

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 8日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580121

研究課題名（和文）放線菌二次代謝産物の分子構築機構および生産制御システムの包括的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of the biosynthetic machinery and their regulatory system for secondary metabolites in *Streptomyces*

研究代表者

荒川 賢治 (ARAKAWA KENJI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：80346527

研究成果の概要（和文）：

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株が生産する2つのポリケチド抗生物質ランカサイジン (LC), ランカマイシン (LM) の生合成および制御システムの包括的解析を行った。LM 生合成クラスターにコードされたII型チオエステラーゼ遺伝子 *lkmE* の遺伝子破壊株は、15-nor-LM 誘導体を蓄積した。これにより、*LkmE* は誤って導入された LM スターター基質を加水分解する役割をもつことが示唆された。また、LC, LM 生産を誘導するシグナル分子 SRB を培養液 160 リットルから単離し、化学合成を組み合わせて構造決定を行った。また SARP 型転写活性化因子 *srrY* がもうひとつの SARP 遺伝子 *srrZ* のプロモーター上流に結合することを明らかにし、これにより LM 生合成の活性化機構が解明できた。

研究成果の概要（英文）：

We carried out comprehensive analysis of the biosynthetic machinery and their regulatory system for lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei* 7434AN4. The disruptant of *lkmE* encoding type-II thioesterase accumulated 15-nor-LM derivatives, suggesting *LkmE* is responsible for hydrolysis of aberrant starter units for LM biosynthesis. We elucidated the structure of the signaling molecules SRBs that induce LC and LM production. Furthermore, the extensive analysis of regulatory genes revealed the positive regulation of LM biosynthesis by two SARP genes.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2012年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：農芸化学，生物生産化学・生物有機化学

キーワード：放線菌・ポリケチド・生合成・ピロロキノリンキノン・制御遺伝子・オートレギュレーター・転写活性化因子・ゲノムマイニング

1. 研究開始当初の背景

土壌微生物である放線菌は、抗生物質に代表される多種多様な二次代謝産物を生産す

る。近年は生合成遺伝子の改変による非天然型抗生物質の創製も盛んに行われており、創薬の研究シーズとして期待されている。本研究では2つのポリケチド抗生物質ランカサイ

ジン (LC) およびランカマイシン (LM) (図 1A) を生産する放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株に注目した。本菌は 3 つの線状プラスミド pSLA2-L (210,614 bp), pSLA2-M (113,451 bp), pSLA2-S (17,526 bp) を保持しており、そのうち LC, LM 生合成遺伝子群は pSLA2-L 上に存在していた。また、pSLA2-L 上にはこれらの制御遺伝子や構造未知の type-II 型ポリケチド (*roc*)・カロテノイド (*crt*) 生合成遺伝子群も本プラスミド上にコードされていた (図 1B) [Mochizuki, *et al.*, *Mol. Microbiol.* **48**, 1501-1510 (2003)]。

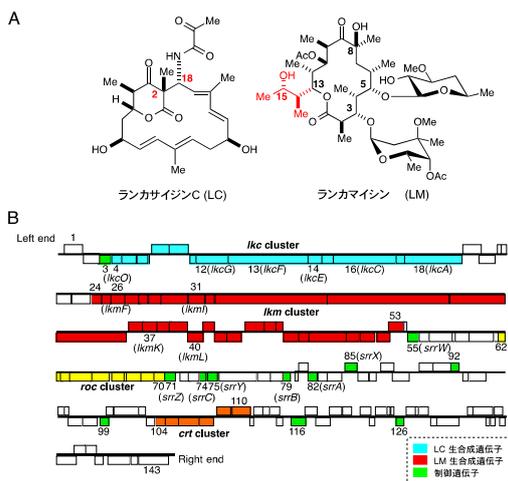


図1 (A) ランカサイジン・ランカマイシンの化学構造 (B) 線状プラスミド pSLA2-L の遺伝子地図

2. 研究の目的

本研究課題では特異なモジュール・反復混合ポリケチド生合成系を有する LC の生合成機構解析、生合成酵素による分子構造変換、構造未知の二次代謝産物のゲノムマイニング、制御遺伝子群の網羅的解析によるシグナルカスケードの全容解明などを有機的に組み合わせる研究を遂行し、放線菌の特異な物質変換機構および制御遺伝子による生産制御機構の総合的解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) LC 生合成におけるモジュラー・反復混合型 PKS の解析

LC ポリケチド骨格の酸化状態から考えるとケト基の還元は計 7 回必要なのに対し、ケト還元酵素 (ketoreductase, KR) ドメインはわずか 3 か所しか存在しておらず、中間体の取得が達成できれば PKS のモジュール・反復型の判別が可能となる。そこで本研究課題では各機能ドメインの破壊株を構築し、得られる微量代謝中間体の化学構造を各種分光機器 (NMR, MS, HPLC) を駆使して解析し、モジュール・反復混合型 PKS の分子認識機構の解明を世界に先駆けて展開する。また、エリスロ

マイシン生合成では、大腸菌内で PKS を発現させ、生成物の取得に成功している。本研究課題でも同様の手法を用いて鍵中間体の取得を目指す。本項目に関しては、生産レベルが野生株と比較して劇的に低下すると考えられるので、制御遺伝子改変による代謝産物生産の閾値向上も考慮して研究を進める

(2) 高機能分子構築を目指した生合成酵素の機能解析

我々は LM 生合成クラスター内の P450 水酸化酵素 *lkmF*, *lkmK* および糖転移酵素 *lkmI*, *lkmL* の遺伝子破壊を行い、後述の post-PKS 経路を明らかにした。まずアグリコンが *LkmK* によって 15 位が水酸化され、次いで *LkmL* による 3 位水酸基のグリコシル化、*LkmF* による 8 位水酸化が生じ、最後に *LkmI* により 5 位水酸基がグリコシル化されて LM が合成される、というものである。

水酸化酵素や糖転移酵素は幅広い基質認識を有するものが多く、反応点にとらわれない物質変換能を発揮する可能性がある。そこで該当酵素を発現し、一連の生合成研究で取得している様々なマクロライド中間体の変換反応を試み、反応点・隣接官能基などの基質特異性や動力学的パラメーターなどを明らかにする。本研究課題は生合成研究の応用展開を探る位置付けである。

また、LC 生合成における PQQ 要求性デヒドロゲナーゼ遺伝子 *orf23*, LM 生合成における II 型チオエステラーゼ遺伝子 *lkmE* の機能についても、それぞれ遺伝子破壊実験や *in vitro* 変換実験、取り込み実験などを駆使して解析を行う。

(3) 二次代謝を司るシグナル分子 SRB の単離・構造決定、およびその生合成

Streptomyces 属放線菌には A-factor, virginia butanolide などのシグナル分子を鍵物質とした二次代謝制御カスケードが存在しており、pSLA2-L 上にも対応する制御遺伝子ホモログが存在していた。すでに申請者は遺伝子破壊株の解析により、*srrX* (シグナル分子 SRB 合成遺伝子) → *srrA* (SRB リセプター) → *srrY* (転写活性化因子) → LC, LM という *S. rochei* 二次代謝制御カスケードの存在を明らかにした。

A-factor に代表されるシグナル分子は nM オーダーで抗生物質生産などを誘導する微生物ホルモンであり、 γ -ブチロラク톤を共通構造として、2 位炭化水素鎖の鎖長および 6 位の酸化状態に多様性がある。また近年フラン骨格を有するシグナル分子が *S. coelicolor* から発見され、*S. rochei* のシグナル分子 SRB の構造多様性に興味を持たれた。*srrX* 破壊株に既知のシグナル分子を添加したところいずれも抗生物質生産が回復せず、

SRB は新規骨格構造である可能性が示唆された。そこで数百リットルスケールで大量培養し、各種クロマトグラフィーを用いて SRB の単離精製を行い、化学合成も組み合わせることで構造決定を行う。SRB 活性検出は *srrX* 破壊株の抗生物質生産性回復により行う。

(4) 二次代謝制御シグナルカスケードの網羅的解析

課題(3)で記載した制御遺伝子の他に SARP 活性化因子遺伝子 *srrZ*, *srrW*, リプレッサー遺伝子 *srrB*, *srrC* などがあり、抗生物質生産への関与が示唆された。*srrZ* 破壊株は LM 非生産となり、リプレッサー *srrB* を破壊すると LC, LM 大量生産株が取得できた。

そこで本研究では制御遺伝子の多重破壊株の作製や RT-PCR による網羅的遺伝子発現解析を行い、抗生物質生産に対する影響を調べる。さらに *SrrB*, *SrrY* タンパク質の標的遺伝子をゲルシフト解析やフットプリントなどを用いて特定し、制御カスケードの全貌を明らかにする。

(5) 二次代謝生合成遺伝子クラスターのゲノムマイニング

pSLA2-L 上には type-II ポリケチド (*roc*) およびカロテノイド (*crt*) 生合成遺伝子群がある (図 1B) が、それらの代謝産物については確認出来ておらず、通常培養条件では生産が抑制されている可能性がある。そこで研究課題 (4) で活性化因子 *SrrY* の標的配列が明らかになった場合、これら生合成クラスターの上流に *SrrY* 標的配列をデザインし、生産誘導を試みる。さらに異種放線菌での生合成クラスターの強制発現も同時並行で行い、潜在的代謝産物と考えられるこれらの物質生産へとこぎ着け、生産制御と物質生産研究との融合を図る。本計画はゲノムマイニングを指向した制御遺伝子解析という位置づけでもある。

4. 研究成果

(1) モジュラー・反復混合型ポリケチド生合成系を証明する鍵物質を得るため、 β -ケト基還元立体化学選択性を司るアスパラギン酸残基に注目し、*lkcF-KR1* ドメインの点変異株 (*lkcF-KR1*^{D351L}) を構築した。本株の代謝産物解析を行ったところランカサイジン生産は失われており、本変異がポリケチド生合成に影響を及ぼすことが分かった。現在、微量代謝産物の網羅的解析を行っているが、鍵中間体の取得には至っていない。ポリケチド生合成の後半に関与すると考えられる *lkcF-KR2* ドメインについても同様の変異を行う予定である。

成熟ポリケチド鎖の切断に関与する *lkcG*-

チオエステラーゼ (TE) ドメインの発現ベクターの構築に着手した。*lkcG*-TE の誘導発現型ベクターを親株および *lkc*-PKS 破壊株に形質転換し、PKS からの遊離ポリケチド中間体の取得を試みている。

また各種 *lkc* 遺伝子破壊株の代謝産物を調べたところ、親株非生産の化合物の蓄積が見出された。これらの化合物を構造解析したところ、抗カビ化合物ペンタマイシンおよびポリケチド化合物シトレジオール、*epi*-シトレジオールであった (図 2)。いずれも LC 生合成中間体との直接の相関性はないが、それらの生合成にも興味を持たれる。

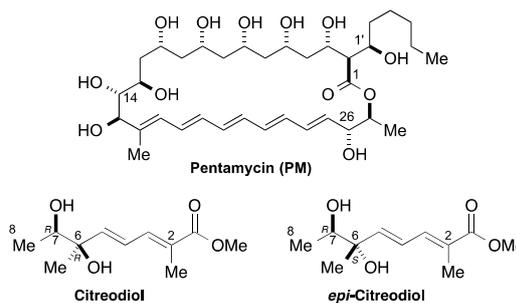


図2 *lkc* 遺伝子破壊株から取得した二次代謝産物

(2) LM 生合成クラスターにコードされた II 型チオエステラーゼ遺伝子 *lkmE* を破壊したところ、新規 LM 誘導体が得られた。この 13 位分岐側鎖は 1-carboxyethyl 基であり、LM のそれ (3-hydroxy-2-butyl 基) と比較して 1 炭素少なく、バリンをスターター基質としている可能性が示唆された。これは [3-²H]3-methyl-2-oxobutyrate を合成し、その取り込み実験により確認した。また、15-nor-LM 誘導体の分岐側鎖の 14 位立体化学も決定する必要がある。そこでプロキラルなメチル基を重水素標識したキラル重水素化イソ酪酸を合成し、取り込ませたところ、(2*R*)-[3-²H]イソ酪酸の重水素取り込みが認められた。これにより 15-nor-LM の 14 位立体化学は *R* であることが分かった。以上により、*LkmE* は誤って導入された LM スターター基質 (この場合はバリン誘導体) を加水分解する役割をもつことが示唆された (雑誌論文④) (図 3)。

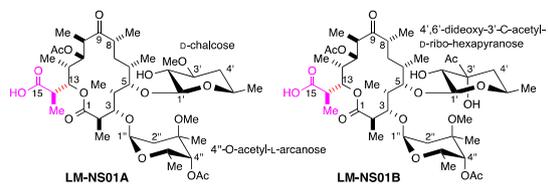


図3 *lkmE* 破壊株から単離したランカマイシン誘導体の化学構造

LC 生合成における PQQ 要求性酵素 Orf23 の役割を調べるために、まず大腸菌発現系でタンパク発現を試みたが、有意なタンパク生成は認められなかった。そこで放線菌発現用プ

ラスミドpHSA81を用いてOrf23発現ベクターpYY03を構築した。

Streptomyces lividans/pYY03形質転換体は、ランカサイジノール(C-24位が水酸基)をランカサイジンC(C-24位がケト基)へと変換した。この変換はpHSA81を含むコントロールでは見いだせなかったため、これによりOrf23はランカサイジン合成においてC-24位酸化に関与することが分かった。本知見はPQQ要求性酵素の抗生物質合成への関与の最初の報告となる。

(3) SRBの単離・構造決定を行うため、200リットルスケールで培養し、各種クロマトグラフィーで精製した。高分解能質量分析により2つの活性成分の存在が示唆された。それらの構造をNMRで解析したところ、いずれもbutenolide骨格を有する新規シグナル分子であった。本構造および1'位立体化学を確認するために化学合成したところ、C-1'位の立体化学はRであることが分かった。今まで知られている放線菌微生物ホルモンはいずれもγ-butyrolactone骨格であり、本成果によりシグナル分子の構造多様性を見出すことが出来た(雑誌論文①)(図4)。

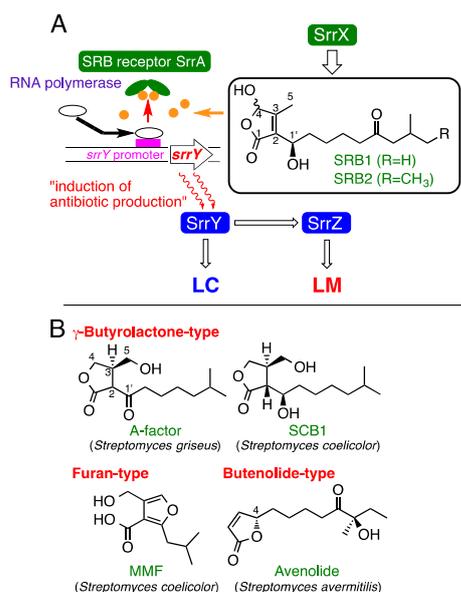


図4 *S. rochei* 二次代謝カスケードおよびシグナル分子の化学構造

(4) SRBリセプター *srrA* の標的遺伝子の発現解析を行ったところ、SARP型アクティベーター *srrY*、リプレッサー *srrB* の発現が16時間以降で開始されることが分かった。また、前者の発現は30時間以降で減少し、後者のそれは40時間以降でも定常的であった。すなわち、*srrY* の発現が、培養前期は *srrA*、培養後期には *srrB* によって抑制されていることを示唆している。また Δ *srrA* 株では *srrY* および抗生物質の早期発現・生産が

認められた。一方 Δ *srrB* 株では *srrY* の発現が培養後期でも観察され、抗生物質の過剰生産が引き起こされた。以上より *srrY* の一過発現による巧妙な抗生物質生産調節機構を示すことが出来た。

(5) ゲノムマイニングの一環として、制御遺伝子に注目した。今回 *srrB*、*lkcF-KR1*、*lkmE* の三重破壊株を構築した。これはリプレッサー *srrB* 変異により二次代謝生産を向上させ、*lkcF-KR1* 変異によりLC合成を遮断し、II型チオエステラーゼ遺伝子 *lkmE* 変異によりLM生産を低下させた株である。本株の代謝産物解析を行ったところ、通常生産していない化合物の蓄積が認められた。UV活性化化合物の構造決定を行ったところ、アゾキシアルケン化合物であることが分かった。アゾ結合の形成機構など不明な点が多く、今後取り込み実験や推定合成遺伝子の破壊・タンパク発現などにより解析していく予定である。

本研究の3年間の成果として、抗生物質合成・二次代謝カスケードの解析を中心にした原著論文7報を含めた雑誌論文計11件を発表した(以下に記載)。LC、LMはともにタンパク合成阻害剤として作用するが、イスラエル・ワイズマン研究所 Ada Yonath 教授(2009年ノーベル化学賞受賞者)との共同研究により、前者はペプチド合成の活性中心、後者は隣接した合成ペプチドの排出部に結合して抗菌シナジー効果を示すことが明らかとなった(雑誌論文③)。本菌が構造の異なる2つの抗生物質を生産し、それらの合成が同一プラスミド上にコードされ、かつ同一の制御カスケードでコントロールされることは、放線菌の生存戦略や生物進化の観点からも大変興味深い。今後も未解明の生合成機構や制御カスケードの解析、さらには制御因子の多面発現制御によるゲノムマイニングなどにも積極的に取り組み、化学の視点から生命現象を追究していきたいと考えている。

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11件)

- ① K. Arakawa, N. Tsuda, A. Taniguchi, H. Kinashi
“The butenolide signaling molecules SRB1 and SRB2 induce lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*”, *ChemBioChem*, **13**, 1447-1457 (2012). (査読有)
- ② Z. Cao, G. Khodakaramian, K. Arakawa, H. Kinashi

- “Isolation of borrelidin as a phytotoxic compound from a potato pathogenic *Streptomyces* strain”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 353-357 (2012). (査読有)
- ③ M. J. Belousoff, T. Shapira, A. Bashan, E. Zimmerman, H. Rozenberg, K. Arakawa, H. Kinashi, A. Yonath.
“Crystal structure of the synergistic antibiotic pair, lankamycin and lankacidin, in complex with the large ribosomal subunit”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2717-2722 (2011). (査読有)
- ④ K. Arakawa, Z. Cao, N. Suzuki, H. Kinashi
“Isolation, structural elucidation, and biosynthesis of 15-norlankamycin derivatives produced by a type-II thioesterase disruptant of *Streptomyces rochei*”, *Tetrahedron*, **67**, 5199-5205 (2011). (査読有)
- ⑤ Y. Yang, T. Kurokawa, Y. Takahama, Y. Nindita, S. Mochizuki, K. Arakawa, S. Endo, H. Kinashi
“pSLA2-M of *Streptomyces rochei* is a composite linear plasmid characterized by self-defense genes and homology with pSLA2-L”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **75**, 1147-1153 (2011). (査読有)
- ⑥ T. Suzuki, S. Mochizuki, S. Yamamoto, K. Arakawa, H. Kinashi
“Regulation of lankamycin biosynthesis in *Streptomyces rochei* by two SARP genes, *srrY* and *srrZ*”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, 819-827 (2010). (査読有)

[学会発表] (計33件)

- ① 荒川賢治、「放線菌線状プラスミドにコードされた抗生物質生合成クラスターの遺伝学的・生物有機化学的解析」日本農芸化学会・農芸化学奨励賞 (2013年3月24日・仙台)
- ② K. Arakawa, N. Tsuda, A. Taniguchi, H. Kinashi
“Isolation, structural elucidation, and biosynthesis of butenolide signaling molecules that induce lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*”, International Conference of Natural Products Biosynthesis (2012年6月18日・淡路島) (国際会議招待講演)
- ③ K. Arakawa, A. Taniguchi, N. Tsuda, H. Kinashi
“Isolation and structural elucidation of the novel γ -butenolide signaling molecules SRBs that switch on antibiotic production in *Streptomyces rochei* 7434AN4”, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (2011年9月8日・札幌) (国際会議口頭発表)

- ④ K. Arakawa, S. Tatsuno, H. Kinashi
“Biosynthesis of the 17-membered polyketide antibiotic lankacidin produced by *Streptomyces rochei* 7434AN4”, Pacificchem 2010 Congress (2010年12月15日・米国ハワイ州ホノルル) (国際会議招待講演)

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/51ab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川 賢治 (ARAKAWA KENJI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：80346527

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：