果、ホルムアルデヒド固定または<sup>60</sup>Co-γ線照射によって生成された死菌体は、両者ともに*S. lividans*による色素生成を誘導しなかった<sup>21)</sup> (図2A)。誘導活性試験の結果は、固体培地および液体培地の両方において、

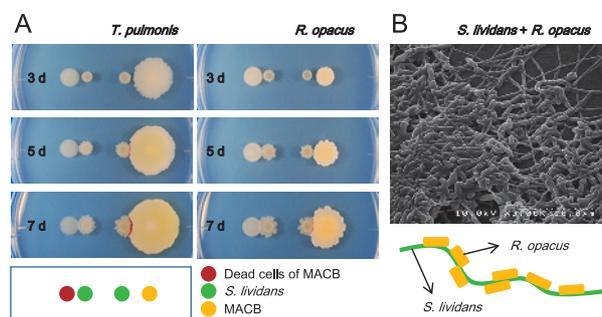


図2. MACB死菌体による色素生産誘導試験 (A) と放線菌とMACBの共凝集 (B)

死滅細胞では*S. lividans*の色素生産応答には不十分であることを示し、MACB生菌のみが有するミコール酸以外の他の何らかの因子が誘導に必要であることを強く示唆した。

#### 親和的な放線菌とMACB

MACB死菌体は色素生産を誘導できなかったことから、*S. lividans*と生菌MACBとの相互作用をさらに調べるために、液体培養中の*S. lividans*とMACBの生菌または死菌との相互作用を、SEMを用いて観察した。複合培養において*S. lividans*菌糸体に対してMACB生菌が接着する様子を観察した<sup>21)</sup> (図2B)。興味深いことに、2種類のMACB細菌*T. pulmonis*および*R. erythropolis*は、*S. lividans*と共凝集を形成していた<sup>21)</sup>。*S. lividans*は、通常、液体培養においてペレットを形成し増殖することから、MACBは培養中に*S. lividans*菌糸体の表面に付着した可能性が高い。一方、死菌体との混合培養においては、MACB死菌体量を増殖定常期と同等以上となるように十分な量を添加したにも関わらず、死菌MACBの*S. lividans*ペレットへの付着は観察されなかった。これは、MACBの接着特性にはミコール酸を有する他に生菌のみが有する特有な性質が関与していることを示唆している。

#### 新しい細菌間コミュニケーション？

複合培養では二つの遺伝的に異なる属の細菌が共凝集体を形成することを示した。*Streptomyces*属細菌とMACBは鞭毛をもたない非運動性細菌であるため、物理化学的特性、線毛または特異的膜タンパク質などのいくつかの因子が*S. lividans*とMACBとの間の細胞接着を媒介すると予測される。脂質に富む外膜が保存されたMACB死菌体は、混合培養において*S. lividans*の菌糸体に付着しなかったことから、細胞表層に存在するミコール酸層などの脂質だけでは*Streptomyces*の細胞膜

のような生体表面への接着には不十分であることが明らかになった。生物の有する接着分子としてアドヘシンタンパク質なども知られており、これは細菌間接着を促進するもっとも一般的な細胞成分であると言われている<sup>22)</sup>。Streptomyces属放線菌において接着タンパク質は報告されていないが、今回の結果から未知のアドヘシン様膜タンパク質が、*S. lividans*とMACBの接着に関与している可能性も考えられる。

ホルムアルデヒド固定およびγ線照射によって損傷のないMACB死菌体を調製することに成功したが、MACB死菌体は*S. lividans*の二次代謝を誘導できなかった。この結果は、MACB死菌体有するミコール酸を含む細胞表層構造が*S. lividans*の色素生産応答の直接的な誘導因子ではないことを示している。また、色素生産誘導時の複合培養状態をSEM観察すると、*S. lividans*とMACB生菌が共凝集していることが観察された。一方、色素生産が誘導されなかったMACB死菌体では共凝集形成は観察されなかった。MACBが誘導する*S. lividans*による色素生産の活性化機構には多くの可能性が考えられるが、*S. lividans*菌糸体に対するMACBの物理的接触が*S. lividans*の二次代謝生産を変化させる引き金となる可能性が示唆された。

## 文 献

- 1) van der Meij, A. *et al.*: *FEMS Microbiol. Rev.*, **41**, 392 (2017).
- 2) Traxler, M. F. and Kolter, R.: *Nat. Prod. Rep.*, **32**, 956 (2015).
- 3) Horinouchi, S. and Beppu, T.: *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, **83**, 277 (2007).
- 4) Martin, J. F. *et al.*: *J. Antibiot. (Tokyo)*, **70**, 534 (2017).
- 5) Urem, M. *et al.*: *Mol. Microbiol.*, **102**, 183 (2016).
- 6) Yoon, V. and Nodwell, J. R.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 415 (2014).
- 7) Hoefler, B. C. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13082 (2012).
- 8) Straight, P. D. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 305 (2007).
- 9) Traxler, M. F. *et al.*: *mBio*, **4**, e00459 (2013).
- 10) Ochi, K.: *J. Antibiot. (Tokyo)*, **70**, 25 (2017).
- 11) Schroeckh, V. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 14558 (2009).
- 12) Nutzmans, H. W. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14282 (2011).
- 13) Onaka, H. *et al.*: *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 400 (2011).
- 14) Hoshino, S. *et al.*: *Org. Lett.*, **19**, 4992 (2017).
- 15) Hoshino, S. *et al.*: *J. Antibiot. (Tokyo)*, doi: 10.1038/s41429-018-0040-4 (2018).
- 16) Sugiyama, R. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **55**, 10278 (2016).
- 17) Onaka, H.: *J. Antibiot. (Tokyo)*, **70**, 865 (2017).
- 18) Derewacz, D. K. *et al.*: *ACS Chem. Biol.*, **10**, 1998 (2015).
- 19) Adnani, N. *et al.*: *ACS Chem. Biol.*, **12**, 3093 (2017).
- 20) Bansal-Mutalik, R. and Nikaido, H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 4958 (2014).
- 21) Asamizu, S. *et al.*: *PloS one*, **10**, e0142372 (2015).
- 22) Kolenbrander, P. E. *et al.*: *Nat. Rev. Microbiol.*, **8**, 471 (2010).