

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14915

研究課題名(和文) 小分子シグナル化合物による休眠二次代謝遺伝子の一括発現と有用生物活性物質の探索

研究課題名(英文) Collective activation of silent biosynthetic pathways for bioactive compounds by small diffusible signaling molecules

研究代表者

荒川 賢治 (ARAKAWA, Kenji)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：80346527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌の二次代謝は、シグナル分子により誘導制御されている。本研究では、放線菌 *Streptomyces rochei* が有するブテノライド型シグナル分子SRBに注目し、菌群における構造多様性および生合成機構、さらには合成酵素と機能の相関性解明を目指し、以下の成果を得た。(1) ランダムに選択した放線菌80株はSRB型分子を有さず、構造特異性が示唆された。(2) SRB生合成について、P450モノオキシゲナーゼSrr0はC-6'メチレン酸化反応に関与することを解明した。(3) SRB型分子の休眠二次代謝誘導能を解析したところ、SRB添加により代謝プロファイルが変化した放線菌の存在が認められた。

研究成果の概要(英文)： Secondary metabolite production in *Streptomyces* is strictly controlled by signaling molecules. We analyzed structural diversity, biosynthesis and biological activity of the signaling molecules SRBs that induce antibiotic production in *Streptomyces rochei*. The followings are short summary in this project.

(1) Around 80 *Streptomyces* strains showed no ability to induce antibiotic production in *S. rochei*, suggesting their signaling molecules are different from SRB-type molecules. (2) P450 monooxygenase Srr0 is responsible to oxidize C-6' methylene group during SRB biosynthesis. (3) Exogenous addition of SRBs caused alteration of the metabolic profiles among some *Streptomyces* strains.

研究分野：生物有機化学

キーワード：シグナル分子 二次代謝生合成 放線菌 ゲノムマイニング P450 デヒドロゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

放線菌は、抗生物質をはじめとする様々な二次代謝産物の生産菌として知られており、人類の健康長寿に多大な貢献をしている。とりわけ、*Streptomyces* 属放線菌の二次代謝は、極微量(nM オーダー)生産されるシグナル分子によりその遺伝子発現が一括制御される。例えば *Streptomyces griseus* のシグナル分子 A-factor (図 1A) は、A-factor 合成酵素 AfsA によって合成され、特異的リセプター ArpA との結合を介して抗生物質ストレプトマイシンを生産誘導する。A-factor 以降発見されたシグナル分子も γ -ブチロラクトンを共通骨格としており、約 60%の放線菌が本タイプをもつと推測されている。一方、近年フラン型分子 MMF、ブテノライド型分子 avenolide (図 1A) が相次いで発見され、残り 40%の構造多様性に興味を持たれた。

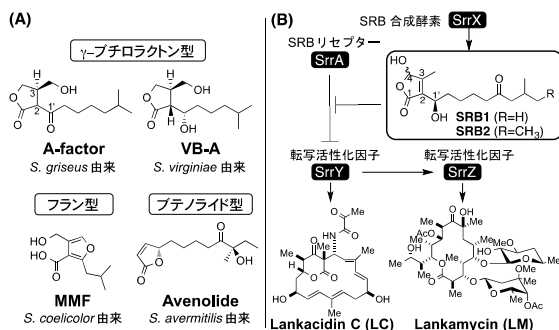


図1. (A) *Streptomyces* 属放線菌シグナル分子の化学構造 (B) *S. rochei* 二次代謝カスケードおよびシグナル分子SRBの化学構造

我々が研究対象としている *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、2つのポリケチド抗生物質ランカサイジン(LC)・ランカマイシン(LM) (図 1B)を生産し、それらの生合成および制御遺伝子は線状プラスミド pSLA2-L にコードされていた [Mol. Microbiol. 48, 1501-10 (2003)]. pSLA2-L 上にシグナル分子合成遺伝子 *srrX* があり、シグナル分子の構造に興味を持たれたため、我々は LC, LM 生産誘導性シグナル分子SRBを培養液160リットルから単離した。化学合成を組み合わせる構造決定を行ったところ、SRBは2,3-二置換ブテノライド骨格を有していた (図 1B)

[Arakawa *et al.*, ChemBioChem 13, 1447-57 (2012)]. SRBは、既知分子(図 1A)と比較してブテノライド骨格および官能基に構造特異性があり、分子進化および多様性を考える上で興味深い。

シグナル分子は二次代謝生産における重要な鍵物質であるにもかかわらず、ほとんどの菌株において構造不明である。その原因は、シグナル分子の生産が極微量 (nM) なためであり、例えば *S. rochei* のSRB生産量は6 $\mu\text{g/liter}$ であった。NMRによる構造解析に至るには、大量培養とともに、微量代謝産物の活性検出を組み合わせた精製法の確立が必要不可欠である。

図2に放線菌シグナル分子の多様性分布を示す。他グループの先行研究において、*S. griseus* や *S. virginiae* など γ -ブチロラクトン型分子生産菌を検定菌とし、それらの抗生物質生産を誘導する放線菌株を調べたところ、約60%の放線菌が γ -ブチロラクトン型分子を有すると報告された [J. Antibiot. 35, 349-58 (1982); Actinomycetol. 9, 57-65(1995)]. しかし残り40%の構造多様性は長い間不明であった。内訳として、[1] SRBなど最近発見されたシグナル分子、[2] シグナル分子非生産、[3] 新規構造、が考えられる。[1]~[3]の多様性解析に際し、本研究は我々が発見したSRBの構造・機能に立脚しているため、従来手法と異なり、以下の特色を有する。

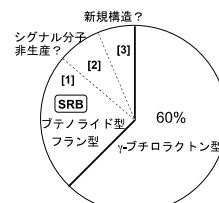


図2. 放線菌シグナル分子の多様性分布 (SRBを含めた残り40%の分布比率は不明)

・シグナル分子制御系の体系化が期待できる

LC, LM 生産回復を指標とするSRB型分子検出システムを確立している。それゆえ、供試菌(120株程度)のスクリーニングを行うこと ([課題1]), SRB型分子の合成酵素およびリセプターのアミノ酸配列情報、さらには基質結合ポケットなどの構造情報の蓄積が期待できる。

・休眠二次代謝の一括活性化が期待できる

シグナル分子は特異的リセプターへの結合を介して二次代謝誘導を引き起こすため、[2] に該当する菌株は、抗生物質非生産である可能性が高い。すなわち、シグナル分子添加により初めて休眠二次代謝の一括活性化が期待できる(研究計画[課題3])。有用生理活性物質の新規発見が減少傾向にある昨今、本研究の遂行は、放線菌資源に基づく新たな医薬品開発の突破口となり得る。

2. 研究の目的

本研究では我々が発見した *S. rochei* の SRB 型シグナル分子に焦点を当て、(1) 放線菌における多様性解析、(2) 高機能化を指向した生合成機構解析、(3) 休眠二次代謝の一括発現誘導、を遂行する。

3. 研究の方法

(1) SRB 型シグナル分子の多様性解析

研究目的でも述べたとおり、SRB は 2,3-二置換ブテノライド骨格(図 1B) を有しており、従来報告されていたシグナル分子(図 1A) とは構造が異なる。*S. rochei* の *srrX* 遺伝子破壊株(SRB 非生産株)に既知シグナル分子を添加したところ、いずれも LC, LM 生産誘導活性(いわゆる交差活性)を示さなかった。このことは、言い換えると「SRB 型シグナル分子を唯一の誘導因子とする放線菌の存在」を示唆している。SRB 型シグナル分子をもつ放線菌のスクリーニングは、シグナル分子リセプターの新たなリガンド認識機構や結合様式の解明にもつながり、シグナル分子を介した二次代謝生産制御機構の体系的理解において重要な足掛かりとなる。

そこで本項目では、放線菌における SRB 型シグナル分子の多様性解析を行った。具体的には、放線菌供試株の培養抽出液を *srrX* 破壊株(SRB 検定菌)に添加培養し、LC, LM 生産性回復を調べた。*srrX* 破壊株を用いた SRB 高感度検出系は、すでに当研究室で確立して

