

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05787

研究課題名(和文) Metabolomics-driven approach to understand antibiotics induction ability mechanism in *Streptomyces coelicolor*研究課題名(英文) Metabolomics-driven approach to understand antibiotics induction ability mechanism in *Streptomyces coelicolor*

研究代表者

PUTRI SASTIA (Putri, Sastia Prama)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50729796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタボローム解析を基盤としたマルチオミクス解析を *S. coelicolor* 株に適用することで、抗生物質生産に寄与する代謝物の特定およびその作用機序の部分的な解明を行った初の研究である。メタボローム解析によって、抗生物質の生産量が細胞内・細胞外の cAMP の量と相関関係にあることが示されると共に、cAMPの培養培地への添加によつての抗生物質の生産性向上が観測された。本研究で得られた抗生物質の制御・誘導機構に関する知見は、今後の抗生物質生産量の増加や新規抗生物質の発見に貢献することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、代謝物および遺伝子発現の点から多くのデータを取得しており、今後の当該分野における各種オミクス解析の結果と統合することで、*S. coelicolor* における抗生物質生産に関連した制御機構の更なる解明が期待される。また本研究で得られた知見は、抗生物質生産における制御機構の理解の一端を広げることが可能にする知見である。本知見の作用機序の更なる理解によつて、新規抗生物質の発見を可能にすることや抗生物質のより効率的な生産に資する知見が特定されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This is the first study to apply metabolome-based multi-omics analysis in *S. coelicolor* strains to identify metabolites that contribute to antibiotic production and to partially elucidate their mechanisms of action. Metabolomic analysis showed that antibiotic production correlated with the amount of intracellular and extracellular cAMP, and that the addition of cAMP to the culture medium increased the productivity of antibiotics such as actinorhodin and germicidin. Metabolomic analysis of cAMP addition to the cell culture suggests the importance of guanine in the positive regulation of cAMP. The knowledge on the mechanism of antibiotics control and induction resulted from this study can contribute to increasing antibiotics production and discovery of new antibiotics in the future.

研究分野：microbial metabolomics

キーワード：メタボロミクス 抗生物質 *Streptomyces* *Actinomyces* 代謝経路 microbiology 微生物学

1. 研究開始当初の背景

- (1) 放線菌は現在までに発見された抗生物質の 7 割近くの生産を担う、抗生物質の重要な生産源である。放線菌における抗生物質合成を担う代謝の誘導の程度は放線菌の有する複雑な制御機構によって支配されている。従って新規抗生物質の発見ひいては発見された抗生物質の工業的生産を見越した生産性向上のためには、抗生物質生産を支配する複雑な制御機構の更なる解明が求められる。放線菌に属する *Streptomyces* 属の中でも *Streptomyces coelicolor* は色を呈する抗生物質を生産する特性を有することから、抗生物質生産に関連する制御機構の解明のためのモデル放線菌として、学術的に有用な研究対象とされてきた。2002 年に *S. coelicolor* の全ゲノム配列が決定されて以来、*S. coelicolor* においても各種オミクス解析が抗生物質生産に関連する制御機構の更なる解明のための有効な手法として採用されるようになった。
- (2) しかし、決定的な欠点として、細胞代謝をシステムレベルで理解できていないことが挙げられる。異種抗生物質の生合成経路の発現を助けるため、あるいは発見された新規抗菌薬の高収率生産に必要な代謝物、例えば代謝経路は何か、あるいは冗長なのか？ 私たちは、抗生物質の非生産者と高生産者の間で起こる代謝の変化を明らかにするための原理実証研究を行うことで、この重要な問いに取り組む。

2. 研究の目的

- (1) 本研究では放線菌 *S. coelicolor* 株における抗生物質生産に関する制御機構解明に資する知見の獲得およびその作用機序の解明を目的とした。
- (2) 本研究ではメタボローム解析による代謝物量情報を主データとしながら、トランスクリプトーム解析による遺伝子発現量情報を統合させたオミクス解析を採用することで、本研究の目的をデータ駆動型の手法によって達成することを目指した

3. 研究の方法

- (1) まず、*S. coelicolor* の異なる培養段階またはアクチノロージン生産量の異なる *S. coelicolor* の LC-MS/MS 解析を行うことで、抗生物質生産に重要な候補代謝物の特定を行った。アクチノロージン生産量の異なる菌株の比較解析を行った。本研究では、より幅広い代謝物カバレッジを実現するために、2 種類の LC-MS/MS プラットフォームを採用しました。1 つはマイナスイオン化モードのイオンペア LC-MS/MS で、これは以前にも紹介されている (Nitta et al., 2017)。
- (2) 候補代謝物を培養培地に添加した際の抗生物質生産量増加を確認することで、その代謝物の重要性の妥当性確認を行うと共に、該当代謝物を培養培地に添加した際のメタボロミクスとトランスクリプトーム解析を行うことで、その作用機序を説明する仮説を提唱した。
- (3) その後、仮説立証のための特定代謝経路の阻害剤を培養培地に添加することで本仮説の部分的な立証を行った。

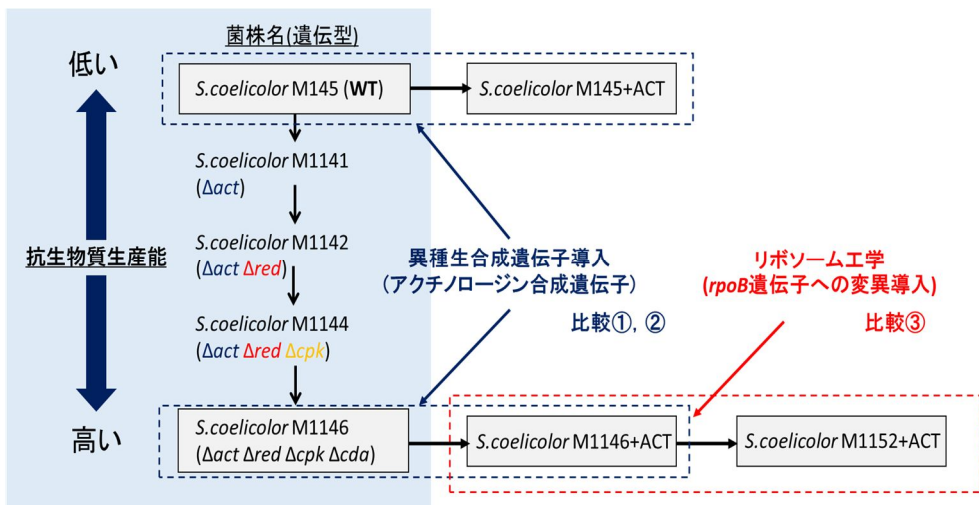


図 1 本研究においてメタボローム解析に供した菌株の概略図

4. 研究成果

(1) *S. coelicolor* は対数増殖期において菌体の合成を行い、培地中の基質が枯渇した増殖定常期において緊縮応答 (Stringent response) が起きることで各種抗生物質の生産を開始する。しかしながら、現在までにおいて、異なる培養期間における *S. coelicolor* の代謝物量の主要な変化を特定した研究例は報告されていない。そこで本研究では *S. coelicolor* の菌株の中でも、抗生物質生産のための宿主株として汎用される M1146 株の対数増殖期および増殖定常期における細胞内・細胞外の一次代謝物の網羅的な絶対定量を行った。Streptomyces *S. coelicolor* M1146 株は、野生株 M145 株における主要な抗生物質合成遺伝子クラスターである act, red, cpk, cda 遺伝子クラスターを破壊した菌株であり、*S. coelicolor* 株における異種由来の抗生物質生産に頻用される株である。結果的に解糖系や TCA 回路などを含む中央代謝に関連する代謝物量の減少が主な代謝物量変化であることが示された。本結果から、抗生物質の合成が開始される増殖定常期は、抗生物質合成のための前駆体量確保の面から適切ではないことが示され、前駆体がより多く確保されている早期の培養段階において抗生物質生産を開始させることが、培養後期における最終的な抗生物質生産量の向上に寄与する可能性が示された。

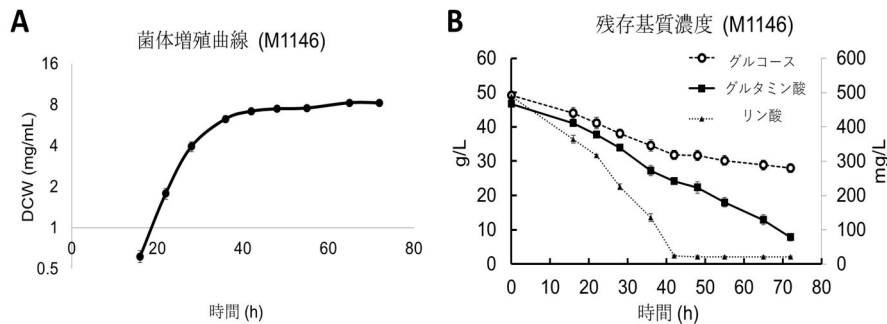


図2 M1146 株の表現型 (菌体量および基質消費量)

(A) M1146 株の DCW (乾燥菌体重量) に基づいた菌体増殖曲線を示す (N=3)。
 (B) M1146 株の残存基質濃度・グルコース, グルタミン酸, リン酸の消費量を示す (N=3)。

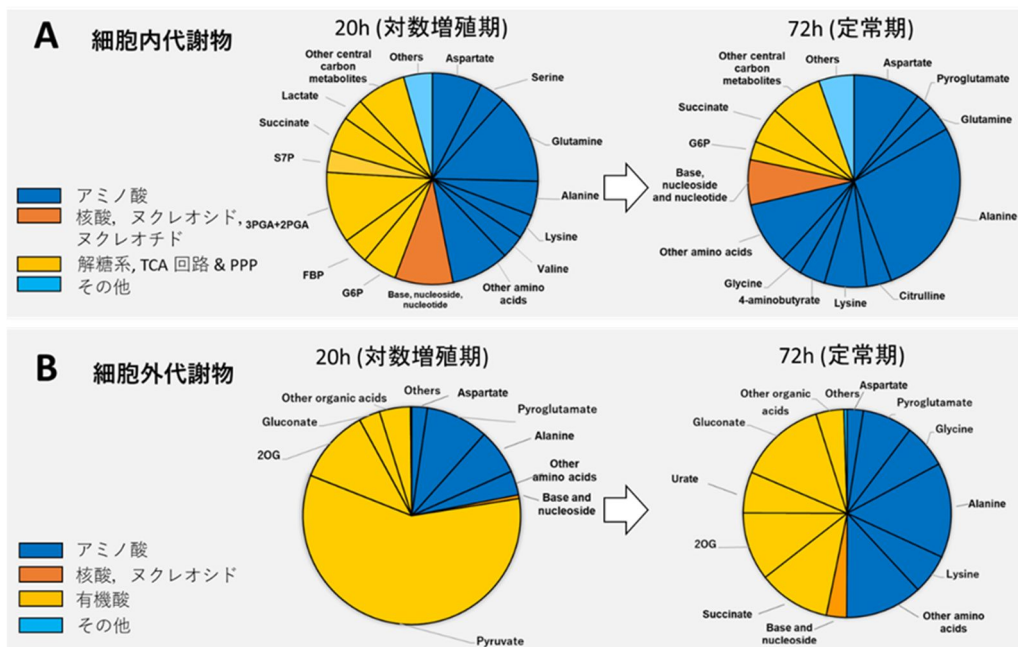


図3 M1146 株における一次代謝物絶対定量結果 (20h: 対数増殖期, 72h: 定常期) 総量比で2%以上のものを代謝物名と共に示している。それぞれ (A) 細胞内代謝物量 (B) 細胞外代謝物量の平均値 (N=3) の総量における量比を示す。

(2) アクチノロージン生産量開始時期・最終生産量を有する *S. coelicolor* 株に対してマルチオミクス解析を適用した結果、細胞内・細胞外における cAMP (環状アデノシンリン酸) の量がアクチノロージンの生産量と相関関係にあることが示され、*S. coelicolor* による抗生物質生産において cAMP が重要である可能性が示された。

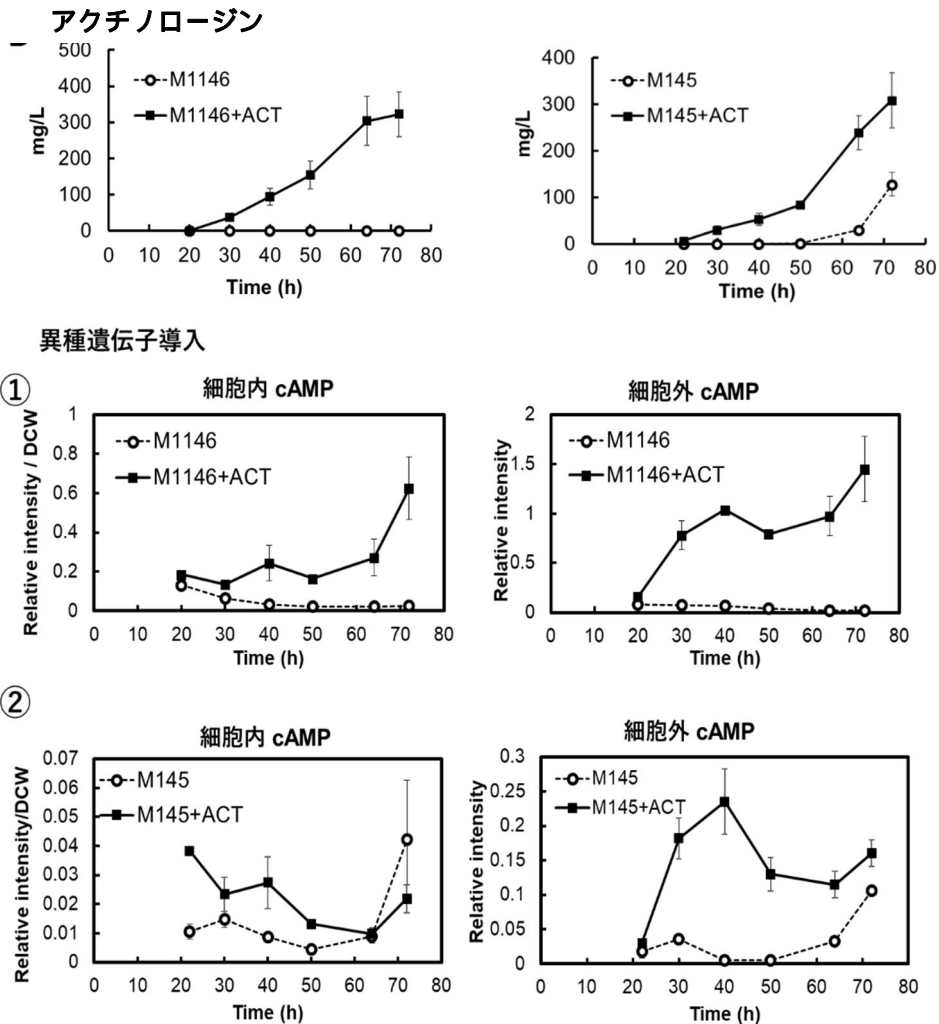


図4 異種遺伝子導入によるアクチノロージンとcAMP量変化 (細胞内・細胞外)
 : M1146株およびM1146+ACT株における細胞内・細胞外のcAMP量の変化 (N=3) : M145株およびM145+ACT株における細胞内・細胞外のcAMP量の変化 (N=3)

(3) *S. coelicolor* によって元来合成されるアクチノロージンを対象抗生物質として設定し、生合成遺伝子導入および *rpoB* 遺伝子への部分変異導入によって、*S. coelicolor* M1146株における抗生物質生産能の強化を行った株の解析を試みた。*rpoB* 遺伝子への部分変異導入によるメタボロームへの影響 に関して、上記と同様のアプローチを用いることでその影響を特定した。また本比較では、先ほど特定した cAMP に着目した比較を行った。FC 値のヒートマップ解析では、異種遺伝子導入によるメタボロームへの影響と同様に細胞外 cAMP の増加が示唆された。部分変異を導入した M1152+ACT 株のコントロール株 M1146+ACT 株との比較において、細胞内の cAMP の優位な差は観測されなかったが、異種生合成遺伝子導入のメタボロームへの影響解析において特に顕著な差が観測された細胞外における cAMP の増加が同様に観測された。本結果から cAMP の抗生物質生における重要性の可能性が示唆された。

***rpoB* 部分変異導入**

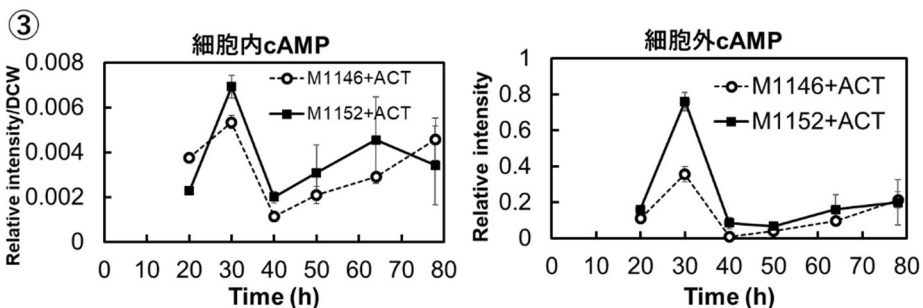


図5 *rpoB* 部分変異導入による cAMP 量変化 (細胞内・細胞外)

M1146+ACT 株および M1152+ACT 株における細胞内・外の cAMP 量の変化 (N=3)

- (4) cAMPの *S. coelicolor* における抗生物質生産への重要性を示すため cAMP を *S. coelicolor* の培養培地への添加実験を試みた。cAMP を培養培地に添加した結果、菌体量の増加、対象抗生物質としていたアクチノロージンの生産量、また抗生物質 Germicidin の生産量の向上を達成した。本知見の作用機序を解明するため、cAMP を培養培地に添加した際のメタボローム解析および RNAseq によるトランスクリプトーム解析を行った。結果として、メタボローム解析では、cAMP 添加試料においてプリン塩基であるグアニン、ヒポキサンチン、キサントシンの量の増大が観測されたと共に、トランスクリプトーム解析では、プリン塩基の合成関連遺伝子の発現レベルの向上が観測された。そこで、サルベージ回路関連遺伝子の発現レベルの向上および GMP (グアノシンーリン酸)量の向上から、**上記のプリン塩基の中でもグアニンおよびグアニンに関連する代謝経路が cAMP 添加による正の制御に寄与しているという仮説を提唱した。**
- (5) 上記を受けて、グアニンと関連する反応に対して競合阻害を示す 7-メチルグアニンを添加することで、グアニン関連代謝を阻害することを試みた。結果として、7-メチルグアニンの添加によって菌体合成およびアクチノロージンの生産量が有意に阻害された。また同時に cAMP を 7-メチルグアニン添加試料に同時に添加することで、7-メチルグアニンによって阻害される反応が cAMP による正の制御の下流に存在することの証明を試みた。その際に、コントロール実験として、グアノシンと競合阻害する 7-メチルグアノシンを培養培地に同様に添加し、本試料に対しても cAMP の添加を行った結果、コントロールである 7-メチルグアノシン添加試料では阻害された菌体量とアクチノロージン生産量の cAMP 添加による回復が観測されたのに対して、7-メチルグアニン添加試料では阻害された菌体量とアクチノロージン生産量の回復が観測されなかった。**本結果から、7-メチルグアニンによって阻害される反応は cAMP による正の制御の下流に存在しており、cAMP による正の制御において重要な役割を有していることが示された。**

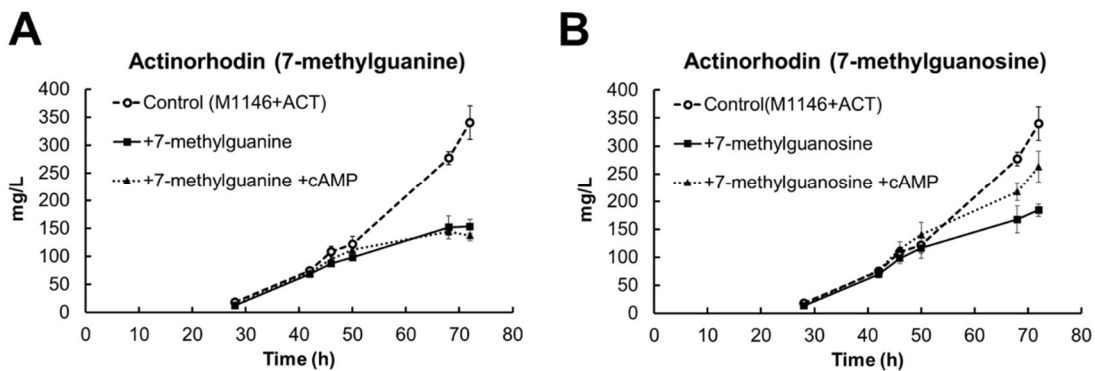


図6 阻害剤の添加および cAMP 添加による阻害の補完結果

(A) : M1146+ACT 株に 7-methylguanidine および cAMP を添加した際のアクチノロージン生産量 (N=3) (B) : M1146+ACT 株に 7-methylguanosine および cAMP を添加した際のアクチノロージン生産量 (N=3)

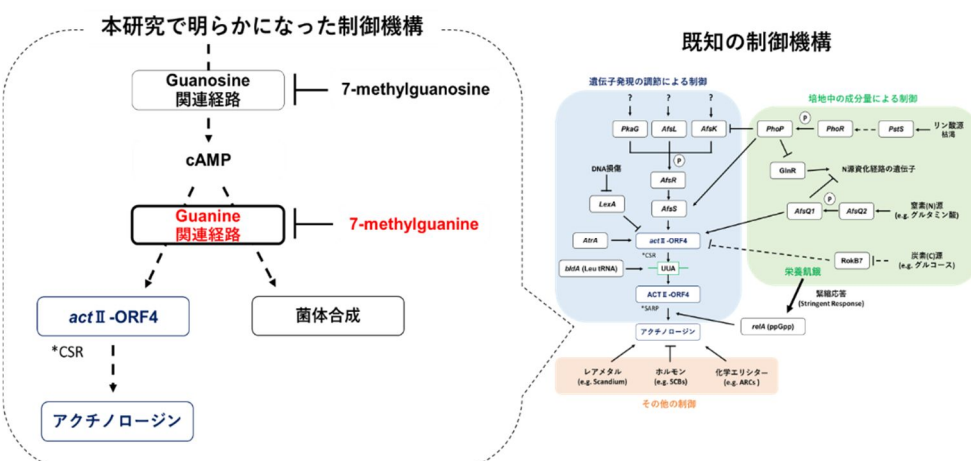


図7 本研究によって新たに明らかになったアクチノロージン生産制御機構

本結果より本研究は *S. coelicolor* における抗生物質生産に関連する制御機構の更なる解明を達成した。本研究はメタボローム解析を基盤としたマルチオミクス解析の *S. coelicolor* への適用を行う研究において端緒を開くものになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nitta Katsuaki, Carratore Francesco Del, Breitling Rainer, Takano Eriko, Putri Sastia P., Fukusaki Eiichiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Multi-Omics Analysis of the Effect of cAMP on Actinorhodin Production in Streptomyces coelicolor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2020.595552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nitta Katsuaki, Breitling Rainer, Takano Eriko, Putri Sastia P., Fukusaki Eiichiro	4. 巻 5
2. 論文標題 Investigation of the effects of actinorhodin biosynthetic gene cluster expression and a rpoB point mutation on the metabolome of Streptomyces coelicolor M1146	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bioscience and Bioengineering	6. 最初と最後の頁 525-536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbiosc.2021.01.002	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 該当する

1. 著者名 Iman Marvin Nathanael, Herawati Elisa, Fukusaki Eiichiro, Putri Sastia Prama	4. 巻 9
2. 論文標題 Metabolomics-driven strain improvement: A mini review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2022.1057709	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sastia P. Putri, Katsuaki Nitta, Francesco Del Carratore, Rainer Breitling, Eriko Takano, Eiichiro Fukusaki
2. 発表標題 Correlation between cAMP and actinorhodin production in Streptomyces coelicolor: a multi-omics approach
3. 学会等名 Metabolomics Society 2021（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sastia P. Putri, Katsuaki Nitta, Francesco Del Carratore, Rainer Breitling, Eriko Takano, Eiichiro Fukusaki
2. 発表標題 Metabolomics-driven approach for microbial strain improvement
3. 学会等名 Symposium on synthetic biology approaches and its applications (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

This research project was conducted in collaboration with Prof. Eriko Takano of the University of Manchester. She obtained a funding from BBSRC in collaboration with my research group and we held a joint symposium to disseminate the result of this collaboration in Osaka University in November 2022. Several postdocs and faculty member involved in the collaboration visited Osaka University to discuss about future collaboration and deliver our results in the joint symposium.

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
研究協力者	福崎 英一郎 (Fukusaki Eiichiro)	大阪大学・工学研究科・教授 (14401)	

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
---------	---------