

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15410

研究課題名（和文）遠縁種間の微生物二次代謝産物生産を可能にする人工生成遺伝子の創製

研究課題名（英文）Synthesis of desined biosynthetic gene cluster for specialized metabolite to express in different genus host

研究代表者

橋本 拓哉（Hashimoto, Takuya）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10783714

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）：放線菌宿主内で、*Chromobacterium* sp. に由来する生合成遺伝子クラスターを効率良く発現させるための人工生成遺伝子クラスターの設計と構築を行った。*Chromobacterium* sp. に由来するペプチド化合物YM-254890の生合成遺伝子クラスターについて、放線菌コドンへ最適化した、放線菌用人工生成遺伝子クラスターを設計した。設計した全長37 kbの人工遺伝子クラスターを合成DNA断片を、順次連結することで構築した。設計通りの人工生成遺伝子クラスターを構築し、放線菌に導入して化合物生産について評価を行った。しかしながら、現時点までに最終化合物の生産は確認出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオエコノミーへの関心から、合成生物学を利活用した物質生産技術が求められている。しかし系統的に大きく異なる属レベルで異なる遺伝子の異種発現は困難なことが多く、遺伝子利用における課題である。そこで、本研究では属レベルで系統の異なる微生物による化合物生産を目指し試みとして*Chromobacterium* sp. QS3666に由来する二次代謝生合成遺伝子クラスターを、*Streptomyces*属放線菌に導入して物質生産を検討した。さらに断片化された合成DNAから人工生成遺伝子クラスターを構築する手法を開発し、将来の人工生成遺伝子クラスターの利活用のための技術開発を行った。

研究成果の概要（英文）：A biosynthetic gene cluster for YM-254890 (YM) from *Chromobacterium* sp. was attempted to be expressed in *Streptomyces* hosts. Artificial biosynthetic gene clusters for YM-254890 were designed in silico. And to complete the synthesis of the designed gene cluster which spans 37 kb, 37 DNA fragments were synthesized. The fragments are assembled for the complete designed biosynthetic gene cluster. Finally the gene cluster was constructed according to the design, and evaluated in three actinomycete hosts. However, production of the final compound could not be confirmed.

研究分野：天然物化学

キーワード：生合成 人工遺伝子クラスター 異種発現 放線菌 *Streptomyces* 合成生物学 コドン最適化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

合成生物学の利活用による物質生産は、将来的なバイオエコノミー社会の中心となり得る技術である。実際に次世代シーケンサーの発展によって配列解析技術が高度化したことで、さまざまな微生物やメタゲノムの遺伝子情報の取得が容易になりつつある。しかし、系統的に大きく異なる微生物、特に種や属を越える微生物間においては、遺伝子発現は困難なことが多く、合成生物学による遺伝子利用のボトルネックとなっている。そこで、本研究では属レベルで系統の異なる微生物による化合物生産の試みとして *Chromobacterium* sp. QS3666 に由来する二次代謝生合成遺伝子クラスターを、*Streptomyces* 属放線菌に導入することで、属レベルで異なる微生物の遺伝子クラスターの発現を目指した。本課題の題材として YM-254890 (以降 YM、図 1) の生合成遺伝子クラスターに着目した。YM は、非リボソーム型ペプチド合成酵素によって生合成される環状ペプチドであり、Gq タイプの G タンパク質ヘテロ 3 量体において、GTP の加水分解反応を選択的に阻害する [1]。これまでに申請者は、生産菌のゲノムから生合成遺伝子クラスターを明らかにしてきた。この生合成遺伝子クラスターを利用して人工生合成遺伝子クラスターの異属微生物における物質生産を検証した。