おり、5 ml の試験管培養で 60 ng の SRB を検出できる。

なお放線菌供試株として、当研究室や広島大学微生物遺伝資源保存室(HUT)で保管している放線菌株約 120 株を用いた。

(2) 高機能化を指向した SRB の生合成機構解析

SRB 合成酵素遺伝子 *srrX* (*orf85*) 近傍には還元酵素 *srrG* (*orf81*)、ホスファターゼ遺伝子 *srrP* (*orf83*)、P450 遺伝子 *srrO* (*orf84*)、チオエステラーゼ遺伝子 *srrH* (*orf86*) などがコードされており、SRB 生合成への関与が考えられた(図 3)。とくに C-1'水酸基、C-6'ケト基は SrrG, SrrO による官能基変換が示唆され、さらに Δ 2,3-二重結合や C-5 メチル基、C-4 位へ

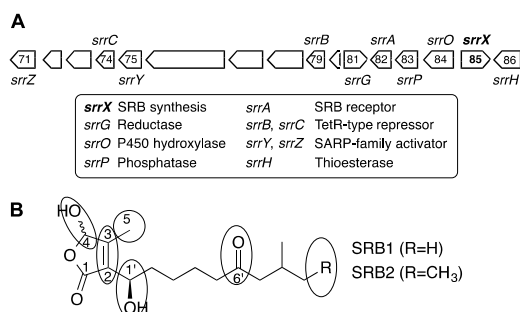


図3. (A) 推定 SRB 生合成遺伝子クラスター
(B) SRB 生合成経路に基づいた構造活性相関

ミアセタール基の存在は、従来の γ -ブチロラクトン型分子とは異なる生合成マシナリーを示唆している。SRB 生合成機構の解明は、構造改変による誘導活性向上の観点からも興味深い。

そこで上述の遺伝子破壊株を構築して代謝産物解析を行い、SRB 生合成機構解明を目指した。さらに 6'-デオキシ SRB など、SRB 生合成中間体の構造活性相関を明らかにするため、該当化合物の基質合成を行う。申請者らは SRB1, SRB2 の化学合成を行っており [ChemBioChem 13, 1447-1457 (2012)]、炭化水素鎖長の改変を含めた構造類縁体の合成スキームはすでに確立している。SRB 生産量は 6 μ g/liter であり、生合成遮断株から得られる SRB 中間体はそれ以上に低収量と考えられる。そこで 30 リットル規模での培養も遂行した。

(3) SRB 型シグナル分子を利用した休眠二次代謝遺伝子の発現誘導

土壌から分離した放線菌のうち、約 2-3 割は抗生物質非生産といわれている。予備的実験として、本研究課題で使用する放線菌株の阻止円検定を行ったところ、2 割の菌株において検定菌 *Micrococcus luteus* に対する抗菌活性を示さなかった。原因の一つとして、シグナル分子の合成欠損が挙げられる。シグナル分子は特異的リセプターへの結合を介して二次代謝誘導を引き起こすため、シグナル分子の合成欠損株は、同時に抗生物質非生産の可能性が高い。図 2 で示したシグナル分子構造多様性は、 γ -ブチロラクトン型分子の有無を指標にしたものであり、本項に該当する菌株は、「残り 40%」の [2] に分類される。

そこで本項目では、SRB を各供試株に添加培養し、代謝プロファイル変化を抗菌活性試験、HPLC などを駆使して解析した。SRB 添加により二次代謝誘導が引き起こされた場合、該当菌株において何らかの要因で *srrX* ホモログが変異・欠失していたと考えられる。本課題で掲げるシグナル分子相補実験は、対象菌のシグナル分子制御系の活性化を促すものであり、休眠二次代謝の一括発現に有効である。

4. 研究成果

(1) SRB 型シグナル分子の多様性解析

(1) において、約 80 株の放線菌について酢酸エチル抽出し、SRB 合成欠損株 KA20 株への添加実験を行ったところ、ランカサイジン (LC) およびランカマイシン (LM) の生産回復は認められなかった。本成果は、放線菌における SRB 型分子の特異性を示唆しており、シグナル分子の多様性解析および新規骨格の発見、さらにそれに伴う二次代謝生産誘導系の構築など、多面的な研究展開の可能性を示すことができた。

(2) 高機能化を指向した SRB の生合成機構解析

P450 モノオキシゲナーゼ *SrrO* の機能解析を行い、SRB 生合成における C-6'メチレン基の酸化反応を司ることを明らかにした。また、*SrrO* の基質特異性解析を行い、C-1'の水酸基の立体化学に関しては、*R* 体、*S* 体ともに C-6'メチレン酸化反応が進行することを明らかにした。また、その変換効率は、若干 *R* 体のほうが高い反応効率で進行していることが分かった。以上、ブテノライド骨格近傍の C-1'位水酸基の立体化学に関しては、*SrrO* の基質認識は寛容であることを見出した。

デヒドロゲナーゼ遺伝子 *srrG* およびホスファターゼ遺伝子 *srrP* の変異株は、いずれも LC, LM を生産せず、SRB 生合成への関与が示唆された。また、*srrG* 破壊株は LC, LM を生産せず、このことによりデヒドロゲナーゼ *SrrG* の、SRB 生合成への関与が示唆された。我々の予想に反して、*srrG* 破壊株における LC, LM 生産は、SRB 添加では回復せず、*srrX* 破壊株(ともに LC, LM 非生産)との共培養により回復した。このことは、*srrG* 変異株により生産される SRB 中間体が、*SrrA* への競合的阻害作用を呈し、その結果 SRB-*SrrA* 複合体の *srrY* からの遊離を阻害している可能性が示唆された。現在、本株からシグナル分子中間体を取得すべく、大量培養を行い、さらに *SrrA* への競合的阻害作用の検証をおこなうべく、*srrA-srrG* 二重破壊株を構築している。

シグナル分子生合成は、その生産量が少ないことから、変換メカニズムの詳細な分子基盤はもちろんのこと、誘導體化などの知見もほとんどない。本成果がシグナル分子生合成の基本システムの理解につながるが大いに期待できる。

(3) SRB 型シグナル分子を利用した休眠二次代謝遺伝子の発現誘導

(1) と関連しているが、「シグナル分子は特異的リセプターへの結合を介して二次代謝誘導を引き起こすため、シグナル分子の合成

欠損株は、同時に二次代謝非生産の可能性が高い」と考えられる。そこで、SRB 型分子の誘導能を[項目 1]で用いた計 80 株にて調べることとした。まず、15 株において解析したところ、SRB 添加により代謝プロファイルが変化した株が 5 株認められた。このことは、放線菌シグナル分子として特異な分子構造と考えられる SRB 型ブテノライド[(1)の結果に基づくと分布割合は 1%以下]に特筆すべき点である。現在、誘導された代謝産物の構造解析を行うべく、SRB 添加サンプルの大量培養に着手している。

本研究の成果として、*Antonie van Leeuwenhoek* に総説の形で発表する(雑誌論文)など雑誌論文計 8 件、さらに 1st China-Japan Joint Symposium(学会発表)、18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes(学会発表)の国際会議招待講演および国内での招待講演(、、など)などの学会発表は計 51 件行った。

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株から単離した新規ブテノライド型シグナル分子 SRB は、従来型分子と構造が異なっており、SRB 型分子を唯一の誘導因子とする放線菌の存在が示唆された。本研究では、SRB 型分子に注目し、(1) 分子多様性解析、(2) 生合成解析・構造活性相関、(3) SRB 分子添加による休眠二次代謝の一括活性化、を挙げた。上述の成果が得られ、放線菌シグナル分子の構造多様性およびゲノムマイニングの新たな分子基盤構築が達成できた。特に (3) に関しては、シグナル分子の添加培養で二次代謝を悉皆的活性化させるアプローチ、であるため、二次代謝クラスターの異種発現や破壊株作製といった遺伝子組換えが不要である。それゆえ、迅速な多検体ハイスルーブット解析が容易であり、尚且つ自然界の様々な複合微生物系にも適用可能である。本研究にて得られた分子基盤を基にして微生物資源を開拓

し、次世代分子創成へのブレークスルーを強力に推進していく所存である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Yamauchi Y., Nindita Y., Hara K., Umeshiro A., Yabuuchi Y., Suzuki T., Kinashi H., Arakawa K., “Quinoprotein dehydrogenase functions at the final oxidation step of lankacidin biosynthesis in *Streptomyces rochei* 7434AN4”, *J. Biosci. Bioeng.*, in press (2018). (査読あり)
DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.03.006

