

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07358

研究課題名(和文) ブテノライド型誘導因子を介した放線菌二次代謝の潜在能開拓

研究課題名(英文) Waking up cryptic secondary metabolisms in actinomycetes by a butenolide-type Streptomyces hormone

研究代表者

木谷 茂 (Kitani, Shigeru)

大阪大学・生物工学国際交流センター・准教授

研究者番号：10379117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放線菌二次代謝シグナル系の改変による休眠物質の生産覚醒化とその生合成系の解明、またブテノライド型シグナル系を有する放線菌種の同定とその二次代謝系の解明、を主目的とした。本研究により、抗寄生虫薬エバーメクチン生産菌において、シグナル受容体の遺伝子破壊がフトキサゾリンAの生産を覚醒すること、またフトキサゾリンA生合成クラスターが公開ゲノム情報にない領域にコードされていることを解明した。また、ブテノライド型シグナル活性を示す物質を同定し、ブテノライド型シグナルの構造活性相関を解明したのに加え、二次代謝シグナルを介した化学シグナルトークを示した。

研究成果の概要(英文)：Streptomyces hormones induce the production of secondary metabolites by binding to the cognate receptors in actinomycetes. In this study, I aimed to awaken cryptic useful secondary metabolites through the manipulation of signaling cascades governed by Streptomyces hormones, and to identify actinomycetes strains in which butenolide-type Streptomyces hormones control secondary metabolism. I demonstrated that gene disruption of Streptomyces-hormone receptor activates the production of phthoxazolin A in Streptomyces avermitilis, and that phthoxazolin A biosynthetic genes are encoded on an extra genomic region that is not found in the public database. Furthermore, identification of butenolide-type Streptomyces hormone-like compounds from Streptomyces albus J1074 led to structure-activity relationship for butenolide-type Streptomyces hormones, as well as chemical communication between different streptomycetes via Streptomyces hormones.

研究分野：応用微生物学

キーワード：抗生物質生産 放線菌 ブテノライド型シグナル 潜在二次代謝

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、多彩な生理活性物質を二次代謝産物とする放線菌を対象として、新型の二次代謝誘導シグナル(プテノライド型シグナル)を抗寄生虫薬エバームクチン生産菌 *Streptomyces avermitilis* より報告した(引用文献)。先行研究により、(i)プテノライド型シグナルの異種放線菌への投与は、休眠化合物の生産を覚醒する、(ii)二次代謝誘導シグナル受容体の遺伝子破壊は、主生成物以外の二次代謝産物の生産にも影響する、(iii)放線菌の30%がプテノライド型シグナルを産生する活性を示す、(iv)プテノライド型シグナルによる二次代謝誘導機構は、従来のシグナル制御系とは異なる、などの成果を挙げた。

研究代表者は、これらの成果を発展させ、(i)プテノライド型シグナル制御系を活用すれば、従来シグナルでは為し得なかった休眠物質の生産が覚醒し、生理活性物質を探索する技術を提案できる、(ii)シグナル受容機構を多種放線菌にて解明すれば、潜在二次代謝能を開拓する制御モデルを確立できる、(iii)微生物ケミカルコミュニケーションを微生物潜在能の発掘に応用できる、と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、(i)プテノライド型シグナル制御系の改変に基づいて、休眠二次代謝能を活性化し、有用生理活性物質を顕在化させ、その生合成系を解明する、(ii)新たに特定するシグナル産生放線菌にてシグナル受容機構を解析し、プテノライド型シグナル系による物質生産制御モデルを確立する、ことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、休眠二次代謝を覚醒させる放線菌として、*S. avermitilis* と異種発現宿主放線菌として著名な *Streptomyces albus* J1074 株、ブチロラクトン型シグナルを産生する *Streptomyces lavendulae* FRI-5 株、二次代謝シグナルが同定されていない *Kitasatospora setae* を、主要な研究対象菌とした。また、上記の4菌株に加え、二次代謝シグナル制御系解明の手がかりとなるブチロラクトン型シグナル産生菌 *Streptomyces virginiae* も対象とし、二次代謝シグナル制御系の総合的な理解にも取り組んだ。一方、休眠二次代謝を覚醒させる放線菌ライブラリーを充実させるため、海綿に共生する放線菌も新たに単離することにした。

(1) 生産覚醒物質フトキサゾリン A の生合成経路の解明

エバームクチン生産オリジナル菌株 *S. avermitilis* KA-320 株を野生型株として、二次代謝シグナル受容体様タンパク質の遺伝

子破壊株 *avaR3* 株(引用文献)から、フトキサゾリン A を標準品として調製した。エバームクチン高生産株 *S. avermitilis* K139 株とゲノム大規模欠失株 *S. avermitilis* SUKA22 株を用いて、そのフトキサゾリン A 生産能を調査した。フトキサゾリン A の生合成遺伝子クラスターを同定するため、*S. avermitilis* KA-320/*avaR3* 株を出発菌株として、左端領域を欠失させた各種 Sald 株を、またフトキサゾリン A 生合成酵素と推定される PtxA の遺伝子破壊株を構築し、そのフトキサゾリン A 生産能を解析した。

(2) プテノライド型シグナル活性を有する放線菌における二次代謝機構の解明

プテノライド型シグナル活性が高い *S. albus* J1074 株(引用文献)にて、プテノライド型シグナルの生合成酵素遺伝子を推定するため、公開ゲノム情報を解析した。推定したシグナル生合成酵素(*aco*)の遺伝子破壊株を構築し、各種培養条件における代謝物プロファイルを HPLC にて解析した。*aco* 遺伝子の破壊に伴い生産が消失する化合物を精製し、その化学構造を各種機器分析により同定した。*S. albus* J1074 株と *S. avermitilis aco* 株を共培養することにより、*S. avermitilis aco* 株のエバームクチン生産回復能を解析した。*S. albus* J1074 株との共培養により *S. avermitilis aco* 株が生産するエバームクチンをイメージング質量分析により可視化した。

(3) ブチロラクトン型シグナル産生菌における休眠二次代謝の覚醒

ブチロラクトン型シグナル産生菌 *S. lavendulae* FRI-5 株にて、各種二次代謝クラスターを確認するため、ゲノム情報を解析した。青色色素インジゴイジンの生合成遺伝子(*lbpA*)を *S. lavendulae* FRI-5 株からクローニングし、構成的プロモーターと共に *S. avermitilis* SUKA22 株に導入した。構築した *S. avermitilis* SUKA22/*lbpA* のインジゴイジン生産能を各種培養条件下にて解析した。

次に、I型ポリケチド合成酵素遺伝子群が座乗するコスミドを *S. lavendulae* FRI-5 株コスミドライブラリーから同定し、*S. avermitilis* SUKA22 株に導入した。コスミド導入に伴い生産が増加する化合物(ラベンジオール)を精製し、その化学構造を各種機器分析により同定した。ラベンジオール生合成酵素と推定される遺伝子を、コスミド導入株にて破壊し、そのラベンジオール生産能を解析した。

(4) 生産覚醒物質キタセタリン生合成系の同定と新規物質の生産

K. setae において、二次代謝シグナルの受容体様遺伝子を破壊すると、新規 -カルボリン化合物キタセタリンの生産が増加する(引用文献)。キタセタリンの生合成遺伝

子を同定するため、推定生合成遺伝子を *S. avermitilis* SUKA22 株に導入し、その代謝物プロファイルを HPLC により解析した。キタセタリン生合成遺伝子の一つである *ks1B* 遺伝子の導入により、生産が検出された化合物を各種機器分析により構造同定した。また、同化合物の抗菌活性と細胞毒性などの生理活性を検討した。

(5) プチロラクトン型シグナルを生産誘導する培養因子の同定

プチロラクトン型シグナル産生菌 *S. virginiae* にて、シグナル生産が観察される合成培地の条件を検討した。合成培地に含まれる各種成分の濃度を变化させた場合のプチロラクトン型シグナル産生能をバイオアッセイにより解析した。また、プチロラクトン型シグナルが生産誘導する抗生物質の生産量を HPLC により定量解析した。

(6) 海綿共生放線菌の単離とその生物学的性質の解明

休眠二次代謝を覚醒させる放線菌種を拡大させるため、海綿に共生する放線菌を、高知県または鹿児島県から単離した。単離した放線菌の多様性を解析するため、その 16s rDNA 配列と抗菌スペクトラムを分析した。

4. 研究成果

(1) 生産覚醒化合物フトキサゾリン A の生合成経路の解明

研究代表者は、エバーメクチン生産菌において、プテノライド型シグナル受容体様遺伝子を機能喪失させることにより、セルロース生合成阻害剤フトキサゾリン A を見出した(発表論文)。フトキサゾリン A の生理活性を検討したところ、ダイズ茎疫病菌 *Phytophthora sojae* とほうれん草根腐れ病菌 *Aphanomyces cochlioides* に対して強い生育阻害活性を示した。フトキサゾリン A の生産がプテノライド型シグナルに制御されるかを検証したところ、プテノライド型シグナルがフトキサゾリン A 生産を負に調節していることが分かった。また、フトキサゾリン A 生産はエバーメクチン生産欠損に対して微小にしか増加しないことから、プテノライド型シグナル受容体様タンパク質がフトキサゾリン A 生産を直接的に制御する様式が明らかとなった。

フトキサゾリン A は既知化合物であったが、その生合成系は報告されていない。そこで、フトキサゾリン A の生合成クラスターを同定するため、フトキサゾリン A の基本骨格から推定される生合成遺伝子群を機能喪失させた。しかし、いずれもそのフトキサゾリン生産能に変化はなく、フトキサゾリン生合成には予想困難な酵素が関与している可能性が示唆された。フトキサゾリン A 生合成に関わるゲノム領域を同定するため、ゲノム大規模欠失株を *Cre/loxP* 法などにより構築した。

その結果、約 690 kb を欠失させた株がフトキサゾリン A の生産を停止したため、領域の限定化を図ったが、生合成遺伝子の同定に至らなかった。フトキサゾリン A 生産の覚醒化が想定外の遺伝子に変異が導入された可能性を疑い、*S. avermitilis* KA-320 株のゲノム再解析を実施したところ、公開されている *S. avermitilis* K139 株には含まれないゲノム DNA 領域が *S. avermitilis* KA-320 株の染色体 DNA 右端領域に位置することが明らかとなった。*In silico* 解析と遺伝子破壊解析により、フトキサゾリン生合成を担う遺伝子群を同定することに成功した。これらの結果より、二次代謝シグナル系の改変が、エバーメクチン生産菌におけるゲノム構造の変遷を解明し、また新たな 1 型ポリケチド合成酵素の発見に結びついた(発表論文)。

(2) プテノライド型シグナル活性を有する放線菌における二次代謝機構の解明

研究代表者は、プテノライド型シグナルを生産欠失する *S. avermitilis aco* 株を用いて、各種放線菌の培養抽出液を精査することにより、放線菌の約 30% がプテノライド型シグナル活性を示すことを明らかにした(発表論文)。その中でも、*S. albus* J1074 株が高シグナル活性を示したことから、*S. albus* J1074 株では、プテノライド型シグナルが支配する二次代謝制御系が存在するのではないかと考えた。*S. albus* J1074 株の公開ゲノム情報に基づき、シグナル生合成に関与する遺伝子(*aco*)を推定し、その機能破壊株を構築した結果、プテノライド型シグナル活性が顕著に低下するとともに、代謝物プロファイルが大きく変化した。一方、シグナル活性を示す培養液を *aco* 遺伝子破壊株に添加したところ、代謝物プロファイルに変動が観察されなかった。そこで、野生型株に存在し、生合成酵素破壊株では生産されない化合物を同定したところ、プテノライド環を含む化合物であることが分かった。類似した挙動を示す放線菌種を複数、見出していることより、プテノライド型シグナル制御系は、放線菌に広く分布する可能性が示唆された。*S. albus* J1074 株より単離したプテノライド環を含む化合物群の二次代謝誘導能を調べたところ、プテノライド型シグナルの構造活性相関が明らかとなった。

また、*S. albus* J1074 株を *S. avermitilis aco* 株と共培養させたところ、エバーメクチンの生産が回復したことから、プテノライド型シグナルが放線菌の種間を超えて作用することが明らかとなり、放線菌の二次代謝シグナルを介した化学コミュニケーションが明らかとなった(発表論文)。

(3) プチロラクトン型シグナル産生菌における休眠二次代謝の覚醒

S. lavendulae FRI-5 株は、プチロラクトン型シグナルを生産して、青色色素インジゴ

イジンを生産する。インジゴイジンは有望な天然染料にあるにも関わらず、*S. lavendulae* FRI-5 株におけるインジゴイジン生産は不安定であった。インジゴイジン生合成酵素遺伝子を *S. lavendulae* FRI-5 株のドラフトゲノム情報から探索したところ、候補遺伝子 *lbpA* を見出した。*lbpA* 遺伝子を構成的プロモーターと共に *S. avermitilis* SUKA22 株に導入したところ、青色色素の生産が観察された。この青色色素の質量を測定したところ、インジゴイジンの質量と一致したことから、*lbpA* 遺伝子がインジゴイジン生合成酵素遺伝子があることが明らかとなった。また、インジゴイジンの基質であるグルタミンを *lbpA* 導入株に添加したところ、インジゴイジン生産を約 10 倍に増加させることに成功した（発表論文）。

次に、休眠二次代謝クラスターを覚醒させるため、多彩な生理活性を示すポリケタイド化合物を生合成する I 型ポリケタイド合成酵素遺伝子に着目した。転写が検出されない I 型ポリケタイド合成酵素遺伝子群が座乗するコスミドを *S. avermitilis* SUKA22 株に導入したところ、宿主株では検出されない化合物が検出された。この化合物を精製し、その化学構造を決定したところ、ストレプトテノール系化合物と考えられる新規化合物であることが分かった。したがって、この化合物をラベンジオールと命名した。ラベンジオール生合成酵素と推定される遺伝子を、コスミド導入株にて破壊したところ、ラベンジオール生産能が消失したことから、ラベンジオール生合成酵素群の取得に成功した。

有用な生理活性を示すストレプトテノール系化合物において、その生合成系は解明されていない。したがって、ラベンジオール生合成系の改変により、非天然型の化合物が創出されることが期待される（発表論文）。

（４）生産覚醒物質キタセタリン生合成系の同定と新規物質の生産

K. setae において、二次代謝シグナルの受容体様遺伝子を破壊することにより、新規-カルボリン化合物キタセタリンを同定した。キタセタリンの生合成遺伝子を同定するため、推定生合成酵素遺伝子を *S. avermitilis* SUKA22 株に導入した結果、キタセタリンとその類縁体に加えて、新たな化合物の生産を検出した。この化合物の化学構造を同定したところ、3つのカルボン酸を有する新規トリプトリン化合物（キタセタリン酸と命名）であることが分かった。キタセタリン酸は、キタセタリン生合成系の中間体であると考えられることから、この発見によりキタセタリン生合成系の理解が進むと考えられる。次に、キタセタリン酸の生理活性を検討したところ、抗菌活性は検出されず、また各種細胞に対する毒性も示さなかった。しかし、小胞体ストレスに関与する腫瘍マーカーに対して発現抑制作用が検出されたため、今後、キタ

セタリン酸が抗ガン剤リード化合物の一つになることが期待される。

（５）プチロラクトン型シグナルを生産誘導する培養因子の同定

プチロラクトン型シグナルによる二次代謝制御系の知見を深めるため、如何にしてプチロラクトン型シグナル自体の生産が誘発されるかを *S. virginiae* を用いて検証することにした。培地成分の詳細な検討を可能とするため、シグナルを生産する合成培地の条件を確立した。次に、各培地成分の初期濃度を減少させたところ、アミノ酸と糖については、各初期濃度とシグナル生産の間に相関が見られなかったのに対し、無機リン酸の初期濃度を減少させた場合、シグナルの早期生産現象が観察された。したがって、プチロラクトン型シグナルの産生が、無機リン酸の濃度減少により誘導されることが明らかとなった。二次代謝シグナルの産生誘導に関する知見は、この研究成果が最初である。今後、この無機リン酸の二次代謝シグナル産生への関与が、放線菌全体に適用できる概念であるかを検証する予定である。

（６）海綿共生放線菌の単離とその生物学的性質の解明

休眠二次代謝を覚醒させる放線菌種を拡大させるため、海綿に共生する放線菌を、高知県または鹿児島県から単離した。単離した放線菌の多様性を解析するため、16s rDNA 配列を分析したところ、代表的な海洋放線菌である *Micromonospora* 属と *Streptomyces* 属に加え、*Blastococcus* 属や *Actinomyces* 属、*Saccharomonospora* 属などの希少放線菌が含まれていることが分かった。次に、抗菌活性や抗真菌活性、放線菌二次代謝に対する誘導活性を検討した結果、分離した海綿共生放線菌の多くが、各種活性を示した。特に、放線菌二次代謝を誘導する活性を示す菌株や結核菌に対して生育阻害活性を示す菌株が得られたことから、これらの海綿共生微生物は新規生理活性物質、特に休眠化合物、の有望な探索源になりうることを示唆された。

<引用文献>

Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, Herawati E, Iguchi H, Nishitomi K, Uchida M, Nagamitsu T, Omura S, Ikeda H, and Nihira T. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:16410-5. 2011.

Miyamoto KT, Kitani S, Komatsu M, Ikeda H, and Nihira T. The autoregulator-receptor homologue Avar3 plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *Streptomyces*

avermittilis. Microbiology 157:2266-75. 2011.

Thao NB, Kitani S, Nitta H, Tomioka T, and Nihira T. Discovering potential *Streptomyces* hormone producers by using disruptants of essential biosynthetic genes as indicator strains. J Antibiot (Tokyo). 70:1004-8. 2017.

Aroonsri A, Kitani S, Hashimoto J, Kosone I, Izumikawa M, Komatsu M, Fujita N, Takahashi Y, Shin-ya K, Ikeda H, and Nihira T. Pleiotropic control of secondary metabolism and morphological development by KsbC, a butyrolactone-autoregulator receptor homologue in *Kitasatospora setae*. Appl Environ Microbiol. 78:8015-24. 2012.

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12件)

Thao NB, Kitani S, Shimma S, and Nihira T. Butenolides from *Streptomyces albus* J1074 act as external signals to stimulate avermectin production in *Streptomyces avermectilis*. Appl Environ Microbiol. 84:e02791-17.2018. DOI: 10.1128/AEM.02791-17. 査読有り

Suroto DA, Kitani S, Arai M, Ikeda H, and Nihira T. Characterization of the biosynthetic gene cluster for cryptic phthoxazolin A in *Streptomyces avermectilis*. PLoS One. 13(1):e0190973. 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0190973. 査読有り

Pait IGU, Kitani S, Roslan FW, Ulanova D, Arai M, Ikeda H, and Nihira T. Discovery of a new diol-containing polyketide by heterologous expression of a silent biosynthetic gene cluster from *Streptomyces lavendulae* FRI-5. J Ind Microbiol Biotechnol. 45:77-87. 2018. DOI: 10.1007/s10295-017-1997-x. 査読有り

Kitani S, Ueguchi T, Igarashi Y, Leetanasaksakul K, Thamchaipenet A, and Nihira T. Rakicidin F, a new antibacterial cyclic depsipeptide from a marine sponge-derived *Streptomyces* sp. J Antibiot (Tokyo). 71:139-41. 2018. DOI: 10.1038/ja.2017.92. 査読有り

Suroto DA, Kitani S, Miyamoto KT, Sakihama Y, Arai M, Ikeda H, and Nihira T. Activation of cryptic phthoxazolin A production in *Streptomyces avermectilis* by the disruption of autoregulator-receptor homologue AvaR3. J Biosci Bioeng. 124:611-7. 2017. DOI:

10.1016/j.jbiosc.2017.06.014. 査読有り
Thao NB, Kitani S, Nitta H, Tomioka T, and Nihira T. Discovering potential *Streptomyces* hormone producers by using disruptants of essential biosynthetic genes as indicator strains. J Antibiot (Tokyo). 70:1004-8. 2017. DOI: 10.1038/ja.2017.85. 査読有り

Pait IGU, Kitani S, Kurniawan YN, Maeda A, Iwai T, Ikeda H, and Nihira T. Identification and characterization of *lbpA*, an indigoidine biosynthetic gene in the γ -butyrolactone signaling system of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. J Biosci Bioeng. 124:369-75. 2017. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.04.020. 査読有り

Sultan SP, Kitani S, Miyamoto KT, Iguchi H, Atago T, Ikeda H, and Nihira T. Characterization of AvaR1, a butenolide-autoregulator receptor for biosynthesis of a *Streptomyces* hormone in *Streptomyces avermectilis*. Appl Microbiol Biotechnol. 100:9581-91. 2016. DOI: 10.1007/s00253-016-7781-4. 査読有り

木谷 茂, 仁平卓也

「放線菌ホルモンによる二次代謝制御メカニズムと有用物質生産への応用」JSM Mycotoxins. 66:73-9. 2016. DOI: 10.2520/myco.66.73. 査読有り

木谷 茂, 仁平卓也

「放線菌に潜在する有用物質生産能力に魅せられて」生物工学会誌 94:387-9. 2016. https://www.sbj.or.jp/wp-content/uploads/file/sbj/9407/9407_tokushu-1_2.pdf. 査読なし

[学会発表](計14件)

上田祥平、他。

“Functional characterization of biosynthetic genes for kitasetaline, a γ -carboline alkaloid, and generation of new γ -carboline derivatives”
第18回国際放線菌学会、2017

木谷 茂

“Waking up cryptic secondary metabolism in actinomycetes for the discovery of new natural products”

日本学術振興会二国間交流事業オープンパートナーシップセミナー、2016

木谷 茂

“*Streptomyces* hormones control antibiotic production in actinomycetes”

2nd International Conference on Chemical Engineering, Food and Biotech, 2015

木谷 茂

“放線菌ホルモン制御系の改変による潜在的有用物質の顕在化”

日本マイコトキシン学会 第 77 回 学術講
演会 シンポジウム、2015

〔その他〕

大阪大学生物工学国際交流センター分子微
生物学研究室ホームページ

<http://www.nihiralab.sakura.ne.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木谷 茂 (Kitani, Shigeru)

大阪大学・生物工学国際交流センター・准
教授

研究者番号：10379117

(3) 連携研究者

荒井 雅吉 (ARAI, Masayoshi)

大阪大学・大学院薬学研究科・特任教授

研究者番号：80311231