

平成22年 3月31日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20780083  
 研究課題名 (和文) 放線菌二次代謝産物の生合成物質変換および生産制御機構の解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of the biosynthetic pathway and the regulatory mechanism of secondary metabolites in *Streptomyces*  
 研究代表者  
 荒川 賢治 (ARAKAWA KENJI)  
 広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教  
 研究者番号：80346527

## 研究成果の概要 (和文)：

2つのポリケチド抗生物質ランカサイジン(LC)・ランカマイシン(LM)を生産する放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株の線状プラスミド pSLA2-L の機能解析を行った。LCの大員環形成が、LkcEによるC-18位アミノ基酸化により生じることを明らかにした。また、LM生合成における水酸化、糖付加の順序を解明した。 $\gamma$ -ブチロラクトン (GB) を鍵物質とした LC・LM 生産制御カスケードの解析も行い、GB 生合成遺伝子  $srrX \rightarrow GB$  リセプター  $srrA \rightarrow$  SARP 型活性化因子  $srrY \rightarrow LC, LM$  というカスケードを明らかにした。

## 研究成果の概要 (英文)：

We analyzed the function of the secondary metabolites genes located on the linear plasmid pSLA2-L. In LC biosynthesis, the C-18 amine group in an acyclic compound is oxidized by LkcE to form the iminium intermediate, which then receives the nucleophilic attack from C-2 enolate to form the 17-membered macrocyclic LC. We also determined the order of post-PKS modification in LM biosynthesis. The extensive transcriptional analysis has revealed that the  $\gamma$ -butyrolactone signaling cascade goes from  $srrX$  through  $srrA$  to  $srrY$ , leading to LC and LM production.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物有機化学

科研費の分科・細目：農芸化学，生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生合成・抗生物質・ポリケチド・制御遺伝子・転写活性化因子・糖転移酵素

## 1. 研究開始当初の背景

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は構造の全く異なる2つのポリケチド抗生物質ランカサイジン (LC)・ランカマイシン (LM) (図 1A) を生産する。本菌は3つの線

状プラスミド (pSLA2-L, -M, -S) を有しており、このうち LC, LM の生合成遺伝子クラスターは全長 210 kb の線状プラスミド pSLA2-L 上に存在していることが当研究室の全塩基決定により明らかとなった。さらに pSLA2-L 上にはこれら LC, LM 生合成クラス

ターの他に機能未知の type-II 型ポリケチドやカロテノイドの生合成遺伝子群、またこれら二次代謝生合成や形態分化の制御を司る制御遺伝子群もコードされていた (図 1B)。

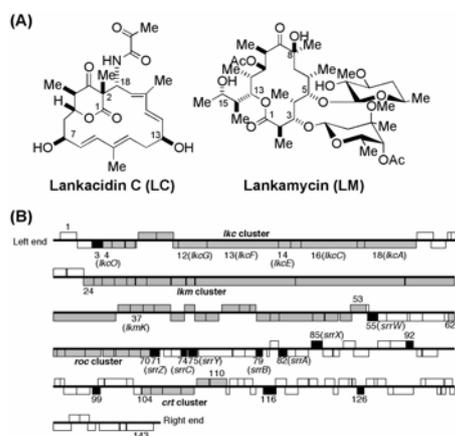


図 1

筆者はこれまでに炭素-炭素結合による 17 員環構造を有した LC の特異な大員環形成に、アミノキシダーゼ *LkcE* が関与することを見出した。また塩基配列解析および遺伝子破壊実験から、 $\gamma$ -ブチロラクトン化合物 (GB) を鍵物質とした LC・LM 生産制御カスケードの存在も明らかにした。放線菌二次代謝産物の特異な生合成機構とその生産制御機構に興味を持たれた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では pSLA2-L にコードされた二次代謝生合成関連遺伝子群のうち、特に炭素-炭素結合による 17 員環構造を有した LC の特異なポリケチド骨格構築機構の解析を中心として、以下の課題の解析を目指した。

- (1) LC 環化酵素 *LkcE* の *in vitro* 反応機構解析
- (2) LC 生合成におけるモジュラー・反復混合型ポリケチド合成酵素 (PKS) の解析
- (3) LM 生合成経路の解析および生合成酵素の基質特異性
- (4) LC・LM 生産制御カスケードの網羅的解析
- (5) 「潜在的」生合成遺伝子クラスターの発現活性化への応用

