

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25560407

研究課題名(和文) 微生物二次代謝を利用した生合成工学ツールの創製

研究課題名(英文) Development of biosynthetic technology tools by using microbial secondary metabolism

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Thioviridamide生産菌のゲノム解析から、前駆体ペプチド遺伝子 tvaA を見だし、遺伝子導入菌において生産を確認することにより、生合成遺伝子を tvaA～tvaL の12遺伝子であると同定した。さらに、prethioviridamide が真の生合成産物であることを明らかにした。

Prodigiosin 側鎖環化遺伝子 redG と相同性を有する rphG 遺伝子の導入菌から、環化体として metacycloprodigiosin および propyl-meta-cyclooctylprodiginine が得られ、rphG は、これまで報告のない位置選択性を有する側鎖環化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 (TVA)-producing organism showed a gene encoding the TVA precursor peptide (tvaA). Heterologous production of TVA in *Streptomyces lividans* identified the thioviridamide biosynthetic gene cluster containing 12 genes (tvaA - tvaL). Prethioviridamide was extracted from the TVA producer with methanol as a true biosynthetic product, which was converted to TVA by acetone treatment.

In the rph gene cluster of the roseophilin producer, four genes including rphG showed homology to the prodigiosin cyclization gene redG. A redG disruptant of *S. coelicolor* expressing rphG produced two cyclized prodigiosins, metacycloprodigiosin and a new analogue, propyl-meta-cyclooctylprodiginine, suggesting that the rphG is a prodigiosin cyclization gene with novel regioselectivity.

研究分野：微生物二次代謝産物のケミカルバイオロジー

キーワード：生合成 thioviridamide チオアミド prodigiosin 側鎖環化遺伝子

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、医薬や研究用ツールとして幅広く利用されている。また、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酵素により生産されている。このような背景をもとに、微生物代謝産物の生合成遺伝子改変により新しい酵素や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、酸化状態や水和状態の改変、アミノ酸の置換程度に限ら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 (TVA) とフラン含有 prodigiosin 系抗生物質 roseophilin (RP) 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、チオアミドやフラン形成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、放線菌由来の抗腫瘍抗生物質として我々が発見した TVA 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、TVA 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 prodigiosin (PG) 系抗生物質 RP は、他の PG 類には見られないフラン環やクロル化ピロールに加えて特殊な環構造を有している。そこで、これらの化学構造を生合成する遺伝子を同定し、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) TVA の生合成に関する研究

ゲノム解析による TVA 生合成遺伝子の探索

TVA は S-(2-aminovinyl)cysteine 残基を有しているが、このアミノ酸は RiPPs と呼ばれるペプチドに特徴的な成分である。RiPPs 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 *Streptomyces olivoviridis* NA05001 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/IC)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ニングした。さらに、生

合成遺伝子を挿入したプラスミドを *Streptomyces lividans* TK23 に導入することにより、TVA の生産を試みた。

TVA 生合成遺伝子の同定と真の生合成産物同定

見いだした TVA 生合成遺伝子クラスター候補をサブクロニングし、*S. lividans* における TVA 生産を確認することにより、TVA 生合成遺伝子を同定した。次に TVA が RiPPs ならば、N 末端の 2-hydroxy-2-methyl-4-oxopentanoyl 基はセリン由来であり、抽出に用いたアセトンが付加して生成した可能性がある。そこで、培養菌体をメタノールで抽出することにより、真の生合成産物の同定を試みた。

遺伝子破壊によるチオアミド生合成遺伝子の同定

TVA 生合成遺伝子クラスター中のチオアミド生合成遺伝子候補を破壊したものを *S. lividans* に導入し、生産物を調べた。TVA 非生産となったものについては、代謝産物を単離、構造決定するとともに、破壊遺伝子を再導入することにより、TVA 生産性回復の確認を試みた。

