

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05724

研究課題名（和文）海産藻類共生細菌における藻類分化誘導因子の生合成機構解明と生産系の再構築

研究課題名（英文）Elucidation of algal morphogen biosynthetic machinery from an epiphytic marine bacterium and its heterologous reconstitution.

研究代表者

兼目 裕充（KENMOKU, HIROMICHI）

徳島文理大学・香川薬学部・准教授

研究者番号：10399438

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）：アオサ藻綱海産藻類の共生細菌が生産する葉状体分化誘導物質サルーシンの生合成に関わる酵素遺伝子クラスター候補を提示できた。また、抗生物質耐性変異株からスクリーニングで得たサルーシン高生産性変異株の変異部位が、他の細菌類において二次代謝産物の高生産性を示す変異部位と共通する2種類の遺伝子に集約されることを明らかにできた。更に、これに関連する培地組成の検討を行い、数百倍の生産性を示す変異株と培地の組み合わせを明らかにできた。一方、細菌培養液からのサルーシンの精製方法については、吸着樹脂や誘導体化法の検討を行い、従来の精製・分析方法に比して簡便かつ堅牢な前処理方法を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本細菌のサルーシンの生合成酵素遺伝子クラスター候補に着目して、比較ゲノム解析を行ったところ、細菌バイオフィルムの生合成遺伝子クラスターとの関連性が示唆されたことや、サルーシンの生産が単一の協調的発現によらない一次代謝的なものであることが示唆されたことから、アオサ藻綱海産藻類の葉状体分化を中心とした細菌共生システムが、進化的にバイオフィルム内での共生的相互作用に由来する可能性を指摘出来た。また、研究開始当初から数百倍の生産性を示す複数の変異株と培地の組み合わせと簡便かつ効率的な大量抽出・精製法を確立するに至り、光学活性サルーシンの発酵生産を現実的なものとする事ができた。

研究成果の概要（英文）：We were able to present a candidate enzyme gene cluster involved in the biosynthesis of thallusin, a thallus differentiation inducer produced by symbiotic bacteria of marine algae of the Ulva class. In addition, the mutation sites of the high thallusin-producing mutants obtained by screening antibiotic-resistant mutants were concentrated in two types of genes that are common to the mutation sites that show high productivity of secondary metabolites in other bacteria. In addition, we studied the composition of the culture medium in this context and were able to find a combination of mutant strain and culture medium that showed several hundred times higher productivity. On the other hand, for the purification of thallusin from bacterial culture broth, we investigated adsorption resins and derivatization methods and were able to establish a pretreatment method that is simpler and more robust than conventional purification and analysis methods.

研究分野：天然物化学、生物分子科学

キーワード：サルーシン 藻類共生細菌 テルペノイド 生合成 分化誘導 ヒトエグサ 変異株 抗生物質

1. 研究開始当初の背景

アオサ藻綱ヒビミドロ目に属するヒトエグサ類は、いわゆる「あおさ」や「あおさのり」として世界的にも食品需要が高まっているが、環境変化等に起因する採苗や養殖管理の難しさから本邦の生産量は年々減少している。その一方で、同綱アオサ目のアオサはグリーンタイドと呼ばれる爆発的な増殖現象を引き起こし、世界各地の海で問題となっている。このような背景から、アオサ藻綱藻類の生活環を制御する分化誘導因子や共生細菌との関係についての研究は各方面から強く要望されている。近年、これらの海産藻類の葉状体分化を極微量で誘導するメロセスキテルペノイドのサルーシンが、分化誘導の必須成分として Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) グループ属細菌類をはじめとする複数種の藻類共生細菌より見出されているが、「藻類は重要な分化誘導因子をなぜ外部の細菌に依存しているのか」、「生産細菌はどのようにサルーシンを生産しているのか」という問いの答えは未だ明らかになっていない。加えて、グリーンケミストリーの観点から、「サルーシン生産細菌の持つ生合成マシナリーを化学合成に代わるサルーシンの高効率な供給に利用できないだろうか」という期待も高い。

2. 研究の目的

そこで、本申請研究では、生産細菌が持つ全てのサルーシン生合成酵素遺伝子類を明らかにすると共に、これらの遺伝子の発現制御機構を解明したい。また、生産細菌自体のサルーシン生産能は非常に低いことから、解明した酵素遺伝子群およびその発現機構を基盤とした遺伝子改変または異種細胞系における生合成経路の再構築によって、サルーシンの効率的な大量生産システムの確立へと発展させたい。

3. 研究の方法

(1) サルーシン生合成酵素遺伝子類を明らかにする研究：

「生産細菌はどのようにサルーシンを生産しているのか」という問いに答えるべく、本研究では具体的に生産細菌が持つ全てのサルーシン生合成酵素遺伝子類を明らかにすることを目的として、次世代シーケンサーを用いた生産細菌のゲノムシーケンスを行う。サルーシン生合成経路はL-トリプトファンから生合成されるキナルジック酸とファルネシル二リン酸の付加、テルペン部分の環化およびキナルジック酸部分の酸化的開環を経ると予測できたことから、ゲノム配列から遺伝子アノテーション情報を得て、推定生合成経路上の反応を担う酵素の遺伝子の検索を行う。遺伝子検索については、推定生合成経路上の触媒反応と同様の機能を持つと思われる遺伝子データベース上の酵素遺伝子配列を基に行うとともに、他の細菌類において二次代謝産物の生産に必要な一連の生合成酵素遺伝子群が、ゲノム上において近接・集積した遺伝子クラスターと呼ばれる構造をとる性質を利用する。得られた酵素候補遺伝子類の機能解析については異種細胞発現系における組み換えタンパクによる生合成中間体およびサルーシンの生産を確認・同定する。また、ゲノム編集を基盤とする遺伝子ノックアウト法を取り入れた酵素候補遺伝子類の機能解析も検討する。

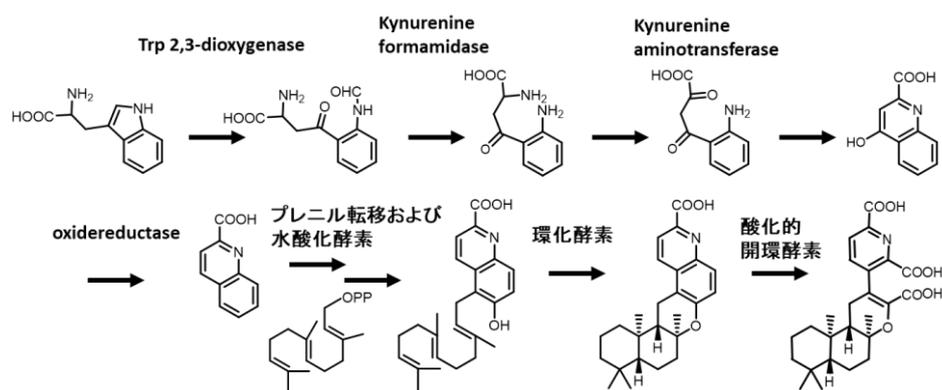


図 1. (-)-サルーシンの推定生合成経路

(2) 生合成経路の再構築および改変等によるサルーシンの大量生産システムの確立：

先行研究におけるサルーシンの生産方法として、生産細菌による生産量は細菌培養液 1L 当たり 1 μg と非常に低いことから、従来での発酵生産は実用性に乏しい。しかし、サルーシン生産細菌の持つ生合成マシナリーは高選択性の合成試薬と捉えることができ、これをバイオテクノロジーを用いたサルーシンの供給に利用できれば、グリーンケミストリーの観点からも非常に魅力的なものとなる。そこで、(1) で明らかにする生合成酵素遺伝子類の機能を物質生産へと応用展開するため、推定生合成経路に沿って酵素遺伝子類を逐次多重導入した大腸菌の組換え体群等を作成する。この際には、本細菌由来の遺伝子は GC 含量が 30%前後となっており、塩基

不足に起因する種々の障害が組換え大腸菌に起こることも想定されことから、大腸菌コドンに合わせた導入遺伝子の改変も必要となる。また、これを補完するものとして、サルーンシン生合成酵素遺伝子群の発現に関わるプロモーター配列の改変や従来技術によるサルーンシン生産性の向上した変異株取得等の生産細菌自体の遺伝子改変も検討する。また、サルーンシンの効率的な大量生産システムの確立を見据え、生産培養方法、サルーンシンの抽出・精製技術、定量方法の検討を行う。

