

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310157

研究課題名(和文) オーファン受容体とそのリガンド同定による放線菌二次代謝制御の統合的理解

研究課題名(英文) Orphan receptors and their ligands in Streptomyces secondary metabolism

研究代表者

仁平 卓也 (Nihira, Takuya)

大阪大学・生物工学国際交流センター・教授

研究者番号：70144441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000円

研究成果の概要(和文)：全ゲノム情報が明らかにされ、又工業生産上極めて重要な医薬品 avermectin の生産菌である *S. avermilitis* を用いて、転写発現パターンより、125個の TetR ファミリー制御因子群、及び2成分制御系のセンサーキナーゼ60個から、リガンドに应答して二次代謝に関与する制御因子を選別した。その後、組換え型タンパク質をアフィニティ担体として低分子リガンドを迅速精製し、LC-MS/MS並びに高分解能H-NMRを用いてその構造を決定した。

研究成果の概要(英文)：Using *Streptomyces avermilitis* which produces avermectin as important anthelmintic and insecticidal drugs, among 125 TetR family regulators and 60 two-component sensor kinases, ligand-responding regulators were selected based on their transcriptional patterns during the cultivation. The selected regulators were overexpressed in *E. coli* and the recombinant regulators were purified using His-tag affinity chromatography. The His-tagged recombinant regulators were used as the affinity proteins, the cognate ligands were trapped from the culture broth in the affinity column, selectively eluted and purified. The purified ligand were analyzed by High-resolution NMR, LC, LC-MS/MS to decide the corresponding structures.

研究分野：分子微生物学

キーワード：放線菌 二次代謝 オーファン受容体 未知リガンド

1. 研究開始当初の背景

土壌原核微生物である *Streptomyces* 属放線菌は、市販抗生物質の約7割など、有用生理活性物質の多くを生産し、医薬品の工業生産に必須である(図1、放線菌が生産する代表的生理活性物質)と同時に新規な骨格を有する生理活性物質を供給する上で極めて重要な位置を占める。本属は、原核生物であるにも拘わらず、約9Mのゲノムサイズ、7,500個以上の遺伝子と、大腸菌などに比して約2倍の、又真核微生物である酵母をも凌駕する遺伝情報を持ち、構造的にも又生理活性的にも極めて多彩な二次代謝産物を作り出す潜在能力を持つ。しかし、個々の菌は30種以上の生合成遺伝子クラスターを保有するにも拘わらず、既報の生産物は多くて5種類であり、大多数の二次代謝生合成系が休眠状態にあるか生産量が微量のため発見に至っていない。ここで、これら休眠遺伝子群を人為的に発現制御する術を見いだせば、新たな生理活性物質発見へと繋がると同時に放線菌の二次代謝制御に大きなブレークスルーをもたらすことになる。

放線菌は、650個弱の制御因子をゲノム上に有し、外来の信号伝達物質に反応して、その二次代謝を調節していると考えられるが、我々が明らかにしてきた γ -ブチロラクトン型 autoregulator とその受容体を介したカスケード以外、ほとんど全容は解明されていない。我々は、TetRファミリーに属する制御因子には、信号伝達物質

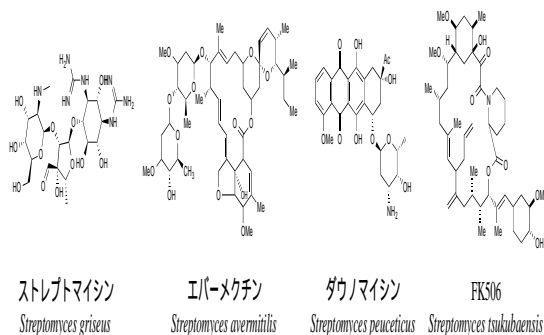


図1 放線菌が生産する代表的生理活性物質

の受容体となるものと推測し、組換え型制御因子への結合を拠り所として低分子リガンドを単離・構造決定した結果、全く新しい放線菌ホルモンと称すべきavenolideが、*Streptomyces avermitilis*に存在し、4 nMという極低濃度でオンコセルカ症治療薬である ivermectin の生産を制御していることを世界に先駆けて明らかにした(PNAS 108, 16410-5, 2011)。(図2、代表的な放線菌信号伝達物質)

