

平成 22 年 6 月 17 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20710154

研究課題名（和文） 放線菌のゲノム解析を応用した有用物質生産系の構築

研究課題名（英文） Construction of genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism.

研究代表者

小松 護 (KOMATSU MAMORU)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員

研究者番号：40414057

研究成果の概要(和文):産業微生物である *S. avermitilis* のゲノム再編成により構築した SUKA 株の種々の化合物に対する物質生産性試験を行った。SUKA 株はアミノグリコシド、ポリケチド、ペプチド、テルペン化合物において生合成遺伝子の供給元の微生物を超える顕著に高い生産性を示した。よって、SUKA は生産性が低い有用な二次代謝産物生産のため異種発現宿主として利用することが期待される。

研究成果の概要(英文): We investigated production of several exogenous secondary metabolites in genome-minimized *S. avermitilis* SUKA. The results revealed that the microorganism has high-level productivity for aminoglycoside, polyketide, peptide and terpene compounds over that of native-producing microorganisms. It suggested that SUKA could be a useful heterologous host for a production of secondary metabolite with a little production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：産業微生物ゲノム

1. 研究開始当初の背景

放線菌 *Streptomyces avermitilis* は 2003 年に池田らにより実用に供されている抗生物質生産のための産業微生物としては世界で初めて全ゲノムが解読され(Ikeda et al., *Nat. Biotechnol.* 21:526 (2003))、その全

塩基配列が公開されている (<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>)。

抗生物質等の生物活性物質は二次代謝産物であり、生産菌の生育には不要であるが、その生合成は生育に必須な一次代謝系によ

り産出されたアミノ酸、糖、低級脂肪酸や有機酸等を前駆物質とし、また、同様に一次代謝系で得られる ATP や NAD(P)H をエネルギーや補酵素として利用することで進行する。例えば、*S. griseus* が生産する streptomycin 等のアミノグリコシド系抗生物質は、一次代謝産物であるグルコースから、*S. avermitilis* が生産する avermectin や *S. erythraea* が生産する erythromycin 等の大環状ラクトン化合物は酢酸やプロピオン酸等の低級脂肪酸を前駆物質として生産される。つまり、二次代謝とは、一次代謝を基盤とする代謝経路であり、二次代謝への前駆物質の十分な供給能力を有する一次代謝系を備えた生物が、二次代謝産物を大量かつ安定に生産することが可能である。ゲノム解析から、*S. avermitilis* のゲノム上には一次代謝に関与する酵素群に多くのパラログが見出された。ゲノム解析が完了している同属の *S. coelicolor* A3(2) や近縁の *C. glutamicum* 等の Actinobacteria や低 GC 含量グラム陽性菌の *B. subtilis* と比較しても、ATP や NAD(P)H 等のエネルギーや補酵素、また、ポリケチド化合物の前駆物質となるマロニル CoA あるいはメチルマロニル CoA の生成に関与する酵素群に多くのパラログが見出され、本菌が多様な二次代謝産物を生産するための能力を潜在的に有していることが推測される。また、当菌は他の *Streptomyces* 属放線菌に観察されるような、二次代謝産物生産の消失などの遺伝学的な不安定さをほとんど有しておらず、安定した生産物を供給するといった産業微生物に求められる重要な特徴を有している。そこで、筆者は、この様な *S. avermitilis* の産業利用株としての優れた特徴を、単に avermectin の工業生産に利用するだけではなく、異種(微)生物由来の有用物質の生産に利用することを計画した。

2. 研究の目的

ヒト・オンコセルカ症の特効薬である avermectin の工業生産株として実用に供されている、*S. avermitilis* のゲノム再編成により、物質生産に特化した汎用宿主を構築し、種々の化合物(主に医薬として利用されているもの)を対象とした物質生産試験を行うことで、その有(実)用性を示す事を目的とする。

3. 研究の方法

これまでの解析から、*S. avermitilis* の主生産物は、ポリケチド化合物である avermectin、oligomycin および filipin であることが確認されている。*S. avermitilis* へ異種微生物由来の二次代謝産物生合成遺伝子(群)を導入した場合、それらも同時に生産されるため、目的物質の分離精製が困難である。また、同じ前駆物質を利用して生合成される化合物の場合、その競合による生産量の低下が生じることが予想される。したがって、本菌の生育ならびに二次代謝に必須な代謝・調節などの重要な関連遺伝子群を残し、異種の物質生産には不要な自身の主生産物を含む二次代謝生合成遺伝子群を取り除くことが必須である。

筆者は P1 ファージ由来の Cre-*loxP* システムを利用し、*S. avermitilis* の線状ゲノムの左端約 1.5 Mb の領域(生育には不要な、avermectin や filipin を含む、二次代謝産物生合成に関与する遺伝子(群)の内の約 3 割が存在している)を欠失させた。同様に、もう一つの主生産物である oligomycin の生合成遺伝子群(約 100kb)を欠失させることにより、主生産物の生産が完全に停止した SUKA5 を構築した。SUKA5 は *S. avermitilis* の主生産物ならびにゲノム上に見いだされた二次代謝生合成遺伝子(群)(32種)の約 3 割を欠失しており、野生株染色体の約 20%、実に 1,613,960bp を欠失している。SUKA5 を液体培養し、菌体ならびに培養上清の粗抽出後、各種クロマトグラフィーを行うと、野生株のそれと比較して、観察される化合物ピークは明らかに消失していた。さらに SUKA5 染色体より、セスキテルペン化合物である、geosmin, neopentalenolactone 生合成遺伝子群ならびに *cyp28*(cytochrome P450; CYP105D7)を欠失させた SUKA17 株を構築した。本研究においては、種々の放線菌由来の二次代謝産物の生合成遺伝子群をクローン化し、SUKA5 あるいは SUKA17 染色体上に導入することによって、それら化合物の生産性を調べた。また、生産が低いあるいは全く観察されない場合には、生合成遺伝子群全体の発現制御を担う転写制御因子のプロモーター置換により、強制的に発現を促すことによりその生産性を調べた。

4. 研究成果

アミノグリコシド化合物(streptomycin)、ペプチド化合物(cephamycin C, echinomycin)、ポリケチド化合物(pladienolide)、テルペン化合物(2-methylisoborneol, cyslabdan)、インドロカルバゾール化合物(rebeccamycin)の生合成遺伝子群を、染色体組込み型ベクターを用いてクローン化することに成功した。SUKA5 あるいは SUKA17 株の染色体上へプロトプラスト形質転換法により各生合成遺伝子群を導入した。各形質転換体について液体培養を行い生産される化合物の生産量を定量した。各化合物の生産性に関して以下に記述する。

(1) Streptomycin (SM)

SUKA5 の SM 生産量は生合成遺伝子の供給元の *S. griseus* IF013350 (約 0.05 mg/mL) の 4 倍の生産量 (約 0.2 mg/mL) であった。また、*S. avermitilis* 野生株 (約 0.03 mg/mL) の 6 倍の生産性を示した。さらには、SM 生合成遺伝子クラスター内に存在する、経路特異的転写制御因子をコードする *strR* を、*S. avermitilis* の主生産物である avermectin 生合成遺伝子クラスター内に存在する経路特異的転写制御因子遺伝子 (*aveR*) のプロモーター支配下で発現させることにより SM の生産時期を早める効果が得られた。本来、*S. avermitilis* はアミノグリコシド抗生物質を生産しないが、本結果から、本菌が同化合物種に対して高い生産能力を有していることが明らかとなった。

(2) Cephamycin C

SUKA17 の Cephamycin C 生産量は生合成遺伝子の供給元の *S. clavuligerus* ATCC27064 (約 0.05 mg/mL) の約 2 倍の生産量 (約 0.09 mg/mL) であった。また、cephamycin 生合成遺伝子クラスター内に存在する、経路特異的転写制御因子をコードする *ccaR* を、*S. avermitilis* 由来の構成的強発現プロモーター (*rpsJp*) の制御下で高発現させることにより、約 0.13 mg/mL にその生産量が増加した。ゲノム解析の結果、*S. avermitilis* の染色体上には、11 個の非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) 遺伝子を保持する、二次代謝正合成遺伝子クラスターと推測される遺伝子群が存在している。しかしながら、これまで検討した如何なる培養条件においても、それら生合成遺伝子群に由来するペプチド化合物は検出されていない。Cephamycin C もまた、

NRPS によって生合成されるペプチド化合物であり、*S. avermitilis* はその様な化合物においても十分な生産能力を有していることが明らかとなった。

(3) pladienolides (PLD)

SUKA5 は染色体上への PLD 生合成遺伝子の導入のみでは PLD を全く生産しなかった。一方で、PLD 生合成遺伝子クラスター内に存在する、経路特異的転写制御因子をコードする *pldR* を *rpsJp* 支配下で強発現させることにより、SUKA5 においてその生産が開始した。しかしながら、野生株においてはほとんど PLD の生産は観察されず、本菌の主生産物である avermectin、oligomycin を旺盛に生産した。SUKA5 の PLD 生産量は、生合成遺伝子の供給元の *S. platensis* Mer-11107 と同程度の生産性を示した。

(4) 2-methylisoborneol (2-MIB), cyslabdan

2-MIB は微生物やカビが生産するモノテルペン化合物である。テルペン化合物は主に植物や糸状菌が生産する化合物として単離され研究が進められてきた。植物では化合物の分類にかかわらず生合成の鍵となるテルペン環化酵素 (Tpc) 間で高い相同性を有している。一方、細菌では Tpc 間の相同性は低く、特に monoterpene の環化酵素遺伝子本体並びに生合成は不明であった。我々は、いわゆる隠れマルコフモデルを適用した統計的機能予測を行い、既存のデータベース内の約 200 万の細菌の蛋白質から 41 種の Tpc と推測される配列を抽出した。その内、7 種の Tpc は sesqui-, diterpene 環化酵素とは系統分類上異なり、さらに、ゲノム上ではメチル基転移酵素遺伝子とオペロンを形成していた。詳細な解析により、これらが 2-MIB 生合成酵素であることが示された。これは、細菌における monoterpene 化合物生合成遺伝子同定として初めての例である。*Saccharopolyspora erythraea* 由来の 2-MIB 生合成遺伝子を *rpsJp* の制御支配下になるように連結し、SUKA17 染色体上へ導入した。その結果、*Sac. erythraea* の生産量の約 3 倍と高い生産性を示した。

Streptomyces sp. K04-0144 が生産するジテルペン化合物である CLD は imipenem との併用により、methicillin 耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に対して抗菌作用を有することでその利用が期待されている (*J. Antibiot.*

(Tokyo), 61:7, 2008)。我々は *Streptomyces* sp. K04-0144 より CLD 生合成遺伝子クラスターを単離同定した。CLD クラスターは単一オペロンを形成しており、4 つの遺伝子 (*cldB*, *cldB*, *cldC* および *cldD*) から構成されていた。*cldB* 遺伝子上流に *rpsJp* を連結し、当該オペロンの転写発現が、その制御支配になるように構築した。SUKA17 の染色体上へ導入し、CLD の生産を調べた。その結果、CLD 生合成 *Streptomyces* sp. K04-0144 の CLD 生産量は超微量 (0.001g/L 程度) であるのに対し、SUKA は主生産物として著量 (0.2g/L) の CLD とその類縁体を菌体内に蓄積した。

テルペン化合物である 2-MIB と CLD の生産について検討した結果、いずれの化合物においても、生合成遺伝子の供給元の微生物よりも顕著に高い生産性を示した。SUKA17 はテルペン化合物を生産しないため、テルペン化合物の生産に適しているといえる。

上記に示す様に、本研究助成期間内において、SUKA17 を宿主として、種々の化合物の生産について検討し、我々が開発する SUKA が様々な化合物に対して適用できることが示された。SM と PLD の生産において、SUKA5 は本菌野生株と比較して顕著に高い生産性を示した。このことは、大規模な染色体欠失操作により、本菌の主生産物である avermectin, oligomycin, filipin を含む多くの二次代謝産物生合成遺伝子群を欠失させたことによって、二次代謝産物の生合成に必要な前駆体やエネルギーが、本来生産されるべき上記の化合物の生産にではなく、導入した外来の二次代謝産物生合成遺伝子群に由来する二次代謝生合成経路に使われたためであると判断できる。

Echinomycin (ECM)、rebeccamycin (RBM) については、SUKA 株においてその生産は観察されなかった。PLD の生産において、遺伝子クラスターの導入のみでは生産がされないが、経路特異的転写制御因子 (*PldR*) を強制発現させることによって、生産が開始した。これは、PLD 生合成遺伝子クラスターの供給元の *S. platensis* が有する、*pldR* よりも上位の制御因子を *S. avermitilis* が保有していないためであると考えられる。ECM ならびに RBM はその生合成遺伝子群内に経路特異的転写制御因子を保持しているが、PLD と同様に、

S. avermitilis がそれら生合成遺伝子群の転写を活性化する上位の制御因子を有していないためであると推測される。よって、それら生合成遺伝子の経路特異的転写制御因子の強制発現によって、生産が開始する可能性が高い。その一方で、SM や Cephameycin C の様に、遺伝子クラスターの導入のみで生産が開始される場合においては、*S. avermitilis* が有する上位の制御系によってその発現が担われている。実際に、SM 生産菌である *S. griseus* においては、SM 生合成遺伝子の発現は、*strR* の上位の制御因子 AdpA (AraC family 転写制御因子) によって活性される。*S. avermitilis* における AdpA ホモログである *bdpA* の破壊は、SM の生産が停止したが、*bdpA* と同様に *adpA* の導入によってもその生産が回復したことから、*bdpA* が *adpA* の役割を担っていることが明らかとなった。

現在、工業微生物 (特に抗生物質生産菌) の全ゲノム解析が達成されている種は極めて少なく、そのゲノム情報を利用する研究は今後の課題である。したがって、本研究の様に実際に工業的に利用されている微生物のゲノムを大規模に改変し、新たな物質生産体系を構築するといった革新的な試みは未だなされていない。本研究によってその汎用宿主としての有用性が示されれば、これまでに生産菌の遺伝学的不安定性あるいは分子遺伝学的基盤の整備が乏しく、生産の最適化 (大量生産) が困難で開発が断念された有用物質に関して、それら生合成遺伝子を汎用宿主へ導入すれば、その化合物の再評価の道が開ける。また、汎用宿主を用いることによって、そのような化合物の工業的大量生産を実現できる可能性がある。

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 5 件)

- ① Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE, Ikeda H, Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE, Ikeda H., Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 査読有、107 巻、2010、pp2646-2651

- ② Morita K, Yamamoto T, Fusada N, Komatsu M, Ikeda H, Hirano N, Takahashi H., In vitro characterization of the site-specific recombination system based on actinophage TG1 integrase., *Mol. Genet. Genomics.*, 査読有、282 巻、2010、pp607-616.
- ③ Morita K, Yamamoto T, Fusada N, Komatsu M, Ikeda H, Hirano N, Takahashi H., The site-specific recombination system of actinophage TG1., *FEMS Microbiol. Lett.*, 査読有、297 巻、2009、pp234-240
- ④ Jiang J, Tetzlaff CN, Takamatsu S, Iwatsuki M, Komatsu M, Ikeda H, Cane DE., Genome mining in *Streptomyces avermitilis*: A biochemical Baeyer-Villiger reaction and discovery of a new branch of the pentalenolactone family tree, *Biochemistry*, 査読有、14:48 巻、2009、pp6431-6440
- ⑤ Tanaka Y, Komatsu M, Okamoto S, Tokuyama S, Kaji A, Ikeda H, Ochi K., Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes., *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有、75 巻、2009、pp4919-4922

[学会発表] (計 21 件)

