

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780067
 研究課題名（和文） ロドコッカス・エリスロポリスが生産する抗菌活性物質とその遺伝子の解析
 研究課題名（英文） Novel antibiotic compounds and its corresponding genes isolated from *Rhodococcus erythropolis* strains
 研究代表者
 北川 航（KITAGAWA WATARU）
 独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノムファクトリー研究部門・研究員
 研究者番号：60415669

研究成果の概要（和文）：ロドコッカス属細菌に多数の抗生物質生産菌が存在することを示し、特にロドコッカス エリスロポリス(*Rhodococcus erythropolis*)に多くの活性株が存在することを明らかにした。また *R. erythropolis* JCM 6824 から、グラム陽性菌に対し非常に高い活性を示す新規の抗生物質 aurachin RE を発見し、構造決定を行った。さらにこの生合成に関わる遺伝子も単離した。これら抗生物質、遺伝子はいずれも *Rhodococcus* 属由来として初めての報告である。さらに *R. erythropolis* DSM 11397、*R. erythropolis* JCM 2895 の各株からもそれぞれ新規の抗生物質、抗菌タンパクを発見した。

研究成果の概要（英文）：A new antibiotic, aurachin RE was isolated from *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824. The new antibiotic showed extremely strong antibiotic activity against Gram-positive bacteria. Biosynthetic genes of aurachin RE were also identified from the producer strain. This is the first report for an antibiotic and its genes from genus *Rhodococcus*. A new antibiotic compound and antibiotic protein were also identified from *R. erythropolis* DSM 11397 and *R. erythropolis* JCM 2895, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：抗生物質生産、*Rhodococcus*

1. 研究開始当初の背景

放線菌に分類される *Rhodococcus* 属細菌は近年その様々な能力が注目され、基礎・応用ともに多くの優れた研究が行われてきた。代表的な例として *Rhodococcus* 由来のニトリ

ルヒドラーゼを用いたアクリルアミドの工業生産が挙げられるが、これは微生物酵素を利用した物質の工業生産における世界初の成功例として知られるものである。また *Rhodococcus* 属は PCB やダイオキシン、ニト

口化合物など多くの有毒かつ難分解性の化合物を強力に分解する能力を有することでも知られ、関連する数多くの研究が報告されてきた。特に PCB 分解菌である *Rhodococcus* sp. strain RHA1 はその多様な化合物を分解する能力と、それを支える多様かつ多重に重複した分解系遺伝子が詳細に研究されている。私はこれまでこの RHA1 株を含む *Rhodococcus* の PCB、フタル酸、および 4-ニトロフェノール分解に関わる遺伝子と機能の研究を行い、また本属のその他の特性についても知り理解を深めて来たことから、*Rhodococcus* 属細菌の持つ幅広い能力とさらなる可能性について常に注目してきた。そこで私は新たな可能性として *Rhodococcus* の抗生物質生産能力について研究を開始した。放線菌は抗生物質生産菌としてよく知られるがその生産株のほとんどが *Streptomyces* 属細菌であり、現在数千とも言われる抗生物質、その他生理活性物質が報告されている。それに対し *Rhodococcus* 属の抗生物質生産菌はわずか 1 例に留まり (研究開始時)、他の属の放線菌と比較しても極めて報告例が少ないものであった。しかし他にも少なからず抗生物質を生産する *Rhodococcus* が存在すると予測し、数多くの *Rhodococcus* 株を収集してその抗菌活性を調べたところ、様々な抗菌スペクトルを示す 10 種、30 株に及ぶ活性株を見いだした。これは *Rhodococcus* 属に多様な抗生物質生産菌が存在することを初めて示した報告であり、新たな抗生物質とその遺伝子資源として *Rhodococcus* 属細菌が極めて重要であることを示すものであった。

2. 研究の目的

上記のように抗生物質生産菌としての *Rhodococcus* の能力が明らかになりつつあるが、個々の株が生産する化合物やその生合成遺伝子についてはほとんど明らかにされていない。本研究では多くの抗菌活性株が得られた *Rhodococcus erythropolis* に特に着目し、以下の 3 点について明らかにすることを目的とする。

(1) 抗菌活性を持つ *Rhodococcus* の多様性とそれらの株の系統分類: これはこれまで抗生物質生産菌としては知られていなかった *Rhodococcus* にどれほどの抗菌活性株が存在するかを明らかにするとともに、それら活性株の系統的な分類を行う。特に上記の様に、*R. erythropolis* から全く異なる抗菌スペクトルを持つ 3 つのグループ (計 15 株) が見いだされていることから、これら株の 16S rRNA 遺伝子、また線状プラスミドの解析などを行い近縁種の株における更なる詳細な分類を試みる。

