

令和 5 年 8 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18678

研究課題名(和文)放線菌における休眠生合成遺伝子の発現に向けて効率的な培養方法の確立

研究課題名(英文)Development of culture method for activation of silent gene expression in actinomycetes

研究代表者

Ulanova Dana (Ulanova, Dana)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・講師

研究者番号：70610129

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)：多くの二次代謝生合成遺伝子群は通常培養条件下では発現しておらず、未利用遺伝子資源のままであることはよく知られている。培養条件による休眠している二次代謝生合成遺伝子の発現活性化は、新規有用物質の探索に有用な手法であると考えられる。本研究では、海洋性放線菌を用い、休眠生合成遺伝子の探索と培養条件改変による遺伝子発現の活性化の解析を目的とした。結果として、新規天然化合物とその生合成遺伝子を発見し、生産を活性化する培養条件を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られる成果を用いることにより、海洋放線菌だけではなく、陸上放線菌の休眠している生合成遺伝子の発現にも応用する予定であり、新規天然化合物の発見と新規創薬シード開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Bacteria belonging to actinomycete group present a rich source of novel bioactive compounds. These compounds are often used in medicine, agriculture and other fields. However, most bioactive compounds whose respective biosynthetic genes are found in actinomycetal genomes are not produced under laboratory conditions. This research aimed to search for such silent genes and respective compounds in marine actinomycetes and trigger their expression by optimization of cultivation conditions. As the result, one potentially novel polyketide derivative has been isolated and its candidate biosynthetic gene cluster was found in the genome of the producer. Conditions necessary for compound production activation were analyzed and may be applied in future for cultivation of other actinomycete strains.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放線菌 天然化合物 生合成 遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医薬資源の開発は、生理活性を持つ天然化合物を効率よく発見し、創薬シードとして提供できるかが、鍵となる。放線菌は多様な天然化合物(二次代謝産物)を産生する産業上重要な微生物群である。陸上放線菌 *Streptomyces* 属などは多様な生理活性化合物を産生する産業上重要な微生物群である。しかし、従来の分離法や培養法では新規天然物の発見が困難となりつつあり、新規天然物の発見のためには、これまで分離があまり試られていなかった特殊環境下に生育している放線菌株を、効率よく分離することが重要である。近年、世界的に多くの研究者が、海洋放線菌は未開拓な新規化合物の宝庫であることに注目している。また、放線菌における多くの二次代謝生成遺伝子の発現は、通常培養条件下では未活性であり、未利用遺伝子資源のままである。培養条件下による休眠している二次代謝生成遺伝子の発現活性化は、新規有用物質の探索に極めて有用な手法であると考えられる。

2. 研究の目的

今までの研究では、研究代表者は新たな天然物とその生合成遺伝子の探索源として、海洋放線菌に着目し、四国太平洋沿岸域の海底土壌や南海トラフの深海底の堆積物から放線菌の分離を試みた(引用文献 1,2)。その結果、*Salinispora*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia* 属といった希少種を多く含む独自の海洋放線菌コレクションを構築した。本研究では、(i)海洋性放線菌コレクションを用いて、様々な培養条件で培養し、特別な条件でのみ生産される天然化合物の探索、(ii)その関連遺伝子の探索、(iii)天然物生産に影響を及ぼす培地成分の解析を行い、新奇生合成遺伝子と生理活性化合物の探索と共に、放線菌における新規二次代謝産物産生のための新たな効率的培養方法の確立を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、海洋性放線菌コレクションを用い、培養条件の改変により、休眠生合成遺伝子を発現させ、生理活性化合物の探索と二次代謝物産生に影響がある培地成分の同定のために、次の実験を行った。

(1) 放線菌の培養と新規天然物のスクリーニング、単離、構造解析

海洋堆積物から分離された放線菌を用い、通常培養条件下で二次代謝産物の生合成遺伝子を発現していない株を選択した。次に、培地成分を改変し、新しい培養条件下で生産された天然物の生産活性化を液体クロマトグラフィー・質量分析(LC/MS)及び生物活性アッセイにより解析した。天然化合物データベースと検出した化合物のデータを比較し、新規候補化合物を選択した。LC/MS と NMR 解析により、本化合物の構造解析を行った。

(2) 生産者の全ゲノム解析と生合成遺伝子群探索

又、この化合物の生合成の理解のため、生合成遺伝子群の同定が必要である。そのため DNA 抽出をし、次世代シーケンサーにより全ゲノム配列解析をした。ゲノムデータを antiSMASH pipeline を用い、DNA データベースと比較し、ターゲット化合物の関連遺伝子群を同定した。

(3) 天然物生産活性がある培養成分の解析

三つ目の目的において、発現活性化に影響を表す培養条件・培地成分の解析を進めた。各成分を除く培養を行い、目的化合物に影響があるか、LC/MS により分析をした。次、大量生産される培養条件を検討し、構造解析のための十分な量を得た。また、活性化機能を解明するために、各培養条件下で RNA 抽出を行い、目的化合物の生合成遺伝子発現解析を行った。

(4) 深海から新たな放線菌の探索

海洋性放線菌コレクションを広げるために、深海からの堆積物を用い、放線菌分離を行った。四国海盆などの堆積試料を用い、寒天プレートに接種し、28℃ で培養することで、コロニーを得た。16S rRNA 遺伝子、16S-23S rRNA 遺伝子 ITS および *gyrB* 断片をコロニー-PCR によって個々の放線菌コロニーから増幅し、配列を決定した。更に、天然化合物生合成遺伝子解析のため、全ゲノム配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 放線菌の培養と新規天然物のスクリーニング、単離、構造解析

放線菌コレクションから約 10 株の培養結果として、*Streptomyces* 属の 2 株は培養条件(通常と改変した条件)下で、抗菌活性が異なることを検出した(図 1)。次に、LC/MS 解析し、一つの株の生産物は既知天然化合物だったが、もう一つの株(*Streptomyces* sp. N4-1)によって生産された天然物はデータベースに同じ化合物を見つけられなかった。そこで、*Streptomyces* sp. N4-1 株は改変した培養条件において、新規化合物(化合物 1)を生産するとわかってきた。しかし、化合物の生産量が低いため、十分量を得られず、もう一度培養条件を検討した。大量生産の培養条件を検討し、構造解析のために十分な量を精製し、構造同定を完成した。結果として、化合物 1 は、既知ポリケチド(化合物 2)の新規類縁体であるとわかってきた。

(2) 生産者の全ゲノム解析と生合成遺伝子群探索

新規化合物の培養条件依存性を調べるために、生合成経路とその制御機構の解明が必要である。そのために、次世代シーケンサーにより生産者株である

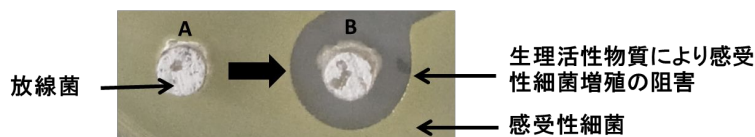


図1. 生理活性天然物の生産の例: 活性がない(A)、活性がある(B)海洋放線菌の培養条件

Streptomyces sp. N4-1 のゲノム解析を行った。ゲノムデータを天然物生合成遺伝子データベースと比較し、II 型ポリケチド合成酵素遺伝子群を同定した。この遺伝子群の数遺伝子は、化合物 2 と生合成遺伝子群と高い相同性を示した。したがって、同定した II 型ポリケチド合成酵素遺伝子群は化合物 1 の生合成に関わる可能性が高いことを示唆した。

(3) 天然物生産活性がある培養成分の解析

発現活性化に影響を表す培養条件・培地成分の検討を行った。各成分を除く培養を行い、目的化合物に影響があるか、解析した。結果として、生産に正影響がある成分を同定した。

次に、遺伝子が発現活性化をする培地成分の解析及び活性化メカニズムを調べた。正影響成分を他の成分の組み合わせと解析し、細菌の増殖及び天然物生産解析を行った。結果として、正影響成分及び補助成分を同定した。また、活性化機能を解明するために、各培養条件下で RNA 抽出を行い、生合成遺伝子発現解析を行った。各培養条件における目的遺伝子の発現レベルが異なると分かった。現在は詳細な解析を実施中である。今後の研究では、詳しい発現解析を行って、活性化メカニズムを解明することを期待する。

(4) 深海から新たな放線菌の探索

4 ヶ月の培養で得られた 2 種の 16S rRNA 遺伝子配列分析を実施した結果、1 つの分離株は *Micromonospora* 属、もう 1 つの分離株は *Salinispora pacifica* と高い配列同一性を示した。後者については、ITS および *gyrB* 配列も *S. pacifica* と高い相同性 (98%) を示した。次、全ゲノム解析を行い、天然化合物生合成遺伝子を同定した。

海洋放線菌は、様々な生物活性化合物の生産者であり、一例として *Salinispora* spp が潜在的に抗癌剤サリノスポラミドを産生することが知られている。本研究は、海洋放線菌の生態学を巡る新たな知見をもたらすものであるといえる。

「引用文献」

1. Ulanova D, Goo KS (2015) Diversity of actinomycetes isolated from subseafloor sediments after prolonged low-temperature storage. *Folia Microbiol (Praha)* 60 (3):211-216.
2. Goo KS, Tsuda M, Ulanova D (2014) *Salinispora arenicola* from temperate marine sediments: new intra-species variations and atypical distribution of secondary metabolic genes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 105 (1):207-219.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Locatelli FM, Goo KS, Ulanova D (2016) Effects of trace metal ions on secondary metabolism and the morphological development of streptomycetes. *Metallomics*, 8(5): 469-480. 査読あり
2. Ulanova D, Uenaka Y, Sakama M, Sakurai T (2020) Draft Genome Sequence of *Salinispora* sp. Strain H7-4, Isolated from Deep-Sea Sediments of the Shikoku Basin. *Microbiol Resour Announc.* 9(45):e00834-20. 査読あり

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Ulanova D, Isolation of actinomycetes from deep-sea sediments of the Pacific Ocean, 日本農芸化学会 2019 年度大会、東京 (2019/3/24-27)
2. Ulanova, D., Isolation of *Salinispora* sp. from deep-sea sediments of the Shikoku Basin, 第 33 回日本放線菌学会大会, 東京 (2018/9/11-12)
3. Ulanova D, Locatelli FM, Secondary metabolite biosynthetic genes in extremophiles – diversity and distribution patterns, 17th International Symposium on Microbial Ecology, Leipzig, Germany, 2018/8/12-17
4. Ulanova D, Sakurai T. 海底堆積物からの放線菌の単離と二次代謝産物の生合成遺伝子研

究, 第 32 回海洋生物活性談話会, 東京 (2018/6/2-3)

5. Ulanova D, Goo KS, Bakal T, Analysis of secondary metabolic potential of actinomycetes from marine core samples, 18th International Symposium on the Biology of Actinomycetes, Jeju, Korea, 2017/05/23-27
6. Ulanova D, Tsuda M, Application of advanced NMR techniques for analysis of actinobacterial metabolism, 第 68 回日本生物工学会大会、富山 (2016/9/28-30)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~ulanova/index.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。