

機関番号：21401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580081

研究課題名 (和文) 抗イモチ病用カスガマイシンの大腸菌による発酵生産と新規ハイブリッド抗生物質の創製

研究課題名 (英文) Biosynthesis of kasugamycin, an anti-rice blast antibiotic, in heterologous microorganisms, for the creation of hybrid antibiotics

研究代表者

小嶋 郁夫 (KOJIMA IKUO)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：90315581

研究成果の概要 (和文)：抗稲イモチ病用抗生物質カスガマイシン (KSM) と構造類似のミノサミノマイシン (MSM) の生合成遺伝子群を放線菌より分離した。これらは共通のカスガミン生合成遺伝子群を含み、染色体組込み型ベクターにより異種・異属放線菌に導入し発現させると KSM と MSM の生産を誘導した。一方、MSM 生合成遺伝子群の一部を発現させると未知の抗生物質を生産した。このように、これら遺伝子群を適宜組み合わせ発現させると新たな抗生物質の生産が可能となる。

研究成果の概要 (英文)：The biosynthetic genes of kasugamycin (KSM), anti-rice blast antibiotic, and minosaminomycin (MSM), an analogue of KSM, were cloned from their producing streptomycetes. It was found that they contained kasugamine-biosynthetic genes in common, and produced KSM and MSM heterologously when introduced via a chromosomal integration vector. In addition, specific parts of MSM biosynthetic genes induced heterologous production of unknown antibiotic(s). These results seem to suggest that suitable combination of these biosynthetic genes enables to produce new antibiotic(s).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：抗生物質生産，代謝工学

1. 研究開始当初の背景

(1) 放線菌 *Streptomyces kasugaensis* が生産する稲いもち病用抗生物質カスガマイシン (KSM, 図 1) は、イノシトールとカルボキシホルムイミドイル側鎖がアミノ基に付加したカスガミンより成るアミノグリコシド系抗生物質である。我々は本菌より KSM 生合成遺伝子クラスターをクローン化して、クラスター内で遺伝子群の転写活性化をもたらす *kasT* 遺伝子を恒常的に発現させることにより、*Streptomyces*

lividans をはじめとする異種 *Streptomyces* 属放線菌において KSM 生産を誘導した。一方、これら生合成遺伝子群を大腸菌や異属放線菌類に導入・発現して KSM を生産させる試みは行っていなかった。

(2) *Streptomyces avermitilis* よりイノシトール 1-リン酸をグルコース 6-リン酸から生合成する酵素遺伝子 *ino1* をクローン化して発現カセットを構築した。

(3) *Streptomyces* sp. MA514-A1 株(以下、

MA514 株)により生産される抗菌抗生物質ミノサミノマイシン(MSM, 図1)は、イノサミンとカスガミンおよびエンジュラシディンより成る KSM の構造類似体である。MSM の生合成研究は行われていなかった。

(4)人や動植物に対して安全で、また耐性菌の出現が極めて少ないなど、抗生物質としての優れた特性を持つ KSM について、誘導体の生産研究は行われていなかった。

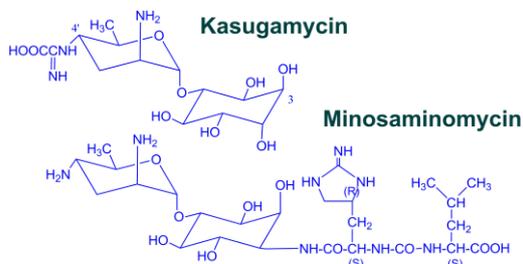


図1. KSM と MSM の化学構造

2. 研究の目的

(1) KSM を大腸菌や *Streptomyces* 属以外の放線菌に効率よく生産させることを目的に、これら菌内に導入し発現が可能な KSM 生合成遺伝子群発現カセットと生合成プラスミドを、KSM 生合成遺伝子群やイノシトール生合成遺伝子 *ino1* の発現カセットを用いて構築する。構築した KSM 生合成プラスミドを大腸菌や異属放線菌に導入・発現させて、これら菌株における KSM 生産誘導を検討する。

(2) MSM の生合成遺伝子クラスターをクローン化して MSM 生合成について知見を得る。さらに、異種放線菌で MSM 生産誘導を可能とする生合成遺伝子群発現カセットと生合成プラスミドを構築する。

(3) KSM と MSM の生合成遺伝子群を利用して異種遺伝子発現用の *S. lividans* を宿主として KSM と MSM の互いの部分構造を有するハイブリッド物質の生産誘導を試みる。

3. 研究の方法

(1) MSM 生合成遺伝子クラスターは、コスミドを用いた MA514 株のゲノムライブラリーよりクローン化した。MSM 生合成遺伝子群の解析、KSM および MSM の生合成遺伝子群カセットの構築は、大腸菌 JM109 を基本とした遺伝子操作で行った。構築した遺伝子発現カセットを放線菌染色体組込み型ベクター pTYM19 などに挿入して生合成プラスミドを構築した。

(2) KSM および MSM の生合成プラスミドや生合成遺伝子群の発現は、異種放線菌については *S. lividans* JT46 および TK21, 異属放線菌については *Rhodococcus erythropolis* L-88, 大腸菌は BL21 株を使用した。L-88, 大腸菌は BL21 株を使用した。株を使用した。

4. 研究成果

(1) 異種微生物で KSM 生産を誘導する生合成プラスミドの構築 (図2)

異種放線菌ならびに大腸菌で KSM 生産を誘導するため、KSM 生合成遺伝子クラスターを利用して 4 種の生合成遺伝子発現カセットおよび生合成プラスミドを構築した。

① KSM 生合成遺伝子クラスター内の KSM 生合成遺伝子群転写活性化遺伝子 *kasT* の上流に *S. avermitilis* 由来リボソーム S10 タンパク質遺伝子 *rpsJ* のプロモーター (*PrpsJ*) を連結してカセット I を構築した。これを染色体組込み型ベクター pTYM19 に挿入して、生合成プラスミド pKSM109 を構築した。

KSM の構成成分のイノシトール増強のため、大腸菌などの細菌で発現可能な Tn5 のネオマイシン耐性遺伝子 *neo* のプロモーター *Pneo* に *S. avermitilis* 由来の *ino1* を連結させた *Pneo-ino1* をカセット I に挿入してカセット II を構築した。本カセットを pTYM19 に挿入して pKSM125 を構築した。

② *KasT* の転写活性化によらず KSM 生合成遺伝子群を恒常的に発現させるため、7 転写単位 (*kasJ*, *kasNO*, *kasQP*, *kasRABCDE1E2F*, *kasI*) および KSM 自己耐性遺伝子群 *kasKLM* と *kac* の上流に *Pneo* を連結してカセット III を構築した。さらに pTYM19 に挿入した生合成プラスミド pKSM81 を構築した。本プラスミドに *Pneo-ino1* ユニットを挿入したカセット IV を構築した。さらに pTYM19 に挿入した pKSM126 を構築した。

(2) KSM 生合成プラスミド導入による異種放線菌 *S. lividans* での KSM 生産誘導

① 異種遺伝子発現用宿主の *S. lividans* JT46

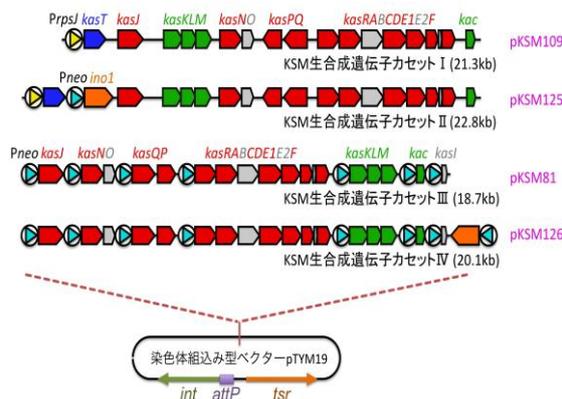


図2. KSM 生合成カセットとプラスミド
各矢印は、青色が転写活性化遺伝子 *kasT*, 赤色がカスガミン生合成推定遺伝子群, 緑色が KSM 自己耐性遺伝子群, 灰色が機能未知遺伝子群, 橙色が *ino1* を示している。

の染色体に、構築した 4 種の KSM 生合成プラスミドを導入して KSM 生産を検討した。各プラスミ

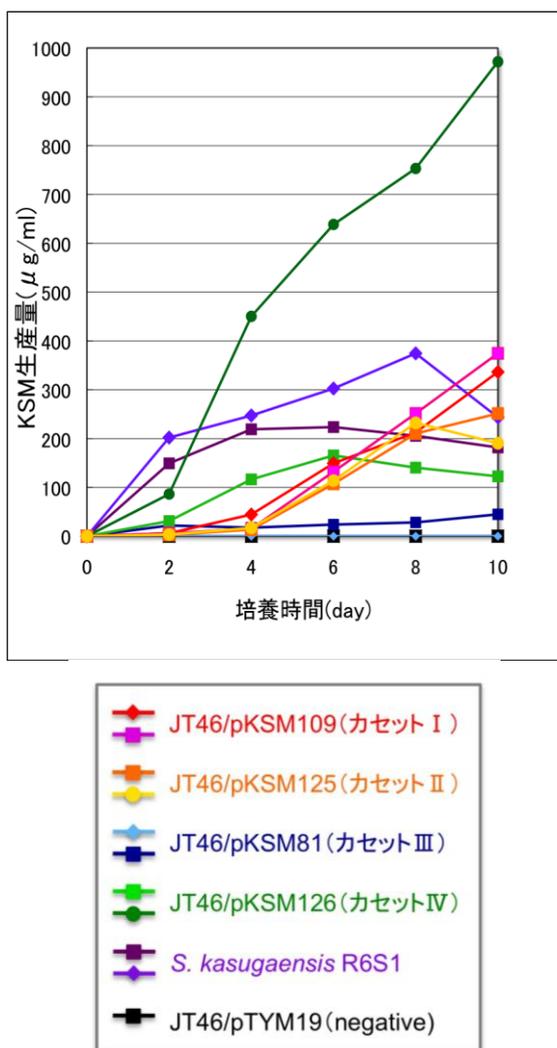


図3. KSM 生合成プラスミド導入株の KSM 生産

ド導入株について、KSM 生産用液体培地 30mL / 100mL フラスコを用いて発酵実験を行った(図3)。その結果、カセット I および II (pKSM109 および pKSM125) の導入株は、KSM 高生産株の *S. kasugaensis* R6S1 と同レベルの KSM を生産した。しかし、カセット II における *Pneo-ino1* 挿入による有意な KSM 生産向上は認められなかった。すなわち、これら導入株での KSM 生産ではイノシトールではなくカスガミンの生合成が律速であると考えられる。

②カセット III (pKSM81) の導入株はいずれも KSM が低生産であった。一方、カセット IV (pKSM126) を導入した2株では KSM の低生産と高生産が観察された。カセット IV 導入による高生産は、*Pneo* による KSM 生合成遺伝子群および *ino1* の発現強化によるカスガミンとイノシトール生合成の増強の結果と考えられる。

③カセット III (pKSM81) の導入株が KSM 低生産であったため、導入株を1週間毎に継代して KSM 生産を調べた。その結果、継代を経る毎に生産量

が低下し、3代継代後の全ての株で KSM 非生産となった。これら菌株の KSM 生合成遺伝子群について PCR 増幅により検討した結果、*kasNO*、*kasQP* および *kasCD* 部分で欠失が生じていた。これは、カセットに複数含まれる *Pneo* 間で相同組換えが生じたためと考えられる。カセット IV (pKSM126) 導入株の一方で KSM 低生産が生じた原因も、*Pneo* 間での相同組換えによると考えられる。

(3) 大腸菌 BL21 におけるイノシトールおよび KSM 生産の誘導(図4)

①大腸菌は KSM の構成成分となる *myo*-イノシトールを生産できないため、大腸菌用の低コピーベクター pSTV28 に *Pneo-ino1* ユニットを挿入して pKP05 を構築した。pKP05 を導入した大腸菌 BL21 は低濃度ではあったがイノシトールを生産した。

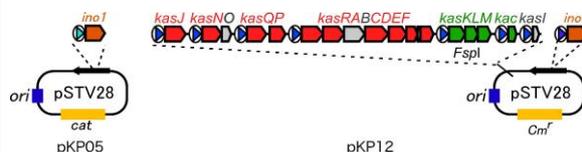


図4. 大腸菌用の *ino1* および KSM 生合成プラスミド

②大腸菌で安定な KSM 生産を導くために、*ino1* 発現カセットを大腸菌用ベクター pSTV28 に挿入した pKP05 に、さらにカセット III を挿入した pKP12 を構築した。大腸菌 BL21 に pKP12 および大腸菌内でも複製可能な pKSM126 をそれぞれ導入し、KSM 生産用培地ならびに放線菌用合成培地にて、培養温度 (20, 15°C) の条件で 7 日間培養して、その培養上清および菌体破砕液を調製した。しかし、これらいずれの培養液からも KSM は検出されなかった。この原因として、(i) 大腸菌内で KSM 生合成酵素遺伝子群の安定発現ができない、(ii) 生合成原料の安定供給が難しい、などが考えられる。

③カセット III を挿入した pKSM81 の大腸菌 BL21 導入株について、図2および3の緑矢印の自己耐性遺伝子群 (*kasKLM* および *kac*) による KSM 耐性誘導について調べた。その結果、導入株は KSM を 400μg/mL 含む LB 培地においても良好に生育したことから、これら自己耐性遺伝子群は正常に発現していることが判った。

(4) *Rhodococcus erythropolis* L-88 における KSM 生産誘導

Rhodococcus 属細菌は、*Streptomyces* 属と同様にアクチノバクテリアに属し、DNA の GC 含量が高い。一方、菌糸状の *Streptomyces* 属に対し、*Rhodococcus* 属細菌は桿菌状形態を示し、抗生物質生産菌も報告されている。そこで、遺伝

子発現用宿主として開発された *R. erythropolis* L-88(以下, L-88 株)を用いて KSM 生合成遺伝子群による KSM 生産誘導を検討した。

① *Streptomyces* 属放線菌の互いに異なる 5 ヶ所の染色体に組み込み可能な 5 種のベクターをエレクトロポレーション法により L-88 株に導入を試みた。その結果、いずれも導入可能であった。すなわち、**図 2**に示す KSM 生合成プラスミドが導入可能であることが判った。

② L-88 株にカセット I および II を有する pKSM109 および pKSM125 をそれぞれ導入した。得られた 2 種のプラスミドの導入株の培養液から、KSM が検出された。すなわち、L-88 株において、カセット I および II の *kasT* 遺伝子が *PrpsJ* により強制発現され、KSM 生合成遺伝子群が発現して KSM が生産されたことが示唆された。

③ KSM 生産用液体培地 KPM に 0.1% イノシトールを添加し、L-88 株の pKSM109 および pKSM125 導入株の KSM 生産を調べた(**図 5**)。そ

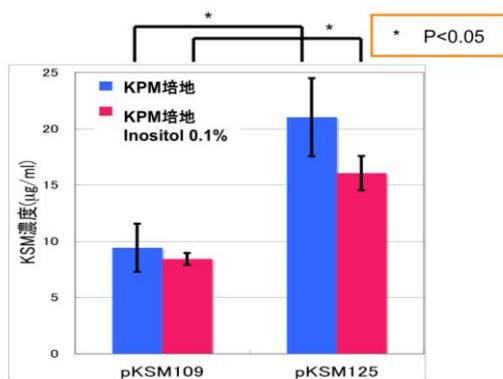


図 5. KSM 生合成プラスミド導入 L-88 株による KSM 生産

の結果、イノシトール添加は KSM 生産に影響せず、一方、pKSM125 導入株は pKSM109 導入株に比して有意に KSM 生産が向上していた。これは、L-88 株はイノシトール生合成系を有しており、イノシトール取り込み能は低い、*ino1* 導入による内因性イノシトールの増加により KSM 生産向上がもたらされたと考えられる。

さらに pKSM125 導入株を用いて、KSM 生産用培地 KPM の糖源と窒素源を検討したところ、1.5% グルコースと 1% バクトソイトンの組合せが KSM 生産に有効であることがわかった。

(5) MSM 生合成遺伝子群のクローニングと解析
MSM は KSM の構成アミノ糖のカサガミンにイノシトール誘導体のイノサミンが結合し、さらに *Streptomyces fungicidicus* が生産するペプチド系抗生物質エンジュラシディンの構成物質のエンジュラシディン(END)が付加した構造を有する(**図 1**)。そこで、MSM 生合成遺伝子群には KSM のカサガミンと END の生合成相

同遺伝子群が両方含まれると推定し、MSM 生合成遺伝子群のクローニングを行った。

① MA514 株ゲノム中のカサガミンおよび END の生合成遺伝子群に対する相同遺伝子群の存在について、縮重プライマーを作成して PCR 増幅により検討した。その結果、KSM 遺伝子群の *kasR* および END 生合成遺伝子群の *endP* に対する相同遺伝子をクローニングできた。これらを基に、遺伝子クローニング用の *kasR* および *endP* 相同遺伝子のプライマーを作成して、これら 2 遺伝子を含む DNA 領域を MA514 株のゲノムライブラリーからクローニングを試みた。3,072 クローンから、2 組のプライマーを同時に増幅した約 32 および 38kb の DNA 断片を含む 2 クローンを得た。これらを、染色体組み込み型ベクターにより *S. lividans* TK21(以下, TK21 株)に導入したところ、いずれの導入株の培養液からも MSM が検出された。すなわち、MSM 生合成遺伝子群がクローニングできた。

② 2 種のクローニング断片のうち約 32kb 断片について全塩基配列を決定した。その結果、MSM 生合成遺伝子クラスターは 21 遺伝子群より成ることが示唆された(**図 6 (B)**)。また、クラスターには KSM 生合成の経路特異的遺伝子 *kasT* の相同遺伝子は見出されなかった。おそらく、MSM は恒常的に生産されていると考えられる。

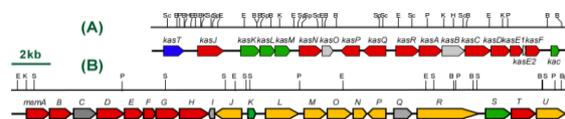


図 6. KSM(A)および MSM(B)の生合成遺伝子クラスター

(A)および(B)における、赤矢印はカサガミン生合成推定遺伝子群、緑矢印は(A)では KSM, (B)では MSM に対する自己耐性遺伝子群、(B)の黄矢印は END 生合成推定遺伝子群、灰色矢印は機能未知遺伝子を示している。

(6) KSM と MSM とのハイブリッド物質の生産を誘導するため、両物質の生合成遺伝子クラスターを、TK21 株の染色体に組込んだ多重導入株を作成した。多重株は、KSM と MSM を同時に生産したが、互いの部分構造を持つハイブリッド物質は検出できなかった。さらに、MSM 生合成遺伝子クラスターのアミノ糖鎖生合成推定遺伝子群(*msmA*~*H*)、END 生合成推定遺伝子群の *msmN* ~ *U* および *msmS* ~ *U* の 3 領域をそれぞれ TK21 株の染色体に組込んだ 3 種の導入株を作成したところ、これらのいずれの導入株も *Pseudomonas fluorescens* に対する抗生物質を生産していることが判った。

5. 得られた成果の意義、今後の展望

(1) *S. kasugaensis* 由来の KSM 生合成遺伝子群を利用して異種放線菌において KSM 生産を導く4種の生合成プラスミドを構築した。特に、pKSM109とpKSM125は安定にKSM生産を導き、異種放線菌の *R. erythropolis* L-88 においても KSM 生産を誘導できた。今回の結果は、稲の抗もち病農薬として国内で広く使用されている KSM を、*Streptomyces* 属のみならず異種放線菌でも生産誘導できた例として極めて学術的価値が高い。本成果は、様々な特性を持つ放線菌に対して KSM 生産を導く可能性を示した。

今後は、これら生合成プラスミドを未利用資源のセルロース系バイオマスを資化できる放線菌に導入することにより、セルロース系バイオマスを原料とした KSM の発酵生産系を構築する。また、桿菌形状を示す pKSM109 を導入した L-88 株を用いて KSM の高生産条件を見出すことにより、新しい KSM 発酵生産系の確立をめざす。

(2) MSM 生合成遺伝子群の解析により、KSM の生合成遺伝子群との比較・検討が可能になり、2種のアミノグリコシド系抗生物質の生合成の理解が深まった。さらに、KSM と同様に MSM の異種放線菌における生産も可能となったことから、これら生合成遺伝子群を用いることにより KSM と MSM との部分構造を有するハイブリッド抗生物質の誘導について研究を進める。さらに、MSM 生合成遺伝子群の特定領域のみを導入・発現させた TK21 株が抗菌物質を生産した。これら抗菌物質は、MSM とは異なった物質である可能性が高く、原因物質の精製と構造決定を行う予定である。

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)

[学会発表] (計5件)

①春日 和, 辻本 敏博, 桑原 直哉, 小林 正之, 上松 仁, 五十嵐 雅之, 小嶋 郁夫, 「アミノグリコシド系抗生物質ミノサミノマイシン生合成遺伝子クラスターの解析」, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 平成 24 年 3 月 24 日, 京都女子大学(京都市)

②春日 和, 藤井 慈子, 桑原 直哉, 湊 由衣子, 小林 正之, 上松 仁, 田村 具博, 池田 治生, 小嶋 郁夫, 「*Streptomyces lividans* および *Rhodococcus erythropolis* を宿主としたアミノグリコシド系抗生物質カスガマイシンの異種生産」, 日本放線菌学会 2011 年度大会, 平成 23 年 9 月 8 日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)

③春日 和, 藤井 慈子, 桑原 直哉, 湊 由衣子, 小林 正之, 上松 仁, 田村 具博, 池田 治生, 小嶋 郁夫, 「*Rhodococcus* 属細菌を宿主としたカスガマイシンの異種生産」, 日本農芸化学会

2011 年度大会, 平成 23 年 3 月 27 日, 京都女子大学(京都市)

④春日 和, 山本 知佳, 松尾 高志, 小林 正之, 上松 仁, 池野 聡一, 池田 治生, 小嶋 郁夫, 「異種微生物におけるカスガマイシン生産をめざした生合成クラスターの再構築」, 日本農芸化学会 2009 年度大会, 平成 22 年 3 月 28 日, 東京大学(東京都, 目黒区)

⑤春日 和, 山本 知佳, 松尾 高志, 小林 正之, 上松 仁, 池野 聡一, 池田 治生, 小嶋 郁夫, 「異種微生物によるカスガマイシンの恒常的生産をめざした生合成遺伝子群の再構築」, 日本放線菌学会 2009 年度大会, 平成 21 年 7 月 16 日, 秋田ビューホテル(秋田市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小嶋 郁夫 (KOJIMA IKUO)
秋田県立大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：90315581

(2)研究分担者

上松 仁 (AGEMATU HITOSHI)
秋田高等工業専門学校・物質工学科・教授
研究者番号：20435407
春日 和 (KASUGA KANOU)
秋田県立大学・生物資源科学部・助教
研究者番号：40315594

(3)連携研究者

池野 聡一 (IKENO SOUICHI)
昭和薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：10286883
(連携期間：平成20年度)