

研究種目：若手 (B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：19710170  
研究課題名 (和文) 病原性放線菌ノカルジアの生産するシデロフォアの生合成に関する研究  
研究課題名 (英文) Analysis of the siderophore genes in Nocardia  
研究代表者  
星野 泰隆 (HOSHINO YASUTAKA)  
研究者番号：40399457

研究成果の概要 (和文) : *Nocardia farcinica* のゲノム解析により見出されたシデロフォア生合成に関与すると推定された *nbt* クラスタによって、シデロフォアが生産されていることを遺伝学的手法等により証明し、さらに生合成経路の改変等による新規化合物の生産を目指している。結果、シデロフォア “Nocobactin NA” の生産を確認し、*nbt* 遺伝子破壊株の解析により nocobactin NA の生産性の減少、消失を確認した。以上の結果から、*nbt* クラスタが nocobactin 生合成に関与していることを証明した。

研究成果の概要 (英文) : Recently, we have determined the complete genome sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152 and found gene clusters (*nbt* gene clusters) thought to be responsible for the biosynthesis of siderophore in the genome. In this study, as expected, a siderophore was isolated from this strain and identified as nocobactin NA. The chemical structure is in good agreement with the gene organization of the *nbt* gene clusters. Furthermore, gene disruption and heterologous expression experiments demonstrated that *nbt* gene clusters were responsible for the biosynthesis of nocobactin NA.

To our knowledge, this is the first example of the biosynthetic genes and pathway of mycobactin type siderophore in the *Nocardia*. Furthermore, this work highlights the importance of genome analysis in combination with metabolite analysis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,400,000	0	1,400,000
20年度	1,100,000	0	1,100,000
21年度	800,000	0	800,000
年度		0	
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：微生物化学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：シデロフォア・ノカルジア・ゲノム・生合成遺伝子・ノコバクチン

## 1. 研究開始当初の背景

今日の医療の現場では、医療の進歩と高度化に伴い、易感染者の増加と高齢人口の増加があいまって、日和見感染症という非常に大きな問題が存在する。さらに、ガン患者やアレルギー患者におけるステロイドの長期使用や免疫抑制剤の多用やエイズなどの免疫力の低下する疾患に於いて、結核や真菌症が問題になってきている。また、結核菌と分類学的に近縁である病原性放線菌ノカルジアの感染症も本邦に於いて増加傾向にあることが報告されている。同様に米国においても年間500~1000人の新規患者が出ている(CDC HPより)。

このような背景から、病原因子や感染メカニズムの解明が急務であるノカルジア症において、我々のグループは、世界に先駆けて *Nocardia farcinica* のゲノム解析を行った。その結果を元に二次代謝経路および病原性因子と推定される遺伝子に関して解析を行い、本菌に起因するノカルジア症の病原メカニズムの解明を目指して研究を進めている。

一方で、*Nocardia* 属放線菌は環境中から分離され二次代謝産物を数多く生産し、さまざまな抗生物質などの生物活性物質の生産菌として知られており、現在まで数多くの生産物の報告がされている。そこで我々は、ゲノム中に存在する二次代謝産物生産に関与すると推定される遺伝子を推定し、その未知の二次代謝産物を明らかにすることを目指している。その中で、まず初めにシデロフォア生産に関与すると予想される遺伝子を明らかにすることを目指した。

## 2. 研究の目的

病原性放線菌 *Nocardia farcinica* IFM10152 株のゲノム解析の結果から、従来のスクリーニングでは見いだせなかった物質をゲノム情報からシデロフォア生合成遺伝子クラスター (*nbt* クラスター) という形で推定し、その産物と考えられるシデロフォアを明らかにする。さらに、この生合成遺伝子クラスターの最終生産物がそのシデロフォアであるかを、遺伝学的手法等を用いて証明する。また、*nbt* クラスターの構成成分である非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS)、ポリケチド合成酵素 (PKS) 等をコードする遺伝子に関して、人為的に改変した生合成遺伝子クラスターを作成し、非天然型化合物を微生物に生産させることによって、新規な生物活性や特性を有する医薬・工業原料の開発に寄与することを目指す。

また、環境下でのシデロフォアの役割の解

明および人に感染した場合における役割についても、何らかの解明することが可能である。したがって、本研究では、創薬および本菌の予防診断・治療法に対し寄与することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) シデロフォアの単離・構造決定

*Nocardia farcinica* のゲノム解析を行った結果から、結核菌のシデロフォア “mycobactin” の生合成遺伝子クラスターと相同性を有している *nbt* クラスター (clusterI: *nbtA-H*, clusterII: *nbtS-T*) が見いだされた。この結果より、本菌株はシデロフォアを生産している可能性を有しており、シデロフォア生産の確認を行った。Chrome azurol S assay (CAS assay) およびシデロフォア生産培地利用による生産を用いて、生産の確認を行った。得られた化合物に関しては、質量分析およびNMRを用いた構造解析により、構造を決定した。

### (2) *nbt* 遺伝子クラスターの解析

単離したシデロフォアが、*nbt* クラスターによって生合成されているかを証明するために以下の方法で行った。

#### ①異種発現

放線菌 *Streptomyces avermitilis* へ *nbt* クラスター導入し、シデロフォア生産を試みた。*nbt* クラスター全体を導入するために、ゲノム解析時に作成した *N. farcinica* の整列プラスミドライブラリーを用いて、導入断片の構築を行った。また、結核菌のサリチル酸生合成遺伝子と相同性を有している *nbtS* 遺伝子は、単独で *S. avermitilis* へ導入し、サリチル酸生産の検討を行った。各種構築した株に関しては、HPLCを用いて nocobactin およびサリチル酸の生産性を確認した。

#### ②破壊株を用いた解析

我々のグループが開発した *Nocardia* の遺伝子操作系等を利用し *nbt* 遺伝子の破壊株の作成を行った。破壊を行った遺伝子は、初発物質であるサリチル酸合成酵素をコードする遺伝子と相同性のある *nbtS*、thioesterase と相同性のある *nbtA*、NRPS をコードする *nbtE* を各々破壊した。構築した株の nocobactin の生産性及び初発物質と推定されるサリチル酸の生産性に関しては、HPLCを用いて確認を行った。

(3) *nbt* クラスター改変株からの新規化合物の生産。

*Nbt* クラスターの改変株を用いて、改変化合物の生産を行った。構造に関しては、MS 及び MS/MS 解析により推定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) シデロフォアの単離及び構造決定

ゲノム解析の結果から予想されたシデロフォアの生産を確認した。各種クロマトグラフィーを用いて精製を行い、2 種類の化合物を得た。MS および NMR の解析の結果、*N. asteroides* から単離報告のある Nocobactin NA (鎖長の異なる 2 種) であることが判明した。

さらに、アミノ酸の立体配置に関しては、カプロラクタム部位の lysine が D-体であり、もう一方は、L-体であることを明らかにした。

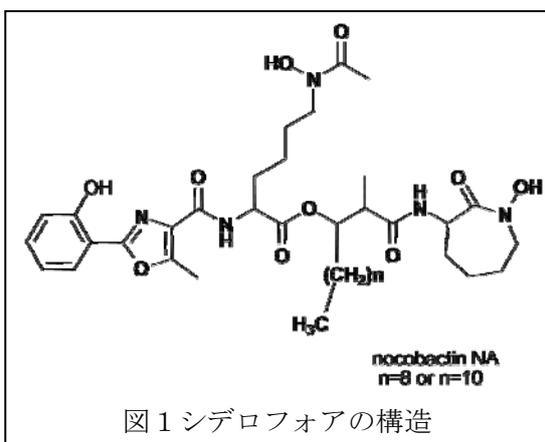


図 1 シデロフォアの構造

##### (2) *nbt* 遺伝子クラスター解析

###### ① *nbt* 遺伝子の配列解析

*nbt* クラスターに含まれる遺伝子のコードするタンパクのアミノ酸配列の解析を行った。NbtC, D, E は、NRPS であり、アデニル化ドメイン (A)、ペプチジルキャリアプロテイン (PCP)、縮合ドメイン、が含まれていることが判明し、さらに NbtE は、エピマー化ドメインを有していることが判明した。NbtS は、結核菌のサリチル酸合成酵素である MbtI と相同性が高く、サリチル酸合成に関与することが予想された。NbtB, D は、PKS であり、ケトシンテース (KS)、アシルトランスフェラーゼ (AT)、ケトリダクテース (KR)、アシルキャリアプロテイン (ACP) を有していた。このことから、NbtB, D は nocobactin の 3-hydroxy-2-methyl fatty acid 部分の生合成に関与すると予想された。NbtA, NbtG、NbtH は、それぞれ thioesterase、lysine-N-oxygenase、N6-hydroxylysine acetyltransferase であると予想された。さらに、3 個の NRPS および NbtT の A ドメインの解析により、各ドメインの修飾するアミノ酸を推定することができ、それは nocobactin NA の構成成分であるアミノ酸と一致した。

###### ② 異種発現

*nbt* クラスター (*nbtA-H, S, T*) を導入し

た *S. avermitilis* 株を利用して異種発現を試みた。HPLC を用いて代謝産物の解析を行った結果、nocobactin NA の生産は確認できなかった。これは、NRPS がホスホパントテン酸転移酵素によって翻訳後修飾された活性型のホロ酵素になっていないと考え、この株に *Nocardia* のホスホパントテン酸転移酵素遺伝子を導入した株を構築したが、同様に nocobactin NA の生産は確認できなかった。

また、*nbtS* を導入した株を利用し、サリチル酸生産を試みた。この結果、サリチル酸の生産が確認された。この結果から、nocobactin NA 生合成の初発物質であるサリチル酸は、この *nbtS* により生合成されていることが示された。

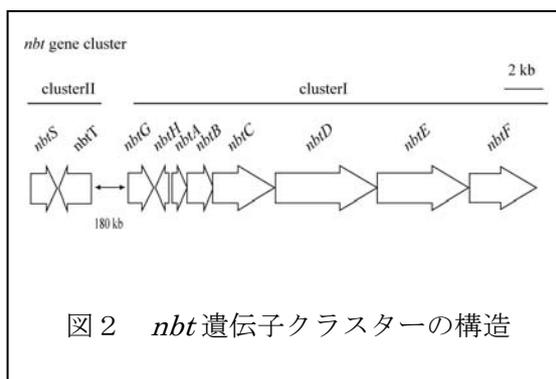


図 2 *nbt* 遺伝子クラスターの構造

###### ③ 破壊株を用いた解析

*nbt* 遺伝子 (*nbtA, nbtE* および *nbtS*) の破壊株およびそれぞれの相補株における nocobactin NA の生産性の確認するために、これらの株の生産物を HPLC にて解析した。*nbtA* および *nbtE* 破壊株では、野生株にみられる nocobactin のピークが検出されなかった。さらに、nocobactin 生合成の初発物質であるサリチル酸は、*nbtA* および *nbtE* の破壊株において検出され、野生株と比較して生産量の増加が見られた。また、これらの相補株では、nocobactin の生産が回復した。以上の結果から、*nbtA* および *nbtE* 遺伝子は、nocobactin NA の生産に必要であることが示唆された。さらに、*nbtE* 破壊株では、nocobactin とは異なる保持時間に、新たなピークが観察された。このピークの UV スペクトルは nocobactin NA と同じであり、HRMS および MS/MS の解析の結果から nocobactin NA 生合成段階の中間体と考えられた。

*nbtS* 破壊株の HPLC による解析では、nocobactin の生産性が、顕著に低下していることが判明し、サリチル酸の生産は確認されなかった。また *nbtS* を相補した株およびサリチル酸を添加した場合には、nocobactin NA の生産は回復した。したがって、NbtS によってサリチル酸が生合成され、このサリチル酸が nocobactin NA の生合成の経路へ供給される主な経路であると考えられた。

以上の(1)(2)(3)の結果から、nbtクラスターは、nocobactin NAの生合成遺伝子クラスターであることが明らかとなった。

### 3) nbt クラスター改変株からの新規化合物の生産

Nocobactin NAの生合成過程を改変し、新たな化合物の生産を試みるために、カプロラクタム環を欠失させた化合物の生産を試みた。カプロラクタム環の生合成に関与すると予想される nbtE 遺伝子の破壊株を利用し、新たな代謝産物の生産を行った。結果、HRMS分析及びMS/MS分析によって、予想した化合物を得ることができた。このような結果から、生合成過程の改変により、新たな化合物を創製することが可能であることが示された。

### 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1件)

①Yasutaka Hoshino (1 番目)、Jun Ishikawa、Yuzuru Mikami、その他 7 名、*Nocardia terpenica* sp. nov., isolated from Japanese patients with nocardiosis、International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology、査読有、Vol. 57、2007、1456-1460

[学会発表] (計5件)

①Yasutaka Hoshino、Identification of two gene clusters for nocobactin biosynthesis in *Nocardia farcinica*、UK-Japan Workshop on Genomics of Antibiotic-producing Actinomycetes: Implications and Applications、2008年10月30日-11月1日、東京

②星野泰隆、病原性放線菌 *Nocardia farcinica* におけるシデロフォア nocobactin の生合成遺伝子の同定、第81回日本細菌学会総会、2008年3月24-26日、京都

③Yasutaka Hoshino、Identification of the salicylate synthase gene of *Nocardia farcinica* and its role in the biosynthesis of nocobactin、International Symposium on the Biology of Actinomycetes、2007年8月26-30日、ニューキャッスル(英国)

④Jun Ishikawa、Development of a genetic analysis system for *Nocardia* species、International Symposium on the Biology of Actinomycetes、2007年8月26-30日、ニューキャッスル(英国)

⑤五ノ井 透、病原性放線菌 *Nocardia* 属 64

種が産生するシデロフォアの多様性の解析、第22回日本放線菌学会大会、2007年5月30日-6月1日、広島

[その他]

ホームページ等

<http://nocardia.nih.go.jp/>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

星野 泰隆 (HOHINO YASUTAKA)

研究者番号：40399457

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

なし