

令和元年6月5日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07674

研究課題名(和文)放線菌汎用宿主における安定した物質生産のための遺伝子導入技術の開発

研究課題名(英文) Development of gene introduction system for stable production of secondary metabolites in engineered *Streptomyces* host

研究代表者

小松 護 (KOMATSU, MAMORU)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：40414057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌 *Streptomyces avermitilis* の大規模染色体欠失体を宿主とした異種微生物由来の二次代謝産物生産における、安定的な二次代謝産物生産系の開発を目的とした。本研究において、巨大な二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの効率的な導入法を開発した。また、導入した遺伝子群の細胞内における安定的保持のための実験手法の開発を行うと共に、多重遺伝子導入系の確立ならびに多重遺伝子導入によるコンビナトリアル生合成系を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

S. avermitilis は認定宿主として登録されており、大腸菌などと同様に取り扱うことが可能である。本菌は現在も抗生物質生産のために利用されており、その様な産業微生物を二次代謝産物生産の為に包括的な異種発現宿主として利用する試みは成されていない。遺伝的背景および遺伝子導入系が整備されていない生産菌の保有する二次代謝産物について、本研究によって得られる成果により、その生合成遺伝子群を汎用宿主に導入すれば、生産過程の包括的な解析の展開が可能となる。さらに、これまで遺伝的な不安定性あるいは分子遺伝学的な基盤の整備が乏しくて解析が断念された多くの二次代謝産物についても適用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a stable secondary metabolite production system in heterologous expression of exogenous gene cluster for secondary metabolite biosynthesis derived from heterogenous microorganisms using an engineered *Streptomyces avermitilis* as a host. In this study, we developed an efficient method to introduce a large gene cluster for secondary metabolite biosynthesis. In addition, we developed an experimental method for stable retention of the introduced gene cluster in cells, a multiple gene introduction system and a combinatorial biosynthesis by the multiple gene introduction system.

研究分野：応用微生物学

キーワード：放線菌 物質生産 二次代謝産物 接合伝達 線状プラスミド 生合成遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

北里研究所の大村(2015年度ノーベル医学生理学賞受賞)らによって発見された、放線菌 *Streptomyces avermitilis* は抗寄生虫・抗昆虫活性を有する avermectin の工業生産菌である。ゲノム解析の結果、他の細菌と比較しても、ATP や NAD(P)H 等のエネルギーや補酵素、また、ポリケチド化合物の前駆体となる malonyl-CoA 或いは

methylmalonyl-CoA の生成に關与する酵素群に多くのパラログが存在していた (*Nat. Biotechnol.* 21:526, 2003)。このことから、*S. avermitilis* は、医薬品素材の供給源として本質的な機能を有しており、二次代謝に關わる前駆物質の供給をはじめとする代謝調節機構が、工場生産に耐え得る十分な機能を備えている微生物であると理解できる。我々は、この優れた特徴を、単に avermectin の工業生産に利用するだけではなく、異種微生物由来の有用物質の生産に応用することを計画した。しかしながら、本菌へ異種二次代謝産物生合成遺伝子群を導入した場合、本菌が生産する二次代謝産物も同時に生成されるため、目的物質の分離と精製が困難である。また、同じ前駆体を利用する生産物の場合、前駆体の競合による生産量の低下が生じることが予想される。したがって、本菌の生育ならびに二次代謝に必須な代謝や調節などの重要な関連遺伝子群を残し、異種微生物由来の二次代謝産物の生産には不要な自身の主生産物を含む二次代謝生合成遺伝子群を取り除くことが肝要である。これまでに、*S. avermitilis* の物質生産能力を最大限に引き出すため、大規模なゲノム再構成により、*S. avermitilis* の染色体を野生株の約 80%程度まで縮小した変異体(SUKA)を作製した(Fig.1)。種々の二次代謝産物の生合成遺伝子群導入による異種発現解析の結果、SUKA 株がそれら化合物を導入した遺伝子の供給元の微生物を超える高い生産性を有していることを報告した。

多くの *Streptomyces* 属は大腸菌で調製した DNA (Dam Dcm HsdM によりメチル化修飾されている)を制限する。I 型ポリケチド合成酵素や非リボソーム型ペプチド合成酵素によって骨格を生成するポリケチドやペプチド化合物の生合成遺伝子群は全長 50 kb 以上にもおよび 100 kb を越すものも少なくない。これらの巨大生合成遺伝子群の異種発現を達成するためには汎用宿主に効率的かつ欠失が生じない遺伝子導

入方法が必須であり、さらに導入した生合成遺伝子群が安定的に保持されることが重要である。申請者はこれまで、*S. avermitilis* 由来の伝達性線状プラスミド(SAP1: 94,287 bp)をベクターとして、二次代謝産物生合成遺伝子群を *S. avermitilis* SUKA 株に導入する方法を開発した

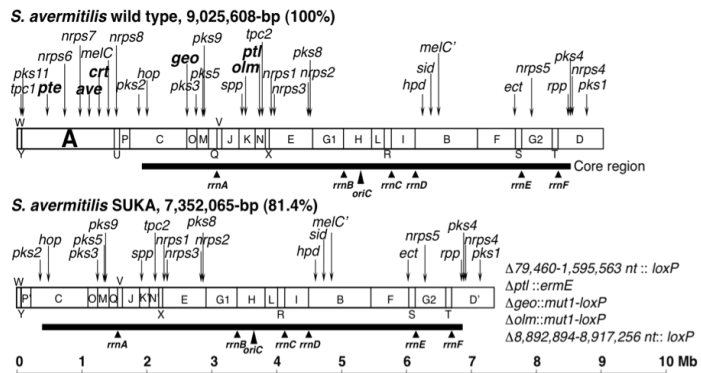


Fig.1. AseI-physical map and distribution of gene clusters for secondary metabolism on *S. avermitilis* and its large-deletion mutant SUKA17. *ave*, *olm*, *pte*, *pks1-7*: type-I polyketide compounds; *pks8-9* & *spp*: type-II polyketide compounds; *rpp*: type-III polyketide compound; *nrps1-8*: peptide compounds; *crt*, *geo*, *ptl*, *shc* & *tpc*: terpene compounds; *hpd*, *melC*, *spp*, *ect*, *sid*: pigments, siderophore and other. *oriC*, replication origin; *rnmA-F*; rRNA operons.

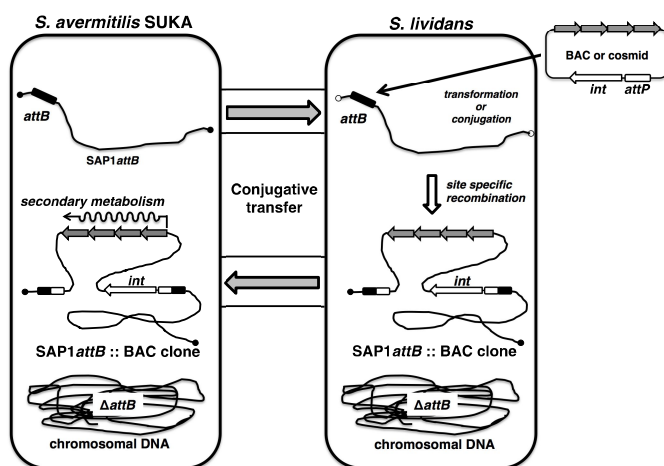


Fig. 2. transfer of SAP1 vector carrying gene cluster for secondary metabolite biosynthesis by mating

(Fig.2)。 *S. lividans* 1326 は一般の *Streptomyces* の菌株と比べ Dam Dcm で修飾された DNA の制限が低いいため、通常の大腸菌で調製した 100 kb 以上の BAC クローンを導入することが可能である。我々は、異なる 5 種の溶原化ファージ(φC31、R4、TG1、φK38-1、φBT1)の部位特異的組み込み配列(*attB*)をタンデムに導入した SAP1 ベクターを構築し、*S. lividans* へ導入した。一方、対応する溶原化因子(*attP-int*)を保持する組込型の BAC クローンを形質転換法により導入し、部位特異的組換えにより SAP1 上へ組込んだ後、得られた *S. lividans* 形質転換体を供与菌として *S. avermitilis* SUKA 株へ接合伝達させる系を構築した。その結果、得られた接合体からは BAC クローンが導入された SAP1 ベクターを検出するとともに、接合体による二次代謝産物の生産を観察するに至っている。現在では、構築した SAP1 ベクターを利用して、I 型ポリケチド合成酵素遺伝子を含む生合成遺伝子群全体を保持する 200 kb を越す BAC クローンについても SUKA 株へ効率よく導入することが可能となった。

2 . 研究の目的

SAP1 は *S. avermitilis* SUKA 株細胞内では比較的安定であるが、 10^{-3} 程度の頻度で脱落する。二次代謝産物生合成遺伝子をより安定に保持させるためには、染色体上へ導入する事が最も理想的であり、安定した物質生産にとって極めて重要である。バクテリオファージの溶原化はファージ染色体上の *attP* と宿主染色体上の *attB* の部位特異的組換えによって生じる。この反応はファージ染色体にコードされる integrase (Int) によって触媒される。一方、ファージ染色体上の *xis* 遺伝子がコードする excisionase (Xis) は宿主染色体からファージ染色体を切り出す反応を触媒する。つまり、Xis を利用すれば、SAP1 ベクター上の二次代謝産物生合成遺伝子群を保持する組込型ベクターが切り出され、再度 Int の触媒により、宿主内在性の *attB* を介して染色体上へ転移できると推測した。もし、SAP1 ベクター上から、染色体上へ移動可能であれば、導入した遺伝子群の安定性が増すだけでなく、更に異なる二次代謝産物生合成遺伝子を、SAP1 を利用して再度導入する事が可能である。例えば、I 型ポリケチド合成酵素によって合成される大環状ラクトン構造に必要な生合成遺伝子領域と、他の生合成遺伝子由来の配糖化などそれを修飾する可能性のある生合成遺伝子領域を同時に導入する事によって、非天然型の化合物を作り出すことが可能となる。さらには、SUKA 株の高い物質生産性を利用することによって、効率良く生産させることができると考えられる。本研究においては、Xis を利用した SAP1 ベクター上から染色体上への導入した二次代謝産物生合成遺伝子群の転移を試みる。さらに、複数の異なる生合成遺伝子の導入によるコンビナトリアル生合成によって、新規誘導体創製のための技術基盤の構築を行う。

3 . 研究の方法

Xis 発現ベクターの構築

Smith らは、φC31 ゲノム上の *xis* 遺伝子ホモログ(*gp3*)を同定し、Gp3 が宿主染色体上からの φC31 ゲノムの切り出しに關与することを報告した(*Mol. Microbiol.* 80:1450, 2011)。我々は、φC31 ならびに φBT の全ゲノム配列が Smith らによって既に決定されていたことから、約 40kb に及ぶ、TG1 ならびに φK38-1 の全ゲノム配列を決定し、Smith らの報告を基に、TG1、φK38-1 ならびに φBT1 ゲノム上から、*xis* ホモログを同定した(なお、R4 については、組換え効率が極めて低いいため、本研究では除外し解析を行わない)。また、*S. avermitilis* における Xis タンパクの発現を考慮し、*S. avermitilis* のコドン使用頻度に従い、φC31、TG1、φK38-1 ならびに φBT1 の *xis* 遺伝子の人工遺伝子を設計し、ユーロフィンジェネティクス株式会社に合成を依頼

した。合成した各 *xis* 遺伝子は構成的発現プロモーターである P_{ermE} の下流に配置した後、温度感受性の不安定性プラスミド (pGM160) に連結した。

