

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658088

研究課題名(和文) LALファミリー転写制御因子を活性化する小分子化合物による休眠遺伝子覚醒の新戦略

研究課題名(英文) Novel strategy to awake gene cluster using small molecules that activate LAL family transcriptional regulator

研究代表者

高橋 俊二 (Takahashi, Shunji)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー

研究者番号：30311608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：様々な放線菌ゲノム解読の結果、医薬・農薬の探索源となる可能性を秘めた多くの未知二次代謝生成遺伝子クラスターが見出されている。本研究では、小分子を用いた遺伝子クラスター活性化手法の開発を目的とした。放線菌に広く見出されるLALファミリー転写制御因子のなかで、リベロマイシン生成遺伝子クラスターに存在するRevUに着目し、リベロマイシン生産増強に関わる小分子化合物の探索・構造最適化を行い、遺伝子活性化機構の解明につながる大きな研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Genome sequencing of Streptomyces spp. revealed many unknown secondary metabolite gene clusters that might be potential sources for a medicinal drug and an agricultural chemical. The objective of the study is an activation of secondary metabolite gene clusters using small molecules. LAL family transcriptional regulators are widely found in Streptomyces spp. Among them, we focused on RevU which exists in reveromycin biosynthetic gene cluster. We searched a small molecule which activates reveromycin production, and optimized its chemical structure. This study gave great insights for the mechanism of the activation of secondary metabolite gene cluster.

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：休眠遺伝子覚醒 バイオメディエーター LALファミリー 小分子化合物 転写制御因子

1. 研究開始当初の背景

微生物が作り出す天然化合物は、医薬シードとして重要であり、抗生物質、抗がん剤、免疫抑制剤など多くの医薬が開発されてきた。近年、新規生理活性化合物の発見が困難となり、合成化合物のスクリーニングも行われているが、多様な構造や生理活性を有する微生物代謝産物が重要である事に変わりはない。近年のゲノム解析から、有用天然物の探索源である放線菌ゲノム中には 30 以上の二次代謝生合成遺伝子クラスターが存在するが、一部しか利用されておらず、未知化合物の発掘が望まれている。

2. 研究の目的

放線菌は、有用化合物の宝庫として知られている。これらの化合物の多くは特定の培地で培養したときにのみ高生産となることが経験的に知られているが、どの物質が生産向上に関わるかについては知見がない。本研究では、放線菌の二次代謝生合成遺伝子クラスターに広く存在する Large ATP binding of LuxR (LAL)ファミリー転写制御因子を活性化する小分子化合物を天然化合物バンク (NPDepo) から探索し、放線菌休眠遺伝子クラスターを覚醒する手法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

小分子化合物を用いた遺伝子覚醒手法開発に向けて、リベロマイシン生合成遺伝子クラスターに存在する LAL ファミリー転写制御因子 (RevU) に着目した。NPDepo 天然化合物ライブラリーを用いて、リベロマイシンの生産を増強する化合物を UPLC-MS により解析を行った。次に、強いリベロマイシン生産誘導活性を有する小分子構造を最適化するために構造活性相関研究を行なった。さらに、全遺伝子の発現解析 (RNA-seq) を行ない、発現誘導される遺伝子クラスターの検討を行った。また、理研・ケミカルバイオロジー研究グループで開発された光親和型化合物ビーズや化合物アレイ (3,500 の天然物 2 セットが一つのガラス基盤に固定化されたもの) を活用して標的分子探索を行った。

バイオメディエーター作用を一般化する為に、異種放線菌由来の未知遺伝子クラスター中に見いだされ、RevU と高い相同性を有する LAL ファミリー転写制御因子遺伝子に注目した。培地にバイオメディエーターを添加し培養を行った後に、酢酸エチル及びブタノール抽出を行い、生産が誘導される化合物を UPLC-MS で解析を行なった。

4. 研究成果

1) 放線菌 (*Streptomyces reveromyceticus*) において、リベロマイシン生産増強に関わる小分子化合物は、LAL ファミリー転写制御因子である *revU* 遺伝子発現を誘導した。本研究で、このような二次代謝生産を促進する外来の小分子化合物をバイオメディエーター

と定義した。構造活性相関研究によりリベロマイシン A の生産誘導に関わるバイオメディエーター (カルボリン化合物) の構造を最適化した。

2) リベロマイシン生産菌のゲノム解読データを活用して、バイオメディエーター処理、未処理の生産菌より調製した RNA を用いて全遺伝子発現の変動を一括解析することにより、リベロマイシン生合成遺伝子クラスター以外にもバイオメディエーター処理後に発現が変動する二次代謝生合成遺伝子クラスターが存在するか否かを検証した。その結果、リベロマイシン生合成遺伝子クラスターの生合成遺伝子群の発現が顕著に増大していることが判明した。この中には LAL ファミリー転写制御因子である RevU も含まれていた。

3) 標的分子の解析に向けて、バイオメディエーターを化合物ビーズに固定化し、リベロマイシン生産菌及び RevU を恒常発現する放線菌 (*Streptomyces lividans* TK23) より調製した細胞抽出液と結合するタンパク質を探索した。コントロールビーズには結合しないが、バイオメディエーター結合ビーズに特異的に結合するタンパク質を SDS-PAGE により分離し、CBB 染色された特異バンドを切り出し、トリプシン消化後に MALDI-TOFMS 解析を行ない、候補タンパク質を見出した。また、特異的結合を評価する為に、ビーズと結合していないバイオメディエーターを用いて競合実験を行った。

4) 標的と予想されるタンパク質を放線菌 (*Streptomyces lividans* TK23) を用いて His-タグ融合タンパク質として発現を行った。標的タンパク質は可溶化されるフラクションが少ないため、共結晶構造解析の為に発現条件や精製条件の検討を行った。

5) バイオメディエーターを添加し異種放線菌の培養を行った後に、生産が誘導される化合物を UPLC-MS 解析を行なったところ、Mass/UV スペクトルから新規と考えられる化合物の生産を確認出来た。

挑戦的萌芽研究の助成により、新しい二次代謝産物探索に向けて新たな方法論を発展させることが出来た。小分子化合物を用いる手法は、遺伝子工学的な技術を全く必要とせず、形質転換が困難な放線菌に対しても広く適用できる点に大きな特色がある。今後の更なる研究展開により、幅広い生命科学分野への波及が大いに期待できる。

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6件)

Lim C. L., Nogawa T., Uramoto M., Okano A., Hongo Y., Nakamura T., Koshino H., Takahashi S., Ibrahim D., and Osada H. RK-1355A and B, Novel Quinomycin Derivatives Isolated from a Microbial Metabolites Fraction Library Based on NPPlot Screening. *J. Antibiot.* 67: 323-329, 2014. 査読有, doi:10.1038/ja.2013.144

Nogawa T., Takahashi S., Sekiyama Y., Takagi H., Uramoto M., Koshino H., Kawatani M., Shimizu T., Osada H. Creation of novel reveromycin derivatives by alcohol-added fermentation. *J. Antibiot.* 66: 247-250, 2013. 査読有, doi: 10.1038/ja.2012.115.

Kato N., Suzuki H., Okumura H., Takahashi S., and Osada H. A point mutation in *ftmD* blocks the fumitremorgin biosynthetic pathway in *Aspergillus fumigatus* strain Af293. *Biosci. Biotech. Biochem.* 77: 1061-1067, 2013. 査読有, doi: 10.1271/bbb.130026.

Nogawa T., Kawatani M., Uramoto M., Okano A., Aono H., Futamura Y., Koshino H., Takahashi S., and Osada H. Pyrrolizilactone, a new pyrrolizidinone metabolite produced by a fungus. *J. Antibiot.* 66: 621-623, 2013. 査読有, doi:10.1038/ja.2013.55.

高橋 俊二、長田 裕之、リベロマイシン A 生合成に関わる未知酵素の解明 - スピロアセタール環化酵素の発見、化学と生物, Vol.51, No.3, 2013, pp.138-140. 査読有

Nogawa T., Takahashi S., Okano A., Kawatani M., Uramoto M., Saito T., and Osada H. Spirotoamides A and B, novel 6,6-spiroacetal polyketides isolated from a microbial metabolite fraction library. *J. Antibiot.*, 65: 123-128, 2012. 査読有, doi:10.1038/ja.2011.121.

[学会発表](計 22 件)

前島 希、Reveromycin A 生合成におけるサクシニル化酵素の機能解析、日本農芸化学会、2014 年 3 月 27-30 日、明治大学

宮澤 岳、Butylmalonyl-CoA 生合成に関与する RevR の機能解析、日本農芸化学会、2014 年 3 月 27-30 日、明治大学

寺井 淳高、Verticilactam 遺伝子クラスターに存在する生合成遺伝子群の機能解析、日本農芸化学会、2014 年 3 月 27-30 日、明治大学

Panthee S., Analysis of RevU interaction to carboline compounds、

日本農芸化学会、2014 年 3 月 27-30 日、明治大学

Takahashi S., Elucidation of reveromycin A biosynthesis, 1st US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products For Young Researcher, March 2-3, 2014, O-okayama, Tokyo.

Takahashi S., In vitro reconstruction of reveromycin A biosynthesis The 7th Japan-Korea Chemical Biology Symposium, Feb 9-11, 2014, Jeju Island, Koera.

Lim C.L., Isolation of Novel Bioactive Compounds from Fraction Library of Microorganisms Based On NPPlot Screening, 2013 年 9 月 18-20 日, 第 55 回天然有機化合物討論会、京都

宮澤 岳、*S. reveromyceticus* を活用した samR0483 遺伝子の機能解析、放線菌学会、2013 年 9 月 5-6 日、メルパルク広島

寺井 淳高、異種発現による Verticilactam 生合成遺伝子の同定、放線菌学会、2013 年 9 月 5-6 日、メルパルク広島

Panthee S., Transcriptomic analysis of biomediator treated *Streptomyces reveromyceticus*, 放線菌学会、2013 年 9 月 5-6 日、メルパルク広島

Miyazawa T., Elucidation of 2-alkylmalonyl-CoA biosynthesis in Reveromycin production, KRIBB-RIKEN Chemical Biology Joint Symposium, May 28-30, 2013, Ochang, Korea.

Takahashi S., Analysis of Reveromycin A biosynthetic machinery, RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology *The 2nd Symposium*, April 15-17, 2013, Wako Saitama.

宮澤 岳、[3,3-D₂]heptanoic acid を用いたリベロマイシン D 生合成経路の解析、日本農芸化学会、2013 年 3 月 24-28 日、東北大学

高橋 俊二、リベロマイシン生合成におけるサクシニル化機構の解析、日本農芸化学会、2013 年 3 月 24-28 日、東北大学

Panthee S., Secondary metabolite production in *Streptomyces* can be induced by β -carboline compounds、日本農芸化学会、2013 年 3 月 24-28 日、東北大学

Takahashi S., Structure and Function of P450revI in Reveromycin A Biosynthesis, チトクロム P450 発見 50 周年記念シンポジウム、2012 年 12 月 2-3 日、九州大学

野川 俊彦、新規リベロマイシン誘導体の創製と活性評価、第 54 回天然有機化合物討論会、2012 年 9 月 18-20 日、東京農業

大学

高橋 俊二、リペロマイシン生合成における3級水酸基のサクシニル化、放線菌学会、2012年9月6-7日、府中の森芸術劇場

宮澤 岳、2-アルキルマロニル-CoA 生合成経路の解析、放線菌学会、2012年9月6-7日、府中の森芸術劇場

Panthee S., Identification of small molecules inducing reveromycin production、放線菌学会、2012年9月6-7日、府中の森芸術劇場

- ⑳ Takahashi S., Novel compound which up-regulates secondary metabolite gene cluster, The International Conference of Natural Product Biosynthesis, June 17-22, 2012, Awaji Yumebutai.
- ㉑ Takahashi S., Deciphering of reveromycin A biosynthesis, RIKEN-MAXPLANCK JOINT RESEARCH CENTER Kick Off Symposium, Mar 6-7, 2012, Dortmund, Germany.

〔その他〕

ホームページ等

天然物生合成研究ユニット

<http://www.csrs.riken.jp/jp/labs/npbu/index.html>

<http://www.csrs.riken.jp/en/labs/npbu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 俊二 (TAKAHASHI, Shunji)

独立行政法人理化学研究所

環境資源科学研究センター

ユニットリーダー

研究者番号：30311608