各研究項目の研究方法及び成果は以下に記載する。

## 3. 研究の方法

### (1) LC 環化酵素 *LkcE* の *in vitro* 反応機構解析

筆者はアミノキシダーゼ *lkcE* 破壊株において線状中間体 LC-KA05 および LC-KA05-2 (図 2) の蓄積を発見した。本課題では *LkcE* を大量発現して線状中間体を *in vitro* 変換反応に賦し、TLC, HPLC, 質量分析, NMR など酵素反応を追跡し、大員環形成メカニズムを明らかにする。

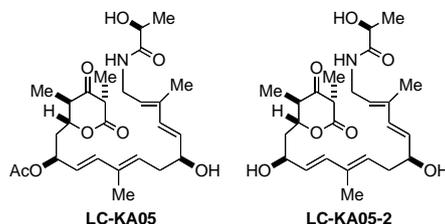


図 2

### (2) LC 生合成におけるモジュラー・反復混合型 PKS の解析

LC ポリケチド骨格の酸化状態から考えるとケト基の還元は計 7 回行われるはずだが、ケト還元酵素 (ketoreductase, KR) ドメインはわずか 3 カ所しか存在しておらず、反復型 PKS の存在が示唆された。もし KR 破壊株から中間体の取得が達成できれば機能ドメインのモジュラー・反復型の判別が可能と考えられた。そこで本課題では KR ドメインの破壊株を構築し、それらから得られる微量代謝産物の化学構造を各種分光機器 (NMR, MS, HPLC) により解析し、LC 生合成における反復型 PKS の寄与を直接実証する。

### (3) LM 生合成経路の解析および生合成酵素の基質特異性

LM は、臨床医学上重要かつ生合成研究が進行しているエリスロマイシンとその化学構造が類似しており、新規創薬の研究ツールとして期待される。LM の 8 位, 15 位水酸基は 2 つの P450 水酸化酵素 *LkmF*, *LkmK* により導入されることが筆者らの研究により明らかとなったが、LM の post-PKS 生合成経路、すなわち 2 つのデオキシ糖の付加も含めたこれら 2 つの水酸基の導入時期は不明であった。そこで糖転移酵素の破壊株作製およびそれら代謝産物の構造解析を行い、LM の生合成経路を解明する。また、P450 水酸化酵素および糖転移酵素は幅広い基質認識をもつことが知られているので、様々な基質の *in vitro* 変換反応を行い、有用工業酵素としての可能性も探る。

### (4) 二次代謝制御シグナルカスケードの網羅的解析

放線菌には  $\gamma$ -ブチロラクトン化合物 (GB) を鍵物質とした特有の二次代謝制御機構があり、pSLA2-L 上にもこれらの相同遺伝子が存在している。筆者は遺伝子破壊実験を基にして GB 合成遺伝子 *srrX*, GB リセプター *srrA*, そしてその標的遺伝子である LC, LM 生合成

活性化因子 *srrY* を発見した。さらにリプレッサー *srrB* を破壊すると LC,LM 大量生産株が取得できた。そこで本課題では未解析の遺伝子変異体の作製や RT-PCR による遺伝子発現解析を行い、抗生物質生産に対する影響を調べる。さらに *SrrB*, *SrrY* などの標的遺伝子・タンパク質をゲルシフト解析やフットプリント、免疫沈降などの手法を用いて特定し、制御カスケードの全貌を明らかにする。

### (5) 「潜在的」生合成遺伝子クラスターの発現活性化への応用

pSLA2-L 上には type-II ポリケチドおよびカロテノイド生合成遺伝子群があるが、それらの代謝産物については確認出来ていない。そこで該当遺伝子クラスターの破壊株を作製し、親株との代謝産物解析を行う。また、これらは通常培養条件では生産が抑制されている可能性がある。そこで (4) で活性化因子 *SrrY* の標的配列が明らかになった場合、プロモーター配列の交換を行い生産誘導を試みる。潜在的代謝産物と考えられるこれらの物質生産へとき着け、生産制御と物質生産研究との融合を図る。

## 4. 研究成果

(1) まず *E. coli* BL21(DE3)pLysS 株に *lkcE* 発現ベクター pKAR1101 を形質転換した。次いで IPTG により誘導し、LkcE タンパクを His-tag 融合タンパク質として十分量取得した。pH=7.6 において LC-KA05-2 の基質変換反応を行ったところ、反応はすみやかに進行し、低極性化合物の生成が認められた。本化合物の構造解析を行ったところ、C-18 がアルデヒドになった化合物であった。本化合物は、C-18 アミノ基が酸化されてイミニウム中間体となり、それが加水分解されて生成されたものと考えられた。これにより LkcE による C-18 アミンの酸化反応を確認できた。さらに反応条件を種々検討したところ、pH=7.0 において目的の 17 員環閉環体であるランカサイジノールの形成が認められた。以上により、LC の大員環形成反応は、まず LkcE によって線状中間体の C-18 アミノ基が酸化されてイミニウム中間体となり、これが分子内求核付加反応を受けて 17 員環骨格が形成される、というメカニズムが明らかとなった (図 3) (学会発表①)。

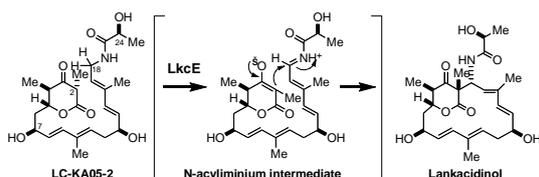


図 3

(2) LC 生合成クラスターの 3 つの KR ドメ

ン (*lkcC-KR*, *lkcF-KR1*, *lkcF-KR2*) の活性残基の点変異株をそれぞれ作製した。これらの代謝産物を TLC, HPLC により詳細に解析したところ、いずれの変異株も LC 中間体を生産していなかった。このことは、LC の PKS が LC ポリケチド中間体の酸化状態を厳密に認識することを示唆している。また、LkcC のタンデム ACP ドメインについても同様に活性残基変異株を構築し、代謝産物解析を行った。その結果、LkcC の ACP ドメインは 1 つで十分であり、ドメインが 2 つ並ぶことで LC の生産性を倍加することが明らかとなった (雑誌論文③)。またこれら ACP 変異株からは鎖長が短いポリケチド中間体は得られなかった。LC の特異なモジュラー・反復混合型ポリケチド生合成について異なるアプローチを行う必要がある。

(3) LM の生合成経路を解明するため、遺伝子破壊株の代謝産物解析を行った。糖転移酵素をコードする *lkmI*, *lkmL* をそれぞれ破壊したところ、前者からは 3 位水酸基のモノグリコシド 3-O-L-arcanosyl lankanolide が、後者からは 2 つのアグリコン 8-deoxylankanolide および 8,15-deoxy-15-oxolankanolide が得られた。このことより、まず図 4 のようにアグリコン 8,15-dideoxylankanolide が P450 酵素 LkmK によって 15 位水酸化され、次いで LkmL による 3 位水酸基のグリコシル化、P450 酵素 LkmF による 8 位水酸化が生じ、最後に LkmI により 5 位水酸基がグリコシル化されて LM が合成される、という経路が明らかとなった (雑誌論文④)。

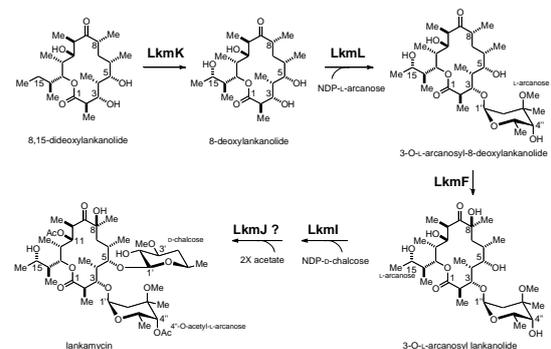


図 4

(4) ゲルシフトアッセイやフットプリント実験により、GB リセプター *SrrA* の標的遺伝子が SARP 型転写活性化遺伝子 *srrY* であることを明らかにし、さらに *SrrA-srrY* のプロモーター結合領域も決定した (雑誌論文⑤)。また SARP 型活性化因子 *srrY*, *srrZ* の遺伝子破壊株を調べたところ、 $\Delta srrY$  株は LC, LM 非生産、 $\Delta srrZ$  株は LM のみ非生産となった。また、転写解析を行ったところ、 $\Delta srrY$  株において *srrZ* の転写は認められなかった。このことは

LM生合成に関して*srrY-srrZ*というカスケードの存在を示唆した。これを確かめるため、*SrrY*タンパクを調製し、ゲルシフト解析を行った。その結果、*SrrY*は*srrZ*上流のダイレクトリピート配列

(TGGAGTG-GGGC-TCGAACG-GCGC-TGGAGAT)を認識して転写活性化することが明らかとなった(雑誌論文①)。またリプレッサー遺伝子*srrB*, *srrC*が抗生物質生産および形態分化に関与していることも分かった。現在これらの標的遺伝子の探索を行っている。

(5) type-II ポリケチド生合成遺伝子群(*orf62-orf70*)のうち、ポリケチド骨格形成を司るminimal PKS 遺伝子*orf67-orf69*の遺伝子破壊を行った。代謝産物解析を行ったところ、親株のそれと有意な違いが認められなかった。原因としては、*orf67-orf69*は染色体上の孢子色素生合成遺伝子と高い相同性があり、これが相補した可能性が考えられた。そこで現在全領域の遺伝子破壊株を構築中である。

本研究の2年間の成果として、抗生物質生合成・二次代謝カスケードの解析を中心にした原著論文を6報発表した(以下に記載)。その中には2009年ノーベル化学賞受賞者Ada Yonath博士との共著論文(雑誌論文②)もあり、*S. rochei*が生産する2つの抗生物質の生合成およびその生産調節機構が世界中で注目されている。本成果を基にして、LC生合成のモジュラー・反復混合PKSの立証を中心とした抗生物質の生合成機構解析、そして二次代謝カスケードの全容解明を進めていく所存である。

[雑誌論文] (計6件)

- ① T. Suzuki, S. Mochizuki, S. Yamamoto, K. Arakawa, and H. Kinashi.  
“Regulation of lankamycin biosynthesis in *Streptomyces rochei* by two SARP genes, *srrY* and *srrZ*”  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **74**, in press (2010). (査読有)
- ② T. Auerbach, I. Mermershtain, C. Davidovich, A. Bashan, M. Belousoff, I. Wekselman, E. Zimmerman, L. Xiong, D. Klepacki, K. Arakawa, H. Kinashi, A. Mankin, and A. Yonath.  
“The structure of ribosome-lankacidin complex reveals ribosomal sites for synergistic antibiotics”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 1983-1988 (2010). (査読有)
- ③ S. Tatsuno, K. Arakawa, and H. Kinashi.

“Extensive mutational analysis of modular-iterative mixed polyketide biosynthesis of lankacidin in *Streptomyces rochei*”

*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 2712-2719 (2009). (査読有)

- ④ K. Arakawa, T. Suzuki, and H. Kinashi  
“Gene disruption analysis of two glycosylation steps in lankamycin biosynthesis in *Streptomyces rochei*”  
*Actinomycetol.*, **22**, 35-41 (2008). (査読有)
- ⑤ S. Yamamoto, Y. He, K. Arakawa, and H. Kinashi.  
“ $\gamma$ -Butyrolactone-dependent expression of the SARP gene *srrY* plays a central role in the regulatory cascade leading to lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*”  
*J. Bacteriol.*, **190**, 1308-1316 (2008). (査読有)

[学会発表] (計22件)

- ① 荒川賢治、「放線菌線状プラスミドにコードされた生合成遺伝子群の機能解析」、2009年度日本放線菌学会大会、2009年7月16日、秋田県秋田市(浜田賞 受賞講演)
- ② 荒川賢治、“Regulation of lankacidin and lankamycin biosynthesis in *Streptomyces rochei*”, Japan-UK Workshop on Genomics of Antibiotic-producing Actinomycetes: Implications and Applications、2008年10月31日、日本大学・東京(国際会議招待講演)
- ③ 荒川賢治、“A modular-iterative mixed polyketide synthases and oxidative macrocyclization in the biosynthesis of the 17-membered antibiotic lankacidin”、7th-Japan-US seminar、2008年5月31日、米国San Diego(国際会議招待講演)

[その他]

研究室のホームページ

[http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin\\_lab/hosen\\_lab.html](http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/hosen_lab.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒川 賢治 (ARAKAWA KENJI)  
広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教  
研究者番号：80346527

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