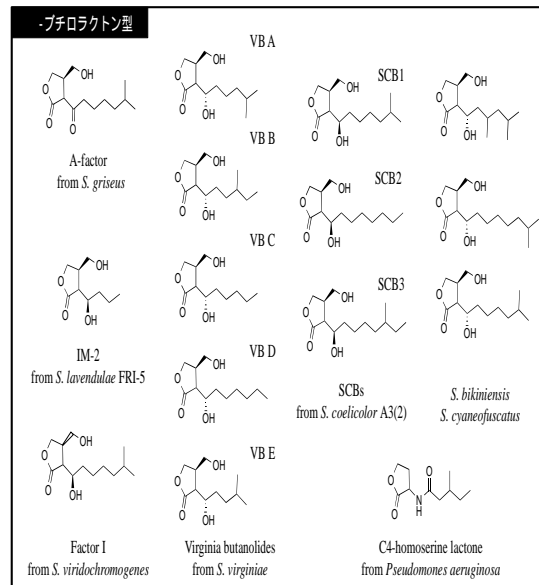


図2 代表的な放線菌信号伝達物質

新規ブテノライド型ホルモンであるavenolideが制御するのは、ivermectin生合成経路以外では、2つの生合成系に過ぎず、また *S. avermitilis* は、120個を超えるTetRファミリー制御因子群を保持することから、いまだ未発見の低分子リガンドが多数存在し、これらリガンドが受容体として機能する制御因子に結合することによって、他の生合成経路が活性化されるものと考えられる。

2. 研究の目的

全ゲノム情報が明らかにされ、又工業生産上極めて重要な医薬品 ivermectin の生産菌である *S. avermitilis* を用いて、転写プロファイルの解析から、125個のTetRファミリー制御因子群、及び2成分制御系

のセンサーキナーゼ60個より、二次代謝に関する制御因子を選別する。その後、組換え型タンパク質をアフィニティ担体として低分子リガンドを迅速精製し、LC-MS/MS並びに高分解能H-NMRを用いてその構造を決定する。

3. 研究の方法

a) 全ゲノム情報から、バイオインフォマテックの各種手法により、TetRファミリー制御遺伝子群、及び2成分制御系のセンサーキナーゼ遺伝子群を推定し、周辺遺伝子の解析と合わせて、二次代謝でのオーファン受容体として働き得る候補遺伝子を同定した。

さまざまな微生物に由来する同群因子のアミノ酸配列に基づく隠れマルコフモデルにより、潜在的な同群制御因子ももれなく同定した。また、リガンド結合領域に焦点をしばった配列解析を行い、アミノ酸、糖、核酸などの単純な一次代謝産物、並びに典型的な抗生物質を結合する制御因子は除外した。

b) 最小培地、炭素源制限培地、窒素源制限培地、リン源制限培地、無機塩制限培地、各種難資化性炭素源培地など、異なる培養条件下で液体培養を行い、候補とした制御因子遺伝子の転写プロファイルを用いてRT-PCRにより解析した。同時に、多波長逆相HPLCにより、二次代謝産物の生産プロファイルの詳細に測定し、各培養条件でどの時期から二次代謝モードに移行するかを決定した。二次代謝への移行時期に、明瞭な転写変化、特に転写上昇を示す制御因子群が、オーファン受容体のまず第1の候補群とした。

c) 信号物質として作用する化合物は、通常低濃度でしか存在せず、効率的な濃縮と高感度の精製法が必須である。このため、オーファン受容体として機能する制御因子を組換え型タンパク質として大量発現し、アフィニティ担体として用いて高度選択的に濃縮を行った。濃縮された低分子リガンドには、更に *tert*-butyldiphenylsilyl 化など

の発色性誘導体化を施し、逆相HPLCにて精製した。この際、リガンド結合部位に変異を導入してリガンド結合能を失わせた受容体タンパク質を担体とした場合の溶出液をネガティブコントロールとして用い、結合活性のあるオーファン受容体に特異的な化合物を得た。精製標品は、高感度分析が可能なLC-MS/MS並びに¹H-NMRを主としてその構造を解析し、構造を決定した。

4. 研究成果

TetR型制御因子は、10本の α -ヘリックスで構成され、N末端側の1番目から3番目のヘリックスで形成されるDNA結合ドメインと、5番目から10番目のヘリックスで形成されるリガンド結合ドメインの2つのドメインより成り、2つのドメインは4番目のヘリックスで連結されている。DNA結合ドメインは、Helix-Turn-Helix (HTH)構造を持ち、配列は良く保存されているが、リガンド結合ドメインは、結合するリガンドの多様性を反映して、共通する保存配列を見いだすことが出来なかった。

TetR制御因子の全長を用いて、ホモロジー検索、相同性解析を行うと、保存性の高いDNA結合ドメインでの相同性値に引っ張られ、リガンド結合ドメインの解析が不可能であることが判明したので、全長から、N末端側1番目から4番目までのヘリックス配列を除去し、残りの配列を用いて相同性解析、系統樹解析を行った。その結果、全115個のTetR制御因子群を、結合するリガンドの種類に応じて30個のサブグループの分類することが可能となった。推定されたリガンドの種類：テトラセノマイシン(3)、脂肪酸(1)、ヌクレオチド(5)、テトラサイクリン(1)、イミダゾール系化合物(1)、単糖(1)、アスコルビン酸誘導体(1)、ATR(1)、アミノ酸(2)、リブロースリン酸(1)、芳香族アミノ酸(1)、アミノ酸(1)、硫酸塩(1)、autoregulator(2)、ケ

ト基含有低分子化合物(1)、ケト酸(2)、糖アルコール(1)、メチル化糖(1)、ヘム(1)、S-アデノシルメチオニン(2)。()内は、サブグループの数を示す。

これら30のサブグループより、推定したリガンドから、一次代謝制御に関わっていると推定されるグループを除き、リガンド決定が二次代謝解析に有望そうな制御因子として、SAV2454, SAV3699, SAV4196, SAV4701, SAV6781の5種をモデル系として、その培養時における転写プロファイルを測定した。TetR型制御因子では、リガンドとの結合により自身の転写が脱抑制/抑制され転写量が顕著に増大/減少することが知られている。従って、培養経時的に転写量が増大/減少するTetR型制御因子は、その時点でリガンドが生産されていることが推定される。

転写プロファイルの測定結果から、上記5種のTetR型制御因子すべてで、対数増殖期と定常期への移行期に転写が観察され、またSAV3689とSAV4193では減少、SAV6781では増大が認められたため、これら3種では、リガンドが培養に伴って生産されたものと推定した。

これら3種のTetR型制御因子について、そのリガンドを決定するべく、各々を大腸菌において大量発現し、単一タンパク質まで精製した。

大量発現時に付加したHisタグを用いて、アフィニティカラムを作成し、選択溶出後、HPLCでの検出感度を上げる目的での誘導体化、更には高分解能HPLCによる分析を経て、TetR型制御因子担体の存在に特異的な化合物を検出できた。これらリガンド候補化合物を精製後、高分解能LC-MS/MSで解析し、SAV6781のリガンドが、3,4-dihydroxybutyl acetateであることを決定した。

Dihydroxybutyl acetateを天然より単離した例は、本研究が初めてであり、

その生合成経路や生理活性については全く報告がない。SAV6781のリガンドであることから、何らかの生理的役割を有すると推定でき、今後その役割を明らかにする必要がある。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

仁平 卓也 (NIHIRA, Takuya)
大阪大学・生物学国際交流センター・
教授

研究者番号：70144441

(2)研究分担者

木谷 茂 (KITANI, Shigeru)
大阪大学・生物学国際交流センター・
准教授

研究者番号：10379117

木下 浩 (KINOSHITA, Hiroshi)
大阪大学・生物学国際交流センター・
助手

研究者番号：20294035