(3) サルーンシン生合成酵素遺伝子の発現調節機構を明らかにする研究：

「藻類は重要な因子をなぜ外部の細菌に依存しているのか」という問いに答えるべく、生産細菌においてサルーンシン生合成酵素遺伝子の発現調節に関わる制御系を総合的に理解することが本研究の二つ目の目標である。当該サルーンシン生産細菌も他の真正細菌と同様に *rpoD* 相同遺伝子群が認識特異性を持つシグマ因子をコードし、環境に対応して RNA ポリメラーゼの特異性を調整していると考えられるが、当該生産細菌では全く研究例が無い。従って、(1) のサルーンシン生合成酵素遺伝子の機能解析から機能が確定した遺伝子の近傍配列や遺伝子クラスターより、プロモーター配列を探索するとともに、共通するプロモーター配列を近傍に置くゲノム上の遺伝子プロファイリングを検討する。さらに可能であるならば、ゲノムに存在する共通プロモーター配列の検証により、サルーンシン生合成がどのような環境因子によって誘導されるのかを明らかにしたい。

4. 研究成果

(1) サルーンシン生合成酵素遺伝子類を明らかにする研究：

①サルーンシン生合成酵素遺伝子クラスターの探索

次世代 DNA シークエンサー Sequel IIe による ccs ロングリードシーケンスを実施後、アセンブルで得られたゲノム配列に対してアノテーションを行い、生産細菌の保有する全ての遺伝子情報を取得した。サルーンシン推定生合成経路上でその存在が推定できた触媒機能を持つ酵素遺伝子が重複するゲノム領域を精査したところ、サルーンシン生合成に関わると考えられる候補酵素遺伝子群が、大きく3領域に分かれてゲノム上で緩やかに分散していると推定できた。これは、他の細菌類において二次代謝産物の生産に必要な一連の生合成酵素遺伝子群が、ゲノム上に密接して集積した遺伝子クラスターと呼ばれる構造をとる従来の知見とは異なっていた。

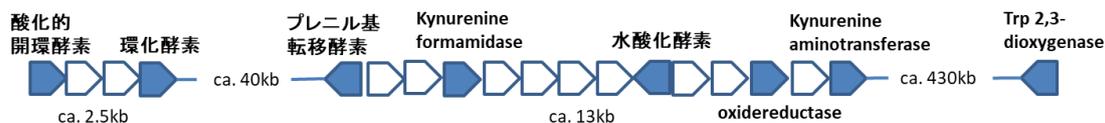


図2. (-)-サルーンシン生合成遺伝子クラスター

②サルーンシン生合成酵素遺伝子類の機能解析

このゲノム領域について、相似性を持つゲノム配列をゲノムデータベース検索したところ、近縁の Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides (CFB) グループ属細菌類をはじめとする数種の海洋性細菌のほか、バイオフィーム生産で知られる細菌の遺伝子クラスターがヒットした。前者には環化酵素がテルペン部分を環化した生合成中間体を生産することで知られる海洋細菌も含まれており、サルーンシン生産細菌は属を超えて意外に広く分布している可能性が示唆された。また、後者のバイオフィーム生産遺伝子クラスターには、サルーンシンのキナルジック酸部分の由来となるトリプトファンから同様に生合成される成分の生合成遺伝子が含まれており、アオサ藻綱海産藻類の葉状体分化を中心とした細菌共生システムが、進化的にバイオフィーム内での共生的相互作用に由来する可能性が示唆された。具体的なサルーンシン生合成酵素候補遺伝子類の機能解析については、プレニル転移酵素の類縁物質に対するファルネシル基転移活性が海外の研究グループから発表された。現在、他のサルーンシン生合成酵素候補遺伝子類の機能解析を検討している。

(2) 生合成経路の再構築および改変等によるサルーンシンの大量生産システムの確立：

①堅牢なサルーンシン定量方法の確立

サルーンシンを含む培養液抽出物の簡便かつ堅牢な定量分析前処理方法の確立については、論文既知のサルーンシン誘導体化方法を参考として検討した。サルーンシンは非常に高極性であることから、既報のとおり ODS カラム精製はできないことが明らかとなり、培養液から得た抽出物に対して1段階で吸着精製できる新たな樹脂の検索を行った。イオン吸着樹脂を中心に検討を行い、高収率でこれを達成することのできるイオン吸着樹脂を見出すことができた。

一方、誘導体化していない状態で LCMS 分析を行うと、サルーンシンの3つのカルボキシ基と種々の多価イオンとのアダクトが生成することで、定量が難しいことが明らかとなったことから、メチル化誘導体として定量することを検討した。イオン吸着樹脂による部分精製フラクションに対して既報のメチル化試薬を用いたところ、メチル化が十分に進んでいないものや分解に

より定量性が非常に不安定であることが明らかとなったため、新たな誘導体化方法の検討を行った。脂肪酸のメチル化で用いられる塩酸メタノールによって、高収率のメチル化を達成し、簡便かつ堅牢な定量分析前処理方法を確立することができた。

②サルーンシン生産細菌の生産性向上を目指した培養培地の検討

酵素遺伝子類の機能解析と並行して、サルーンシン生産能が亢進した生産細菌株の取得に先立ち、少量培養でサルーンシンの検出が行える実験系の確立を目指した。(1)ではゲノム上でサルーンシン生合成酵素候補遺伝子の近傍にデンプン輸送体に関わる遺伝子が存在したこと、サルーンシン生合成中間体にトリプトファンがあることから、培地成分としてスターチとアミノ酸類がサルーンシン生産に及ぼす影響について検討した。野生株において、先行研究で用いられている培地へのスターチ添加で約100倍、さらに種々のアミノ酸源のうち、ペプトンを添加した培地においては約350倍のサルーンシン生産量が得られた。

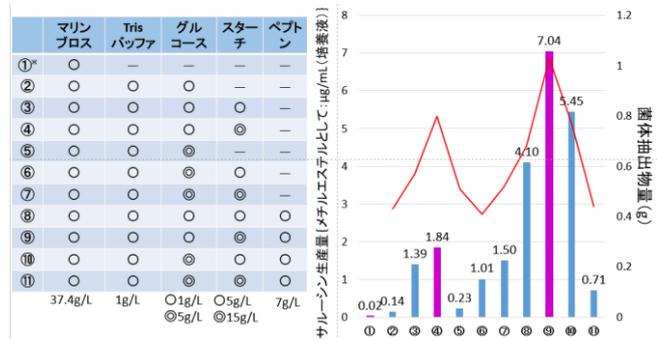


図3. 野生株における培地とサルーンシン生産性の関係

③生産性向上を目指した変異株の取得

当初、(1)のサルーンシン生合成酵素遺伝子の解析により機能が確定した酵素遺伝子を逐次導入した組み換え大腸菌による大量生産を目指したが、生産細菌において明確な遺伝子クラスター構造を示していないことから、機能解析に時間がかかると考えた。そこで、これと並行して高いサルーンシン生産性を有する変異株の取得を試みた。細菌類において、数種の抗生物質に対する耐性変異株は、二次代謝産物の生産性の向上を示すことが知られていることから、本細菌においても、それぞれの抗生物質耐性変異株の取得を行い、高いサルーンシン生産性を示す耐性変異株のスクリーニングを行った。リボソームタンパク質の変異により耐性株が出現するストレプトマイシン (Sm) およびゲンタマイシン、RNAポリメラーゼの変異により耐性株が出現するリファンピシンを用いて耐性株を取得し、サルーンシン生産性を検討したところ、低Sm耐性株および高Sm耐性株の中に、野生株と比べて2~3.5倍にサルーンシン生産性の向上した変異株が存在することが示された。

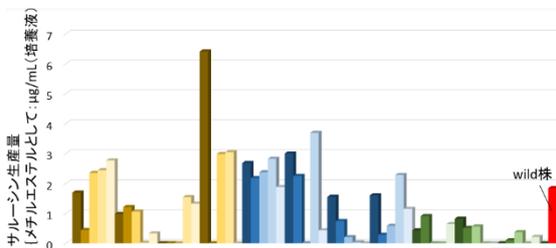


図4. 低Sm耐性株のサルーンシン生産量

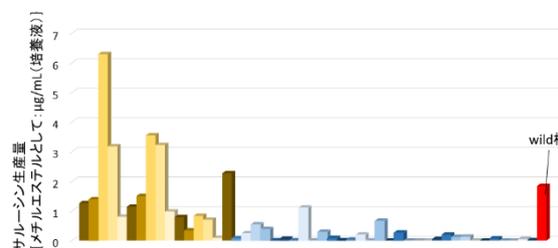


図5. 高Sm耐性株のサルーンシン生産量

(3) サルーンシン生合成酵素遺伝子の発現調節機構を明らかにする研究:

当初、(1)のサルーンシン生合成酵素遺伝子の機能解析から機能が確定した遺伝子の近傍配列や遺伝子クラスターよりプロモーター配列を探索する予定であったが、明確な遺伝子クラスター構造を示していないことから、培地成分等の環境要因とサルーンシン生産との関連性に関する精査が必要となった。まず、(2)で得られた変異株のサルーンシン生産の亢進が、他の細菌類の二次代謝産物の生産性の向上と同様の機構でもたらされているのかについて検証した。複数の高生産性変異株を対象として、次世代シーケンサーによるSNP・indel解析を行った。その結果、高生産性変異株の変異部位は、他の細菌類において二次代謝産物の高生産性を示す抗生物質耐性株の変異部位と共通する2種類の遺伝子 (rpsL および rsmG) の変異に集約されることを明らかにできた。また、サルーンシン高生産性変異株について、次世代シーケンサーによる発現遺伝子量解析を行ったところ、サルーンシン生合成酵素遺伝子候補を含めた一次・二次代謝系酵素遺伝子全般の発現

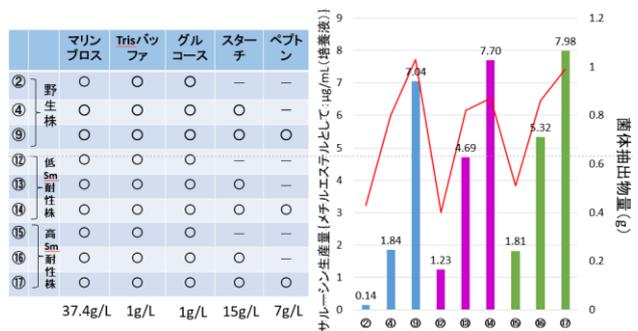


図6. 変異株培地とサルーンシン生産性の関係

上昇が確認された。他の細菌類において rpsL 変異は 70S リボソームの安定化に寄与して定常期のタンパク質合成の上昇をもたらし、rsmG 変異はリボソーム中の 16S rRNA へのメチル化機能の喪失による s-アデノシルメチオニン合成の上昇により二次代謝が増大することが知られており、本細菌変異株でのサルーシン生産性の向上もこれに起因するものと考えられた。

(2) で示した野生株培養培地の検討において、スターチやペプトンの添加がサルーシンの著しい生産性の向上を示していることから、サルーシン高生産変異株に対するこれらの培地成分の影響を確認した。+スターチ培地においては、野生株と比して約 3 倍の生産量となった。一方、+スターチ+ペプトン培地において、生産量は微増となった。このことから、培養培地におけるスターチの存在がサルーシン生産と密接に関わっていることが示唆された。

以上、本研究では、アオサ藻綱海産藻類の共生細菌が生産する葉状体分化誘導物質サルーシンの生合成に関わる酵素遺伝子クラスター候補を提示できた。また、抗生物質耐性変異株からスクリーニングで得たサルーシン高生産性変異株の変異部位が、他の細菌類において二次代謝産物の高生産性を示す変異部位と共通する 2 種類の遺伝子に集約されることを明らかにできた。更に、これに関連する培地組成の検討を行い、数百倍の生産性を示す変異株と培地の組み合わせを明らかにできた。一方、細菌培養液からのサルーシンの精製方法については、吸着樹脂や誘導体化法の検討を行い、従来の精製・分析方法に比して簡便かつ堅牢な前処理方法を確立することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井裕大、高原冬弥、岡本育子、田中正巳、中島勝幸、浅川義範、兼目裕充
2. 発表標題 藻類共生細菌における抗生物質耐性変異によるサルーシン生産性向上の検討
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------