

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15469

研究課題名(和文)植物由来希少放線菌ゲノムからの新規生物活性物質探索

研究課題名(英文) Search for novel bioactive compounds from the genome of endophytic actinomycetes

研究代表者

稲橋 佑起 (Inahashi, Yuki)

北里大学・感染制御科学府・講師

研究者番号：70645522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：微生物資源として未利用であった植物由来希少放線菌から新規生物活性物質の取得を目的に、それらのゲノムから新規二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの探索を行った。Streptosporangium oxazolinicum K07-0460およびAcrocarpospora sp. K10-0603のゲノムから新規性が予想されたポリケチド合成酵素または非リボソームペプチド合成酵素等を含む二次代謝産物生合成遺伝子クラスターについてStreptomyces属放線菌で異種発現を行うことで、新規ベンゾキノン化合物、新規環状ペプチドおよび新規ヒドロキシピラン化合物の取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放線菌の二次代謝産物からはストレプトマシンやエパーメクチンなどの抗生物質が発見され、医薬品等の探索源として大きく寄与してきた。我々はこれまで多くの放線菌を植物から分離し、生物活性物質探索に利用してきた。近年、ゲノム解析技術の進歩により、そのゲノムにはまだ多くの二次代謝産物生合成遺伝子が眠っていることが明らかとなってきた。我々の保有する植物由来放線菌を最大限に活用するために、それらのゲノムから生合成遺伝子を探索し、その発現を試みた結果、新規化合物の取得に成功した。今後は、これらの化合物から医薬品のリードとなるような活性を見出していきたい。

研究成果の概要(英文)：Actinomycetes are attractive source for natural products. So far, we isolated endophytic actinomycetes and discovered some new species and novel compounds. However most of the isolates are untapped for bioresource, even if there are more potential in the genomes. In this study, biosynthetic gene clusters for new compounds were investigated from the genomes and expressed in heterologous host to search the products. In the result, new benzoquinone analog was discovered from type III Polyketide synthase (PKS) in Streptosporangium oxazolinicum K07-0460, and new tetrapeptides and new hydroxypyran analogs were discovered from non-ribosomal peptide synthetase (NPRS) and type I PKS, respectively in Acrocarpospora sp. K10-0603.

研究分野：微生物医薬品学

キーワード：植物由来放線菌 二次代謝産物 生合成 異種発現 ゲノムマイニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

微生物や植物は酵素反応を利用して多種多様な化合物を生産するため、天然物には有機合成では合成が難しい構造の化合物が多い。さらに、天然物は生物活性を有する化合物が多い点から、医薬品の探索源として有望である。グラム陽性菌である放線菌の二次代謝産物よりストレプトマイシンやエパーメクチン等の抗生物質が発見され、放線菌は生物活性物質の探索源として大きく寄与してきた。一般に放線菌は土壌に棲息するが、我々は微生物資源の拡大のために植物から放線菌の分離を試み、1000株以上の放線菌を取得してきた。得られた菌株の75%は希少放線菌 (*Streptomyces* 属以外の放線菌) であり、多くの新属や新種を提唱するに至った (Matsumoto A. et al. J. Antibiot. 2018, 70, 514-519.)。さらに、それら希少放線菌の培養液からアクチノアロライドやスポキサゾマイシン、トレハンジェリン等の新規生物活性物質を見出し (Inahashi Y. et al. Org. Lett. 2015, 17, 864-867. Inahashi Y. et al. J. Antibiot. 2011, 64, 303-307. Nakashima T. et al. J. Antibiot. 2013, 66, 311-317.) 植物由来希少放線菌の二次代謝産物は天然物資源として有用であることを示してきた。しかし、植物由来希少放線菌のうち、新規生物活性物質の取得にまで至った菌株はごく一部であり、多くの菌株は生育が遅く、二次代謝産物の生産性や生産量が低いため、培養液からの活性物質探索が困難な状態にあった。

近年、ゲノム解析技術の進歩により、放線菌はゲノムに5~30個以上の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを有することが明らかとなってきた (Nett M. et al. Nat. Prod. Rep. 2009, 26, 1362-1384.)。二次代謝産物の生産が困難な植物由来希少放線菌のゲノムにも多数の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在すると考えられ、その中に新たな生合成遺伝子クラスターも存在することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、微生物資源として未利用であった植物由来希少放線菌のゲノムから二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを探索し、遺伝子工学的手法によりその産物を生産させることで、新規二次代謝産物の取得を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ゲノムシーケンスからの生合成遺伝子クラスターの探索

放線菌ゲノムのドラフトシーケンスを antiSMASH (Blin K. et al. Nucleic Acid Res. 2019, 47, W81-W87) で解析することで、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの探索を行なった。

(2) 生合成関連遺伝子のクローニング

生合成関連遺伝子を PCR で増幅後、PCR 産物を放線菌用発現ベクターにクローニングした。作製したベクターをエレクトロポレーションにより *E. coli* ET12567/pUZ8002 に導入後、接合伝達により放線菌宿主へ導入することで遺伝子発現株を作製した。

(3) ゲノムのコスミドライブラリー作製および生合成遺伝子クラスターの取得

コスミドベクター pOJ446 の BamHI 消化物および放線菌ゲノム DNA の MboI 部分消化物をライゲーションさせ、LAMBDA INN (ニッポンジーン) を使用してパッケージングを行った後、*E. coli* XL1 Blue MRF' へ導入することでコスミドライブラリーを作製した。

生合成遺伝子クラスターの上流、中央、下流をそれぞれ特異的に増幅させるプライマーを用いて PCR を行うことで、目的的生合成遺伝子クラスターを含むコスミドをライブラリーより探索した。

(4) 培養および培養液の LC/MS 解析

生産培地に種培養液を 1% となるように植菌し、27°C で 6 日間振とう培養した。生産培養後、培養液に等量のエタノールを加え、菌体成分を抽出し、3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。得られた上清からエタノールを留去後、酢酸エチルで抽出し、酢酸エチル層を乾固させ、メタノールに溶解させた後、LC/UV/MS 解析を行った。

(5) 単離精製および構造解析

培養液を HP20、シリカゲルおよび ODS カラムクロマトグラフィーで粗精製し、分取 HPLC により単離した。得られた物質について高分解能質量分析、各種 NMR 解析によりその構造を決定した。

4. 研究成果

(1) 植物由来希少放線菌のゲノム解析

7科17属に属する植物由来希少放線菌18株のドラフトゲノムシーケンスを行い、得られた配列を antiSMASH で解析した結果、1菌株あたり7から30前後の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが推定された。そのうち、既知の遺伝子クラスターとの相同性が低く、新規性が予想されたクラスターについて異種発現を試みた結果、*Streptosporangium oxazolinicum* K07-0460 および *Acrocarpospora* sp. K10-0603 由来の3種類の生合成遺伝子クラスターから新規物質を取得したので、それらについて報告する。

(2) *Streptosporangium oxazolinicum* K07-0460 のゲノムからの新規物質探索

K07-0460 株のゲノムシーケンスを antiSMASH で解析し、III型ポリケチド合成酵素 (PKS) を含む生合成遺伝子クラスターを選択した。当該遺伝子クラスターをプラスミドにクローニングし、*Streptomyces* 属放線菌で異種発現を行なった。生産された物質を各種クロマトグラフィーで単離精製し、NMR および HR-MS 解析により構造解析することで新規ベンゾキノン類縁体と決定した。

(3) *Acrocarpospora* sp. K10-0603 のゲノムからの新規物質探索

K10-0603 株のゲノムシーケンスを antiSMASH で解析し、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) を含む遺伝子クラスター (603C7) および I 型 PKS を含む遺伝子クラスター (603C14) の2種類の生合成遺伝子クラスターを選択した。

遺伝子クラスター603C7にはNRPS、シトクロム P450 および SARP ファミリー転写制御因子の遺伝子が含まれており、そこからテトラペプチドが合成されると予想された。K10-0603 株のゲノムのコスミドライブラリーから PCR による探索で、603C7 を含むコスミドベクターを取得した。さらに、本クラスターの発現を活性化させる目的で、アクチベーターである SARP の発現ベクターを構築した。両ベクターを異種発現用宿主である *Streptomyces* 属放線菌に導入し、その培養液と空ベクター導入株の培養液を HPLC 解析により比較した結果、603C7 および SARP の共発現によって生産される化合物 K10-0603C7-A および B を見出した (図1)。本物質は遺伝子クラスター603C7のみを導入した株では確認されなかったことから、本遺伝子クラスターの発現は SARP ファミリー転写制御因子によって正に制御されていることが示唆された。共発現株を大量培養後、各種クロマトグラフィーを用いてそれらを精製した。単離した物質について HR-MS および各種 NMR 解析を行うことで、K10-0603C7-A および B は分子内にヘミアミナルを有する新規環状テトラペプチドと決定した。

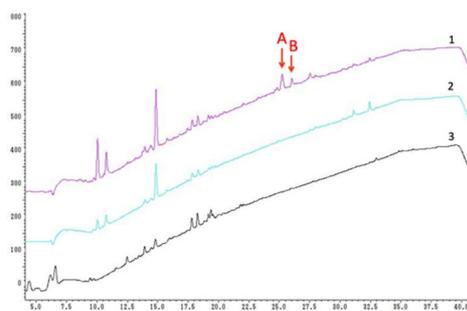


図1. 培養液抽出物の HPLC 解析結果

- 1: 遺伝子クラスター603C7 および SARP 導入株
- 2: 空ベクター導入株
- 3: 培地成分

遺伝子クラスター603C14にはI型PKS、LuxRファミリー転写制御因子およびオキシドレダクターゼ等の遺伝子が含まれていた。K10-0603株のコスミドライブラリーより当該遺伝子クラスターをPCRにより探索し、複数のコスミドから得られた遺伝子クラスターの断片を繋ぎ合わせることで、クラスターの全領域をクローニングした。さらに、当該遺伝子クラスターに含まれるLuxRファミリー転写制御因子の発現ベクターを別途作製した。両ベクターを異種発現用宿主である *Streptomyces* 属放線菌に導入し、その培養液を HPLC 解析することで、603C14 および LuxR の共発現によって生産される化合物 K10-0603C14-A を見出した。本物質を各種カラムクロマトグラフィーにより単離精製し、NMR および HR-MS 解析を行うことでその構造をヒドロキシピランに脂肪酸側鎖と糖が結合した新規物質と決定した。

今後は取得した物質の量上げを行い、生物活性を見出したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koomsiri Wilaiwan, Inahashi Yuki, Leetanasaksakul Kantinan, Shiomi Kazuro, Takahashi Yoko, Omura Satoshi, Samborsky Markiyan, Leadlay Peter F., Wattana-Amorn Pakorn, Thamchaipenet Arinthip, Nakashima Takuji	4. 巻 82
2. 論文標題 Sarpeptins A and B, Lipopeptides Produced by Streptomyces sp. K0-7888 Overexpressing a Specific SARP Regulator	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2144 ~ 2151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.9b00074	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Intra Bungonsiri, Euanorasetr Jirayut, Take Akira, Inahashi Yuki, Mori Mihoko, Panbangred Watanalai, Matsumoto Atsuko	4. 巻 69
2. 論文標題 Saccharopolyspora rhizosphaerae sp. nov., an actinomycete isolated from rhizosphere soil in Thailand	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1299 ~ 1305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.003307	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mingma Ratchanee, Inahashi Yuki, Matsumoto Atsuko, Takahashi Yoko, Duangmal Kannika	4. 巻 73
2. 論文標題 Amycolatopsis pithecelloba sp. nov., a novel actinomycete isolated from roots of Pithecellobium dulce in Thailand	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 230 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-019-0271-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muangham Supattra, Lipun Kenika, Matsumoto Atsuko, Inahashi Yuki, Duangmal Kannika	4. 巻 72
2. 論文標題 Quadrisphaera oryzae sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from leaves of rice plant (<i>Oryza sativa</i> L.)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 93 ~ 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-018-0112-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Rachniyom Hathairat, Matsumoto Atsuko, Inahashi Yuki, Take Akira, Takahashi Yoko, Thamchaipenet Arinthip	4. 巻 68
2. 論文標題 Actinomadura barringtoniae sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of Barringtonia acutangula (L.) Gaertn.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 1584 ~ 1590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.002714	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 稲橋佑起, 森下結衣, 木村徹, 須賀拓弥, 高橋洋子, 大村智, 中島琢自
2. 発表標題 植物由来放線菌Acrocarpospora sp. K10-0603のゲノムからの新規物質探索
3. 学会等名 第11回北里化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田祐輝, 稲橋佑起, 武晃, 池田翔一, 大村智, 松本厚子
2. 発表標題 植物の根より分離されたStreptosporangiaceae科に属するK14-0274株の分類研究
3. 学会等名 第34回日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲橋 佑起, Wilaiwan Koomsiri, Kantinan Leetanasaksakul, 塩見 和朗, 高橋 洋子, 大村 智, Markiyan Samborskyy, Peter F. Leadlay, Pakorn Wattana-Amorn, Arinthip Thamchaipenet, 中島 琢自
2. 発表標題 Streptomyces sp. KO-7888のSARP family regulator発現株が生産する新規物質Sarpeptinについて
3. 学会等名 第34回日本放線菌学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲橋佑起
2. 発表標題 Novel drug discovery under JSPS-NRCT Programs between Kitasato Univ. and Kasetsart Univ.
3. 学会等名 Microbial Natural Products: Discovery of Novel Compounds and Biosynthetic Pathways (JSPS-NRCT symposium) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----