- ①池田 治生 原核細胞生物におけるテルペン合成酵素遺伝子の包括的解析 2010 年度日本農芸化学会大会 2010 年 3 月 30 日 東京
- ②房田 直記 分裂酵母におけるアクチノファージ TG1 部位特異的組換え酵素、インテグラーゼ (TG1 integrase) を用いたゲノムへの遺伝子導入 2010 年度日本農芸化学会大会 2010 年 3 月 30 日 東京
- ③森田 健太郎 アクチノファージ TG1 の産生する Ser 型インテグラーゼを用いた迅速なクローニング法の開発 2010 年度日本農芸化学会大会 2010 年 3 月 30 日 東京
- ④沼田 淳 16 員環マクロライド bafilomycin の生合成研究 2010 年度日本農芸化学会大会 2010 年 3 月 29 日 東京
- ⑤小松 護 産業微生物の二次代謝産物生産に対する緊縮制御因子 ppGpp の応用 2010 年度日本農芸化学会大会 2010 年 3 月 28 日 東京
- ⑥内山 琢麻 *Streptomyces avermitilis* に

おける新規テルペン化合物の生産 2010 年度日本農芸化学会大会 2010 年 3 月 28 日 東京

⑦山下 晃代 アクチノファージ ϕ K38-1 の産生するセリン型インテグラーゼによる部位特異的組換え系の構築と解析 2010 年度日本農芸化学会大会 2010 年 3 月 28 日 東京

⑧内山琢麻 *Streptomyces avermitilis* における異種菌株由来テルペン化合物の生産 2009 年度日本放線菌学会大会 2009 年 7 月 17 日 秋田市

⑨小松護 *Streptomyces avermitilis* におけるアミノグリコシド抗生物質の生産 2009 年度日本放線菌学会大会 2009 年 7 月 17 日 秋田市

⑩田中幸徳 リファンピシシン耐性 (*rpoB*) 変異の導入による各種抗生物質生産力の増強と休眠遺伝子の活性化 2009 年度日本放線菌学会大会 2009 年 7 月 16 日 秋田市

⑪山本智之 アクチノファージ TG1 インテグラーゼの部位特異的組換えに関わる配列要素の解析 2009 年度日本農芸化学会 2009 年 3 月 29 日 福岡

⑫森田健太郎 アクチノファージ TG1 の産生する Ser 型インテグラーゼによる部位特異的組換え機構の解析 2009 年度日本農芸化学会 2009 年 3 月 29 日 福岡

⑬小松護 産業利用放線菌を宿主としたアミノグリコシド抗生物質の生産 2009 年度日本農芸化学会 2009 年 3 月 29 日 福岡

⑭沼田淳 16 員環マクロライド Bafilomycin の側鎖生合成遺伝子の解析 2009 年度日本農芸化学会 2009 年 3 月 29 日 福岡

⑮奈良綾子 16 員環マクロライド Bafilomycin の生合成遺伝子群の解析 2009 年度日本農芸化学会 2009 年 3 月 29 日 福岡

⑯田中幸徳 異なったストレプトマイシン耐性変異 (*rsmG* 及び *rpsL*) 導入による放線菌の抗生物質生産性の増強 2009 年度日本農芸化学会 2009 年 3 月 28 日 福岡

⑰高松 智 *Streptomyces avermitilis* の産生する zizaene 類の生合成解析 日本薬学会第 128 年会 2009 年 3 月 28 日 京都

⑱Komatsu M Identification of genes for bacterial monoterpene biosynthesis. UK-Japan Workshop 2008, Genomics of

Antibiotic producing Actinomycetes:
Implications and Applications 2008年11
月1日 東京

⑱ 奈良綾子 16員環マクロライド
Bafilomycin の生合成遺伝子群の解析 2008
年度日本放線菌学会大会 2008年7月11日
山梨市

⑳ 田中幸徳 ストレプトマイシン弱耐性変
異 *rsmG* 導入による *Streptomyces* 属の二次代
謝の変化 2008年度日本放線菌学会大会
2008年7月10日 山梨市

㉑ 小松護 微生物ゲノムデータベースから
の異臭物質(2-methylisoborneol)生合成遺伝
子の同定 2008年度日本放線菌学会大会
2008年7月10日 山梨市

[その他]

ホームページ等

<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 護 (KOMATSU MAMORU)

北里大学・北里生命科学研究所・研究員

研究者番号：40414057

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：