

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430201

研究課題名(和文) TSS-seqによる放線菌プロモーターのコレクション

研究課題名(英文) Identification and collection of actinomycete promoter sequences by TSS-seq

研究代表者

石川 淳 (Ishikawa, Jun)

国立感染症研究所・真菌部・室長

研究者番号：40202957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬剤耐性菌の制圧のために、抗生物質の主たる生産者である放線菌においても、ゲノム科学を応用した新たな開発が盛んに行われているが、その道具立ては未だ十分ではなく、特に、放線菌遺伝子の発現のためのプロモーターリソースは限られている。そこで本研究では、近年、原核生物でも可能となったmRNAの解析を応用し、放線菌ゲノムにおけるTSS-seq (Transcriptional Start Site sequencing) を行い、その上流配列のk-mer解析により、多数の放線菌のプロモーターと考えられる配列を見出した。それらの配列は抗生物質の開発を始めとする放線菌ゲノム工学に資すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, discovery and development of novel antibiotics from actinomycetes is performed by genomic approaches. However there are still not enough technology for engineering antibiotic-producing actinomycetes, especially promoter for gene expression. In this work, by using NGS, we identified many transcriptional start sites (TSSs) in a Streptomyces genome and estimated putative consensus sequences of streptomyces promoter. From 18-hr culture, E. coli's Pribnow-like hexamers were found at surrounding -14 position. These findings may contribute to genomic engineering in actinomycetes, including the development of novel antibiotics.

研究分野：微生物ゲノム科学

キーワード：転写開始点 ゲノム工学 抗生物質

1. 研究開始当初の背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌(VRE)、カルバペネム耐性腸内細菌(CRE)、超多剤耐性結核菌(XDR-TB)などのいわゆる“薬の効かない病原菌”の出現や蔓延により、「(有効な)抗生物質のない世界」の到来が危惧されており、世界はこれらの薬剤耐性菌を制圧するための早急な対策を迫られている。近年はワクチンによる病原菌や薬剤耐性菌の制圧の試みも盛んに行われているが、その理由のひとつには、新規な抗生物質の発見や開発に要する多大な時間的、経済的コストがある。実際に、1960年代以降に上市された新規な抗生物質(既存品の類縁体や誘導体は除く)は、リネゾリドとダプトマイシンしかなく、さらに、新規な抗生物質が上市されても早晩耐性菌が出現してしまうという問題もある。しかしながら、近年のゲノム科学の急速な進展により、抗生物質開発の効率は大きく変わりつつある。

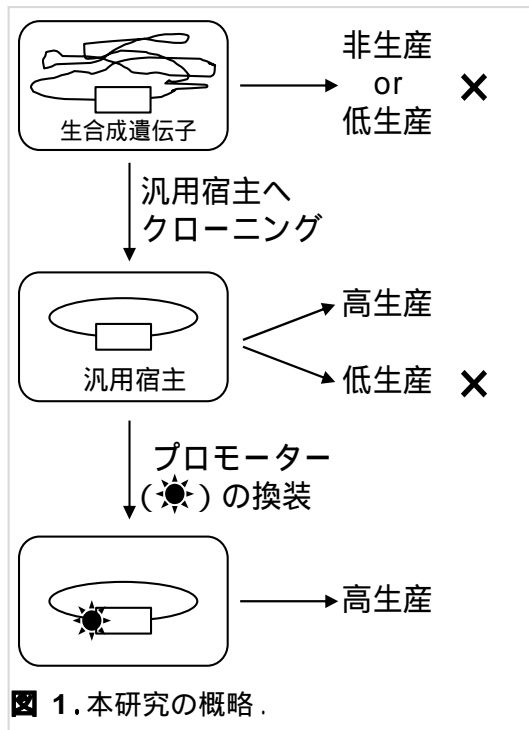


図 1. 本研究の概略.

現在臨床で用いられている抗生物質、抗がん剤、免疫抑制剤などの大半は放線菌が生産する二次代謝産物がもたっている。申請者は、世界に先駆けて数々の放線菌のゲノム解析を行ってきた。その結果、駆虫薬エバメクチン生産菌である *Streptomyces avermitilis* は、エバメクチン以外にも 31 個(合計 32 個)の二次代謝産物(生命維持に必須でない代謝を一次代謝に対して二次代謝と呼ぶ)を生産するであろうことを明らかにし、それらのいくつかについては実際に生産物を特定して来た。同様の結果は他の放線菌ゲノムからも得られたことから、我々がこれまでに認識していた二次代謝産物は、放線菌が本来持っている能力のせいぜい 1 割ほどでしかないことが明らかとなった。残りの 9 割には新規な抗生物質のもととなる物質が含まれることが期

待され、抗生物質発見のプロセスは一昔前と異なる様相を呈してきている。

2. 研究の目的

すでに放線菌ゲノム配列を出発点とした、言うなれば次世代の抗生物質の開発が開始されており、ゲノム工学を駆使した汎用的な宿主の開発も行われているものの、その道具立ては必ずしも十分とは言えない。抗生物質の開発では、構造決定はもちろんのこと、作用機作の解析や臨床試験のためなどに十分な量を確保しなければならないが、培養条件を最適化しても生産量の上がないケースも多い。抗生物質生合成遺伝子のネイティブなプロモーターは必ずしも大量生産に有効ではなく、高発現あるいは誘導型プロモーターへの換装が望まれるが、放線菌の遺伝子操作に用いることのできるプロモーターは発現の高低、誘導の有無にかかわらず数個しか知られておらず(*ermEp*, *xylEp*, *tipAp* など)、自在な制御には程遠いのが現状である。

一方、原核生物の mRNA は polyA 配列を持たないなどの理由で精製が困難であったが、近年 Terminator 5'-phosphate-dependent exonuclease(TPE)などの酵素や特異的ハイブリダイゼーションを利用することにより、RNA の 90%以上を占める rRNA(ribosomal RNA)を選択的に除去し、mRNA を精製することが可能になった。

そこで本研究では、放線菌ゲノムにおいて TSS-seq(Transcriptional Start Site sequencing)を行い、放線菌のプロモーター配列をコレクションし、抗生物質の開発など放線菌ゲノム工学に資することを目的とする(図 1)。

3. 研究の方法

(1)本研究は放線菌遺伝子発現に関する学術的な知見を得るのみでなく、抗生物質の開発に資することを目的とするため、工業生産に耐える資質を持った菌種を解析する必要があるため、実際に薬として使われている抗生物質を生産する *Streptomyces griseus*(ストレプトマイシン生産菌)を用いた。

S. griseus ISP 5236 の 8 時間、18 時間および 24 時間培養菌体から total RNA を調製し、その 20 μg ずつを TPE で処理した後、Ribo-Zero rRNA Removal Kit(Illumina)で処理して rRNA を除去した。続いて GeneRacer Kit(Invitrogen)とランダムプライマーを組み合わせて 5'末端を選択的に増幅してライブラリーを作製した後、Illumina HiSeq でシーケンシングを行い、最終的に 217,255,686リードを得た。rRNA 由来リードの混入は約 3%であった。

(2)得られたリードから 5'末端アダプター配列を含みかつアダプターの下流に 30 塩基以上を持つリードを選別することにより、46,457,392 リードの RNA 5'末端配列を得た。それらを bowtie2 によりリファレンス配列(Acc. No. AP009493)にマップリングし、coverage が 5 以上を判定基準として、3,220 箇所の転写開始点(TSS)を見出した。

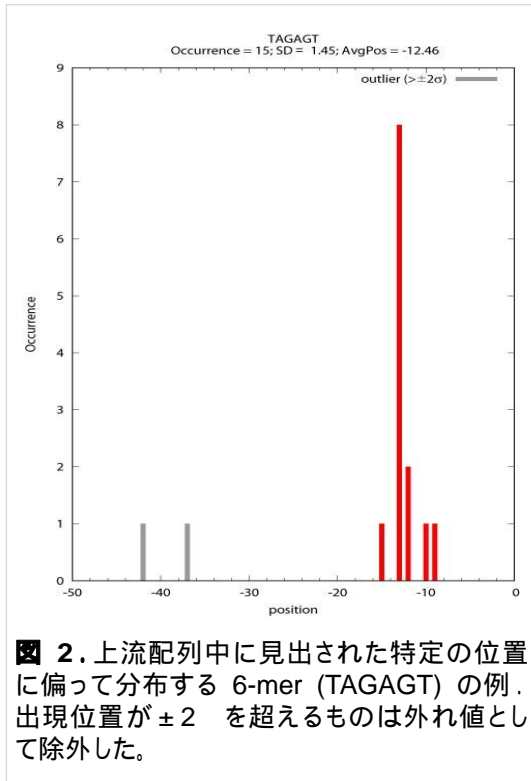


図 2. 上流配列中に見出された特定の位置に偏って分布する 6-mer (TAGAGT) の例. 出現位置が ±2 を超えるものは外れ値として除外した。

(3) 次に、プロモーターが位置すると考えられる TSS の上流配列 (50 塩基) をコレクションし、それらを様々な手法でアラインメントしたが、特徴のある配列は見出されなかったため、次に k-mer 解析を行った。

3,220 本の upstream 配列コレクション中に見出される全ての 6-mer の出現位置と出現回数を調査し、5 回以上出現し、かつその出現位置の標準偏差が 5 以下の 6-mer を抽出した結果、ある特定の位置に頻度高く出現する 74 個の 6-mer を見出した (図 2)。一方、リファレンス配列からランダムに切り出した 3,000 本の 50-mer を同様に k-mer 解析したが、標準偏差 5 以下では 6 個の 6-mer

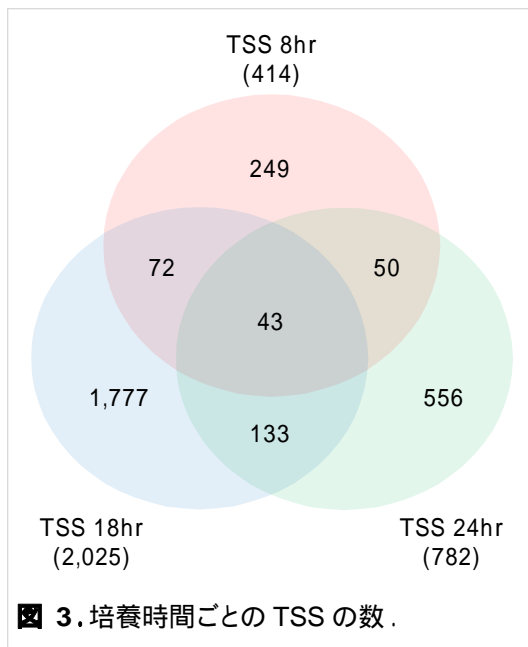


図 3. 培養時間ごとの TSS の数。

が見出されるのみであり、解析手法の妥当性が示された。

表 1 .TSS 上流配列の特定位置に高頻度に見出された 6-mer の例 (一部抜粋)。

6-mer	出現回数	平均位置	標準偏差
TAGGCT	37	-12.3	1.51
TACGCT	28	-12.8	3.30
TACCCT	26	-13.5	3.42
TAGGCT	22	-12.6	3.08
TAAGGT	19	-12.6	1.70
AGACTG	18	-12.6	3.87
TACGAT	17	-13.6	3.84
TAGAGT	15	-12.5	1.45
GTTAGG	15	-13.4	4.44
TCTGAT	14	-18.0	4.42
GTATGG	13	-13.3	3.09
CCGTTA	13	-16.2	3.38
TGACTT	13	-34.9	4.70
AGAATG	12	-11.6	0.64
TAGACT	12	-12.7	0.96
TATGCT	12	-13.3	2.80
GTTAGC	12	-14.6	3.14
TAGCAT	11	-12.0	0.77
TACCAT	11	-10.7	2.86
CAGACT	11	-13.4	3.80
GTTGCA	11	-16.5	4.25
TAACCT	10	-12.1	0.57
TAACGT	10	-12.1	1.91
TAGGAT	10	-14.3	4.94

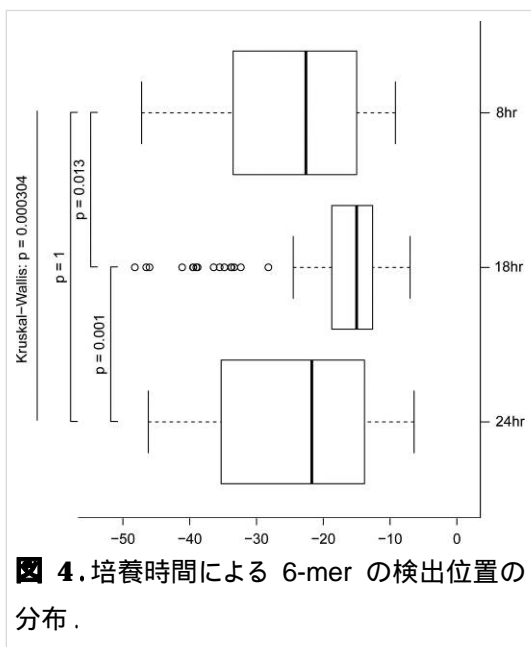
(4) 次に、リードデータを培養時間ごとに分別し、それぞれの培養時間ごとに TSS を抽出した結果、すべての培養時間に共通して検出される TSS と、培養時間に特異的に検出される TSS が見出された (図 3)。

さらに、特定の位置に高頻度に出現する 6-mer の位置の分布を培養時間ごとに調べた結果、8 時間と 24 時間では上流領域全体に渡ってそのような 6-mer が検出されたが、18 時間では -14 を中心とする極めて狭い範囲に多数が見出された (図 4)。これら 3 群間に差異のあることは Kruskal-Wallis 検定により有意と認められ、さらに 2 標本 t 検定においては、8 時間と 24 時間の間に有意差はなかったものの、8 時間と 18 時間あるいは 18 時間と 24 時間において有意差が認められた。

4. 研究成果

放線菌プロモーターのまとまった解析は文献的にも 1990 年代に 2 報があるのみで、しかも情報学的に行われたのみで実験的証拠は無く、本研究は実体を伴った初の成果となるのかも知れない。

対数増殖期である 18 時間培養では -14 周辺の極めて狭い領域に多数の 6-mer が見出された (図 4)、これらの多くは大腸菌等で知られている -10 配列に相当すると考えられ、その配列も



大腸菌の-10 配列と類似していた。一方他の時間帯では、位置、配列ともに大腸菌とは異なる 6-mer も見出されており、これらを含む上流配列を含む配列をレポーター遺伝子などを用いて検証する必要があるものの、本研究により見出された配列は、抗生物質や有用酵素の大量あるいは効率的な生産に利用することが可能であると考えられる。

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)

(学会発表)(計2件)

石川 淳, 星野泰隆: 2ndFind: 二次代謝産物合成遺伝子クラスター発見ウェブツール. 第 29 回日本放線菌学会大会, 平成 26 年 6 月 19-20 日, つくば.

石川 淳, 星野泰隆: 2ndFind: a web-based support tool to find secondary metabolite biosynthetic gene cluster. 第 9 回日本ゲノム微生物学会年会, 平成 27 年 3 月 6-8 日, 神戸.

(その他)

石川 淳: *Streptomyces griseus* のゲノム情報サーバー
<http://streptomyces.nih.go.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 淳 (ISHIKAWA, Jun)
 国立感染症研究所・真菌部・室長
 研究者番号: 40202957

(2)研究分担者

星野泰隆 (HOSHINO, Yasutaka)
 国立感染症研究所・真菌部・主任研究官
 研究者番号: 40399457