Arakawa K., “Manipulation of metabolic pathway controlled by signaling molecules, inducers of antibiotic production, for genome mining in *Streptomyces* spp.”, *Antonie van Leeuwenhoek*, **111**, 743-751 (2018). (査読あり)
DOI: 10.1007/s10482-018-1052-6

Tsujita N., Kuwahara H., Koyama H., Yanaka N., Arakawa K., Kuniyoshi H., “Molecular characterization of aspartylglucosaminidase, a lysosomal hydrolase upregulated during strobilation in the moon jellyfish, *Aurelia aurita*”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**, 938-950 (2017). (査読あり)
DOI: 10.1080/09168451.2017.1285686

Kamei R., Fujimura T., Matsuda M., Kakihara K., Hirakawa N., Baba K., Ono K., Arakawa K., Kawamoto S., “A flavanone derivative from the Asian medicinal herb (*Perilla frutescens*) potently suppresses IgE-mediated immediate hypersensitivity reactions”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **483**, 674-679 (2017). (査読あり)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.12.083

Ayoub A. T., El-Magd R. M. A., Xiao J., Lewis C. W., Tilli T. M., Arakawa K., Yosi Nindita Y.,

Chan G, Sun L., Glover M., Klobukowski M., Tuszynski J., “Antitumor activity of lankacidin antibiotics is due to microtubule stabilization via a paclitaxel-like mechanism”, *J. Med. Chem.*, **59**, 9532-9540 (2016). (査読あり)

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00597

荒川 賢治, 「放線菌のシグナル分子制御系
改変による休眠二次代謝の誘導」, バイオ
サイエンスとインダストリー, **74**, 40-42
(2016). (査読なし)

[学会発表](計 51 件)

Arakawa K., “Genome mining, biosynthesis, and biological activity of azoxyalkene compound in *Streptomyces rochei*”, Department of Pharmaceutical Sciences Seminars (2018 年 3 月・国際会議招待講演)

Arakawa K., “Structure, activity and biosynthetic investigation of butenolide-type signaling molecules SRBs that induce antibiotic production in *Streptomyces rochei*”, 1st China-Japan Joint Symposium on Natural Product Biosynthesis, Shanghai, China (2017 年 10 月・国際会議招待講演)

Arakawa K., “Genome mining and biosynthetic investigation of azoxyalkene compound produced by a multiple gene disruptant of *Streptomyces rochei*”, 9th US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products, Los Angeles, USA (2017 年 6 月・国際会議招待講演)

Arakawa K., “Manipulation of regulatory pathway controlled by signaling molecules SRBs, inducer of antibiotic production in *Streptomyces rochei*, for genome mining”, 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (2017 年 5 月・国際会議招待講演)

荒川 賢治, 「抗生物質生産をナノモルオーダーで誘導する放線菌シグナル分子の

単離・構造決定・生合成」, 東京大学薬学部天然物化学教室・第 96 回セミナー(2017 年 4 月・招待講演)

Arakawa K., “Biosynthetic investigation of secondary metabolites induced by genome-wide metabolic engineering”, 2nd US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researcher (2017 年 3 月・国際会議招待講演)

荒川 賢治, 「放線菌二次代謝合成・制御系の合理的改変による休眠二次代謝の発掘」, 第 68 回日本生物工学会大会シンポジウム・微生物の潜在能力に注目した有用二次代謝産物の「ものづくり」戦略(2016 年 9 月・招待講演)

荒川 賢治, 「放線菌の抗生物質生産をナノモルオーダーで誘導するシグナル分子の単離・構造決定・生合成」, 日本農芸化学会中四国支部創立 15 周年記念 第 23 回若手シンポジウム(第 8 回 農芸化学の未来開拓セミナー)(2016 年 5 月・招待講演)

[図書](計 1 件)

荒川 賢治(分担執筆)他、「応用微生物学 第 3 版」, pp.131-136, 文永堂出版(2016).

[その他]

研究室ホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/5lab/Arakawa/intro-J.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 賢治 (ARAKAWA, Kenji)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号: 80346527