

平成30年6月5日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18673

研究課題名(和文) ミコール酸含有細菌が刺激する放線菌の二次代謝産物生産の分子機構と普遍性

研究課題名(英文) Investigation of the molecular mechanism of mycolic acid-containing bacteria involved secondary metabolism activation by Streptomyces species

研究代表者

浅水 俊平 (Asamizu, Shumpei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：90709057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌は医農薬として利用される有用天然物の生産者であり、近年のゲノム解析から一菌株当たり20以上の有用天然物を生産する能力があることが示唆されている。本課題ではミコール酸含有細菌による放線菌休眠二次代謝遺伝子の活性化機構に関わる遺伝子の同定を目的に研究を行った。共培養時の網羅的転写再解析の結果、放線菌転写変動遺伝子の数は8時間で全遺伝子の約2割にも及んだ。また、非応答性の放線菌変異株スクリーニングを行い、現在16株のゲノムリシーケンスからいくつかの二次代謝産物生産に関わる変異遺伝子の同定に至った。今後の更なる解析により活性化の分子機構を明らかにすることを現在目指している。

研究成果の概要(英文)：Actinomycetes are producer of valuable secondary metabolites (SM) and are suggested to possess 20-40 of cryptic SM gene clusters. A group of mycolic acid-containing bacteria (MACB) was shown to activate the cryptic gene clusters of actinomycetes, and this project was to identify the gene(s) responsible for the response by Streptomyces to MACB and to elucidate the SM activation mechanism in Streptomyces. Using transcriptomic analysis, we found that the expression variation reached to more than 20% of whole genes in the co-culture by *S. coelicolor* at 8 hours. We also used heavy ion beam induced mutagenesis of *S. coelicolor* and screened the response deficient mutants. Among them, we had re-sequenced the mutant genomes of 16 strains and identified several genes responsible for the production of secondary metabolites. We are now targeting the genes responsible for the activation of SM and investigate molecular basis of the response system to MACB by Streptomyces species.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放線菌 二次代謝 微生物間相互作用 ミコール酸含有細菌 Streptomyces Tsukamurella 網羅的転写解析 変異株解析

1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解析から膨大な数の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが発見され、一菌株ゲノムあたり 20-40 個の「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを持つことが見積もられている。ところが通常の実験室における純粋培養では一菌株あたり発現している二次代謝産物は平均して 5 個程度と言われ、ゲノムから見積もられる数から類推すると、残りの 6-8 割の「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子クラスターは休眠状態にあるか、その生産物が検出できていない状況にある。このような背景から、休眠状態にある「潜在的」二次代謝産物生合成遺伝子クラスターがコードしている天然物を次の医薬農薬資源として活用するための方法論を開発することが、現在急務となっている。

自然界において微生物は複雑に生態系を構築していると考えられるが、一方で実験室では常に単菌化され取り扱われている。細菌にとって二次代謝産物は自然環境中での生物間のコミュニケーションや、他の微生物などを排除するための拮抗物質としての生態学的側面を担うことが考えられる。このことから、自然界において異種・異属の微生物同士では何らかの「他者認識機構」により、普段発現されない二次代謝経路を特異的に発現する可能性は高い。実際に微生物が他者を化学物質などを介した方法で認識し、それに対する応答として生産する物質を特異的代謝産物 (Specialized metabolites) と呼び、事実存在することが実験的に明らかになってきている。

微生物の「他者認識機構」、またそれに伴うお互いの相互作用様式も多様であり、そのことから「微生物間相互作用を介した特異的代謝産物の生産機構」は未だ十分な研究が行われておらず、今後のより深い相互作用様式に関する機能解析が必須である。

2. 研究の目的

異属細菌同士の相互作用から実験室での通常の培養では入らない二次代謝 (天然物生合成) のスイッチが入る。そのような異属細菌同士の相互作用から生じる特異的代謝産物からは、新規化学構造を有する生物活性物質が複数発見され、次世代の抗生物質開発につながる事が期待できる。放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) (または *Streptomyces lividans* TK23) とミコール酸含有細菌 (MACB) では、二次代謝のスイッチが細胞同士の接触に起因することが強く示唆されている。本研究課題では、網羅的転写解析から見出した変動遺伝子について遺伝学的・生化学的に追及し、ミコール酸含有細菌が引き起こす放線菌の二次代謝産物活性化における分子機構を明らかにすることを主目的とし、また本様式の普遍性を触倉島由来自然分離株と MACB の相互作用の解析から明らかにする。

3. 研究の方法

S. coelicolor JCM4020 株を用いて、*Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 株と共培養を行い、純粋培養液と共培養液からトータル RNA を抽出し、RNA-seq による網羅的転写解析を行い、転写変動遺伝子の同定を行った。重イオン ($^{12}\text{C}^{5+}$) 照射により、放線菌の変異株ライブラリーを作製し、ミコール酸含有細菌に対する二次代謝非応答性変異株のスクリーニングを行った。

同一土壌から分離された放線菌とミコール酸含有細菌を二層式フラスコで培養し、代謝産物の解析を行った。共培養時の様子を走査型電子顕微鏡などを用いて、形態観察を行った。

4. 研究成果

(1) 転写変動遺伝子の解析

当初の研究計画では複合培養時の放線菌網羅的転写解析の結果をもとに発現変動遺伝子を不活化するアプローチにより、ミコール酸含有細菌に対する放線菌 *S. coelicolor* JCM4020 株の二次代謝活性化応答に関連する遺伝子を同定する計画を立てた。*S. coelicolor* 株と *Rhodococcus erythropolis* PR4 株を用いた複合培養において初期に発現変動した遺伝子について遺伝学的な解析を行った。しかしながら活性化遺伝子の中で候補遺伝子を選抜し、その変異株を取得し、二次代謝応答性試験を行ったが野生株の応答性と比較し、有意な変化を生じる変異株は得られなかった。

(2) プロモーターアッセイ

また当初の研究計画での網羅的転写解析により同定された活性化遺伝子の上流非翻訳領域の推定プロモーター領域をクローニングしたレポーターアッセイにおいても、有意な変化を生じる変異株を得られなかった。ビオラセイン色素の生産を指標にしたコロニーレベルでの活性化を観察することが出来なかったことから、蛍光蛋白質などを用いた細胞レベルでのプロモーターの活性化に関するレポーターアッセイは保留した。

(3) RNA-seq による再解析

R. erythropolis の完全ゲノムが公開されていることから当初本菌株を網羅的転写解析に用いたが、寒天培地上の対峙培養によってより明確に *S. coelicolor* の二次代謝応答反応を観察できる *T. pulmonis* TP-B0596 を用いた網羅的転写変動解析を行った。2 時間、4 時間、7.5 時間の *S. coelicolor* の転写変動の経時変化を RNA-seq により観察した。7.5 時間の時点で、活性化・抑制に変動した遺伝子は 800 個以上になり、全遺伝子の約 2 割に及んだ。特にリン酸飢餓応答に関連する制御系 (PhoR-PhoP) と鉄欠乏応答 (シデロフォア生合成など) に関連する遺伝子の顕著

な活性化を明らかにした。

(4) 変異株の選抜

網羅的転写変動解析により変動が起こった遺伝子の候補が活性化と抑制を合わせて1600個以上に及んだことから、遺伝子破壊などの遺伝学的解析は、実質的に困難となった。そこで順(古典)遺伝学的手法を用いた関与遺伝子の同定を試みた。重イオン($^{12}\text{C}^{5+}$)ビームを変異源として *S. coelicolor* 孢子に照射し、変異株ライブラリーを作製した。約15万個の孢子から二次代謝非応答性の放線菌変異株をスクリーニングした。最小培地で生育し、期中菌糸形成能に異常がなく、かつミコール酸含有細菌との接触相互作用に色素(二次代謝産物)生産応答しない変異株を59株取得した。現在その内16株についてMiSeq(イルミナ)を用いた次世代シーケンスにより、ショートリードのシーケンスを得た。また *S. coelicolor* JCM4020 株の *de novo* ゲノムシーケンスを PacBio RSII により取得し、アセンブルにより1コンティグを得た。野生株のゲノム配列をリファレンスとして変異点解析を行ったところ、変異株ゲノム中に1から5個程度のDNA変異点を同定した。その内2株について遺伝子相補実験を行ったところ、グルタミン酸合成酵素(GltB)または翻訳伸長因子(FusA)が欠損することにより二次代謝生産が起こらなくなっていることを明らかにした。

(1) 自然分離放線菌の相互作用

放線菌のMACBに対する接触依存的な二次代謝応答機構についてその普遍性を検証するために、自然共分離菌を用いて解析を行った。舳倉島由来共分離菌の中で見いだされた放線菌 *Streptomyces* sp. HEK138A と MACB 細菌 *Mycobacterium* sp. 138B の組み合わせを解析した。二種類の細菌は共培養時に *S. lividans* TK23 株と *T. pulmonis* TP-B0596 株の例と同様に共凝集することがSEM観察などから明らかになった。二層式フラスコ培養を用いた培養では、透析膜で仕切られた条件では抗菌物質の生産誘導が起こらず、二種類の細菌が接触する条件でのみ枯草菌に対する抗菌活性物質が生産されることが明らかになった。特徴的なUV吸収や質量イオンが得られないために、純粋培養液抽出物と複合培養液抽出物との比較解析からも本抗菌物質の同定には至っていないが、現在抗菌活性を指標に化合物の単離精製を試みている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Hoshino S, Wong CP, Ozeki M, Zhang H, Hayashi F, Awakawa T, Asamizu S, Onaka H, Abe I; Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated from a combined-culture of *Umezawaea* sp. and mycolic

acid-containing bacterium. *J Antibiot* (Tokyo), 2018, 査読有
doi: 10.1038/s41429-018-0040-4

Hoshino S, Okada M, Awakawa T, Asamizu S, Onaka H, Abe I; Mycolic Acid Containing Bacterium Stimulates Tandem Cyclization of Polyene Macrolactam in a Lake Sediment Derived Rare Actinomycete. *Org Lett*, 2017, 19巻, 4992-4995, 査読有
doi: 10.1021/acs.orglett.7b02508

Asamizu S; Exploiting the potential of biosynthesis of natural products by actinomycetes: bacterial interaction-driven natural product discovery and biosynthetic machinery. *Actinomycetologica*, 2017, 31巻, S30-S40, 査読無
<http://www.actino.jp/journal/index-j.html>

Asamizu S; Biosynthesis of nitrogen-containing natural products, C7N aminocyclitols and bis-indoles, from actinomycetes. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2017, 81巻, 871-881, 査読有
doi: 10.1080/09168451.2017.1281726

Ozaki T, Yamashita K, Goto Y, Shimomura M, Hayashi S, Asamizu S, Sugai Y, Ikeda H, Suga H, Onaka H; Dissection of goadsporin biosynthesis by in vitro reconstitution leading to designer analogs expressed in vivo. *Nat Commun*, 2017, 8巻, 14207, 査読有
doi: 10.1038/ncomms14207

Sugiyama R, Nishimura S, Ozaki T, Asamizu S, Onaka H, Kakeya H; Discovery and total synthesis of streptoaminals: antimicrobial [5,5]-spirohemiaminals from the combined-culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55巻, 10278-10282, 査読有
doi: 10.1002/anie.201604126

[学会発表](計17件)

浅水俊平, 尾仲宏康, 「異属細菌間の相互作用がもたらす放線菌特殊代謝」, 2018年度日本農芸化学会, 愛知県名古屋市, 2018/3/15-18

A. A. C. Pramana, S. Kawai, M. Kato, S. Asamizu, Y. Sugai, H. Suzuki, Y. Arakawa, H. Onaka, "Discovery of a new antibiotic-siderophore hybrid

compound from combined-culture of *Streptomyces* sp. HOK021 and *Tsukamurella pulmonis*.”, 2018 年度日本農芸化学会, 愛知県名古屋市, 2018/3/15-18

加藤 愛美, 浅水 俊平, 菅井 佳宣, 尾仲 宏康, 「舳倉島自然土壌から共分離された放線菌とミコール酸含有細菌の相互作用」, 2018 年度日本農芸化学会, 愛知県名古屋市, 2018/3/15-18

柳澤昌臣, 浅水俊平, 佐藤勝也, 大野豊, 尾仲宏康, 「重イオンビーム照射変異株を用いた異属細菌刺激による放線菌二次代謝活性化機構の解析」, QST 高崎サイエンスフェスタ 2017, 群馬県高崎市, 2017/12/12-13

浅水俊平, 「放線菌の眠れる二次代謝を呼び覚ます! 異属細菌間での競合と協調」, 第 69 回日本生物工学会大会, 東京都, 2017/9/12

A. A. C. Pramana, S. Asamizu, Y. Sugai, H. Onaka, “ Analysis of combined-culture induced specialized metabolites with antibiosis from *Streptomyces* sp. HOK021 ” , 第 32 回日本放線菌学会, 長野県長野市, 2017/9/7-8

加藤 愛美, 浅水 俊平, 菅井 佳宣, 尾仲 宏康, 「自然土壌から共分離された放線菌とミコール酸含有細菌の相互作用の解析」, 第 32 回日本放線菌学会, 長野県長野市, 2017/9/7-8

下村 杜人, 尾崎 太郎, 杉山 龍介, 西村 慎一, 浅水 俊平, 掛谷 秀昭, 尾仲 宏康, 「複合培養によって生産されるテトラヒドロキノリン化合物の解析」, 第 32 回日本放線菌学会, 長野県長野市, 2017/9/7-8

S. Asamizu, Y. Sugai, H. Onaka “ Transcriptomic responses of *Streptomyces coelicolor* A3(2) in Combined-culture environment with *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596 ” ISBA2017, Jeju Korea, 2017/5/24

A. A. C. Pramana, S. Asamizu, Y. Sugai, H. Onaka, “ Analysis of intergeneric bacteria induced specialized metabolites with antibiosis from soil isolated actinomycetes. ” , The 2nd A3 Foresight Symposium on “ Chemical & Synthetic Biology of Natural Products ” , JEJU, Korea, 2017/5/24

浅水俊平, 菅井佳宣, 尾仲宏康, 「ミコール酸含有細菌に対する放線菌の網羅的転写応答解析」2017 年度日本農芸化学会, 京都市, 2017/3/18

柳澤昌臣, 浅水俊平, 菅井佳宣, 佐藤勝也, 尾仲宏康, 「複合培養における放線菌の二次代謝活性化に關与する遺伝子のイオンビームを用いた逆遺伝学的解析」, 2017 年度日本農芸化学会, 京都市, 2017/3/18

浅水俊平, 「放線菌由来の窒素含有天然物生合成に關する研究」, 第 31 回日本放線菌学会, 東京都文京区, 2016/9/8

浅水俊平, 佐々木槇子, 尾崎太郎, 菅井佳宣, 宮本憲二, 尾仲宏康, 「複合培養における *Streptomyces coelicolor* A3(2) の経時的トランスクリプトーム解析」, 第 31 回日本放線菌学会, 東京都文京区, 2016/9/8

柳澤昌臣, 浅水俊平, 菅井佳宣, 佐藤勝也, 尾仲宏康, 「重イオンビーム遺伝子変異導入法を用いた複合培養による放線菌の二次代謝活性化に關与する遺伝子の探索」, 第 31 回日本放線菌学会, 東京都文京区, 2016/9/8

S. Asamizu, “ Secondary metabolite induction by mycolic acid-containing bacteria in *Streptomyces* ” The 1st A3 Foresight Symposium on “ Chemical & Synthetic Biology of Natural Products ” , Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 2016/8/23

浅水俊平, 「放線菌由来窒素含有天然生物活性物質の生合成に關する研究」, 2016 年度第一回日本農芸化学会関東支部例会, 東京都世田谷区, 2016/6/25

〔その他〕

ホームページ等
<http://microbial-potential.bt.a.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅水 俊平 (ASAMIZU, Shumpei)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教
研究者番号: 90709057