

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450112

研究課題名(和文)放線菌汎用宿主における有用物質生産を目指した高分子DNA導入法の開発

研究課題名(英文)Construction of linear plasmid vector for cloning of giant gene cluster for secondary metabolite biosynthesis

研究代表者

小松 護 (KOMATSU, MAMORU)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：40414057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌*S. avermitilis*の大規模欠失体(SUKA)は異種の二次代謝産物生産のための宿主として有用である。しかしながら、全長100 kbを超える様な生合成遺伝子群を含むBACクローンの導入効率が極めて低いため、接合伝達性線状プラスミド(SAP1)を利用した遺伝子導入法を開発した。5種のバクテリオファージのattB配列を組込んだSAP1を形質転換能力の高い*S. lividans*に導入した後、組込型BACクローンを形質転換法によりSAP1ベクター上に組込んだ。得られた形質転換体を供与菌としてSUKAと接合を行い、100 kbを超す生合成遺伝子群を効率よく導入することができた。

研究成果の概要(英文)：We have constructed the large-deletion mutants of *S. avermitilis* (SUKA) for expression of exogenous gene clusters for secondary metabolite biosynthesis. The entire biosynthetic gene cluster for polyketide compound is quite large in comparison with biosynthetic gene clusters for other metabolites and some of them are ~ 100 kb. In order to achieve the heterologous expression of these giant biosynthetic gene clusters in SUKA, more efficient methods for gene introduction are indispensable. Most *Streptomyces* microorganisms strongly restrict DNA prepared in *E. coli* because they possess unique methyl-specific restriction system. However, *S. lividans* is not an ideal host since it possesses a weak methyl-specific restriction system. In this study, we have developed efficient heterologous expression system. Procedures are based on integrating BAC vector, a preferable transformation host (*S. lividans*) and transfer of linear plasmid vector by interspecific mating between *S. lividans* and SUKA.

研究分野：応用微生物

キーワード：二次代謝産物生産 異種発現 接合伝達 放線菌 生合成遺伝子 線状プラスミド

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效薬) の工業的な生産菌として利用されており、2003年に申請者所属の研究室において、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 (*Nat. Biotechnol.* 21:526, 2003)、その全塩基配列 (9,025,608 bp) を公開している (<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>)。ゲノム解析から、本菌のゲノム上には avermectin を含む多種多様な二次代謝産物生合成遺伝子群 (少なくとも 32 種) に加え、一次代謝に関与する酵素 (遺伝子) 群に多くのパラログが見出された。同様にゲノム解読がなされた同属の *S. coelicolor* A3(2) や近縁の *Corynebacterium glutamicum* 等の actinobacteria や低 GC 含量グラム陽性菌の *B. subtilis* と比較しても、ATP や NAD(P)H 等のエネルギーや補酵素、また、ポリケチド化合物の前駆体となる malonyl-CoA 或いは methylmalonyl-CoA の生成に関与する酵素群に多くのパラログが存在していた。また、*S. avermitilis* は実際に avermectin の工業生産に用いられていることから、医薬品素材の供給源として本質的な機能を有しており、二次代謝に関わる前駆物質の供給をはじめとする代謝調節機構が、工場生産に耐え得る十分な機能を備えている微生物であると理解できる。申請者は、このような *S. avermitilis* の産業利用株としての優れた特徴を、単に avermectin の工業生産に利用するだけではなく、異種微生物由来の有用物質の生産に応用することを計画した。しかしながら、本菌へ異種二次代謝産物生合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、目的物質の分離と精製が困難である。また、同じ前駆体を利用する生産物の場合、前駆体の競合による生産量の低下が生じることが予想される。したがって、本菌の生育ならびに二次代謝に必須な代謝や調節などの重要な関連遺伝子群を残し、異種微生物由来の二次代謝産物の生産には不要な自身の主生産物を含む二次代謝生合成遺伝子群を取り除くことが肝要である。申請者はこれまでに、*S. avermitilis* の物質生産能力を最大限に引き出すため、大規模なゲノム再構成により、*S.*

avermitilis の染色体を野生株の約 80%程度まで縮小した変異体 (SUKA) を作製した (Fig.1)。SUKA 株は, avermectin (ave) を含む、*S. avermitilis* の主生産物生合成遺伝子群を全て欠失しており、通常の培養においてはほとんど二次代謝産物を生産することは無い。これまでに、アミノグリコシド、ポリケチド、テルペン、ペプチド化合物をはじめとする種々の二次代謝産物の生合成遺伝子群を *S. avermitilis* SUKA 株に導入することによって、本菌がそれら化合物を導入した遺伝子の供給元の微生物を超える高い生産性を有していることを報告した¹⁻³⁾。また、極めて単純化された本菌の二次代謝プロファイルは、物質生産性の高さに加え、目的化合物の簡便な分析ならびに精製過程を与え、また、二次代謝産物の生合成解析やコンビナトリアル生合成といった応用面においても有用な異種発現宿主として利用できる。

2. 研究の目的

二次代謝産物の生成過程における種々の解析は、生合成経路の解明や生合成遺伝子群の発現調節機構の理解など基礎的な研究のみならず、それらの成果を工業的な安定かつ大量生産への達成といった応用研究に発展させることが期待できる。これらの解析には分子遺伝学的なアプローチが極めて重要であるが、多くの *Streptomyces* 属の菌株では DNA の導入さえも困難な場合があり、二次代謝産物生合成遺伝子群のクローニングのみならず、その生合成遺伝子群の評価ができない場合が多い。*S. avermitilis* は大腸菌から調製した DNA 分子を分解する制限系を有しており、遺伝子を導入する際は *dam* (DNA adenine methylase) 遺伝子ならびに *dcm* (DNA cytosine methylase) 遺伝子を欠損した大腸菌から調製した非メチル化 DNA 分子を用いなければならない。しかしながら、モジュラー型ポリケチド合成酵素遺伝子を含む、ポリケチド化合物の生合成遺伝子クラスターの様に 100 kb を超える DNA 断片の導入は、たとえ非メチル化 DNA 分子を調製しても困難であり、その形質転換効率は極めて低い。これらの問題を回避するためには対象とする二次代謝産物生合成遺伝子群を物質生産に適した *S. avermitilis* SUKA 株に導入して解析できる系の構築が必要である。本研究は *S. avermitilis* が保持する線状プラスミド SAP1 (94,287 bp⁵⁾) をベクターとして利用し、巨大 DNA 断片を効率よく導入するための方法を開発することを目的とする。SAP1 は *Streptomyces* 属細菌間で接合伝達によって容易に転移し、異種菌株細胞内でも安定に保持されることが明らかとなっている。先に述べたように、*S. avermitilis* は本菌が保持する制限系により、巨大な DNA 分子の導入が極めて困難である。一方で、同属の *S. lividans* は制限系をほとんど保持せず、非メチル化 DNA 分子を調製しなくとも、容易に巨大 DNA を導入することが可能である⁴⁾。SAP1

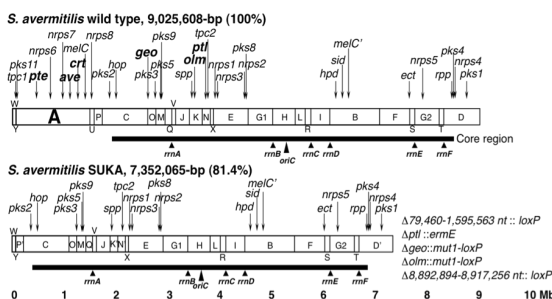


Fig.1. AseI-physical map and distribution of gene clusters for secondary metabolism on *S. avermitilis* and its large-deletion mutant SUKA17. ave, olm, pte, pks1-7: type-I polyketide compounds; pks8-9 & spp: type-II polyketide compounds; rrp: type-III polyketide compound; ntps1-8: peptide compounds; crt, geo, pti, shc & tpc: terpene compounds; hpd, melC, spp, ect, sid: pigments, siderophore and other. oriC, replication origin; rmA-F: rRNA operons.

は接合により *S. avermitilis* と *S. lividans* 間を可逆的に転移し、安定に保持されることが明らかとなっている。そこで、SAP1 を保持する *S. lividans* に目的の巨大二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを導入した後、接合によって *S. avermitilis* に転移する方法を検討した (Fig. 2)。

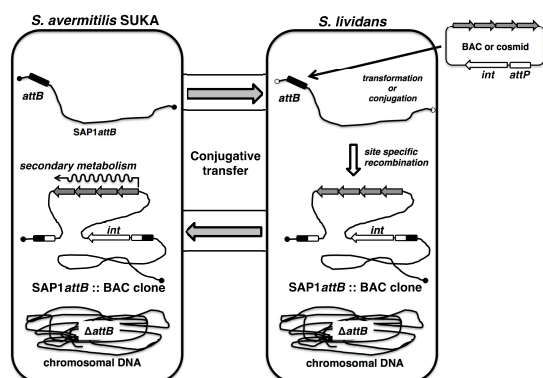


Fig. 2. Experimental scheme of this study

3. 研究の方法

S. avermitilis 大規模欠失体 (SUKA) における巨大 DNA 分子導入法の確立ならびにそれを利用した異種 (微生物由来) の二次代謝産物生産を達成するため以下の 4 つの課題に分けて検討した。

(1) アクチノファーゼ溶原化因子の導入による SAP1 ベクターの構築

SAP1 上にファージ溶原化因子 (*attB*) の導入を行う。ファージ溶原化は、ファージゲノム上に存在する *int* 遺伝子がコードする integrase が触媒するファージゲノム上の *attP* サイト (*int* の数 10 bp 上流に存在する) と細菌ゲノム上の *attB* サイトを介した部位特異的組換え反応である。我々はこれまでの解析から、自律複製型プラスミドに比べ、染色体組込み型ベクターを用いて、二次代謝産物生合成遺伝子を染色体上へ直接導入する事によって、より安定的な物質生産を達成できることを明らかにしている。よって、SAP1 への遺伝子導入はファージの部位特異的組換え系を利用した染色体組込み型ベクターによって行う。そこで、SAP1 上へ *attB* を導入し、SAP1 をベクターとして利用できる系の構築を行った。我々はこれまで、5 種のアクチノファーゼ (C31, R4, TG1, K38-1, BT1) の溶原化因子 (*int-attP*) を導入した、cosmid ならびに BAC ベクターを含む染色体組込み型ベクターを開発した。また、それぞれの染色体上の特異的組込み部位 (*attB*) を同定している。SAP1 上には、*S. avermitilis* 由来の上記 5 種のアクチノファーゼの *attB* を同時に導入することを計画した。上記 5 種のアクチノファーゼの *attB* はオペロン社 (現ユーロフィンジェノミクス株式会社) に依頼し、5 種の *attB*

(各 50 bp 程度) をタンデムに配列した人工遺伝子を設計することによって構築した。SAP1 への人工遺伝子の導入は、相同的組換え反応を利用し、viomycin 耐性遺伝子 (*vph*) とカセット化することで SAP1 上へ導入した。

(2) *S. lividans* の *attB* 多重破壊株の作製

S. lividans の染色体上に存在する内在性の *attB* の欠失を行うことにより、SAP1 上に導入した *attB* サイトへの選択的な部位特異的組換え系を構築した。*S. lividans* TK24 株の染色体上に存在する各アクチノファーゼの *attB* サイトは、それぞれ、染色体上の互いに異なる位置に存在しており、各 *attB* サイトを個別に欠失させた。なお、*S. lividans* は R4 に対する *attB* サイトを保持していない。方法は、相同的組換え機構を利用し、薬剤耐性遺伝子と交換することによって、一連の変異体を順次作製した。我々はこれまで、大腸菌 P1 ファージ由来の Cre-*loxP* 系を *Streptomyces* 属細菌で利用できるように最適化したマーカーレス遺伝子破壊法を構築した。また、単一菌株を用いた多重遺伝子破壊株の構築のため、組換え後に染色体に残る *loxP* が、Cre によって再認識されない変異型 *loxP* を作製した。利用可能な薬剤耐性遺伝子の数には限りがあるため、遺伝子破壊に使用する薬剤耐性遺伝子の両端に変異型 *loxP* を配置することによって *attB* 欠失体を作製した後、Cre 発現ベクターを導入し、薬剤耐性遺伝子を除去した。これにより、4 種の *attB* 多重破壊株をマーカーレスで作製することが可能であり、薬剤耐性遺伝子を遺伝子導入のための選択マーカーとしてのみ使用できる。

(3) SAP1 接合伝達法の最適化

これまでに SAP1 が可逆的に *S. avermitilis* SUKA 株と *S. lividans* 間を移動することを明らかにしている。また、試験的にアクチノファーゼ C31 の *attB* を導入した SAP1 (SAP1 *attB*_{C31}) に対して、40 kb 程度の streptomycin 生合成遺伝子群を保持する染色体組込み型の cosmid ベクターを導入した結果、接合伝達により高効率で両菌株間を可逆的に移動した。また、streptomycin の生産も、染色体上の *attB* サイトに導入した場合と同じく良好であったことからこの系を用いた物質生産が利用できることを確認した。しかしながら、ポリケチド化合物をはじめとする、100 kb 程度の生合成遺伝子クラスターを保持するいくつかの BAC クローンを SAP1 へ導入した結果、その接合伝達効率は極めて低下したため、接合伝達効率を上げるための詳細な条件検討を行った。接合伝達は、両菌株から調製した孢子懸濁液あるいは液体培養後の菌糸を用いるが、これまでの解析から、使用する両菌株孢子懸濁液あるいは菌糸懸濁液の混合比率が重要であることが判明している。スラン