(2) RP の生合成に関する研究

側鎖架橋遺伝子の同定

Streptomyces griseoviridis 2464-S5 における RP 生合成遺伝子として *rph* 遺伝子クラスターが同定されているが、本クラスター中には *Streptomyces coelicolor* の PG 環化酵素遺伝子 *redG* と同源性を有する 4 つの遺伝子 *rphG*, *rphG2*, *rphG3*, *rphG4* が見いだされている。そこで、*S. coelicolor* M511 の *redG* 破壊株にこれらの遺伝子を導入し、生産される環化 PG を解析することにより、環化遺伝子の同定とその機能解明を試みた。

ゲノム解析によるクロル化遺伝子の探索
rph 遺伝子クラスターの 25 遺伝子のうち 21 遺伝子は *S. coelicolor* の *red* 遺伝子クラスター遺伝子と同源性を有しており、残りの 4 遺伝子も調節遺伝子や耐性遺伝子と考えられる。したがって、*rph* クラスター中にはクロル化遺伝子、フラン形成遺伝子の候補はなく、これらはクラスター外に存在する可能性が考えられる。そこで、*S. griseoviridis* 2464-S5 ゲノム DNA の塩基配列解析を行い、クロル化遺伝子候補を探索した。次に、クロル化遺伝子候補周辺の遺伝子からフラン形成遺伝子候補を捜した。さらに、クロル化遺伝子候補を用いて dechlororoseophilin のクロル化を試みた。

4. 研究成果

(1) TVA の生合成に関する研究

ゲノム解析による TVA 生合成遺伝子の探索

TVA 生産菌 *Streptomyces olivoviridis* NA05001 のドラフトゲノム解析を行い、VMAAAAS(I/C)IALHC をコードする遺伝子を探した結果、C 末端に VMAAAASIALHC 配列を有する 75 アミノ酸からなるペプチド (図 1) をコードする遺伝子 *tvaA* が見いだされた。

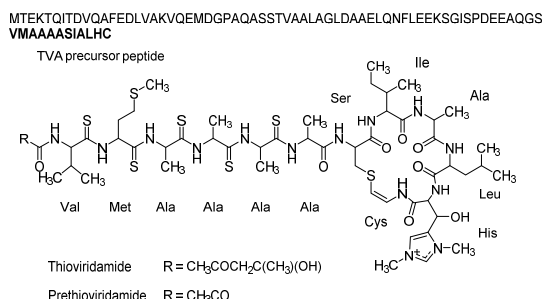


図 1 TVA と preTVA の構造

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)。そこで、16.6 kb にわたる *tvaA* ~ *tvaO* の 15 遺伝子を含む領域をクローニングし、これを *S. lividans* に導入した。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、本遺伝子クラスターは TVA 生合成遺伝子であることが明らかになった。



図 2 TVA 生合成遺伝子 (*tva*) クラスター

TVA 生合成遺伝子の同定と真の生合成産物同定

クローニングされた遺伝子の TVA 生合成に必要な領域を確認するため、*tvaA* ~ *tvaL* の 12 遺伝子をサブクローニングし、*S. lividans* に導入した。形質転換株の培養抽出物の HPLC を *tvaA* ~ *tvaO* 導入株と比較したところ、TVA 生産性は同等であることが確認され、*tvaA* ~ *tvaL* が TVA 生合成遺伝子クラスターであると同定した (図 2)。したがって、チオアミド化遺伝子も本クラスター内に存在することが示された。

図 1 に示すように、TVA 前駆体ペプチドの VMAAAASIALHC 配列の N 末端バリン残基にはセリンが結合しているが、TVA の N 末端は 2-hydroxy-2-methyl-4-oxopentanoyl 基であり、セリンと比較すると C₃ ユニットの付加が生じている。一方、TVA の菌体からの抽出にはアセトンが用いられており、生合成産物にアセトンが付加している可能性が考えられる。そこで、*tva* 遺伝子クラスターによる真の生合成産物の同定を試みた。

まず、*tvaA* ~ *tvaL* を導入した *S. lividans* の培養菌体をメタノールで抽出し、抽出物を HPLC 分析したところ TVA は検出されなかった。

次に菌体メタノール抽出物をアセトンで処理したところ、溶液中に TVA が生成することが明らかになった。そこで、菌体メタノール抽出物中の TVA 前駆体を、酢酸エチル抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS-HPLC により精製し、この TVA 前駆体を prethioviridamide (preTVA) と命名した。preTVA は高分解能 FAB-MS において C₅₃H₈₇N₁₄O₉S₇⁺ の M⁺ イオンを与え、その ¹H NMR スペクトルにおいて、アセチル基のシグナルが検出されることから、その構造を図 1 に示すように決定した。preTVA は、アセトン処理によって TVA に変換されることから、preTVA が *tva* 遺伝子クラスターによる真の生合成産物であることが示された。

遺伝子破壊によるチオアミド生合成遺伝子の同定

tva 遺伝子クラスター中の遺伝子産物は、既知のタンパク質との相同性から機能の推定が可能である (表 1)。すなわち、TvaB は発現調節タンパク質、TvaF は C 末端ステインの脱炭酸を伴う環化を触媒するデカルボキシラーゼ、TvaG はヒスチジン残基のメチル化を触媒するメチルトランスフェラーゼ、TvaJ はヒスチジン残基のヒドロキシ化を触媒するオキシゲナーゼ、TvaK は前駆体ペプチドからリーダーペプチドを切断するペプチダーゼであると考えられる。したがって、チオアミド生成に関与する遺伝子は、*tvaC*、*tvaD*、*tvaE*、*tvaH*、*tvaI*、*tvaL* の 6 遺伝子のいずれかであることが示された。そこで、これらのうち、*tvaD* および *tvaH* の遺伝子破壊による機能同定を試みた。

表 1 *tva* クラスター中の ORF

ORF	aa	Homologous protein	Identity (%)
TvaA	75	TVA precursor peptide	
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

tva 遺伝子クラスターをクローニングしたプラスミドを鋳型に、PCR を用いて *tvaD* または *tvaH* の上流と下流を増幅した。両者を連結することにより、*tvaD* または *tvaH* を欠失した *tva* クラスターを得た。これらを *S. lividans* に導入して HPLC 分析したところ、

TVA 関連化合物は認められなかった。次に、*tvaD* または *tvaH* を欠失した *tva* クラスターの下流に *tvaD* または *tvaH* を連結し、TVA 生産性が回復するかどうか確かめた。しかし、いずれのプラスミド導入によっても TVA 生産性は回復しなかった。さらに、再導入した *tvaD* または *tvaH* が転写されていない可能性を考慮し、その下流にカナマイシン耐性遺伝子を連結したプラスミドを構築した。これらのプラスミドで形質転換した *S. lividans* はカナマイシン耐性となったことから、遺伝子の転写は正常に行われていることが示唆された。

tva 遺伝子クラスターの *tvaC* ~ *tvaL* の 10 遺伝子は、ほぼ隙間なく繋がっており、一つの転写単位であることが判明している。今回の結果から、遺伝子破壊クラスターでは翻訳段階に異常が生じていることが示唆され、遺伝子破壊による機能解明が困難であることが示された。

一方、*tva* 遺伝子クラスターと類似の生合成遺伝子群を有する微生物がデータベース上に複数見だされている。現在、これらの生合成遺伝子クラスターを *S. lividans* 中で発現させ、得られた TVA 様代謝産物の構造と遺伝子の差異を利用して、その遺伝子機能の解明をめざしている。

(2) RP の生合成に関する研究 側鎖架橋遺伝子の同定

Streptomyces griseoviridis 2464-S5 における *rph* 遺伝子クラスター中には PG 環化遺伝子 *redG* と相同性を有する *rphG*, *rphG2*, *rphG3*, *rphG4* が見だされている (表 2)。そこで、*S. coelicolor* M511 の *redG* 破壊株に *rphG* または *rphG2* ~ *rphG4* を導入し、生産される環化 PG を解析した。その結果、*rphG2* ~ *rphG4* 導入株には新たな代謝産物が認められなかったが、*rphG* 導入株の培養抽出物中に 2 個の PG 関連化合物の生産が確認された。これらを精製し、構造解析したところ、一方は metacycloprodiginosin (MCP) であることが明らかになった。もう一方は、高分解能 FAB-MS より MCP と同じ分子式 $C_{26}H_{33}N_3O$ が判明し、NMR スペクトル解析の結果、新規 PG 環化体 propyl-*meta*-cyclooctylprodiginine であることが明らかになった (図 3)。PG 環化遺伝子としては、undecylprodiginine から butyl-*meta*-cycloheptylprodiginine を生成する *redG* や、MCP を生成する *mcpG* が知られているが、*rphG* はそれらと異なる位置選択性をもつ環化酵素をコードしていることが明らかになり、生合成工学ツールとして有用であることが示された。一方、RP は、これらとは異なる形式で側鎖が環化していることから、*rphG2* ~ *rphG4* がその環化に関与している可能性が示唆された。

ゲノム解析によるクロル化遺伝子の探索
rph 遺伝子クラスターの 25 遺伝子のうち

表 2 *rph* クラスター中の ORF

ORF	Homologous protein	Identity (%)
B	RDD domain-containing protein	34
Y	Hypothetical protein (RedY)	55
W	Prolyl-PCP dehydrogenase (RedW)	69
X	ketomyristoyl-ACP synthase (RedX)	43
D	Transcriptional regulator	61
A1	ABC transporter	46
A2	ABC transporter	57
A3	Transcriptional regulator	40
M	Prolyl AMP ligase (RedM)	54
L	Polyketide synthase (RedL)	54
K	Oxidoreductase (RedK)	68
J	Thioesterase (RedJ)	58
G2	Oxygenase (RedG)	51
G3	Oxygenase (RedG)	39
G4	Oxygenase (RedG)	44
I	Methyltransferase (RedI)	59
H	Phosphotransferase (RedI)	59
G	Oxygenase (RedG)	57
Z	Response regulatot (RedZ)	50
V	Dehydrogenase (RedV)	42
U	Phosphopantetheinyl transferase (RedU)	46
T	Hypothetical protein (RedT)	55
P	3-Oxoacyl-ACP synthase (RedP)	58
O	Peptidyl carrier protein (RedO)	75
N	Aminotransferase (RedN)	78

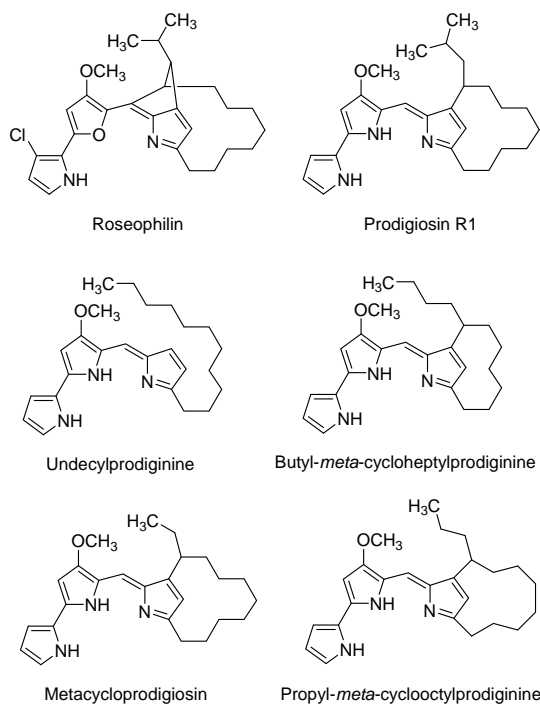


図 3 関連 PG 類の構造

21 遺伝子は *S. coelicolor* の *red* 遺伝子クラスター遺伝子と相同性を有しており、残りの *rphB* と *rphA3* は調節遺伝子、*rphA1* と *rphA2*

は耐性遺伝子と考えられる(表2)。したがって、クローラ化遺伝子、フラン形成遺伝子は本クラスター内に存しないことが示唆された。そこで、*S. griseoviridis* 2464-S5 のドラフトゲノム解析を行い、クローラ化遺伝子を探した。その結果、クローラ化遺伝子の候補として、FAD₂ 依存性ハロゲナーゼ遺伝子 *hrmQ* と相同性を有する *orf16-3*、およびプロモペルオキシダーゼ遺伝子 *bpoA2* と相同性を有する *orf141-6* が *rph* クラスター外に見いだされた。

HrmQ はピロールのクローラ化を触媒する酵素であることが報告されていることから、*S. coelicolor* M511 に *orf16-3* を含む領域を導入して代謝産物を解析した。しかし、形質転換体の代謝産物に変化は認められなかった。次に、大腸菌に生産させた *Orf16-3* を用いて dechlororoseophilin のクローラ化を試みたが、RP は生成しなかった。

orf16-3 は既知遺伝子との相同性が低く(32%)、二次代謝遺伝子と考えられ、同様に既知遺伝子と相同性の低い(49~61%) *orf16-4*、*orf16-5*、*orf16-6* とともにクラスターを形成している。一方、これらの中に化合物骨格を形成する遺伝子が含まれないことから、他のクラスターと共同して二次代謝に関与することが予測される。したがって、これらは RP 生合成遺伝子の一部である可能性が高く、現在、クローラ化条件等の精査を試みている。

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)

1. Yoichi Hayakawa, Minami Akimoto, Akari Ishikawa, Masumi Izawa, Kazuo Shin-ya: Curromycin A as a GRP78 downregulator and a new cyclic dipeptide from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, 査読有, **69**, 187-188 (2016) doi:10.1038/ja.2015.115

2. Yoichi Hayakawa, Junki Saito, Masumi Izawa, Kazuo Shin-ya: Actinopyrone D, a new downregulator of the molecular chaperone GRP78 from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, 査読有, **67**, 831-834 (2014) doi:10.1038/ja.2014.76

3. Masumi Izawa, Shoko Kimata, Ayumi Maeda, Takashi Kawasaki, Yoichi Hayakawa: Functional analysis of hatomarubigin biosynthesis genes and production of a new hatomarubigin using a heterologous expression system. *J. Antibiot.*, 査読有, **67**, 159-162 (2014) doi:10.1038/ja.2013.96

4. Yoichi Hayakawa, Toshio Kobayashi, Masumi Izawa: Indanostatin, a new neuroprotective compound from *Streptomyces* sp. *J. Antibiot.*, 査読有, **66**, 731-733 (2013) doi:10.1038/ja.2013.80

5. Masumi Izawa, Takashi Kawasaki, Yoichi Hayakawa: Cloning and heterologous expression of the thioviridamide biosynthesis gene cluster from *Streptomyces olivoviridis*. *Appl. Environ.*

Microbiol., 査読有, **79**, 7110-7113 (2013) doi:10.1128/AEM.01978-13

6. Keiko Takata, Masato Iwatsuki, Tsuyoshi Yamamoto, Tatsuya Shirahata, Kenichi Nonaka, Rokuro Masuma, Yoichi Hayakawa, Hideaki Hanaki, Yoshinori Kobayashi, George A. Petersson, Satoshi Ōmura, Kazuro Shiomi: Aogacillins A and B produced by *Simplicillium* sp. FKI-5985: New circumventors of arbekacin resistance in MRSA. *Org. Lett.*, 査読有, **15**, 4678-4681 (2013) doi:10.1021/ol401975z

[学会発表](計6件)

1. 木股祥子、伊澤真澄、川崎崇、早川洋一: Roseophilin の生合成に関する研究。日本薬学会(2016年3月28日、横浜)

2. 伊澤真澄、長嶺翔太、曾根りさ子、早川洋一: 含チオアミド抗生物質 thioviridamide 前駆体の同定。日本放線菌学会(2015年9月8日、富山)

3. 木股祥子、伊澤真澄、川崎崇、早川洋一: Prodigiosin 類の環化遺伝子に関する研究。日本放線菌学会(2015年9月8日、富山)

4. 秋元美波、石川亜香里、伊澤真澄、早川洋一: *Streptomyces* sp. RAI364 株が生産する二次代謝産物の研究。日本薬学会(2015年3月27日、神戸)

5. 木股祥子、伊澤真澄、川崎崇、早川洋一: Prodigiosin 類の環化遺伝子に関する研究。日本薬学会(2015年3月27日、神戸)

6. 岸本政洋、伊澤真澄、川崎崇、早川洋一: 含チオアミド抗生物質 thioviridamide の生合成遺伝子。日本薬学会(2014年3月29日、熊本)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[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: