

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14349

研究課題名（和文）200 kbを越す超巨大生合成遺伝子クラスターを利用した化合物生産法の確立

研究課題名（英文）Development of a heterologous expression method for exploitation of large biosynthetic gene clusters over 200 kb.

研究代表者

橋本 拓哉（Hashimoto, Takuya）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：10783714

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：これまでに例のない、微生物由来の200 kbを超える遺伝子クラスターの異種発現による化合物生産が可能か検証した。対象としてMicromonospora chalcea AK-AN57 に由来するquinolidomicinA1の遺伝子クラスター（215 kb）を選んだ。まず細菌人工染色体を用いて215 kbの遺伝子全長を取得した。次にクラスター内の正の転写因子と遺伝子クラスターを共に異種発現宿主で発現させることでquinolidomicinA1の生産を達成した。これは200 kb を超える遺伝子クラスターを利用した異種発現による化合物生産の初めての例である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで生合成遺伝子を利用した異種発現による化合物生産の例は限られており150 kb を超える例はほとんどない。本研究の結果、200 kbを超える生合成遺伝子クラスターを取得し転写因子と共発現することで生合成経路の異種宿主内での再構築に成功した。200 kb を超える遺伝子クラスターを利用して化合物生産を達成した初めての例である。本研究と同様の手法を利用することで、非リボソームペプチドやポリケチドの生合成に関わる巨大生合成遺伝子クラスターを利用した有用物質の探索や生産につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Production of secondary metabolites using biosynthetic gene clusters over 200 kb had not been reported previously. Establishment of a method for heterologous expression of biosynthetic gene cluster over 200 kb will enable us to exploit biosynthetic gene clusters without limitation of size. To this end, we demonstrated heterologous expression of the biosynthetic gene cluster of quinolidomicin A1 derived from Micromonospora chalcea AK-AN57, which is the largest macrolide from terrestrial origins. Its biosynthetic gene cluster spanning 215 kb was cloned and co-expressed with two positive transcriptional regulators in Streptomyces lividans TK23 redDX. As a result, production of quinolidomicinA1 in the heterologous host was accomplished. This is the first example of the heterologous expression of the biosynthetic gene cluster over 200 kb.

研究分野：生物有機化学

キーワード：二次代謝 放線菌 ポリケチド 大環状マクロライド 異種発現 細菌人工染色体（BAC） 生合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Avermectin、erythromycin および rapamycin など、臨床薬として知られる大環状ポリケタイドは多くの不斉炭素を持ち、有機合成による全合成は極めて困難なことが知られている。上記の臨床薬の供給はすべて微生物による発酵生産によって供給されている。

複雑な構造にもかかわらず、合成によって臨床薬が供給されている例としてクロイソカイメンに由来する天然物 halichondrin B と、その構造を基に開発された抗がん剤 HALAVEN について述べる。Halichondrin B は分子量 1,111 の巨大なポリケタイド系化合物である。その真の生産者はカイメン中に存在する培養困難な共生微生物とされているが、その生産菌は未同定である。Halichondrin B の構造を基に開発された乳がんの治療薬 HALAVEN は、その複雑な骨格と多数の不斉点を持つため、60 工程以上・2 年間に要する合成によって臨床薬として供給されている。

近年、微生物解析技術、配列解読技術の向上により培養困難な微生物の DNA 配列も取得可能になりつつある。例えばカイメン由来の強力なプロテアーゼ阻害剤 calyculin について、真の生産者である共生微生物とその生合成遺伝子が同定されている¹。このような背景から、将来的には難培養微生物由来の化合物も、遺伝子組換え微生物により物質生産することが期待できる。

Halichondrin B の構造からその生合成遺伝子クラスターのサイズは、およそ 200 kb を超える程度と見積られる。これまで 200 kb を超える巨大な生合成遺伝子クラスターを利用して化合物生産を行った例の報告はない。そのため、200 kb を超える巨大な生合成遺伝子クラスターを用いた異種発現の実例を示すことは、将来の遺伝子を利用した化合物生産につながる重要な知見となる。そこで本研究では 200 kb を超える生合成遺伝子によって生産されるマクロライド化合物、quinolidomicin A₁ をモデルに 200 kb を超える生合成遺伝子を利用した化合物生産の可否について検討した。

2. 研究の目的

上述した背景を踏まえ、本研究では *Micromonospora chalcea* AK-AN57、および *Micromonospora* sp. JY16 株が生産する quinolidomicin A₁² をモデル化合物として生合成遺伝子クラスターのクローニング、取得した生合成遺伝子クラスターを利用した化合物生産の実施、検討を行った。Quinolidomicin A₁ は陸生微生物に由来する化合物の中で最大の 60 員環マクロライド構造を持つ。その分子量は 1,530 と halichondrin B を上回り、推定生合成遺伝子クラスターのサイズは 200 kb 以上と予想できた。本遺伝子クラスターのクローニングと異種発現を達成し、遺伝子組換えによる化合物生産の実証を目指した。

3. 研究の方法

研究開始時点で AK-AN57 株のドラフトゲノムシーケンスを取得していた。詳細なアノテーション解析によって、quinolidomicin A₁ 推定生合成遺伝子クラスターの領域を絞り込んだ。

次に本遺伝子クラスター領域のクローニングを検討した。染色体組み込みサイトが付加した細菌人工染色体 (BAC) vector、pKU518³ を利用し、*Micromonospora chalcea* AK-AN57 のゲノム DNA ライブラリーを構築した。インサート DNA は BamHI による部分消化によって得られた DNA 断片のうち 250 kb 前後の DNA 断片を精製して用いた。生合成遺伝子クラスター領域の上流配列と下流配列を増幅させるプライマーオリゴのペアを利用した PCR によって、目的の遺伝子クラスター領域を含む複数の BAC クローンを取得した。取得クローンを宿主放線菌 *Streptomyces lividans* TK23ΔredDX 株および *Streptomyces avermitilis* SUKA32 株に導入し生産を検討した。さらに BAC クローン単独の導入で化合物が生産されない場合に備えて、生合成遺伝子クラスター内にコードされている 2 つの転写因子、*qnmRI*、*qnmRII* について、*Streptomyces* 宿主で機能するプロモーター *sav2794p*⁴ を利用して宿主内で共発現させた。各形質転換体の代謝物解析を行い化合物の生産を確認した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子クラスター領域の解析による生合成経路の推定

Quinolidomicin A₁ の生合成遺伝子クラスター領域には 44 の遺伝子がコードされていることが配列解析の結果から明らかとなった。44 の遺伝子の中には、骨格形成を担う 13 のポリケタイド合成酵素 (PKS) (*qnmA1-A13*)、化合物の排出に関与する 4 つのトランスポーター遺伝子 (*qnmK*, *L*, *T*, *U*)、PKS の翻訳後修飾であるホスホパンテチニル基転移酵素遺伝子 (*qnmP*)、骨格形成後の化合物の修飾反応を担うモノオキシゲナーゼ遺伝子 (*qnmG*) とメチル基転移酵素遺伝子 (*qnmH*) がコードされていた。さらに rifamycin 生合成経路で開始基質となる AHBA の生合成遺伝子群と相同性を示す 6 つの遺伝子 (*qnmS2-S7*) がクラスター内に存在した。これらの遺伝子は rifamycin 生合成における開始基質の生合成を担う。そこで quinolidomicin A₁ 生合成でもこれら 6 つの遺伝子は開始基質生合成に関与し、発色団のベンゾキノン構造の形成を担っていることが示唆された。さらに遺伝子クラスター内で正の転写調節因子として機能する Large ATP-binding *luxR* type regulator と相同性を示す 2 つの遺伝子 (*qnmRI*, *RII*) も見出された。遺伝子クラスター内に存在する遺伝子で、機能未知遺伝子としてアノテーションされる (*qnmC*, *D*, *E*, *F*, *M*, *V*, *W*)、非リボソーム型ペプチド合成酵素と相同な 2 つの遺伝子 (*qnmB1*, *B2*) も見出された。これらの遺伝子の機能は今のところ明らかになっていない。以上の解析か

ら quinolidomicin A₁ の生合成遺伝子クラスター領域として約 215 kb の領域を同定した。

(2) BAC を利用した遺伝子クラスター領域の取得と異種放線菌での発現

配列解析から同定した 215 kb の領域を取得するために、人工染色体(BAC)vector、pKU518 を利用して *Micromonospora chalcea* AK-AN57 のゲノム DNA ライブラリーを構築した。本研究課題開始以前にも検討しており、インサートサイズとして最大 220 kb までの DNA を含む DNA ライブラリーを構築したが、遺伝子クラスター全長の取得に至らなかった。そこで十分なインサートサイズの DNA ライブラリーの構築のため、250 kb 前後の DNA 断片を利用して DNA ライブラリーの構築を行った。PCR による選抜を経てクラスター領域全長を含む BAC クローン pKU518quiP9-L5 を取得した。本 BAC クローンを宿主放線菌である *Streptomyces lividans* TK23 *redDX* 株および、*S. avermitilis* SUKA32 株へと導入し、それぞれの培養抽出物を分析したが、化合物の生産は確認できなかった。

(3) 転写因子を利用した遺伝子クラスターの発現促進

化合物生産が見られなかったため、遺伝子クラスターの解析結果について再度精査した。クラスター内に存在する 2 つの正の転写因子 *qnmRI*, *RII* に着目した。*sav2794p* の制御下で *qnmRI*, *RII* を遺伝子クラスターと共発現させた。その結果、確かに quinolidomicin A₁ の標品と一致するピークを確認できた。このことから quinolidomicin A₁ の異種発現に成功した。BAC の単独導入で化合物を生産しなかった理由はクラスター内の転写因子 *qnmRI*, *RII* のプロモーターが *Streptomyces* 属細菌内で機能しないためと考えられる。宿主で機能するプロモーターを利用して転写因子を発現させる手法は、他の化合物の異種発現にも適用できるだろう。本研究は 200 kb を超える巨大な生合成遺伝子クラスターを利用して化合物生産を行った初めての例である。

(4) QuinolidomicinA₁ の構造訂正

LC/MS による解析で quinolidomicin A₁ のピークは元の生産菌 AK-AN57 株、JY16 株の双方の生産する quinolidomicin A₁ の値と確かに一致した。しかし、その推定組成式 C₈₃H₁₃₃NO₂₂S は quinolidomicin A₁ の文献値 C₈₃H₁₃₂O₂₃S と不一致だった²。即ち、quinolidomicin A₁ の提唱構造に誤りがあることが示唆された。組成式の差分と、NMR の化学シフトの文献値から、提唱構造の 1 つの水酸基がアミノ基に置換した構造が真の構造と推定した。生合成経路を考慮し、置換している水酸基は 70 位と推定した。そこで quinolidomicin A₁ について、¹H-¹⁵N HMBC 測定を行った。その結果、71 位のプロトンから ¹H-¹⁵N の相関ピークが検出された。この結果から quinolidomicin A₁ は報告された構造の発色団の 70 位の水酸基をアミノ基に置き換えた訂正構造を提示した。

(5) 総括

以上の結果から 200 kb を超える生合成遺伝子を利用して、quinolidomicin A₁ の生合成遺伝子クラスターの取得および異種発現に成功した。*Streptomyces* 属細菌で機能するプロモーター制御下で転写因子を発現させることで異属に由来する二次代謝生合成遺伝子クラスターを発現できた。また quinolidomicin A₁ の訂正構造について提示した。巨大海洋ポリエーテルのような特殊な例を除き、典型的な二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターはおよそ 200 kb 以内に収まることが多い。そのため、原理的にほぼ全ての遺伝子のクローニングが取得可能と言える。これを基盤として巨大生合成遺伝子クラスターを利用した有用物質の探索や生産、遺伝子改変による化合物の構造改変へつなげることが期待される。

<引用文献>

1. Wakimoto, T., *et al.*, Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 648-55.
2. Hayakawa, Y., *et al.*, Structure of a novel 60-membered macrolide, quinolidomicin A₁. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 3014-5.
3. Kim, J., *et al.*, Distribution and functional analysis of the phosphopantetheinyl transferase superfamily in *Actinomycetales* microorganisms. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* **2018**, 115, 6828-33.
4. Amagai, K., *et al.*, Identification of a gene cluster for telomestatin biosynthesis and heterologous expression using a specific promoter in a clean host. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hashimoto Takuya, Hashimoto Junko, Kozone Ikuko, Amagai Keita, Kawahara Teppei, Takahashi Shunji, Ikeda Haruo, Shin-ya Kazuo	4. 巻 20
2. 論文標題 Biosynthesis of Quinolidomycin, the Largest Known Macrolide of Terrestrial Origin: Identification and Heterologous Expression of a Biosynthetic Gene Cluster over 200 kb	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 7996 ~ 7999
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.8b03570	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hashimoto Takuya, Amagai Keita, Kawahara Teppei, Hashimoto Junko, Kozone Ikuko, Takahashi Shunji, Ikeda Haruo, Shin-ya Kazuo
2. 発表標題 Biosynthesis of quinolidomycin: Identification and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster over 200 kb
3. 学会等名 3rd European Conference on Natural Products (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本 拓哉、橋本 絢子、小曾根 郁子、酒井 紀子、高橋 俊二、池田 治生、新家 一男
2. 発表標題 BACを利用した200 kb を超えるquinolidomycin生合成遺伝子クラスターの異種発現
3. 学会等名 日本農芸化学会 2020 大会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----