

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：23401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660064

研究課題名(和文)ポリリジン生産放線菌におけるリジン生合成経路の解析

研究課題名(英文)Lysine biosynthetic pathway in a Streptomyces strain producing polylysine

## 研究代表者

濱野 吉十 (Hamano, Yoshimitsu)

福井県立大学・生物資源学部・准教授

研究者番号：50372834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：-ポリ-L-リジン(-PL)は、25～35残基のL-リジンが直鎖状につながったホモポリアミノ酸であり、放線菌*Streptomyces albulus* NBRC14147によって生産される。*S. albulus* NBRC14147のドラフトゲノム解析を行いリジン生合成経路の各種遺伝子を同定したところ、複数のisozyme遺伝子が存在することを見出した。RT-PCRによって、これらisozyme遺伝子の転写量を評価したところ、一次代謝特異的あるいは二次代謝特異的に機能するisozyme遺伝子が存在することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：-Poly-L-lysine (-PL), consisting of 25-35 L-lysine residues, is produced by *Streptomyces albulus* NBRC14147. Since -PL is produced as a secondary metabolite, high transcript levels of the -PL synthetic gene are observed during late-growth phase. Interestingly, however, the transcript level of the aspartokinase gene (ask gene) was low in the late-growth phase, although aspartokinase is a rate-limiting enzyme in the L-lysine biosynthetic pathway (DAP pathway). A draft-genome sequencing of *S. albulus* NBRC14147 revealed that this strain has isozyme genes involved in the DAP pathway. In addition, RT-PCR analysis demonstrated the growth-phase dependent operation of the isozyme genes.

研究分野：応用微生物学

キーワード：生合成

1. 研究開始当初の背景

(1)  $\epsilon$ -PL は、L-リジンの  $\epsilon$ -アミノ基と  $\alpha$ -カルボキシル基がイソペプチド結合でつながった 25~35 残基からなる直鎖状のホモポリアミノ酸であり (図 1)、放線菌 *Streptomyces albulus* NBRC14147 をはじめとする数種の放

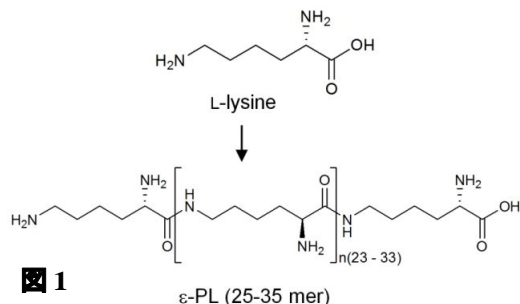


図 1

線菌の 2 次代謝産物として生産される (図 2)<sup>1)</sup>。最近我々は、 $\epsilon$ -PL の生合成メカニズムを明らかにし、 $\epsilon$ -PL 生合成酵素 (Pls) が非リボソームペプチド合成酵素様の新奇ペプチド

$\epsilon$ -PL 生産培養における各種パラメータ

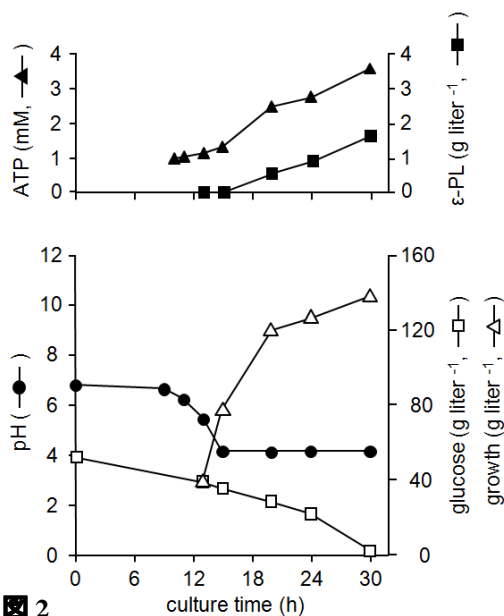
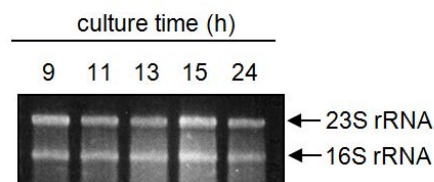


図 2

合成酵素であることを見出した<sup>2)</sup>。Pls をコードする遺伝子 (*pls* 遺伝子) の発現は対数増殖期中期から開始されるが (図 3)、興味深いことに、リジンの生合成経路の律速酵素遺伝子である aspartokinase 遺伝子 (*ask* 遺伝子) の転写量は、 $\epsilon$ -PL の生産性が向上するとともに低下することを見出した<sup>3)</sup>。

(2) *S. albulus* NBRC14147 は、実験室レベルの培養において 2 g/L もの  $\epsilon$ -PL を生産することから、生合成出発原料である L-リジンの強力な生合成経路を有していると推測される。放線菌、大腸菌、枯草菌などの原核生物は、アスパラギン酸からジアミノピメリン酸を経由するジアミノピメリン酸経路 (DAP 経路)

各培養時間の菌体から抽出した全 RNA の電気泳動



*pls* 遺伝子と *ask* 遺伝子の定量 RT-PCR

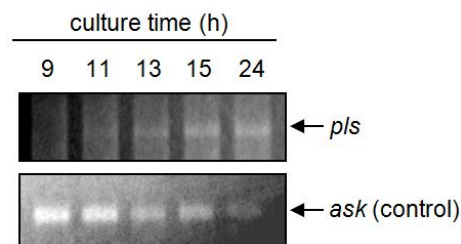


図 3

によってリジンを生合成する (図 4)。一方、カビ、酵母などの真核微生物はホモクエン酸からアミノアジピン酸を経由するアミノアジピン酸経路を利用していることが知られている。最近さらに、古細菌においてはアミノアジピン酸からリジンへの新規経路が見出されるなど、リジン生合成経路の種類と分布は多様である。したがって、 $\epsilon$ -PL 生産に多量のリジンが必要である  $\epsilon$ -PL 生産菌においては、それに特化したリジン代謝系が存在することが推測された。

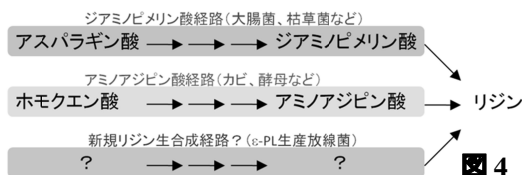


図 4

2. 研究の目的

$\epsilon$ -PL の生合成出発原料である L-リジンの生合成経路遺伝子 (*ask* 遺伝子) の転写量は、 $\epsilon$ -PL の生産性が向上するとともに低下する興味深い結果を得ている。これは、L-リジンの供給が従来から知られている DAP 経路ではなく、別経路で生合成される可能性を示唆している。あるいは、 $\epsilon$ -PL 生産菌が特化したリジン代謝制御系を有している可能性も考えられた。

我々が想定している“原核生物に共通して存在する新規のリジン生合成経路”が実際に存在し、それが  $\epsilon$ -PL 生産菌におけるリジン供給を担っているとすれば、その新規経路を  $\epsilon$ -PL 生産放線菌を実験材料として同定できる可能性が高い。また、この新規経路の発見は、工業原料や飼料として需要の大きいリ

ジンの効率生産につながるだけでなく、その経路阻害剤は、新規作用メカニズムを有する感染症治療薬になる可能性もあり、医薬品リード化合物のスクリーニング系としての期待も高い。

そこで本研究では、*S. albulus* NBRC14147 における新規 L-リジン生合成経路の同定および DAP 経路酵素あるいは遺伝子の特異な制御系を検証することを目的にした。

### 3. 研究の方法

(1)  $\epsilon$ -PL 生産野生株 *S. albulus* NBRC14147 は、実験室レベルの培養において 2 g/L の  $\epsilon$ -PL を生産し、変異育種された工業用高生産変異株は、*pls* 遺伝子に変異が導入されていないにも関わらず 30 g/L もの  $\epsilon$ -PL を生産する。したがって、工業用高生産変異株は L-リジン経路が強化された変異株であると予想され、また、これら菌株間の遺伝子変異点の違いを精査することで、新規経路の同定につながると期待された。そこで、 $\epsilon$ -PL 生産菌の野生株である *S. albulus* NBRC14147 および工業生産株の両菌株のドラフトゲノムシーケンスを行い、工業生産株の変異点を同定するとともに、DAP 経路の全遺伝子の同定を行った。

(2) *S. albulus* NBRC14147 を培養し、経時的に菌体を回収し、全 RNA を抽出した。cDNA を合成し、各種 DAP 経路遺伝子について、RT-PCR による転写解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 野生株 *S. albulus* NBRC14147 および工業生産株の両菌株のドラフトゲノムシーケンスを行ったところ、DAP 経路の全ての遺伝子を同定することができた (図 5)。

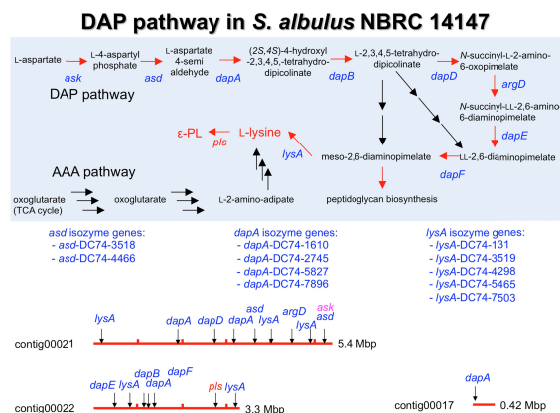


図 5

興味深いことに DAP 経路の多くの遺伝子に複数の isozyyme 遺伝子が存在していること

を見出した。また、真菌で知られるアミノアジピン酸経路に相同性を示す遺伝子は認められなかったことから、*S. albulus* NBRC14147 における既知のリジン生合成経路としては、DAP 経路のみであることが判明した。

野生株 *S. albulus* NBRC14147 および工業生産株について、変異解析を行ったところ、工業生産株において、変異点が 177 カ所、挿入が 609 カ所、欠失が 666 カ所あることが判明した。このように変異箇所が膨大であるため、工業生産株においてどの変異が  $\epsilon$ -PL 高生産に関連しているのかを同定することは不可能であった。さらに、同様の理由にて、新規リジン生合成経路の同定も不可能であった。

(2) *S. albulus* NBRC14147 株において、DAP 経路の多くの遺伝子に複数の isozyyme 遺伝子が存在していることを見出した (図 5)。*asd* 遺伝子に 2 つ、*dapA* 遺伝子に 4 つ、*lysA* 遺伝子に 5 つの isozyyme 遺伝子が存在していた。そこで、これら isozyyme 遺伝子が  $\epsilon$ -PL 生産とどのように関連しているのか、RT-PCR による発現解析を行った。その結果、一次代謝特異的だけでなく、二次代謝特異的に機能している isozyyme 遺伝子の存在を明らかにした (図 6)。

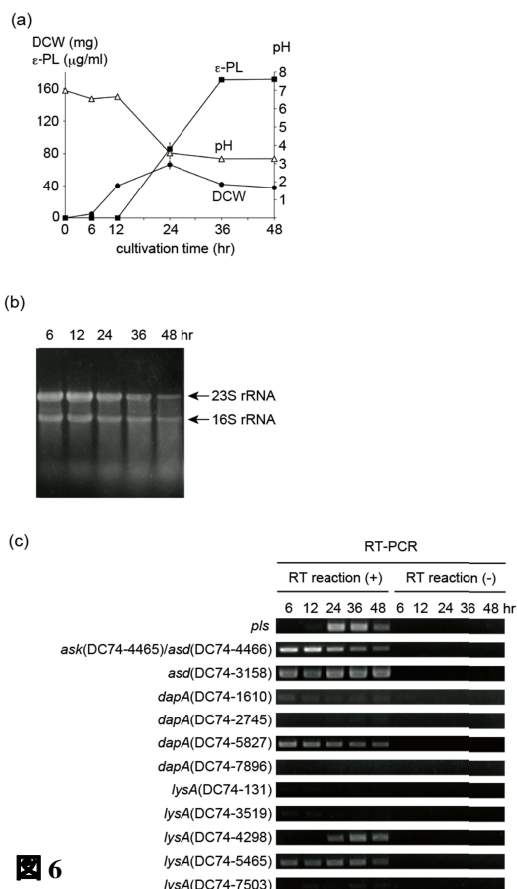


図 6

<引用文献>

- 1) Y. Hamano, In: Y. Hamano, editor, Amino-acid homopolymers occurring in nature. *Microbiology Monographs*, vol. 15, Heidelberg, Springer, 2010.
- 2) K. Yamanaka, C. Maruyama, H. Takagi, and Y. Hamano.  $\epsilon$ -poly-L-lysine dispersity is controlled by a highly unusual non-ribosomal peptide synthetase. *Nature Chemical Biology*, 4, 766-772 (2008)
- 3) K. Yamanaka, N. Kito, Y. Imokawa, C. Maruyama, T. Utagawa, and Y. Hamano. Mechanism of  $\epsilon$ -poly-L-lysine production and accumulation revealed by identification and analysis of an  $\epsilon$ -poly-L-lysine-degrading enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76, 5669-5675 (2010).

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)  
論文投稿準備中

[学会発表](計0件)

[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]

6 . 研究組織

(1)研究代表者

濱野 吉十 (HAMANO, Yoshimitsu)  
福井県立大学・生物資源学部・准教授  
研究者番号：50372834

(2)研究協力者

玉井 悠暉 (TAMAI, Yuki)