ト状に試験管内で作製した寒天培地上に両菌株孢子懸濁液を混合して塗布するのみで接合伝達が進行するが、ここでは、培地組成の検討に加え、詳細な孢子懸濁液の混合比について検討した。

(4)SAP1をベクターとした二次代謝産物生合成遺伝子クラスター導入による物質生産

モジュラー型ポリケチド合成酵素遺伝子を含む二次代謝産物生合成遺伝子クラスターをはじめとする種々の巨大遺伝子断片を、当該法を用いて *S. avermitilis* SUKA株へ導入した後、培地検討などを含めた詳細な物質生産性の検討を行う。

4. 研究成果

(1)アクチノファーゼ溶原化因子の導入によるSAP1ベクターの構築

SAP1上には自律複製、分配、接合伝達に関わる遺伝子が保存されており、*Streptomyces* 属放線菌において、同種ならびに異種間で接合伝達され、宿主内で安定に保持される。*S. avermitilis*とは対照的に、*S. lividans*は制限系をほとんど有しておらず、容易に高分子DNAを導入することができる。また、*S. lividans*から調製したDNAは *S. avermitilis* に対して高い形質転換効率を示すことから、*S. lividans*にSAP1を保持させ、目的の遺伝子群をSAP1上に導入した後、接合伝達によりSUKA株にSAP1をベクターとして移動できると推測した。SAP1をベクターとして利用するため、5種の溶原化ファージ(φC31、R4、TG1、φK38-1、φBT1)に対応する *S. avermitilis* 染色体上の *attB* 配列をタンデムに配列した人工遺伝子を設計し、*vph* とカセット化することによってSAP1上に相動的組換えによって導入した。各ファージの溶原化因子(*int-attP*)を保持する5種の組込み型ベクターをプロトプラスト形質転換法により導入した。パルスフィールド電気泳動を行った結果、SAP1に導入した *attB* サイトに各ベクターが部位特異的に組込まれることを確認した。

(2)*S. avermitilis* SUKA株ならびに *S. lividans* の *attB* 多重破壊株の作製

SAP1上に特異的に組込み型ベクターを導入するため、供与菌である *S. lividans* 染色体上の内在性の *attB* サイトを全て欠失した後、構築したSAP1ベクターを導入した。SAP1ベクターを保持する *S. lividans* に対し、プロトプラスト形質転換法により、100~200 kb程度の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを保持する組込み型BACクローンを導入した。パルスフィールド電気泳動を行った結果、得られた *S. lividans* 形質転換体において完全長の各二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが安定してSAP1ベクター上に組込まれていることを確認した。

3)SAP1接合伝達法の最適化

S. lividans を供与菌としたSUKA株(受容

菌)に対するSAP1ベクターの接合伝達は、詳細な条件検討の結果、可溶性デンプンを炭素源とする合成培地に少量の酵母抽出物(0.2%)を添加した寒天培地(M4YE)を試験管内で傾斜状に固化した後、供与菌と受容菌の孢子混合液を塗布し、4日間程度培養することによって接合体が得られた。また、孢子懸濁液の混合比率を調製することによって接合効率は変化したが、受容菌の孢子懸濁液量を供与菌の10~20倍使用することによって最も効率良く接合体が得られた。パルスフィールド電気泳動を行った結果、得られた接合体において、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを保持するSAP1ベクターが、欠失(deletion)や再編成(rearrangement)が無く、安定して保持されていることが確認された。また、I型ポリケチド合成酵素遺伝子を含む *concanamycin* 生合成遺伝子群全体を保持する約220 kbのBACクローンについてもSUKA株へ効率よく導入することができた。

(4)SAP1をベクターとした二次代謝産物生合成遺伝子クラスター導入による物質生産

モジュラー型ポリケチド合成酵素遺伝子を含む二次代謝産物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を、*S. lividans* を供与菌として接合伝達により構築したSAP1ベクターを運び屋として *S. avermitilis* SUKA株へ導入した。得られた接合体について、各二次代謝産物の生産について調べた。約100 kbの *nemadectin* 生合成遺伝子クラスターについて調べた結果、導入した二次代謝産物生合成遺伝子群に由来する目的の化合物の生産が確認された。生産量は0.15 g/Lと高い生産性を示した。また、接合体選択時に使用した、選択薬剤非添加によっても、生産性に影響しないことから、導入した、遺伝子群が宿主細胞内でSAP1上に安定に保持されていると判断できる。よって、当該法を用いることによって、安定した物質生産が達成できることが明らかとなった。

本研究により、これまでに困難であった *S. avermitilis* SUKA株に対する巨大DNA分子の導入が可能となった。これにより、更に多種多様な二次代謝産物生合成遺伝子の導入が可能となり、SUKA株を汎用宿主とした効果的な異種生産が期待できる。

<引用文献>

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:2646-2651 (2010).
ACS Synth. Biol. **2**:384-396 (2013)
J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **41**:233-250 (2014)
J. Bacteriol. **170**: 5607-5612 (1988)
Nat. Biotechnol. **21**:526-531 (2003)

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)

Izumikawa M., Kozone I., Hashimoto J., Kagaya N., Takagi M., Koiwai H., Komatsu M., Fujie M., Satoh N., Ikeda H., Shin-ya K., Novel thioviridamide derivative--JBIR-140: heterologous expression of the gene cluster for thioviridamide biosynthesis. *J. Antibiot (Tokyo)*. 68:533-6(2015).doi: 10.1038/ja.2015.20 査読有

Yamada Y., Komatsu M., Ikeda H., Chemical diversity of labdane-type bicyclic diterpene biosynthesis in Actinomycetales microorganisms. *J. Antibiot (Tokyo)*.2016 doi: 10.1038/ja.2015.147. 査読有

Izumikawa, M., Kozone, I., Hashimoto, J., Kagaya, N., Takagi, M., Koiwai, H., Komatsu, M., Fujie, M., Satoh, N., Ikeda, H., Shin-Ya, K., Novel thioviridamide derivative-JBIR-140: heterologous expression of the gene cluster for thioviridamide biosynthesis. *J Antibiot (Tokyo)* 68(8):533-6.(2015)

doi:10.1038/ja.2015.20. 査読有

Yamada, Y., Kuzuyama, T., Komatsu, M., Shin-Ya, K., Omura, S., Cane, DE., Ikeda, H., Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 112(3):857-862 (2015) doi:10.1073/pnas.1422108112. 査読有

Miyamoto, KT., Komatsu, M., Ikeda, H., Discovery of gene cluster for mycosporine-like amino acid biosynthesis from Actinomycetales microorganisms and production of a novel mycosporine-like amino acid by heterologous expression. *Appl. Environ. Microbiol.*, 80(16):5028-5036.(2014) doi:10.1128/AEM.00727-14. 査読有

Komatsu, M., Komatsu, K., Koiwai, H., Yamada, Y., Kozone, 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*.2:384-396(2013)doi: 10.1021/sb3001003. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

小松護 放線菌汎用宿主における二次代

謝産物生産に適した構成的発現プロモーターの探索 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 29 日 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

小松護 *Streptomyces* 属細菌における伝達性線状プラスミドベクターを利用した二次代謝産物生合成遺伝子の導入、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 26 日-29 日 岡山大学津島キャンパス(岡山県岡山市)

小松護 巨大生合成遺伝子導入のための線状プラスミドベクターの開発、2014 年度日本放線菌学会大会 2014 年 6 月 20 日 つくばカピオ(茨城県つくば市)

小松護 放線菌における線状プラスミドを用いた二次代謝産物生合成遺伝子群の接合伝達 2014 年度日本農芸化学会 2014 年 3 月 28 日 明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

小松護 放線菌汎用宿主の開発と物質生産への応用 酵素工学研究会第 70 回講演会 2013 年 10 月 25 日 東京大学・山上会館(東京都文京区)

小松護 放線菌汎用宿主の開発と物質生産への応用 2013 年度日本放線菌学会大会 2013 年 9 月 5 日 メルパルク広島(広島県広島市)

〔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
北里大学・大学院感染制御科学府・微生物制御工学研究室ホームページ
<http://www.lisci.kitasato-u.ac.jp/me/>

(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・講師
研究者番号：40414057

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：