Xis による SAP1 ベクター上から染色体上への二次代謝産物生合成遺伝子の転移の検証

oC31、TG1、oK38-1 ならびに oBT1 の各ファージ溶原化因子 (*int-attB*) を保持する 4 種の組込み型ベクターにそれぞれ lactacystine 生合成遺伝子 (各約 20 kb) をクローン化した後、構築した各組込み型ベクターを用いて SAP1 ベクターを保持する *S. lividans* をプロトプラスト形質転換し、SAP1 ベクター上に導入した。得られた *S. lividans* 形質転換体を供与菌として *S. avermitilis* SUKA 株に対し、接合により、lactacystine 生合成遺伝子を保持する SAP1 ベクターを導入した。得られた接合体に、構築した *xis* 発現ベクターを導入した。それら *xis* 発現ベクターを保持する形質転換体について、パルスフィールド電気泳動による全ゲノムの制限酵素消化パターン解析ならびにサザンハイブリダイゼーション解析を行った。

SAP1 ベクターを用いた異なる生合成遺伝子の同時導入の検討

SAP1 を保持している細胞に対して、SAP1 ベクターを導入する場合、接合効率が約千倍以上低下するため、一度、SAP1 を脱落させる必要がある。これまで、プラスミドの分配に参与する SAP1 上の *parA* 遺伝子の破壊により、SAP1 が簡単に脱落する事を確認している。*parA* の破壊には、CRISPR/Cas9 を利用する。CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術 (*Nature*, 495, 50, 2013) は、2 本鎖 DNA の目的領域を特異的に剪断するシステムであり、遺伝子編集のためのスタンダードとして生物種を問わず利用されている。2015 年に、Cobb らによって *Streptomyces* 属細菌において、CRISPR/Cas9 が利用できることが報告された (*ACS synth. biol.* 4:723, 2015)。Cobb らが開発した CRISPR/Cas9 発現プラスミド (pCRISPOmyces-2) を購入し、*parA* 領域の部位特異的剪断による不活化のため、*parA* の部分配列を有する gRNA を連結した後、*S. lividans* 細胞内に導入し、SAP1 の脱落について検討した。

我々は、*Streptomyces* 属細菌に近縁の *Kitasatospora setae* が生産するポリケチド化合物である bafilomycin B1 と *Streptomyces neyagawaensis* が生産する concanamycin の母核構造である大環状ラクトン構造が類似していることに注目し、bafilomycin B1 の母核構造である、bafilomycin A1 を *S. neyagawaensis* の培養液に添加することによって、bafilomycin A1 が配糖化されることを明らかにした。我々は、各生産菌より、bafilomycin ならびに concanamycin の全生合成遺伝子を含む、BAC クローンを取得している。これら生合成遺伝子を、SAP1 ベクターを用いて、*S. avermitilis* SUKA 株に導入した結果、各化合物が生産されることを確認している。また、各化合物の生合成は既に明らかとなっており、必要な部分領域のみを残すように、各 BAC クローンの最小化を行った。その後、bafilomycin A1 の生合成に必要な領域について SAP1 を用いて SUKA 株へ導入した。染色体上へ転移した株の SAP1 ベクターを脱落させた後、concanamycin 生合成における配糖化に参与する遺伝子を SAP1 によって導入し、bafilomycin A1 配糖化体を生産する SUKA 株の構築を行った。

4. 研究成果

放線菌 *Streptomyces avermitilis* の大規模欠失体 (SUKA) を宿主とした二次代謝産物の異種生産系において、100 kb を超える様な巨大な生合成遺伝子群の場合、接合伝達性の線状プラスミド SAP1 をベクター (SAP1.3; SAP1::*attB*_{oC31}-*attB*_{oR4}-*attB*_{TG1}-*attB*_{oK38-1}-*attB*_{oBT1}) として用いることで、比較的容易に導入できる。本研究では、導入した遺伝子群の安定的保持を目的として、SAP1.3 に導入した種々の二次代謝産物生合成遺伝子群を含むファージ由来の組込み型ベクターを染色体上へ移動することを試みた。我々は、溶原化ファージの宿主ゲノムからの切り出し

に關与する excisionase (Xis)を利用すれば、SAP1 ベクター上の組込み型ベクターが切り出され、SUKA 内在性の *attB* を介してベクター上にコードされる Integrase(Int)の触媒によって染色体上へ部位特異的に移動できると推測した。そこで、lactacystin 生合成遺伝子を含む 5 種 (ϕ C31, R4, TG1, ϕ K38-1, ϕ BT1)の組込み型ベクターを保持する SAP1.3 を SUKA に導入した後、各ファージから見出した *xis* を強発現した。得られた接合体について、パルスフィールド電気泳動による制限酵素消化パターンの解析ならびにサザン解析を行った結果、*xis* 遺伝子の導入の有無にかかわらず、内在性の *attB* を介して SAP1 ベクター上から染色体上へ部位特異的に転移していた。この事は、Int が逆反応活性を有しており、SAP1.3 上の組込型ベクターの切り出しに關与すること、また、切り出された組込み型ベクターが、再度 Int の触媒によって、部位特異的に SUKA の染色体上へ組込まれたと判断された。大腸菌のラムダファージに代表される、tyrosine integrase をモデルにした解析から、バクテリオファージの溶原化は integrase の触媒によってファージ染色体上の *attP* と宿主染色体上の *attB* の部位特異的組換えによって生じ、また、ファージ染色体上の *xis* 遺伝子がコードする excisionase (Xis)は Int との相互作用により、宿主染色体からファージ染色体を切り出す反応を触媒することが知られている。一方で、今回使用した 5 種のファージ(ϕ C31, R4, TG1, ϕ K38- 1, ϕ BT1)が有する integrase は、ラムダファージとは異なり、serine 型である。serine integrase を保持するファージにおいても、ラムダファージの知見と同様に、切り出しには Xis が關与することが ϕ C31 をモデルにした解析によって示されている。しかしながら、我々のこれまでの解析から、それら serine integrase が組込みと切り出しの両方の反応を触媒する可能性が強く示唆された。この事は基礎生物学的に新しい知見であり、非常に興味深い。すなわち、SAP1 ベクター上から染色体上への二次代謝産物生合成遺伝子群の移動は、それら serine integrase の活性によって、可逆的かつ自発的に進行することが示され、*xis* 遺伝子を強制発現する必要がないことが明らかとなった。

続いて、目的遺伝子を染色体上に移動した後の不要な SAP1 ベクターを効率良く脱落させる系の開発を試みた。これにより、SAP1 ベクターを用いた多重遺伝子導入が可能となり、SUKA 株を用いたコンビナトリアル生合成への応用が期待できる。そこで、CRISPR/Cas9 系を用いて、SAP1 の分配に關与する ParA 遺伝子を標的とした剪断によって、SAP1 ベクターを脱落させる系の開発を目指した。CRISPR/Cas9 発現ベクター(*ACS synth. biol.* 4:723, 2015)を用いて、*parA* の部分配列を有する gRNA を連結した後、SUKA 株に導入して発現させた。その結果、極めて低い頻度(1%以下)ではあったが、SAP1 ベクターの脱落が確認できた。しかしながら、さらに効率良く脱落させるため、Cre/*loxP*系による方法を再検討した。SAP1 ベクター上の *parA* を挟み込むように、2 つの *loxP* を導入した新たな SAP1 ベクター(SAP1.14)を構築した。SAP1.14 を保持する SUKA 株に Cre 発現ベクターを導入した結果、高い効率(20%以上)で SAP1.14 が脱落することを確認した。

我々は、*Streptomyces* 属細菌に近縁の *Kitasatospora setae* が生産するポリケチド化合物である bafilomycin B1 と *Streptomyces neyagawaensis* が生産する concanamycin の母核構造である大環状ラクトン構造が類似していることに注目し、bafilomycin B1 の母核構造である、bafilomycin A1 を *S. neyagawaensis* の培養液に添加することによって、bafilomycin A1 が配糖化されることを見出した。そこで我々は、各生産菌より、bafilomycin ならびに concanamycin の全生合成遺伝子を含む BAC クローンを取得し、これら生合成遺伝子を、SAP1 ベクターを用いて SUKA 株に同時導入した結果、bafilomycin が配糖化された、新規化合物が検出された。

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Distribution and functional analysis of the phosphopantetheinyl transferase superfamily in *Actinomycetales* microorganisms. Kim JH, Komatsu M, Shin-Ya K, Omura S, Ikeda H. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 26;115(26):6828-6833 (2018). doi: 10.1073/pnas.1800715115. 査読有り
2. Neothioviridamide, a Polythioamide Compound Produced by Heterologous Expression of a *Streptomyces* sp. Cryptic RiPP Biosynthetic Gene Cluster. Kawahara T, Izumikawa M, Kozono I, Hashimoto J, Kagaya N, Koiwai H, Komatsu M, Fujie M, Sato N, Ikeda H, Shin-Ya K. *J. Nat. Prod.* 23;81(2):264-269 (2018). doi: 10.1021/acs.jnatprod.7b00607. 査読有り
3. Characterization of bafilomycin biosynthesis in *Kitasatospora setae* KM-6054 and comparative analysis of gene clusters in *Actinomycetales* microorganisms. Nara A, Hashimoto T, Komatsu M, Nishiyama M, Kuzuyama T, Ikeda H. *J. Antibiot.* (Tokyo). 70(5):616-624 (2017). doi: 10.1038/ja.2017.33. 査読有り
4. Heterologous production of kasugamycin, an aminoglycoside antibiotic from *Streptomyces kasugaensis*, in *Streptomyces lividans* and *Rhodococcus erythropolis* L-88 by constitutive expression of the biosynthetic gene cluster. Kasuga K, Sasaki A, Matsuo T, Yamamoto C, Minato Y, Kuwahara N, Fujii C, Kobayashi M, Agematu H, Tamura T, Komatsu M, Ishikawa J, Ikeda H, Kojima I. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(10):4259-4268 (2017). doi: 10.1007/s00253-017-8189-5. 査読有り
5. tRNA-Dependent Aminoacylation of an Amino Sugar Intermediate in the Biosynthesis of a Streptothricin-Related Antibiotic. Maruyama C, Niikura H, Izumikawa M, Hashimoto J, Shin-Ya K, Komatsu M, Ikeda H, Kuroda M, Sekizuka T, Ishikawa J, Hamano Y. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:3640-3648 (2016). doi: 10.1128/AEM.00725-16.
6. Chemical diversity of labdane-type bicyclic diterpene biosynthesis in *Actinomycetales* microorganisms. Yamada Y, Komatsu M, Ikeda H. *J. Antibiot.* (Tokyo). 69:515-523 (2016). doi: 10.1038/ja.2015.147. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 小松護、池田治生 フェージ由来 integrase による excisinase 非依存的な切り出し反応 第 32 回(2017 年度) 日本放線菌学会大会 2017 年 9 月 7 日～8 日(長野県長野市) 一般講演
2. 小松護 放線菌ゲノム縮小株を宿主とした二次代謝産物生合成遺伝子群の異種発現 日本薬学会関東支部大会 (東京都文京区・東京大学大学院薬学研究科 山上会館 2016 年 9 月 17 日) 招待講演
3. 小松護 放線菌ゲノム縮小株を宿主とした二次代謝産物生合成遺伝子群の異種発現 第 15 回微生物研究会 (神奈川県藤沢市・日本大学生物資源科学部 湘南キャンパス 2016 年 11 月 5 日) 招待講演

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kitasato-u.ac.jp/lisci/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。