(2) 抗生物質生産に関わる遺伝子の特定: *R. erythropolis* から見いだされた 3 つのグルー

プの株からそれぞれ抗生物質生産に関わる遺伝子を特定し、生合成経路についても知見を得る。また *Rhodococcus* 属は線状プラスミドを有し、PCB 分解遺伝子などがそこに存在する事が知られているが、抗菌関連遺伝子についてもその局在性を調べる。

(3) *R. erythropolis* が生産する抗菌活性物質の抽出・精製: 特にこれまでに見いだした抗菌活性 *R. erythropolis* の中で最も広い抗菌スペクトルを示すグループ I の株から抗菌活性物質を抽出・精製法を確立し、構造決定する事を目指す。

前述のようにこれまで抗生物質生産菌として放線菌はよく知られてきたが、そのほとんどが *Streptomyces* 属の株であった。この *Streptomyces* 属から多数の生産菌が見いだされている理由として、実際にこの属の菌株が高い確率で抗生物質生産能を有している事とは別に、他の菌が無視されてきた事にも関係があると考えられる。研究者らが自然界から新規の抗生物質生産菌をスクリーニングする際、二次分化して外生孢子形成を行う菌、つまり *Streptomyces* 属を優先して用いて来たことは事実である。孢子形成を行わない菌はどの属であるかコロニーの形状や色などの外見ではほとんど判断出来ず、その研究は後回しあるいは無視され、*Streptomyces* 属ばかりを研究対象にしてきた。このような背景で *Streptomyces* の研究は他の放線菌と比べはるかに進んでいるが、同時に飽和しかけているとも言える。全く新規の機能を持つ新規の抗生物質を見いだそうとする場合、*Streptomyces* 属以外の菌種から生産菌を探索することは非常に有意義である。本研究で着目した *Rhodococcus* 属細菌はその生活範囲 (土中、水中、植物、動物) や生育温度が非常に広く、そのような環境で他の微生物との競争に勝ってきたと考えられるため、新規の抗生物質の生産菌として有力な候補であるといえる。近年の新病原体の発生、あるいは多剤耐性菌の発生などの問題から、抗生物質は常に新しいものが求められているが、この研究によって *Rhodococcus* から新規の抗生物質やその遺伝子が単離され、応用のための基礎情報が得られると考えている。

3. 研究の方法

(1) 抗菌活性を持つ *Rhodococcus* の多様性とそれらの株の系統分類: これまでに既に多数の抗菌活性 *Rhodococcus* を見いだしているが更にスクリーニングの数を増やし、抗菌活性株を検索してその多様性を明らかにする。具体的には菌株保存機関から数多くの *Rhodococcus* を収集し、その中から抗菌活性株をスクリーニングする。スクリーニングは軟寒天重層法において *Rhodococcus* 属が被験菌に対して作らせる生育阻止円を観察する

ことで行う。初めのスクリーニングでは数株の被験菌を用い、そこで得られた抗菌活性株についてはさらに被験菌を20株以上用いてそれぞれその抗菌スペクトルを詳細に調べる。また各株の16S rRNA 遺伝子配列を決定し、それら活性株の系統分類を行う。またMALDI MSを用いた最新の解析法も用い、詳細な系統分類も行う。

(2) 抗菌物質生産に関わる遺伝子の特定:
抗菌活性を示した *Rhodococcus* 属細菌の中から特に抗菌スペクトルが広いものなど特徴のあるものを選択し、その遺伝子の単離を行う。特に既に得られている *R. erythropolis* の3つのグループからそれぞれの遺伝子単離を目指す。遺伝子単離の方法は我々の研究室で開発された *Rhodococcus* 属で有効なランダムトランスポゾン導入法を用いる。この手法ではゲノム中にランダムにカナマイシン耐性遺伝子が組み込まれるため、カナマイシン耐性となった株から抗菌活性を失った変異株をまずスクリーニングする。このようにして得た変異株から、組み込まれたカナマイシン耐性遺伝子の周辺ゲノムを解析することで抗菌活性に関与する遺伝子を単離する。また単離した遺伝子についてその局在性について調べる。具体的にはパルスフィールドゲル電気泳動装置を用いてゲノムを染色体とプラスミドに分離し、この分離したDNAに対して単離した抗菌関連遺伝子をプローブにサザン解析を行うことで局在性を確認する。

(3) *R. erythropolis* が生産する抗菌活性物質の抽出・精製: 現在までに単離している抗菌活性 *R. erythropolis* 株の中で最も広い抗菌スペクトルを示した株から、その抗菌物質の抽出法、精製法を確立し、構造決定に用いる事の出来る精製度にし、物質同定を行う。具体的には生産菌の培養液から有機溶媒を用いて抗菌物質を抽出し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて活性化区分の取得、成分の精製を行う。

4. 研究成果

(1) 抗菌活性を持つ *Rhodococcus* の多様性とそれらの株の系統分類:

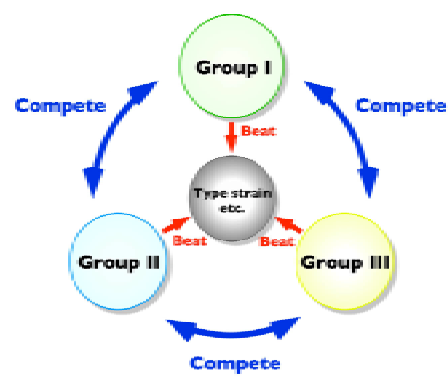
抗菌スペクトルの違いから3グループに分類される *R. erythropolis* 全15株の16S rRNA 遺伝子の解析を行い、全ての株が同一の配列を有することを明らかにし、抗菌活性が異なる株間であっても15株が非常に近縁である事を示した。またこの15株に加え非抗生物質生産の6株を加えた計21株の *R. erythropolis* について *gyrB* 遺伝子配列、線状プラスミドなどの解析を行い、その系統関係・種内多様性を明らかにした。

産業技術総合研究所環境管理技術研究部門計測技術研究グループと共同で、MALDI-MSを用いたりボソームタンパクの分子量を指

標とした新しい *R. erythropolis* の分類法を開発し、16S rRNA 遺伝子よりも高解像度でこれらの株を分類する事に成功した。この分類結果は *gyrB* 遺伝子配列による系統解析とよく一致していた。

R. erythropolis の抗菌活性株・非抗菌活性株の計21株について16S rRNA, *GyrB*, *RpoB* の各遺伝子、さらに当初の計画に加え *AtpD*, *RecA*, *TrpB* の各遺伝子についてもその保存配列からPCR primerを設計し、800-1500bpの部分配列を決定した。これらの情報からMulti-locus sequence analysis (MLSA)を行い、前年度のMALDI-MSによる系統解析と共に、これら近縁株の詳細な系統分類を行うと共に、種内多様性をあらためて明らかにした。

R. erythropolis には抗菌スペクトルの異なる3グループ(Group I, II, III)の抗菌活性株が存在することが明らかになった。これらグループの株は同属同種でありながら、それぞれ他の2グループに対しても抗菌活性を示すという、きわめて珍しい種内競争(三つどもえ、下図)がみられることが明らかとなった。それぞれ異なる抗生物質を介した三者間の種内競争は初めての報告である。



(2) 抗菌物質生産に関わる遺伝子の特定:

抗生物質生産株である *R. erythropolis* JCM 6824 から、抗生物質生合成遺伝子を単離するため、トランスポゾン変異導入法により、抗菌活性を失った変異株を得た。この変異株の遺伝子解析により、本菌株の生合成遺伝子クラスター(全11のORF)の取得に成功した。これらのORFについてそれぞれ遺伝子破壊株を構築し、これらのORF(遺伝子)が抗菌活性に必須であることを証明した。またこの遺伝子配列から予測される酵素タンパクの推定機能は後述する本菌株から単離した新規抗生物質の構造とその予想生合成経路とよく一致した。これまで抗生物質生合成遺伝子が *Rhodococcus* から見いだされたことはなく、本研究が初めての報告である。

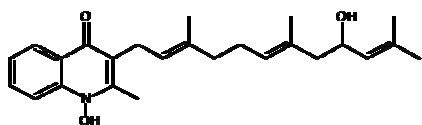
前述のJCM 6824株とは異なる抗菌スペクトルを示す *R. erythropolis* DSM 11397 から、同様にトランスポゾン変異導入法を用いて

抗菌活性を失った変異株を得た。この変異株の遺伝子解析から *Pseudomonas* 属細菌によく研究されている抗生物質、phenazine の生合成遺伝子と類似の遺伝子クラスター(全 11 の ORF)の取得に成功した。これらの ORF についてそれぞれ遺伝子破壊株を構築し、これらの ORF(遺伝子)が抗菌活性に必須であることを証明した。このことから DSM 11397 は phenazine 骨格を有する抗生物質を生産していると結論づけた。

上記、JCM 6824 株また DSM 11397 株とも異なる抗菌スペクトルを示す *R. erythropolis* JCM 2895 の抗生物質生合成遺伝子を得るため、トランスポゾン変異導入法を用いて抗菌活性を失った株のスクリーニングを行ったが数十万クローンの解析においても目的の変異株を得ることは出来なかったこのため現在手法を変えて遺伝子解析を進行している。

(3) *R. erythropolis* が生産する抗菌活性物質の抽出・精製:

R. erythropolis JCM 6824 の生産する抗生物質をその培養液から抽出し、新規抗生物質の取得に成功した。まず最少培地にコハク酸など少量の炭素源を加えた液体培地を作成し、JCM 6824 の種菌を植菌、28 で 24 28 時間振盪培養した。この培養液を滅菌フィルターに通して菌体を除去した後、C18 カラム、酢酸エチル、さらに HPLC を用いて抗菌活性画分を濃縮・精製した。十分に精製した後、¹H、および ¹³C NMR、並びに精密質量分析を行い、組成 C₂₅H₃₃NO₃、分子量 395、下記に示す構造の新規化合物であることを明らかにし、aurachin RE と命名した。本物質はグラム陽性細菌に対し非常に高い抗菌活性を示し、最小生育阻止濃度(MIC)は *Arthrobacter atrocyaneus* IAM 12339^T と *Corynebacterium glutamicum* IAM 12435^T に対し 0.01 μg/ml、また *Streptomyces griseus* IAM 12311^T と *Rhodococcus erythropolis* IAM 12122^T に対し 0.1 μg/ml を示した。本発見は二次代謝産物のいわゆる抗生物質として(抗菌ペプチド以外の)、*Rhodococcus* での初めての報告である。



R. erythropolis DSM 11397 の生産する抗生物質を得るため、上記と同様の方法で培養液中からの抽出・精製を試みた。C18 カラム、酢酸エチル、HPLC を用いて精製した化合物は濃い橙色の化合物であり、サイズ排除クロマ

トグラフィーの結果、分子量 180 前後の物質であると推定された。また GC-MS の解析からは分子量 212 の物質であることが推測された。この結果と遺伝子解析の結果から、本菌株の生産する抗生物質は phenazine 骨格に比較的小さい置換基がついた化合物であると予測された。これまでに分子量 212 の phenazine 系抗生物質は報告されていないことから本物質が新規化合物である可能性もあり、今後構造解析を進めて行く。phenazine 系の抗生物質はこれまで *Rhodococcus* で見いだされたことはなく、今回が初めての報告となる。

R. erythropolis JCM 2895 の生産する抗菌物質を得るため培養液からの抽出を試みたが、有機溶媒を用いた方法では抗菌画分を得ることは出来なかった。また培養液から得られる抗菌活性は 37 以上の温度に対しきわめて容易にその活性を失うことが明らかになった。これらのことから上記 2 株の抗生物質とは異なり、本菌株の抗菌成分は抗菌活性を持つタンパク質であると推定した。現在この物質の本体がタンパク質であるという仮定のもと、物質同定を行うべく研究を進めている。本物質が抗菌タンパク質であれば *Rhodococcus* としては初めての報告となる。

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 3 件)

すべて査読あり

(1) Teramoto, K., Kitagawa, W., Sato, H., Torimura, M., Tamura, T., & Tao, H. (2009) Phylogenetic Analysis of *Rhodococcus erythropolis* Based on the Variation of Ribosomal Proteins as Observed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry without Using Genome Information. *J. Biosci. Bioeng.*, 108(4), 348-353.

(2) Kitagawa, W., & Tamura, T. (2008) A Quinoline Antibiotic from *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824. *J. Antibiot.* 61(11), 680-682.

(3) Kitagawa, W., & Tamura, T. (2008) Three types of antibiotics produced from *Rhodococcus erythropolis* strains. *Microbes & Environ.*, 23(2), 167-171.

[学会発表](計 4 件)

(1) *Rhodococcus erythropolis* が生産する 3 種の抗菌物質と生合成遺伝子解析, 北川 航、田村 具博, 日本放線菌学会大会, 秋田、2009/07/17

(2) 抗菌活性を有する *Rhodococcus*

*erythropolis*の多様性,北川 航、田村 具博、
寺本華奈江(日本電子)、佐藤 浩昭、孫 麗
偉、鳥村 政基、田尾 博明,日本微生物生態
学会 第24回大会,札幌、2008/11/26

(3) Intraspecies competition among
antibiotic-producing *Rhodococcus*
erythropolis strains,北川 航、田村 具博,
放線菌ゲノム生物学に関する日英ワークシ
ョップ,東京市ヶ谷、2008/10/31

(4) THREE GROUPS OF ANTIBIOTIC-PRODUCING
RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS,北川 航、田村 具
博,国際微生物生態学会(ISME),ケアンズ、
2008/08/21

〔その他〕

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/rigb/gf-ppt/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 航 (KITAGAWA WATARU)

独立行政法人産業技術総合研究所・ゲノム

ファクトリー研究部門・研究員

研究者番号: 60415669

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし