

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30日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22603011

研究課題名（和文） 生合成工学ツールの創製をめざした微生物二次代謝研究

 研究課題名（英文） Studies on microbial secondary metabolism
for development of biosynthetic technology tools

研究代表者

早川 洋一（HAYAKAWA YOICHI）

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：20208606

研究成果の概要（和文）：Thioviridamide 生産菌のゲノム解析を行い、thioviridamide 前駆体ペプチドをコードする遺伝子 *tvaA* を見いだした。さらに、15 遺伝子 (*tvaA*～*tvaO*) を導入した放線菌において thioviridamide の生産を確認したことから、チオアミド生成遺伝子を含む thioviridamide 生合成遺伝子クラスターを同定した。Hatomarubigin 生合成における架橋酵素遺伝子 *hrbY* およびメチル化遺伝子 *hrbU* を同定した。また、*hrbF* を破壊した hatomarubigin 生合成遺伝子導入菌において 5-hydroxyhatomarubigin E の生産が確認され、*hrbF* はヒドロキシ基導入に関与する遺伝子であることが示された。

研究成果の概要（英文）：The genome analysis of a thioviridamide-producing organism revealed a gene encoding the thioviridamide precursor peptide (*tvaA*). Heterologous production of thioviridamide by 15 genes (*tvaA* - *tvaO*) identified the thioviridamide biosynthetic gene cluster including thioamide-forming genes. In the hatomarubigin biosynthetic gene cluster, *hrbY* and *hrbU* were identified as a methylene-bridge forming gene and a methyltransferase gene, respectively. The *hrbF*-deficient gene cluster produced 5-hydroxyhatomarubigin E, suggesting that *hrbF* controls the hydroxylation regioselectivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：生合成、チオアミド、メチレン架橋、thioviridamide、hatomarubigin

1. 研究開始当初の背景

微生物二次代謝産物は多様な構造と活性を持ち、医薬、農薬、研究用試薬として広く利用されているが、化学合成された物質と比較して構造展開が困難であり、化学資源としての汎用性には欠けている。一方、微生物の

生合成反応は基質選択性、光学特異性等の点で極めて優秀であり、多くの有用化合物が微生物変換や微生物酵素を用いて生産されている。このような背景のもとに、微生物代謝産物の生合成遺伝子改変により、新しい化合物を創製する生合成工学が展開されている。

しかし、生合成工学による物質生産は、アミノ酸の置換や酸化状態、水和状態の改変程度に限定されているのが現状である。したがって、よりダイナミックな構造展開を図るのならば、新しい生合成反応の導入が不可欠であり、そのような生合成ツールの発見が求められている。

我々は、生物活性微生物代謝産物の探索過程で、様々な構造と活性を有する有機化合物を単離してきた。その中で、チオアミド含有ペプチド thioviridamide とメチレン架橋アングサイクリン hatomarubigin D は、他の微生物代謝産物に見いだされていない構造を有する点でユニークであり、その生合成機構解明に興味を持たれるとともに、チオアミド形成反応や芳香族メチレン架橋反応を利用する新しい生合成工学のツール創製が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、抗腫瘍活性を有する放線菌代謝産物として我々が発見した thioviridamide が、極めて稀なチオアミド結合を有するペプチド化合物であることに着目し、thioviridamide 生合成遺伝子を同定し、チオアミド生成遺伝子を明らかにすることを目的とする。さらに、チオアミド化遺伝子の機能を解析し、新しい生合成工学ツールの創製をめざす。また、我々が発見したアングサイクリン系抗生物質 hatomarubigin D は、芳香族ポリケチドがメチレンを介して二量体化した化合物であり、このような架橋構造は他の微生物代謝産物では知られていない。そこで、メチレン架橋酵素遺伝子を含む hatomarubigin 生合成遺伝子を同定し、各反応を解析することにより、生合成工学ツールとしての有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) Thioviridamide の生合成に関する研究

① PCR による NRPS 遺伝子の探索

Streptomyces olivoviridis NA05001 が生産する thioviridamide (TVA) は、11 個のアミノ酸残基が 6 つのアミド結合と 5 つのチオアミド結合により結合しているペプチド化合物である。ペプチド系抗生物質の多くは nonribosomal peptide synthetases (NRPS) によって生合成されることが知られている。NRPS はアミノ酸 1 残基に対して 1 つのモジュールから構成されており、その遺伝子はクラスターを形成している。そこで、微生物由来 NRPS のアデニル化領域におけるアミノ酸保存配列を基にプライマーを設計し、TVA 生産菌のゲノムを鋳型に PCR を行った。増幅した DNA 断片をクローニングし、塩基配列を解析することにより NRPS 遺伝子を同定した。次に、TVA 生産菌ゲノム DNA を Sau3AI で部分消

化した後、コスミドベクター pWE15 に挿入し、コスミドライブラリーを作製した。得られた NRPS 遺伝子断片をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、NRPS 遺伝子を含むコスミドを取得した。さらに、このコスミドを用いて NRPS 遺伝子周辺の塩基配列を解析した。

② ゲノムライブラリーの塩基配列解析による NRPS 遺伝子の探索

NRPS 遺伝子のサイズを考慮すると、TVA 生合成遺伝子では 50 kbp 以上にわたって NRPS が連続していると考えられる。そこで、TVA 生産菌ゲノム DNA のコスミドライブラリーの塩基配列をランダムに解析することにより、TVA 生合成遺伝子の NRPS を見いだせると考えた。コスミドを 200 個選択し、コスミドベクターのクローニング部位プライマーを用いて、コスミド挿入 DNA 末端における NRPS の有無を調べた。NRPS が検出されたコスミドについてサブクローニングを行い、NRPS 遺伝子周辺の塩基配列解析を行った。

③ ドラフトゲノム解析による TVA 生合成遺伝子の探索

Lantibiotics やチオペプチド系抗生物質などの少数のペプチド系微生物代謝産物は、その前駆体ペプチドがリボソーム系により合成された後、翻訳後修飾により生合成される。そこで、TVA 生産菌ゲノム DNA の塩基配列解析を行い、前駆体ペプチドの予測アミノ酸配列 (VMAAAAS(/C)IALHC) をコードする遺伝子を探索した。次に、見いだされた遺伝子周辺の塩基配列を明らかにするとともに、TVA 前駆体ペプチド遺伝子を含む生合成遺伝子クラスターをクローニングした。さらに、生合成遺伝子を挿入したシャトルベクター pWHM3 を *Streptomyces lividans* TK23 に導入することにより、TVA の生産を試みた。

(2) Hatomarubigin の生合成に関する研究

① メチレン架橋遺伝子の同定

Streptomyces sp. 2238-SVT4 における hatomarubigin (HR) 生合成遺伝子クラスターを同定するため、アングサイクリンのアロマトラーゼまたはサイクラーゼ間で高度に保存されているアミノ酸配列を基に設計したプライマーを用いて PCR 法で両酵素の遺伝子を増幅した。次に、HR 生産菌のゲノム DNA を Sau3AI で部分消化し、コスミドライブラリーを作製した後、PCR 断片をプローブとするコロニーハイブリダイゼーションにより、目的の遺伝子を含むコスミドを取得した。さらに、アロマトラーゼおよびサイクラーゼ遺伝子の周辺領域 35 kbp の DNA 塩基配列を決定した。本遺伝子群のうち、アングサイクリンの生合成に必要な遺伝子は、前半の 25 個の ORF に

含まれていた。そこで、*hrbR1*~*hrbX*の25遺伝子を3領域に分割してクローニングし、pWHM3に挿入したプラスミドを構築した。これを*S. lividans*に導入後、代謝産物をHPLC分析した。

メチレン架橋酵素の候補遺伝子である*hrbY*をタンパク質生産用ベクターであるpQE30にクローニングし、大腸菌で生産したHrbY組換え酵素を用いてhatomarubigin C (HRC)の変換反応を行った。また、*hrbR1*~*hrbX*の25遺伝子に*hrbY*を連結し、これを導入した*S. lividans*の代謝産物をHPLC解析した。

② メチル化遺伝子の同定

hrbR1~*hrbX*および*hrbY*を挿入したpWHM3を用いて、PCRと制限酵素処理により*hrbU*を欠失したプラスミドを構築した。これを*S. lividans*に導入し、代謝産物をHPLC分析した。本形質転換体は新規HR類を生産したので、この化合物を単離し、構造決定した。

次に、pQE30に*hrbU*をクローニングし、大腸菌で生産したHrbU組換え酵素を用いて、得られた新規HRの変換反応を行った。

③ 機能未知遺伝子の機能解明

*hrb*クラスター中の機能未知遺伝子である*hrbF*について異種発現系を用いた機能解析を試みた。*hrbR1*~*hrbX*および*hrbY*を挿入したpWHM3を用いて、PCRと制限酵素処理により、*hrbF*を欠失したプラスミドを構築した。これを*S. lividans*に導入し、代謝産物をHPLC分析した。本形質転換体は新規HR類を生産したので、この化合物を単離し、構造決定した。

4. 研究成果

(1) Thioviridamideの生合成に関する研究

① PCRによるNRPS遺伝子の探索

NRPSのアミノ酸保存配列を利用したPCRによる探索において、NRPS1~NRPS5の5つのNRPS遺伝子を同定した。また、NRPS2を含むコスミド中にNRPS6が見いだされた。サブクローニングしたコスミドDNAの塩基配列を解析した結果、これらの周辺には連続したNRPS遺伝子を確認できず、これらのNRPSはTVA生合成に関与しないことが示唆された。

② ゲノムライブラリーの塩基配列解析によるNRPS遺伝子の探索

TVA生産菌ゲノムDNAのコスミドライブラリーを用いた探索により、NRPS7およびNRPS8が見いだされた。このうち、NRPS8を含むコスミドの塩基配列を解析した結果、さらに2つのNRPS遺伝子(NRPS9およびNRPS10)が確認された。しかし、周辺に他のNRPS遺伝子は存在せず、これらのNRPS遺伝子がTVA

生合成遺伝子ではないことが示されるとともに、TVAはNRPSにより生合成されるペプチドではない可能性が示唆された。

③ ドラフトゲノム解析によるTVA生合成遺伝子の探索

TVAの構成アミノ酸には、異常アミノ酸*S*-(2-aminovinyl)cysteine (AviCys)が含まれている(図1)。AviCysはepidermin、microbisporicin、cypemycinなどのリボソーム系により生合成されるペプチド抗生物質中に見いだされ、セリンまたはシステイン由来のデヒドロアラニン残基とC末端システイン残基が酸化的脱カルボキシル化反応により縮合して生成することが報告されている。したがって、TVAがリボソーム系により生合成されるとすると、その前駆体ペプチドはVMAAAAS(/C)IALHC配列を有すると推定される。

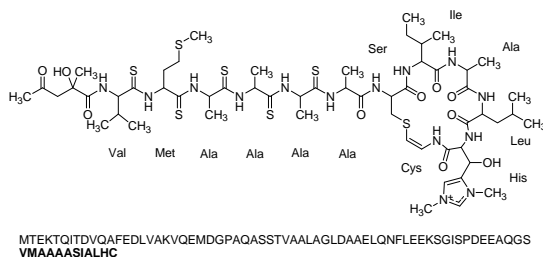


図1. TVAとTVA前駆体ペプチドの構造

そこで、TVA生産菌である*Streptomyces olivoviridis* NA05001のドラフトゲノム解析を行い、上記アミノ酸配列をコードする遺伝子を探索した。その結果、C末端にVMAAAASIALHC配列を有する75アミノ酸からなるペプチドをコードする遺伝子*tvaA*が見いだされた(図1)。*tvaA*下流には、制御遺伝子*tvaB*を挟んで連続する10遺伝子(*tvaC*~*tvaL*)が存在し、これらはTVA生合成遺伝子クラスターを形成すると考えられる(図2)。*tvaA*上流に位置する2個のORFは、それぞれDNAポリメラーゼおよびプロテアーゼと高い相同性を示し、同一単位で転写されると考えられることから、TVA生合成遺伝子クラスターに含まれないことが示唆された。同様に、*tvaL*下流の*orf4*は、DNAポリメラーゼと高い相同性を示すため、本クラスターから除外した。*tvaL*と*orf4*間には、4個のORFが存在するが、これらがTVA生合成に必要なかどうか確認するため、16.6 kbpにわたる*tvaA*~*tvaO*の15遺伝子を含む領域をクローニングした。これを*S. lividans*に導入し、形質転換株の培養抽出物をHPLC分析したところ、TVAの生産が確認された。したがって、本遺伝子クラスターはTVA生合成遺伝子であることが同定され、チオアミド化遺伝子もクラスター内に存在することが示された。

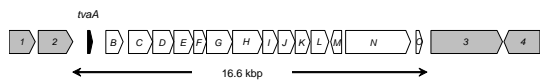


図 2. TVA 生合成遺伝子 (*tva*) クラスター

表 1. *tva* クラスター中の ORF

ORF	aa	Homologous protein	Identity
Orf1	401	DNA polymerase III	90
Orf2	529	Protease	83
TvaA	75	ABC transporter	46
TvaB	275	SARP family regulator	35
TvaC	377	Phosphotransferase	29
TvaD	328	Hypothetical protein	25
TvaE	308	Phosphotransferase	48
TvaF	197	Decarboxylase	39
TvaG	407	Methyltransferase	43
TvaH	452	Methanogenesis marker protein 1	36
TvaI	218	TfuA-like core domain-containing protein	44
TvaJ	280	Dioxygenase	29
TvaK	220	Cysteine protease	27
TvaL	282	Integral membrane protein	31
TvaM	160	Response regulator	55
TvaN	1003	Transcriptional regulator	67
Tva0	94	Hypothetical protein	54
Orf3	1089	Transcriptional regulator	63
Orf4	561	DNA polymerase I	87

TVA 生合成遺伝子産物の相同タンパク質を表 1 に示す。TvaF は epidermin、microbisporicin、cypemycin における AviCys 生成に関与するデカルボキシラーゼと同一性を示すことから、同様の機能を有すると考えられる。TvaK はシステインプロテアーゼと同一性を示すことから、TVA 前駆体ペプチドからリーダーペプチドを切断するプロテアーゼであると考えられる。TvaG と TvaJ は、それぞれメチルトランスフェラーゼおよびジオキシゲナーゼと同一性を示した。TVA はヒスチジン由来の β -hydroxy- N^1, N^3 -dimethylhistidinium 残基を有することから、これらの酵素はその生合成に関わると推定される。制御遺伝子以外の残る ORF は *tvaC*、*tvaD*、*tvaE*、*tvaH*、*tvaI*、*tvaL*、*tvaO* の 6 遺伝子であり、これらの中にチオアミド化遺伝子が存在すると考えられる。

(2) Hatomarubigin の生合成に関する研究

① メチレン架橋遺伝子の同定

アングサイクリンのアロマトーゼ、サイクララーゼを増幅する PCR により、*Streptomyces* sp. 2238-SVT4 におけるアングサイクリン生合成遺伝子群をクローニングした。周辺領域

の塩基配列を決定した結果、hatomarubigin (HR) 生合成への関与が考えられる 30 個の ORF が明らかになり、これらの遺伝子は 30 kbp にわたるクラスター (*hrb* クラスター) を形成していた (図 3)。本クラスター内にはアングサイクリン抗生物質生合成遺伝子に共通して存在するポリケチド合成酵素、酸化還元酵素、オキシゲナーゼのほかに *O*-メチル転移酵素が含まれていた (表 2)。

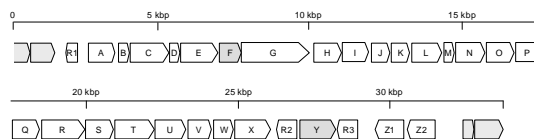
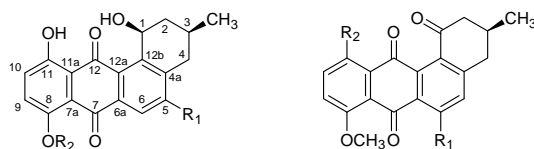


図 3. HR 生合成遺伝子 (*hrb*) クラスター



HRC	R ₁ = H, R ₂ = CH ₃	Hatomarubigin A	R ₁ = OH, R ₂ = H
HRE	R ₁ = H, R ₂ = H	Hatomarubigin B	R ₁ = H, R ₂ = OH
HRF	R ₁ = OH, R ₂ = H	Rubiginone B ₂	R ₁ = H, R ₂ = H

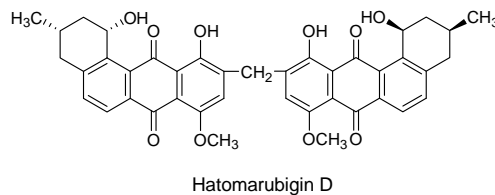


図 4. HR 類の構造

hrb クラスターのうち、*hrbR1*~*hrbX* の 25 遺伝子を *S. lividans* に導入し、代謝産物を HPLC 分析した。その結果、hatomarubigin A、B、C および生合成中間体の rubiginone B₂ の生産が確認され (図 4)、*hrb* クラスターが HR 生合成遺伝子であることが明らかになった。

Hatomarubigin D (HRD) 生合成におけるメチレン架橋には、残る 5 遺伝子のうち、2 個の調節遺伝子を除く 3 遺伝子 (*hrbY*、*hrbZ1*、*hrbZ2*) のいずれかが必要なことが示唆された。そこで、酸化還元酵素と同一性を示す HrbY の組換え酵素を用いて HRC の変換反応を行った。その結果、メチルコバラミンと NADPH の存在下で HRD の生成が確認された。次いで、*hrbR1*~*hrbX* に *hrbY* を連結し、*S. lividans* に導入した。代謝産物を HPLC 分析したところ、HRD の生産が確認され、HRD の生合成におけるメチレン架橋遺伝子は *hrbY* であることが明らかになった。

表 2. *hrb* クラスター中の ORF

ORF	aa	Homologous protein	Identity
R1	71	Regulatory protein	42
A	281	Unknown protein (Aur10)	42
B	112	Cyclase (JadI)	70
C	423	Ketosynthase (JadA)	82
D	107	Predicted protein	42
E	404	Chain length determinant factor (JadB)	71
F	234	Methyltransferase	34
G	680	Oxygenase-reductase (LndM2)	57
H	373	Oxygenase	45
I	262	Reductase (LanV)	49
J	226	Oxygenase	35
K	208	Oxygenase (JadG)	30
L	358	Oxygenase (LndZ5)	42
M	87	Acyl carrier protein (JadC)	72
N	302	Type II thioesterase	35
O	261	Ketoreductase (JadD)	79
P	311	Aromatase (UrdL)	79
Q	279	Phosphopantetheinyl transferase (JadM)	53
R	460	Oxygenase (LanE)	64
S	254	Ketoacyl reductase	44
T	434	Transporter (UrdJ2)	47
U	343	<i>O</i> -Methyltransferase	38
V	263	Dehydrogenase / reductase	43
W	193	Reductase (Lan0)	58
X	377	Oxygenase (LanZ5)	36
R2	200	Transcriptional regulator	46
Y	365	Oxidoreductase	47
R3	240	Repressor-response regulator (JadR1)	61
Z1	304	Reductase	32
Z2	334	Reductase	71

② メチル化遺伝子の同定

hrb クラスター中には、既知のアングサイクリン合成遺伝子と相同性を示さない遺伝子が含まれている。このような遺伝子の機能解析法を確立するために、*O*-methyltransferase 遺伝子と相同性を有する *hrbU* に着目した。*hrb* クラスターから *hrbU* を欠失させたプラスミドを構築し、*S. lividans* を形質転換した。本形質転換体は新規 HR 類を生産したが、この化合物は *Streptomyces* sp. 2238-SVT4 の培養物中にも確認された。

培養菌体をアセトン抽出し、濃縮後酢酸エチル抽出したものをシリカゲルカラム (hexane - CHCl₃ = 1 : 1)、ODS-HPLC (80% MeOH) で精製することにより本化合物を単離し、hatomarubigin E (HRE) と命名した。その分子式は高分解能 FAB マススペクトルより

C₁₉H₁₆O₅ と決定し、各種 2 次元 NMR 解析より HRE は 8-*O*-demethylhatomarubigin C であることが明らかになった (図 4)。次に、HrbU 組換え酵素を用い、*S*-アデノシルメチオニンの存在下で HRE の変換反応を行ったところ、HRC の生成が確認された。したがって、*hrbU* は hatomarubigin の 8 位の *O*-メチル化酵素遺伝子であることが判明した。

③ 機能未知遺伝子の機能解明

次に、*hrb* クラスター中の機能未知遺伝子として *hrbF* に着目した。HrbF はメチルトランスフェラーゼと相同性を有することから、メチレン架橋に関与する可能性も示唆されたので、クローニングした *hrb* 遺伝子クラスター中における *hrbF* の破壊を行った。この *hrbF* 欠失プラスミドを導入した *S. lividans* においても、HRD を含むすべての HR 類の生産が確認され、*hrbF* は HR 生合成に必須の遺伝子ではないことが示された。一方、*hrbF* 欠失プラスミド導入株の生産物と *hrb* クラスター導入株の生産物を比較すると、*hrbF* 欠失プラスミド導入株においてのみ検出される HPLC ピークの存在が明らかになった。培養菌体から、アセトン抽出、酢酸エチル抽出、ODS-HPLC (80% MeOH - 0.2% H₃PO₄) により本化合物を精製し、新規 HR 類である hatomarubigin F (HRF) を単離した。HRF の分子式は高分解能 EI マススペクトルより C₁₉H₁₆O₆ と決定し、各種 2 次元 NMR 解析より HRF は 5-hydroxyhatomarubigin E であることが明らかになった (図 4)。したがって、*hrbF* はアングサイクリン骨格のヒドロキシ化において位置選択性を制御する遺伝子であることが示唆された。

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 4 件)

1. Masato Iwatsuki, Toshiya Ishimori, Tsuyoshi Yamamoto, Keiko Takata, Mihoko Mori, Kenichi Nonaka, Rokuro Masuma, Yoichi Hayakawa, Hideaki Hanaki, Kazuro Shiomi, Satoshi Omura: Biverlactones A-D, new circumventors of arbekacin resistance in MRSA, produced by *Penicillium* sp. FKI-4429. *Tetrahedron*, 査読有, **67**, 6644-6648 (2011)
2. Takashi Kawasaki, Yuki Yamada, Tomoka Maruta, Ayumi Maeda, Yoichi Hayakawa: Hatomarubigin E, a biosynthetic intermediate of hatomarubigins C and a substrate of HrbU *O*-methyltransferase. *J. Antibiot.*, 査読有, **63**, 725-727 (2010)
3. Yoichi Hayakawa, Yumi Yamazaki, Maki Kurita, Takashi Kawasaki, Motoki Takagi, Kazuo

Shin-ya: Flaviogeranin, a new neuroprotective compound from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, 査読有, **63**, 379-380 (2010)

4. Takashi Kawasaki, Reiko Hirashima, Tomoka Maruta, Haruka Sato, Ayumi Maeda, Yuki Yamada, Maho Takeda, Yoichi Hayakawa: Cloning and characterization of a gene cluster for hatomarubigin biosynthesis in *Streptomyces* sp. strain 2238-SVT4. *Appl. Environ. Microbiol.*, 査読有, **76**, 4201-4206 (2010)

[学会発表] (計 11 件)

1. 伊澤真澄、前田鮎美、木股祥子、川崎崇、早川洋一 : 異種発現系を用いた hatomarubigin 類の生産. 日本薬学会 (2013 年 3 月 29 日、横浜)

2. 渡邊安希子、伊澤真澄、川崎崇、早川洋一 : 含チオアミド抗生物質 thioviridamide の生合成研究. 日本薬学会 (2013 年 3 月 29 日、横浜)

3. 伊澤真澄、前田鮎美、川崎崇、早川洋一 : Hatomarubigin 生合成遺伝子の機能解析. 日本農芸化学会 (2012 年 3 月 23 日、京都)

4. 川崎崇、平島麗子、山田佑樹、武田真歩、丸田智加、前田鮎美、佐藤はるか、中井恵美、早川洋一 : Hatomarubigin の生合成に関する研究. 天然有機化合物討論会 (2010 年 9 月 30 日、静岡)

5. 川崎崇、平島麗子、山田佑樹、武田真歩、前田鮎美、早川洋一 : Hatomarubigin 生合成遺伝子の機能解析. 日本放線菌学会 (2010 年 9 月 2 日、東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 洋一 (HAYAKAWA YOICHI)

東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 20208606

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :