

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05806

研究課題名（和文）放線菌プロモーターのリソースライブラリーの構築

研究課題名（英文）Construction of a resource library of actinomycete promoters

研究代表者

石川 淳（Jun, Ishikawa）

国立感染症研究所・品質管理研究センター・主任研究官

研究者番号：40202957

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：課題番号26430201で得た高品質なTSS（Transcriptional Start Site）を精査し、プロモーター候補配列が位置すると考えられる3,220本のTSSの上流配列を得て、それらの配列中の6-mer（4,096通り）の分布を探索した結果、88個の6-merが見いだされた。次に、各6-mer毎の出現位置と出現回数を解析した結果、TSSの上流の-12および-40周辺に高頻度で出現する6-mer（プロモーターに特徴的な配列）を見出し、-12周辺に出現する6-merと-40周辺に出現する6-merの両方を含む上流配列を探索した結果、31本のプロモーター候補配列を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多剤耐性菌の問題の深刻化など、新たな抗生物質の登場が切望されているが、既存抗生物質の誘導体ではない真に新しい抗生物質を開発するために、ゲノム情報を用いた開発が行われている。しかしながら、その道具立ては十分とは言えず、さらに、放線菌のプロモーターに関する網羅的な研究は数例しかないため、遺伝子発現を自在に操作し得る多様なプロモーターを含むリソースの提供は、抗生物質開発などの放線菌ゲノム工学ばかりでなく、放線菌の学術的理解に資すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：After careful examination of the high-quality Transcriptional Start Site (TSS) obtained in KAKENHI No. 26430201, 3,220 upstream sequences of TSSs where candidate promoter sequences were obtained. We explored the distribution of 6-mer in those sequences, and found 88 6-mers were found. Next, as a result of analyzing the position and number of occurrences of each 6-mer, we found 6-mer (sequences characteristic of promoters) that occur at high frequency around -12 and -40 nucleotides upstream of TSS. By searching upstream sequences containing both 6-mer that appear around -12 and -40 nucleotides, 31 candidate promoter sequences were found.

研究分野：微生物ゲノム

キーワード：放線菌 プロモーター

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年はワクチンによる病原菌や薬剤耐性菌の制圧の試みも盛んに行われているが、その理由のひとつには、新規な抗生物質の発見や開発に要する多大な時間的、経済的コストがある。実際に、既存品の類縁体や誘導体を除くと 1960 年代以降に上市された新規な抗生物質は、ムピロシン、リネゾリドおよびダプトマイシンの 3 つしかない [文献 1]。しかしながら、近年のゲノム科学の急速な進展により抗生物質開発の効率は大きく変わりつつある。

現在臨床で用いられている抗生物質、抗がん剤、免疫抑制剤などの大半は放線菌が生産する二次代謝産物がもとなっており、申請者は、世界に先駆けて数々の放線菌のゲノム解析を行ってきた [文献 2-5]。その結果、ノーベル賞受賞菌であるエバメクチンを生産する *Streptomyces avermitilis* は、エバメクチン以外にも 31 個（合計 32 個）の二次代謝産物を生産するであろうことを明らかにし、それらのいくつかについては実際に生産物を特定した。同様の結果はストレプトマイシン生産菌 (*Streptomyces griseus*) などの他の放線菌ゲノムからも得られたことから [文献 4]、我々がこれまでに認識していた放線菌の二次代謝産物は、放線菌が本来持っている生産能力の 1 割ほどでしかないことが明らかとなった。すなわち、残りの 9 割には新規な抗生物質のもととなる物質が含まれることが期待され、抗生物質発見のプロセスは一昔前と異なる様相を呈してきている。

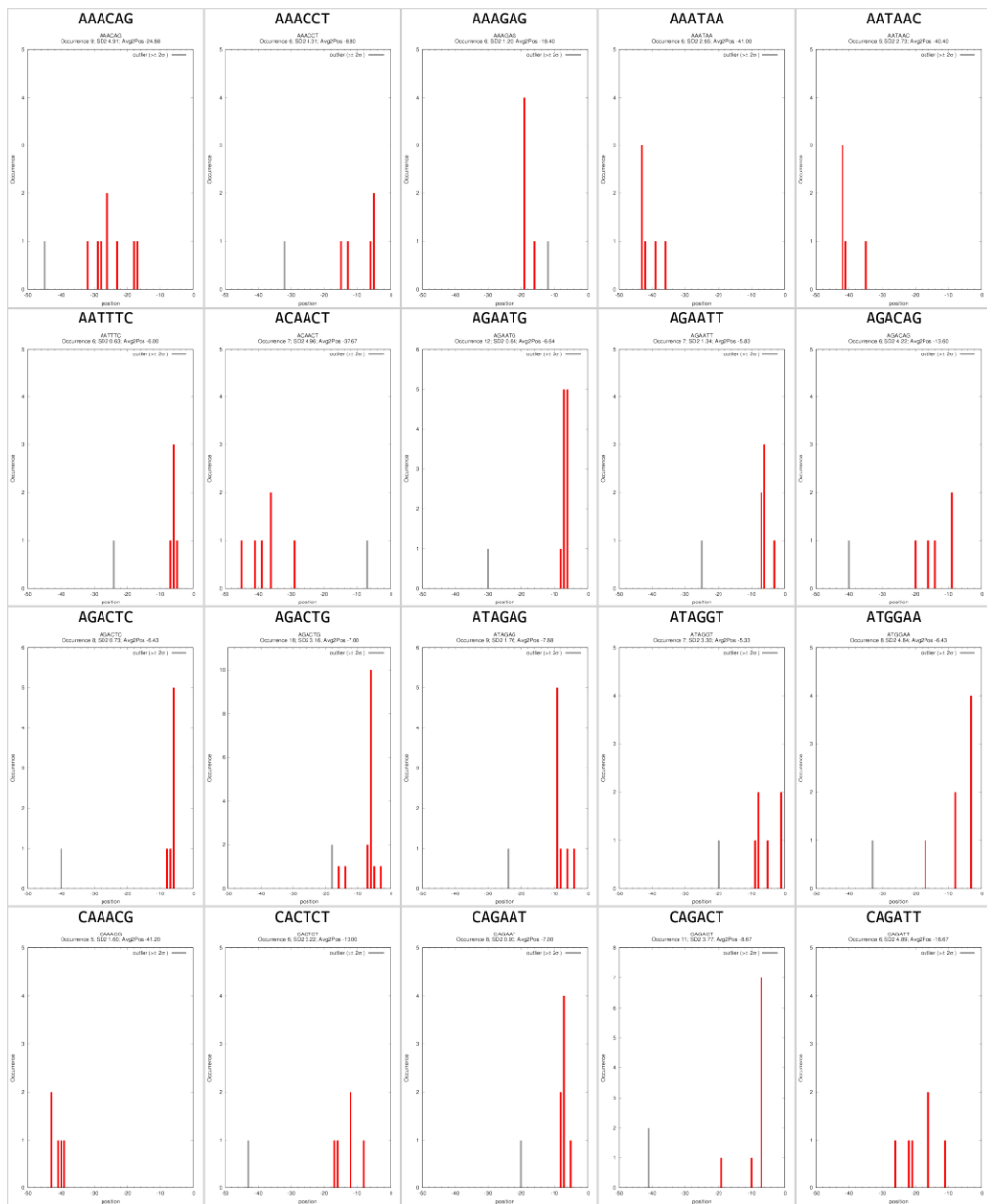
2. 研究の目的

上述のように、すでに放線菌ゲノム配列を出発点とし、ゲノム工学を駆使した汎用的な宿主の開発 [文献 6] も行われているが、その道具立ては未だ十分とは言えない。抗生物質の開発では、構造決定はもちろんのこと、作用機作の解析や臨床試験のためなどに十分な量を確保しなければならないが、培養条件を最適化しても生産量の上がらないケースも多い。抗生物質生合成遺伝子のネイティブなプロモーターは必ずしも大量生産に有効ではなく、高発現あるいは誘導型プロモーターへの換装が望まれるが、現状で放線菌の遺伝子操作に汎用的に用いることのできるプロモーターは発現の高低、誘導の有無にかかわらず数種しか知られておらず (*ermEp*, *xylEp*, *tipAp* など)、自在な制御にはほど遠いのが現状である。そこで申請者は、ストレプトマイシン生産放線菌 *S. griseus* ゲノムにおいて行った TSS-seq (Transcriptional Start Site sequencing) から見出した約 3,000 の転写開始部位 (TSS) 情報を用い、TSS の上流配列が実際にプロモーター活性を持つか否かを実験的に検証し、活性を持つものを収集した放線菌プロモーターのリソースライブラリーを構築し、抗生物質の開発など放線菌ゲノム工学に資することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究の前段となる研究 (課題番号: 26430201) で得た、約 3,000 の高品質な TSS を in-house プログラムにより精査し、プロモーター候補配列をが位置すると考えられる TSS の上流配列を情報学的手法により解析し、共通配列の探索や分類を行い、それらを含む DNA 配列をクローニングあるいは合成し、*in vivo* での機能性や強度の測定を行う。また、その過程で、バラエティーに富んだ配列を集め、プロモーターリソース (配列) ライブラリーとして広く提供する。

図 1. TSS 上流域における 6-mer の出現位置の分布. (一部のみ)
 横軸は出現位置 (5'末端)、縦軸は出現回数、グレーは外れ値。
 全データはウェブで公開。



4. 研究成果

4. 1 配列データ解析

本研究の前段となる研究 (課題番号: 26430201) で得た高品質な TSS を精査し、プロモーター候補配列が位置すると考えられる 3,220 本の TSS の上流配列を得た。次に、それらが有すると考えられる共通配列を探索するために、6-mer (4,096 通り) の分布を探索した結果、88 個の 6-mer が見いだされた (表 1)。次に、各 6-mer 毎の出現位置と出現回数を解析した結果 (図 1 および表 1)、-12 および -40 周辺に高頻度で出現する 6-mer のあることが明らかとなった (図 2)。それらの配列は、プロモーターに特徴的な配列であると考えられたため、-12 近辺に出現する 6-mer と -40 近辺に出現する 6-mer の両方を含む上流配列を探索した結果、31 本のプロモーター候補配列を見出した (図 3)。

表1. TSS 上流域における 6-mer の出現回数 (抜粋). 出現位置は 5'末端を示す。

6-mer	出現回数	平均出現位置	標準偏差
AGACTC	8	-11.3	0.88
AGAATG	12	-11.6	0.64
CAGAAT	8	-11.9	1.25
TAGCAT	11	-12.0	0.77
TAATTT	5	-12.0	0.63
TAACCT	10	-12.1	0.57
TAACGT	10	-12.1	1.91
TCTAGA	8	-12.1	3.64
TAGATT	5	-12.2	0.40
TAGGCT	37	-12.3	1.51
TATGAT	5	-12.4	0.49
CTATGG	6	-12.4	1.62
TACACT	6	-12.4	0.49
TAGAGT	15	-12.5	1.45
TAGGTT	9	-12.6	0.49
TACAGT	7	-12.6	0.73
AGACTG	18	-12.6	3.87
TAAAGT	6	-12.6	0.49
TAAGGT	19	-12.6	1.70
TACGCT	28	-12.8	3.30
GGTAAC	7	-13.0	2.38
TATCGT	9	-13.1	0.60
GTATGG	13	-13.3	3.09
TATGCT	12	-13.3	2.80
AAACCT	6	-13.4	4.32
CAGACT	11	-13.4	3.80
TACCCT	26	-13.5	3.42
TACGAT	17	-13.6	3.84
GAAATG	6	-37.6	2.58
GTTTGA	6	-39.0	4.40
TATGAG	6	-39.4	3.26
GTCAAT	7	-39.5	4.35
CTGTTT	7	-40.8	2.54
GCCATT	7	-40.9	1.36
ACAACCT	7	-42.0	4.97
TTTTCT	6	-43.2	0.98
CATTTT	6	-43.5	3.25
AATAAC	5	-45.4	2.73

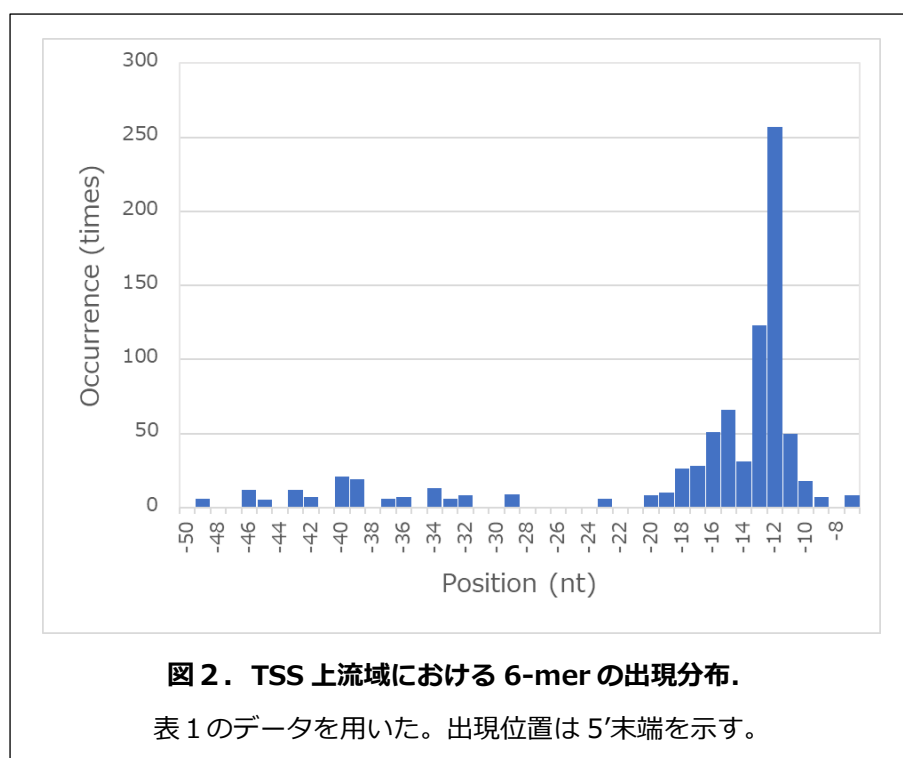


図2. TSS 上流域における 6-mer の出現分布.

表1のデータを用いた。出現位置は5'末端を示す。

4. 2 *In vivo* 発現解析

コロナ禍による業務逼迫や、ラボワークのない所属部署への異動により実施できなかった。

図3. プロモーター候補配列.

大文字は TSS 上流域に特徴的に出現した 6-mer を表す (表 1)。

```
aaacgagccGTCAATgtttcagctacgggggtctTACCCtctacgcgga  
aacgagccGTCAATgtttcagctacgggggtctTACCCtctacgcgga  
aggttgcctgcgGATTACgtccctcggacggtggcgggTAGGCTaggccg  
attagacggggatgaGAAATGggtgagcggagtgcgcttGTATGGtcgc  
ccgtccgcgtcGCCATTgtcggagcggccccgcgggtatcTACGCTgcg  
cctatcggctcgatTATGAGttgccaagcgaatcggcTAACGTagtgaac  
cctatcggctCGATTAtgagttgccaagcgaatcggcTAACGTagtgaac  
ccttgcgttgataaGTCAATagtttgcgctgcttacgcTAGTCTtgccgc  
ccttgcgttgataaGTCAATagtttgcgctgcttacgcTAGTCTtgccgc  
ccttgcgttgataaGTCAATagtttgcgctgcttacgcTAGTCTtgccgc  
cgaccggttTATGAGcaggggcgcgggtccatgTAGGCTgttgcctcatc  
cgccccaaaaaccgTTGACAcggtggatgtggggaggTAGATTtgaacg  
ctagaacggaTGACTTtcccagtcagtcacaggggTAGGCTggcacc  
ctgaAATAACGaacggccgtgttgttgcgggtgttggTAAATTCatag  
ctgAATAACgaacggccgtgttgttgcgggtgttggTAAATTCatag  
cTGAATAaacgaacggccgtgttgttgcgggtgttggTAAATTCatag  
gaccggaaggagTTTGAacgaagccctcggagccctGTATGGttcaacc  
gcccgcgtccGCCATTtccggcaacgcgggtcaagggtCAGAAAttagag  
gtcgcacgggtgTTGACAgaaagcggccacgggcccggTAGGTTcggccag  
gtctctcaaacgagccGTCAATgtttcagctacgggggtctTACCCtct  
gtctctCAAACGagccgtcaatgtttcagctacgggggtctTACCCtct  
gtggCAAACGcggccactccgatgtcacacgactcacgTAGGCTcggaaag  
tcgcccgataAATAACTtgaaccgtgatccgggacgctccTAGTCTgtgg  
tcgcccgataAATAACTtgaaccgtgatccgggacgctccTAGTCTgtgg  
tcgcccgatAAATAActtgaaccgtgatccgggacgctccTAGTCTgtgg  
tcgcccgatAAATAActtgaaccgtgatccgggacgctccTAGTCTgtgg  
tctcaaacgagccGTCAATgtttcagctacgggggtctTACCCtctacgc  
tctCAAACGagccgtcaatgtttcagctacgggggtctTACCCtctacgc  
tgaAATAACgaacggccgtgttgttgcgggtgttggTAAATTCatagt  
tgAATAACgaacggccgtgttgttgcgggtgttggTAAATTCatagt  
TGAAATAaacgaacggccgtgttgttgcgggtgttggTAAATTCatagt
```

4. 3 リソース提供 (成果公開)

本研究で明らかとした TSS 上流配列、プロモーター候補配列等は、*S. griseus* ゲノムホームページ (<http://streptomyces.nih.go.jp/TSS/>) において公開した。

【参考文献】

1. Donadio, S., *et al.* J. Antibiot. **63**:423-430, 2010.
2. Ikeda, H., Ishikawa, J., *et al.* Nat. Biotechnol. **21**:526-531, 2003.
3. Ishikawa, J., *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**:14925-14930, 2004.
4. Ohnishi, Y., Ishikawa, J., *et al.* J. Bacteriol. **190**:4050-4060, 2008.
5. Yamamura, H., Ishikawa, J., Hoshino, Y., *et al.* Stand. Genomic Sci. **7**:294-303, 2012.
6. Komatsu M, *et al.* ACS Synth. Biol. **2**:384-396, 2013.
7. Strohl, W. R. Nucl. Acids Res. **20**:961-974, 1992.
8. Bourn, W. R. & Babb, B. Nucl. Acids Res. **23**:3696-3703, 1995.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Transcriptional Start Site of Streptomyces griseus
<http://streptomyces.nih.go.jp/TSS/>

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
研究分担者	星野 泰隆 (Hoshino Yasutaka) (40399457)	国立感染症研究所・真菌部・主任研究官 (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関