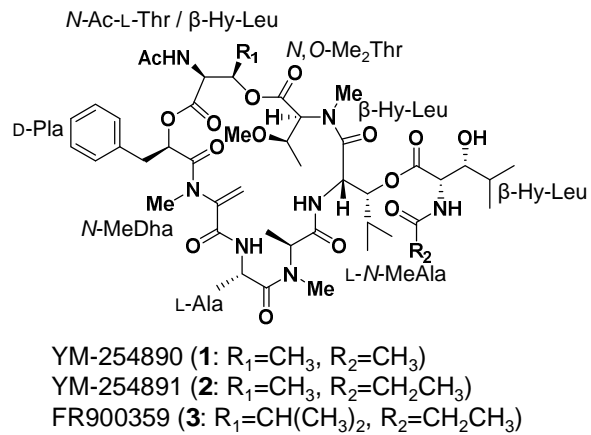


図 1. YM-254890 とその類縁化合物の構造

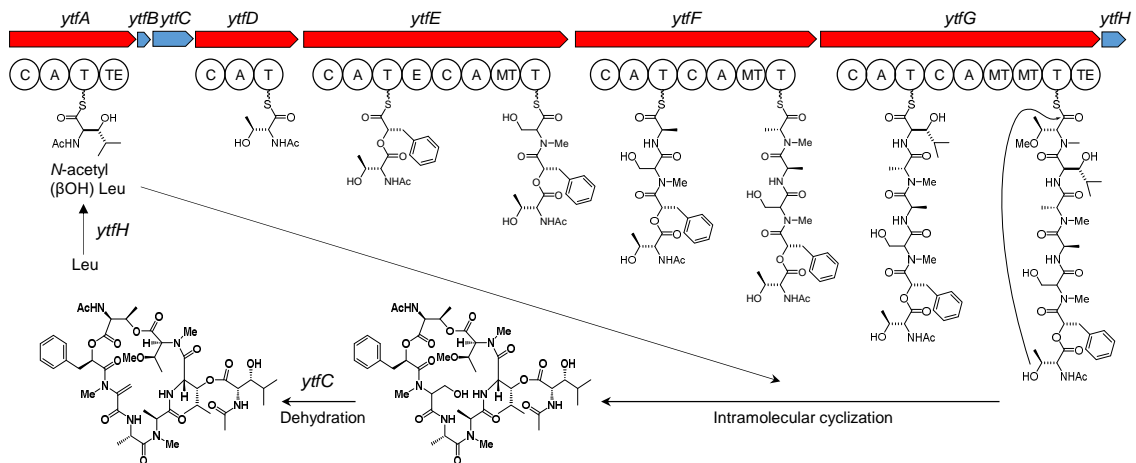


図 2. YM-254890 の推定生合成経路

2. 研究の目的

本研究ではこの YM 生合成遺伝子クラスターを放線菌型コドンの遺伝子に変換した人工生合成遺伝子クラスターを構築し、この人工遺伝子クラスターの放線菌内での異種発現によって、YM の生産を目指した。さらに、このような人工生合成遺伝子クラスターを短い DNA 断片を連結した、人工生合成遺伝子クラスターを構築する手法の確立を目指した。さらに、属レベルで異なる系統の微生物の遺伝子の発現による、化合物生産が可能になるかについて検証した。

