

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2011 ～ 2012
課題番号：23780089
研究課題名（和文） 放線菌大規模染色体欠失株を宿主とした有用物質生産
研究課題名（英文） Heterologous secondary metabolite production in genome-minimized <i>Streptomyces</i> host
研究代表者 小松 護 (KOMATSU MAMORU) 北里大学・大学院感染制御科学府・助教 研究者番号：40414057

研究成果の概要（和文）：

我々は、抗寄生虫薬である avermectin の工業生産菌である *Streptomyces avermitilis* の染色体大規模欠失株 (SUKA) が種々の異種(微)生物由来の二次代謝産物生産のための汎用宿主として利用できることを報告してきた。本研究では、5種の異なるアクチノファージの溶原化因子 (*attP-int*) を保持する染色体組込み型ベクターと部位特異的組換え機構である Cre/*loxP* システムを組み合わせることにより、5種の染色体組込み型ベクターを同時に染色体上へ導入可能なマーカーレス多重遺伝子導入法を確立した。これにより、数種の異なる、あるいは類似の二次代謝産物生合成遺伝子の同時導入による新規有用物質生産の為の基盤技術を構築した。

研究成果の概要（英文）：

We have already demonstrated the heterologous expression of biosynthetic gene clusters in the large-deletion mutants of *S. avermitilis* (SUKA) that lack major endogenous biosynthetic gene clusters and did not produce these endogenous metabolites. SUKA have been shown to be versatile and effective hosts for the expression of heterologous gene clusters governing the production of a variety of secondary metabolites. In this study we developed novel marker-less multi gene introduction system using 5 integrating vectors derived from 5 different actinophages. It is useful gene introduction system for production of unnatural compounds by combinatorial biosynthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

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：*Streptomyces avermitilis*, Cre/*loxP*, genome, secondary metabolism, actinophage, synthetic biology

1. 研究開始当初の背景

放線菌 *Streptomyces avermitilis* は抗寄生虫・抗昆虫活性を有する avermectin (ヒト・オンコセルカ症などの特効薬) の工業生産菌であり、2003年に申請者所属の研究室に

より実用に供されている抗生物質生産菌としては初めてゲノム解析が完了した。(*Nat. Biotechnol.* **21**:526, 2003)。申請者は *S. avermitilis* の産業微生物としての優れた物質生産能力を異種(微)生物由来の有用物

質生産に応用することを計画し、これまで *S. avermitilis* のゲノム再構成により、物質生産に特化した汎用宿主の育種並びに種々の化合物を対象とした物質生産試験を行い、その有用性を示した。大規模染色体欠失株である *S. avermitilis* SUKA は本菌の主生産物であるポリケチド化合物 avermectin(*ave*)、oligomycin(*olm*)、filipin (*pte*)に加え、テルペン化合物である pentalenolactone (*ptl*)、carotenoids (*crt*)、geosmin (*geo*) を含む約 1.6 Mb(野生株染色体の 20%程度)に及ぶ領域を欠失している。当領域には当菌染色体上に見出されている 32 種の二次代謝生成遺伝子群の 3 割と染色体不安定性の原因となる IS エlementのほとんどが含まれている。通常、本菌野生株へ異種二次代謝産物生成遺伝子群を導入した場合、本菌が生産する二次代謝産物も同時に生成されるため、前駆体やエネルギー供給の競合による目的化合物の生産量の低下が生じる。一方、SUKA は主要な二次代謝産物を全く生産しないため、目的化合物を効率よく生産することができる。

2. 研究の目的

これまでの研究成果により、SUKA が異種微生物由来の有用物質生産に有用であることが示された。更に申請者は、複数の異なる二次代謝産物生成遺伝子群の同時導入による、新規非天然型化合物の生成を計画した。汎用宿主へ、類似あるいは異なる二次代謝産物生成遺伝子(群)や cytochrome P450 などの比較的基質特異性の低い修飾酵素を同時に導入することによって、新たな新規の非天然型化合物が生成する可能性がある。例えばポリケチド化合物の生合成遺伝子群の一部を異なる類似の生合成過程を有する化合物の生合成遺伝子の一部と入れ替え、本来の生合成経路を変更することによって、非天然型の新たな新規化合物が合成される可能性がある。これは、新たな医薬品や医薬品リード化合物として期待できる。しかしながら、複数の遺伝子(群)を同時に細胞内へ導入する場合には、使用する複数のプラスミドベクターが細胞内で安定的に保持されるなければならない。また、使用可能な薬剤耐性遺伝子の数には限りがあるため、ベクター導入後の薬剤耐性遺伝子の除去が必須である。よって、本研究期間内には既に開発している 5 種の染色体組込み型ベクターを基礎とした、新たなマーカレス多重遺伝子導入法の確立を行い、異なるあるいは類似の生合成経路を有する二次代謝産物生合成遺伝子を簡便かつ同時に汎用宿主の染色体上へ安定に導入することができる基盤技術の開発を行う。これにより新たな物質生産体系構築のための基盤技術の開発を行い、新規生物活性物質の創製を目指す。

3. 研究の方法

申請者はこれまで、既存ならびに新たに土壌より分離した 5 種のアクチノファージ(ϕ C31, R4, TG1, ϕ K38-1, ϕ BT1)の部位特異的組換え機構を基礎とする染色体組込み型ベクター(pKU460, pKU461, pKU462, pKU463, pKU464)を開発した。これらは導入後、染色体上の互いに異なる位置に部位特異的に組込まれ、非薬剤選択圧下においても安定に保持されることを確認している。これらは理論上同時に染色体へ導入することが可能であるが、使用可能な薬剤耐性遺伝子の数に限りがあり困難であることから、5 種の染色体組込み型ベクターを改良し、それら全てをマーカレスで導入することが可能な技術の開発を行う。申請者はこれまでに、P1 ファージ由来の Cre/*loxP* を改変した変異型 *loxP* を構築した。Cre/*loxP* システムは、Cre リコンビナーゼが触媒する、互いに相同な 42 bp の *loxP* 配列間の特異的組換え反応である。同じ DNA 分子内で 2 つの *loxP* 分子が同一の方向性を有して存在している場合、*loxP* に挟まれた DNA 領域が特異的に染色体などの DNA 分子から切り出されることから、DNA 分子内からの目的分子の切り出しや除去に有用である。しかしながら、DNA 領域が切り出された後、親 DNA 分子上に一分子の *loxP* 配列が傷跡として残る。その配列は Cre によって再認識されるため、同一 DNA 分子上での複数回の利用が困難とされてきた。一方で、変異型 *loxP* は組換え後は、Cre によって再認識されない塩基置換が施されているため、単一 DNA 分子内での複数回(無制限)の使用が可能である。つまり、5 種の染色体組込み型ベクターが保持する薬剤耐性遺伝子を変異型 *loxP* で挟み込み、各ベクターを染色体へ導入後、細胞内で Cre を発現させることにより、簡便に薬剤耐性遺伝子を除去することが可能である。これを繰り返し行うことにより、最大で 5 種の染色体組込み型ベクター(5 つの遺伝子群)を単一染色体内に薬剤耐性遺伝子を必要とすることなく導入することが可能であると考えられる。これまでの解析から、変異型 *loxP* で挟み込んだ薬剤耐性遺伝子の Cre による切り出し効率はほぼ 100%であることを確認している。

ベクターの作成法は次のように行った。既に作成している変異型 *loxP* で挟み込んだ薬剤耐性遺伝子のカセットを保持するプラスミドを鋳型として、PCR によってカセット部分を特異的に増幅した。この時、増幅されるカセットの両端に、42 bp の 5 種の染色体組込み型ベクターの相同配列(薬剤耐性遺伝子近傍の配列)が付加されるようにプライマーを設計した。カセットの増幅後、 λ RED システムを用いた組換えシステムを用い、既に

ベクターが保持している薬剤耐性遺伝子と置換することによって構築した。ベクター作成後、5種のベクターを段階的に導入した。各段階において、ベクターの導入後、Cre 発現ベクター(不安定性変異が導入されているため、簡単に放線菌細胞内より脱落する)をさらに導入し、薬剤耐性遺伝子の除去を行った。各段階が正確に進行していることは、パルスフィールドゲル電気泳動を用いて、全5種類のベクターが特異的部位に正確に組み込まれていることを確認した。

大規模染色体欠失株 SUKA22 に対し、互いに異なる(微)生物由来の生合成遺伝子群を同時に導入することにより、新規非天然型化合物の創製を行った。ここでは、type I型ポリケチド合成酵素によって生成する大環状ラクトン化合物について検討した。

4. 研究成果

5種の異なるアクチノファーゼの溶原化因子(*attP-int*)を保持する染色体組込み型ベクターと部位特異的組換え機構である Cre/*loxP* システムを組み合わせることで、5種の染色体組込み型ベクターを同時に染色体上へ導入可能なマーカレス多重遺伝子導入法の確立を行った。組換え後に、不活性型配列を生じる変異型 *loxP* で挟み込んだ薬剤耐性遺伝子のカセットを保持するプラスミドを鋳型として、PCR によってカセット部分を特異的に増幅した。この時、増幅されるカセットの両端に、染色体組込み型ベクター上の 42 bp の相同配列(標的とする導入領域)を付加したプライマーを用いた。カセットの増幅後、 λ RED システムを用いた遺伝子組換えシステムを用い、5種の染色体組込み型ベクター上に上記の薬剤耐性遺伝子カセットを導入した。ベクター作成後、5種のベクターをそれぞれ段階的に *S. avermitilis* にプロトプラスト形質転換法により導入した。各導入段階において、Cre 発現ベクターを導入し、薬剤耐性遺伝子の除去を行った。他の染色体組込み型ベクターを順次導入し、パルスフィールドゲル電気泳動を行った結果、5種類のベクターが全て染色体の互いに異なる特異的部位に正確に組み込まれていることを確認した。

大規模染色体欠失株 SUKA22 に対し、異なる(微)生物由来の生合成遺伝子群を同時に導入することによる、非天然型化合物の創製を試みた。特に、I型ポリケチド合成酵素の触媒により生成する大環状ラクトン化合物について検討を行った。I型ポリケチド合成酵素の遺伝子サイズは数 10kb にもおよび、またそれが複数連結したオペロン構造を取っており、母核構造形成後の修飾に関与する酵素遺伝子を含むその生合成遺伝子クラスター全体のサイズは 100 kb にも及ぶ。SUKA

株に対し、Erythromycin 生合成遺伝子クラスターをはじめとする種々の生合成遺伝子クラスターの導入を試みた結果、*S. avermitilis* が有する制限系により、巨大サイズの遺伝子クラスターの導入は困難であった。本菌が保有する制限系を回避するため、ゲノム情報より推測された制限酵素遺伝子の破壊を行ったが、得られた変異株においても巨大な DNA 分子を導入することは出来なかった。制限系に関与する因子について現在も特定を試みているが、今後、巨大 DNA 分子を導入するための新たな遺伝子導入法を確立する必要がある。

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 4 件)

- ① Komatsu, M., Komatsu, K., Koiwai, H., Yamada, Y., Kozono, I., Izumikawa, M., Hashimoto, J., Omura, S., Shin-Ya, K., Cane, D., Ikeda, H., Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolite., *ACS Synthetic Biology*. (2013) in press DOI:10.1021/sb3001003 査読有
- ② Aroonsri, A., Kitani, S., Hashimoto, J., Kosone, I., Izumikawa, M., Komatsu, M., Fujita, N., Takahashi, Y., Shin-ya, K., Ikeda, H., Nihira, T., Pleiotropic control of secondary metabolism and morphological development by KsbC, a butyrolactone autoregulator receptor homologue in *Kitasatospora setae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**:8015-8024 (2012) DOI: 10.1128/AEM.02355-12. 査読有
- ③ Morita, K., Morimura, K., Fusada, N., Komatsu, M., Ikeda, H., Hirano, N., Takahashi, H. Site-specific genome integration in alphaproteobacteria mediated by TG1 integrase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**:295-304 (2012) DOI: 10.1007/s00253-011-3545-3. 査読有
- ④ Miyamoto, K.T., Kitani, S., Komatsu, M., Ikeda, H., Nihira, T. The autoregulator receptor homologue AvaR3 plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *Streptomyces avermitilis*. *Microbiology*. **157**:2266-2275 (2011) DOI: 10.1099/mic.0.048371-0. 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

- ①小松護, 転写に関わる遺伝子変異による異種二次代謝産物生合成遺伝子群発現の改変
文部科学省科学研究費補助金 新学術領域研究 生合成マシナリー:生物活性物質構造多様性創出システムの解明と制御 第2回公開シンポジウム 平成23年6月4日(東京) 口頭発表
- ②Kiyoko Miyamoto, Shigeru Kitani, Mamoru Komatsu, Haruo Ikeda, Takuya Nihira, The autoregulator-receptor homologue AvaR3 is a global regulator controlling antibiotic production and cell morphology of *Streptomyces avermitilis*. The 2011 Annual meeting of the Society for Actinomycetes Japan joined with International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 平成23年9月8日(北海道・札幌市) 口頭発表
- ③Mamoru Komatsu, Hiroyasu Onaka, Mervyn J. Bibb, Haruo Ikeda, Heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolite derived from shikimate pathway in engineered *Streptomyces avermitilis*. The 2011 Annual meeting of the Society for Actinomycetes Japan joined with International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 平成23年9月8日(北海道・札幌市) 口頭発表
- ④Kiyoko Miyamoto, Shigeru Kitani, Mamoru Komatsu, Haruo Ikeda, Takuya Nihira, The autoregulator-receptor homologue AvaR3 is a global regulator controlling antibiotic production and cell morphology of *Streptomyces avermitilis*. The 2011 Annual meeting of the Society for Actinomycetes Japan joined with International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 平成23年9月8日(北海道・札幌市) ポスター発表
- ⑤Mamoru Komatsu, Hiroyasu Onaka, Mervyn J. Bibb, Hruo Ikeda, Heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolite derived from shikimate pathway in engineered *Streptomyces avermitilis*. The 2011 Annual meeting of the Society for Actinomycetes Japan joined with International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 平成23年9月8日(北海道・札幌市) ポスター発表
- ⑥Yu-ki Yamada, Takuma Uchiyama, Mamoru Komatsu, Haruo Ikeda. Comprehensive analysis of terpene compounds from prokaryote. The 2011 Annual meeting of the Society for Actinomycetes Japan joined with International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. 平成23年9月8日(北海道・札幌市) ポスター発表
- ⑦森田健太郎, 森村浩司, 房田直記, 小松護, 池田治生, 平野展孝, 高橋秀夫 TGI フェージングインテグラーゼを用いた α プロテオバクテリアゲノム改変技術の開発 第63回日本生物工学会大会 平成23年9月27日(東京) 口頭発表
- ⑧Mamoru Komatsu, Kozo Ochi, Hruo Ikeda. Effect of Refampicin-Resistant Mutation on the Heterologous Expression of Secondary metabolism in Gemone-Engineered *Streptomyces avermitilis*. 16th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. 平成23年12月12日(Puerto Vallarta, Mexico) ポスター発表
- ⑨小松護, 尾仲宏康, Mervyn J. Bibb, 池田治生 *Streptomyces avermitilis* SUKA株を宿主としたシキミ酸経路由来二次代謝産物の異種生産 日本農芸化学会2012年度大会 平成24年3月24日(京都) 口頭発表
- ⑩小松護, 池田治生 生合成マシナリー構築のための汎用宿主の開発 日本農芸化学会2012年度大会 平成24年3月25日(京都) 口頭発表
- ⑪小松護, 小曾根郁子, 新家一男, 片岡正和, 池田治生 線状プラスミドを利用した二次代謝産物生合成遺伝子クラスター導入法 2012年9月7日(東京都府中市・府中の森芸術劇場) ポスター発表
- ⑫宮本聖子, 小松護, 池田治生 放線菌におけるマイコスボリン様アミノ酸生合成遺伝子群の解析 2012年9月7日(東京都府中市・府中の森芸術劇場) 口頭発表
- ⑬山田佑樹, 西出崇人, 小松護, 池田治生 Labdane型ジテルペン合成酵素遺伝子の swapping による機能解析 (第22回ドリコールおよびイソプレノイド研究会 2012年9月29日(新潟・新潟大学駅南キャンパス) 口頭発表
- ⑭山田佑樹, 西出崇人, 小松護, 池田治生 Labdane型ジテルペン合成酵素遺伝子の swapping による機能解析 2012年化学生物研究会 2012年10月12日(慶応義塾大学日吉キャンパス藤原洋記念ホール) 口頭発表
- ⑮山田佑樹, 西出崇人, 小松護, 池田治生 Labdane型ジテルペン合成酵素遺伝子の swapping による機能解析 2013年3月25日(仙台・東北大学川内北キャンパス) 口頭発表
- ⑯小松護, 小曾根郁子, 橋本詢子, 新家一男, 片岡正和, 池田治生線状プラスミドを利用した二次代謝産物生合成遺伝子クラスター導入法 2013年3月25日(仙台・東北大学川内北キャンパス) 口頭発表
- ⑰宮本聖子, 小松護, 池田治生 放線菌におけるマイコスボリン様アミノ酸生合

成遺伝子群の解析 2013年3月25日(仙台・東北大学川内北キャンパス) 口頭発表

[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・大学院感染制御科学府・助教

研究者番号：40414057