

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850044

研究課題名(和文)複合培養における放線菌二次代謝遺伝子プロモーターの活性化機構

研究課題名(英文)Analyses of secondary metabolism gene promoters activated by combined-culture

研究代表者

浅水 俊平 (ASAMIZU, Shumpei)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：90709057

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)：放線菌の二次代謝産物は医薬・農薬として利用されている。放線菌ゲノム解析から潜在的二次代謝遺伝子群が一菌株に20～40個存在する明らかになっている。本研究では放線菌に眠っている二次代謝遺伝子を覚醒させる手法として、放線菌とミコール酸含有細菌との共培養(複合培養)法に注目した。本課題では二次代謝遺伝子の活性化機構を明らかにするために、生産量が増大することが明らかになったゴードスポリンの生合成遺伝子に注目し、前駆体ペプチド遺伝子の発現プロモーターを明らかにした。この結果と網羅的転写解析の結果を考え合わせ、二次代謝産物の生産量の増加には細胞全体の一次代謝変化が一因となっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Secondary metabolites (SMs) produced by actinomycetes are great resources for therapeutic application. Actinomycetes are suggested to possess more than 20 of cryptic gene clusters for SMs production. Our study focus on co-culture method between actinomycetes and mycolic acid-containing bacteria (MACB), that had been shown to activate the cryptic gene clusters of actinomycetes. We used biosynthetic gene cluster of a ribosomal synthesized peptide antibiotic as a model to elucidate the mechanism of activation by stimulation of MACB.

Within this specific research project, godA promoter (PgodA) was identified using genetic analyses and colorimetric reporter assay. The sequence of PgodA showed consensus of HrdB. Transcriptomic analyses of co-culture between *Streptomyces coelicolor* and MACB showed global variations of gene expression by *S. coelicolor*, suggesting a possibility that overproduction of SMs are as the result of flux balance variations of whole cell metabolism.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放線菌 ミコール酸含有細菌 二次代謝 共培養 微生物間相互作用 遺伝子プロモーター 遺伝子発現 複合培養

1. 研究開始当初の背景

放線菌は生物活性物質生産者として、産業上非常に重要な細菌である。近年のゲノム解析技術の進歩により、急速にゲノム情報が蓄積され、その結果、放線菌には既知の天然物生合成遺伝子情報との相同性から得られるだけでも一菌株あたり 20-40 個程度の二次代謝産物生合成遺伝子群がゲノムに存在すると予想されている。この一菌株ゲノムあたりに存在する「潜在的な」ものを含める二次代謝産物生産能は、通常の培養液の化学分析で見いだされる数(多くて 10 個程度)を大きく上回る。潜在的な二次代謝経路は通常のラボ培養条件では、多くの場合完全に休眠しているか、ほとんど発現していないと考えられる。このことから、まだ発見されていない新規な二次代謝産物が数多く放線菌の中に眠っていることが予想できる。

2. 研究の目的

放線菌とミコール酸を細胞壁細分とする細菌群を同じ試験管内で共培養すると、放線菌の純粋培養では確認できない二次代謝産物の生産が放線菌に誘導される(Onaka H, et al. *Appl Environ Microbiol.* 77(2):400-6, 2011)。本現象を利用した放線菌の眠っている二次代謝産物生産能を覚醒させる方法を「複合培養法」と命名している。本方法は放線菌の眠っている二次代謝産物生産能を効率よく覚醒させる技術になりうると期待しているが、その基礎となる誘導現象の分子レベルでのメカニズムは全くわかっていない。本研究では、ミコール酸含有細菌からの刺激に対して応答する放線菌二次代謝産物生合成遺伝子プロモーターに注目し、本現象の一端を分子レベルで解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1)ミコール酸含有細菌(*Tsukamurella pulmonis*)と放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 株を主なモデルとして利用し、複合培養における放線菌の刺激応答シグナルカスケード下流での二次代謝産物生産活性化機構を、ゴードスポリン構造遺伝子(*godA*)のプロモーターの活性化機構を分子生物学・生化学的な手法を用いて明らかにすることを試みる。

(2)ゲノム解析が完了している放線菌や既にクローニングしている二次代謝産物生合成遺伝子群を用いて、複合培養に応答する二次代謝を精査し、ゲノム情報から、複合培養に応答するプロモーターの候補を抽出・選択し、レポーターアッセイなどを用いて更に確認し、共通する保存配列を明らかにすることを試みる。

4. 研究成果

(1)解析候補となる放線菌二次代謝生合成遺伝子群の選抜

ゴードスポリンの生合成遺伝子クラスターを連結したベクターを汎用異種発現宿主である *Streptomyces lividans* に導入した株を作製し、ミコール酸含有細菌との複合培養を行った。その結果、ゴードスポリンの生産量は純粋培養と比較し二倍以上に増加することが観察された(発表論文 Onaka H., et al. *J Antibiot* 2015)。そこで、本生合成系を第一の解析候補とした。

(2)色素生産を指標としたレポーターアッセイ系の構築

放線菌内での任意のプロモーターの下流に連結した遺伝子の発現強度を簡易的に観察するために、デオキシピオラセイン(紫色色素)の生産を指標にしたレポーターアッセイ系の構築を行った。*Chromobacterium violaceum* 由来のデオキシピオラセイン生合成遺伝子(*vioA-E*)を、放線菌染色体組み込み型のプラスミド(pTYM19)に連結した。*vioA* 上流に構成的発現プロモーター(P_{ermE^*})を連結し、放線菌内でのデオキシピオラセインの異種生産を確認し、レポーターアッセイに用いることとした。

(3)ゴードスポリン構造遺伝子プロモーターの解析

ゴードスポリンはリボソーム翻訳型ペプチド抗生物質であることから、構造ペプチドをコードする遺伝子(*godA*)上流の非翻訳領域に、複合培養に特異的な遺伝子発現制御系が存在することが予想された。そこで *godA* 遺伝子上流の非翻訳領域の解析を行った。5'側非翻訳領域の切縮め、3'側非翻訳領域の切縮め、更に 5'-RACE 法を用いることにより、*godA* の転写開始点を決定した。更に部位特異的変異解析によりプロモーター配列を同定した。

次に、このプロモーター配列が複合培養時にも機能する唯一のプロモーターであるかを確認するために、上述のレポーターアッセイ系を用いて解析を行った。その結果、純粋培養時も複合培養時も同じプロモーターにより転写されることが明らかになった。また転写開始点の-35 及び-10 領域の配列が主要シグマ HrdB のコンセンサス配列とよく一致した。

これらの結果の基づき、他の構成的プロモーターを用いて、同様のレポーターアッセイを複合培養で行ったところ、*godA* プロモーター制御時と同様の生産量増加の傾向が確認できた。これらのことから、現在ゴードスポリン生産量の増加は共培養時の特異的な制御因子が介在する様式ではなく、細胞機能全体の活性化が起因している可能性を推定している。

(4)他の解析候補となる放線菌二次代謝生合成遺伝子群の選抜

複合培養時特異的に生産される二次代謝

産物が新たに5種類(15個)発見された。*S. endus* S-522由来のI型ポリケチド化合物 alchivemycin 類 (Igarashi Y, *et al. Org Lett.* 12(15):3402-5, 2010)に加えて、*S. cinnamoneus* NBRC 13823由来のインドロカルガゾール arcyriaflavin E (Hoshino S, *et al. J Antibiot.* 68(5):342-4, 2015)と *S. nigrescens* HEK-616由来の 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoline (5aTHQ) 類 (発表論文 Sugiyama R, *et al. Org Lett.* 17(8):1918-21, 2015)と *Streptomyces* sp. CJ-5由来のbutanolide化合物 chojalactone 類 (Hoshino S, *et al. Org Lett.* 17(6):1501-4, 2015)と *Streptomyces* sp. NZ-6由来のmacrolactam化合物 niizalactam 類 (Hoshino S, *et al. J Nat Prod.* 78(12):3011-7, 2015)が発見されている。
5aTHQ 類生産菌のドラフトゲノムを解析し、その生合成遺伝子群を推定した。その推定遺伝子クラスターを *S. lividans* に導入し、5aTHQ の生産を確認することにより生合成遺伝子群を同定した。また生産菌での定量的 RT-PCR による転写解析から 5aTHQ 生合成遺伝子群の複合培養時特異的な転写活性化を見出した。

(6)網羅的転写解析による複合培養で活性化される遺伝子及びそのプロモーターの解析
これまでの結果を踏まえ、より網羅的に複合培養特異的な発現変動遺伝子を見出すことにより、二次代謝活性化の仕組みを明らかにすることを考えている。そのために現在は RNA-seq を用いた網羅的転写解析に注力している。現在までに複合培養におけるモデル放線菌である *Streptomyces coelicolor* A3(2) を用いて、純粋培養、ミコール酸含有細菌 *Tsukamurella pulmonis* との複合培養、また *Bacillus subtilis* との共培養における転写応答を比較解析し、特異的な発現変動遺伝子の同定を試みている。

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)

Ozaki T, Kurokawa Y, Hayashi S, Oku N, Asamizu S, Igarashi Y, Onaka H. Insights into the Biosynthesis of Dehydroalanines in Goadsporin. 査読有, *ChemBiochem.* 2016, 17 巻, 218-223 doi: 10.1002/cbic.201500541

Asamizu S, Ozaki T, Teramoto K, Satoh K, Onaka H. Killing of Mycolic Acid-Containing Bacteria Aborted Induction of Antibiotic Production by *Streptomyces* in Combined-Culture. 査読有, *PLoS One.* 2015, 10 巻, e0142372 doi: 10.1371/journal.pone.0142372

Onaka H, Ozaki T, Mori Y, Izawa M, Hayashi S, Asamizu S. Mycolic acid-containing bacteria activate heterologous secondary metabolite expression in *Streptomyces lividans*. 査読有, *J Antibiot (Tokyo).* 2015, 68 巻, 594-597 doi: 10.1038/ja.2015.31

Sugiyama R, Nishimura S, Ozaki T, Asamizu S, Onaka H, Kakeya H. 5-Alkyl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines, new membrane-interacting lipophilic metabolites produced by combined culture of *Streptomyces nigrescens* and *Tsukamurella pulmonis*. 査読有, *Org Lett.* 2015, 17 巻, 1918-1921 doi: 10.1021/acs.orglett.5b00607

Haginaka K, Asamizu S, Ozaki T, Igarashi Y, Furumai T, Onaka H. Genetic approaches to generate hyper-producing strains of goadsporin: the relationships between productivity and gene duplication in secondary metabolite biosynthesis. 査読有, *Biosci Biotechnol Biochem.* 2014, 78 巻, 394-399 doi: 10.1080/09168451

Hayashi S, Ozaki T, Asamizu S, Ikeda H, Ōmura S, Oku N, Igarashi Y, Tomoda H, Onaka H. Genome mining reveals a minimum gene set for the biosynthesis of 32-membered macrocyclic thiopeptides lactazoles. 査読有, *Chem Biol.* 2014, 21 巻, 679-688 doi: 10.1016/j.chembiol.2014.03.008

[学会発表](計13件)

浅水俊平、尾仲宏康、「異属細菌による放線菌二次代謝産物の誘導」2014年度第1回公益社団法人日本農芸化学会関東支部例会、東京都文京区、2014/5/24

浅水俊平、尾崎太郎、尾仲宏康、「死細胞は放線菌の二次代謝を複合培養において誘導しない」2014年度日本放線菌学会大会、つくば市、2014/6/19-20

Shumpei Asamizu, Taro Ozaki, Hiroyasu Onaka, "Secondary metabolites induction by mycolic acid-containing bacteria in *Streptomyces*", *Natural Product Discovery and Development in the Post Genomic Era*, CA, USA, 2015/1/11-14

浅水俊平、尾崎太郎、佐藤勝也、尾仲宏康、「複合培養における放線菌二次代謝の

誘導要因の探索」、2015年度日本農芸化学会大会、岡山市、2015/3/27

浅水俊平、尾崎太郎、寺本華奈江、佐藤勝也、尾仲宏康、「複合培養における放線菌とミコール酸含有菌の生死で異なる相互作用」、第30回日本放線菌学会、富山市、2015/9/7-8

Shumpei Asamizu, Taro Ozaki, Kanae Teramoto, Katsuya Satoh, Hiroyasu Onaka "Adhesion of alive mycolic acid-containing bacteria is an important factor to induce secondary metabolisms in Streptomyces" Pacificchem2015, HI, USA, 2015/12/17

浅水俊平、「放線菌由来窒素含有天然生物活性物質の生合成に関する研究」、2016年度大会日本農芸化学会、札幌市、2016/3/27

佐々木槿子、浅水俊平、尾崎太郎、宮本憲二、尾仲宏康、「RNA-seqによるミコール酸含有細菌に対する Streptomyces coelicolor A3(2)の応答解析」、2016年度大会日本農芸化学会、札幌市、2016/3/28

〔その他〕

ホームページ

<http://microbial-potential.bt.a.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅水 俊平 (ASAMIZU, Shumpei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：90709057