3. 研究の方法

本研究は次の各段階によって行った。

YM 生合成遺伝子クラスターの生合成遺伝子内に存在する 8 つの各遺伝子の放線菌コドン

への最適化

最適化した各遺伝子配列の適切な配置と発現エレメントの構築

実際の配列構築のための DNA 断片の設計

DNA 断片の取得と段階的なつなぎ合わせによる人工生成遺伝子クラスター全長の取得

取得した人工生成遺伝子クラスターの放線菌内での発現の検討

配列設計と、配列構築の実験の流れを図 3 に示した。

人工生成遺伝子クラスターの構築と評価

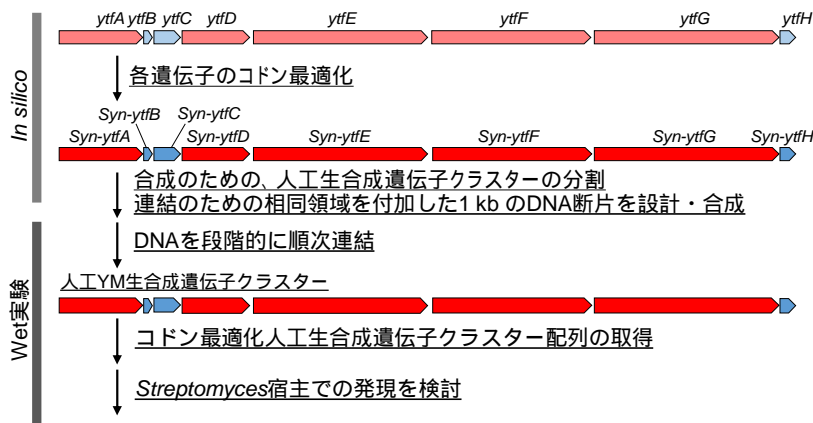


図 3. 人工生成遺伝子クラスターの構築と評価

4. 研究の成果

(1) *in silico* での人工生成遺伝子クラスターの設計

YM-254890 の生合成遺伝子クラスターは 8 つの遺伝子から成り、非リボソーム型ペプチド合成酵素遺伝子である *ytfA*, *D*, *E*, *F*, *G* および、MbtH protein と相同性を示す *ytfB*, malate dehydratase と相同性を示す *ytfC* および、ロイシンの β 位の酸化を触媒する *ytfH* で構成される。これまでに、類縁化合物である FR900359 の生合成遺伝子が報告されており、同様に 8 つの生合成遺伝子によって生合成されることが報告されている [2]。また、我々のグループにおいても、*Pseudomonas putida* を宿主とした異種発現実験に成功していることから、5 つの非リボソーム型ペプチド合成酵素遺伝子を含めた 8 個の遺伝子が YM の生合成に必要なことを確認できている。最上流の遺伝子である *ytfA* 遺伝子上流には、これらの CDS 配列と比べて GC 含量が有意に低い約 500 bp の領域が存在し、YM 生合成遺伝子クラスターのプロモーター領域と推定した。その他に遺伝子クラスター内にプロモーター候補となる長さの遺伝子間領域がないため、本遺伝子クラスターはシングルオペロンとして転写されると推定した。そこでまずコドン最適化のため、8 つの遺伝子配列の情報を抜き出した。これらの各遺伝子配列を放線菌コドンへと最適化した。具体的には、*Streptomyces avermitilis* の全コドンから、一次代謝経路に関連する遺伝子を選抜し、これらの遺伝子に利用されているコドンを基にしてコドンテーブルを作成した。このコドンテーブルを用いて各遺伝子のコドン頻度を最適化した。コドン最適化を行う際、同時に各段階のクローニング作業において、切り出しに用いる type IIS 制限酵素である SapI サイトが遺伝子クラスター内部に存在しないことを確認した。次に最適化した各遺伝子配列を、元の生合成遺伝子クラスターと同じ配置で各遺伝子を連結した。その際、遺伝子間領域が離れている場合は遺伝子間領域を削除し、代わりに人工リボソームバインディングサイト (RBS) (AGAGG) を開始コドンの 6 bp 上流に配置した。さらに、NRPS で翻訳カップリングしている箇所において、RBS が見られない箇所には、翻訳カップリングを損ねないよう RBS を設計した。最後に遺伝子クラスターの最上流に *sav2794p*、最下流に terminator を付加し、プロモ-

ター上流に EcoRI、terminator の下流に HindIII サイトを付加した。以上の設計によって、プロモーター領域を含めて約 37 kb の人工生合成遺伝子クラスターを設計した。

(2)人工生合成遺伝子クラスターの合成と連結による完全長の取得

次にこの全長配列を断片化し、37本の約1 kbサイズのDNA断片を設計・取得した。取得した各断片を、両端に type IIS 制限酵素を配置するように PCR で増幅した pRed をクローニングベクターとして用いて Gibson アセンブリーを行った。得られたプラスミドクローンを type IIS 制限酵素で反応を行うことで、相同領域を持つインサートを順次切り出し、Gibson アセンブリーによって段階的に連結した。この工程を繰り返し、最終的に 37 kb 全長を持つ人工生合成遺伝子クラスターの取得に成功した。得られた人工生合成遺伝子クラスターについて、発現用ベクターである pKU592A へと載せ替えを行い、導入用プラスミド pKU592A-synYM を構築した。

(3)放線菌宿主内での評価

放線菌宿主へと導入することによって評価した。プロモーター宿主として、*Streptomyces avermitilis* SUKA22、*Streptomyces lividans* TK23 Δ redDX、*Streptomyces albus* J1074 株について検討を行った。前培養 GSY 培地にて、27°C、2 日、その後、組成の異なる 4 種の物質生産培地 (Q, BPS, GY, Cia44) を利用して、27°C、5 日間培養を行った。培養液を *n*-BuOH にて抽出し、乾固した抽出物を LC/MS (XevoG2 Tof) にて分析した。しかしながら、いずれの条件においても、YN-254890 の生産は見られなかった。そこで導入した pKU592A-synYM の全長配列について PacBio シーケンサーによって確認した。その結果、*ytfD* の E926 のコドンに変異が入り、ナンセンス変異を起こしていることが確認出来た。そこで、我々が独自に開発した、Cas9 と Gibson アセンブリーを組み合わせた配列改変法を用いて、変異箇所の修復を行った [3]。修復した pKU592A-synYM を上記の各種放線菌に導入し、再度評価を行った。しかしながら、YM の生産は確認出来なかった。

以上の結果から、人工生合成遺伝子クラスターの設計を行い、40 kb 弱の生合成遺伝子クラスターの配列を設計通り、効率よく構築する手法の開発に成功した。一方で、放線菌宿主内での評価を行ったが、YM-254890 の生産は LC/MS では検出出来なかった。今後、各遺伝子の発現条件の最適化を更に検討することによって、YM-254890 の生産が期待できる。さらに本研究で開発したコドン最適化や、人工生合成遺伝子クラスター構築のためのノウハウは、他の生合成遺伝子クラスターのコドン最適化などでも適用可能と考えられる。

<引用文献>

1. Nishimura A., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 107, 13666-71 (2010)
2. Hermes, C., *et al.*, Nat. Commun. 12, 144 (2021).
3. Kudo, K., *et al.*, Nat. Commun. 11, 4022 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takuya Hashimoto, Junko Hashimoto, Noritaka Kagaya, Takehiro Nishimura, Hikaru Suenaga, Makoto Nishiyama, Tomohisa Kuzuyama, Kazuo Shin-ya	4. 巻 74
2. 論文標題 A novel oxazole-containing tetraene compound, JBIR-159, produced by heterologous expression of the cryptic trans-AT type polyketide synthase biosynthetic gene cluster	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 354-358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-021-00410-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 工藤 慧、橋本 拓哉、橋本 絢子、小首根 郁子、加賀谷 紀貴、上岡麗子、西村 壮央、小松護、末永 光、池田 治生、新家 一男
2. 発表標題 I型ポリケタイド合成酵素の精密改変による次世代天然物化学
3. 学会等名 第64回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八十島 浩太郎、吉田 将人、河原 哲平、橋本 拓哉、新家 一男、土井 隆行
2. 発表標題 オキサゾリン・N-ニトロソヒドロキシルアミン・3-アシルテトラミン酸を含有するJBIR-141 の全合成研究
3. 学会等名 第64回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本拓哉、淡川孝義、張驪驛、小首根郁子、橋本絢子、池田治生、阿部郁朗、新家一男
2. 発表標題 BACを利用したポリケタイド化合物の異種生産とPKS遺伝子の編集による化合物の構造改変
3. 学会等名 第62回 天然有機化合物討論会
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
---------	---------