

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05799

研究課題名(和文)カナマイシン生産放線菌の遺伝子増幅機構を利用した分子育種法(ZouA法)の確立

研究課題名(英文) Establishment of Molecular Breeding Method (ZouA Amplification) Using the Mechanism of Kanamycin-Producing Actinomycetes

研究代表者

石崎 仁将 (ISHIZAKI, Yoshimasa)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・主任研究員

研究者番号：10414103

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)：日本初の抗生物質であるカナマイシン(KM)は、放線菌の一種によって生産されますが、この株は、ゲノムDNAのKMの生産に必要な領域を多コピー化し、生産量をもつています。本研究では、このシステムを他の細菌株の抗生物質生産に関与するDNA領域に適用し(この技術をZouA法と呼んでいます)、この領域の多コピー化と抗生物質の生産量増加を目指しました。

その結果、KM生産菌と同属の菌株1株とこれとは遠縁のグラム陰性菌2株においてDNA領域の多コピー化と、このうち2株については抗生物質の生産量が最大で5倍に高められることを確認しました。また、目的の株を効率よく選出す方法も確立しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ZouA法の応用例として、カナマイシン生産株の近縁株において色素の高生産については報告がありましたが、有用化合物の高生産、また遠縁の株におけるこの技術の適用は他に報告がありません。本研究の結果は、ZouA法が有用物質を生産するすべての細菌に、さらにはより高等な微生物、酵母やカビに対しても適用可能である事を期待させます。

また、ZouA法は現在知られている他の技術より簡便です。さらには既に抗生物質の発酵生産に使われている微生物が元来持つシステムで安全性にも問題がないと思われるので、直ちに社会に貢献できる技術であると考えられています。

研究成果の概要(英文)：Kanamycin, the first antibiotic developed in Japan, is produced by a strain of bacteria classified as actinomycete. This strain has a system in which it selectively amplifies only the region of the genomic DNA related to kanamycin production, which enable an enhancement in productivity. In this study, we aimed to apply this system to the DNA region involved in antibiotic production in other bacterial strains and enhance the production by amplifying this region.

As a result, we observed the amplification of the DNA region in three strains, one belonging to the same genus as the kanamycin-producing strain, and the others being distantly related Gram-negative bacteria. We confirmed that the production of antibiotics in these two strains could be increased up to five times the original level. Furthermore, we established an efficient method for selecting the desired strains.

研究分野：微生物遺伝学

キーワード：分子育種 遺伝子増幅 ZouA法

1. 研究開始当初の背景

医薬品開発の分野において、天然物、とりわけ放線菌をはじめとする微生物の生産物は今もなお最も重要なシーズである。一方で、微生物生産物およびその誘導体を医薬品として利用する際、その生産量がネックになる。微生物培養物の多くはその複雑な構造のため安価な化学合成が困難であり、高生産株を用いた発酵生産に頼ることがほとんどである。

しかしながら、ゲノム解析が一般化し、代謝産物生合成遺伝子クラスターの同定が比較的容易になった今日においても、目的の代謝産物のみを高生産する株の取得プログラムは、変異剤処理や紫外線照射とスクリーニングを繰り返すという偶発的な事象に期待する古典的な方法に依存しているのが現状である。遺伝学的手法による高生産株の獲得(分子育種)はいくつか提案されてはいるものの、それぞれに難点がありいずれも一般化していない。したがって、多くの微生物株に対して容易に適用可能で、代謝産物の工業レベルでの使用に耐えうる高生産に繋がる遺伝子操作法が開発できれば、微生物による物質生産における大きな転換点になると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、kanamycin 生産株 *Streptomyces kanamyceticus* が持つ DNA 配列増幅機構に着目した。この株も古典的な育種によって高生産化が達成された一例であるが、育種株においては kanamycin 生合成遺伝子クラスターがゲノム中でタンデムに増幅していることが明らかになっている。この多コピー化は、DNA relaxase 様タンパク質 ZouA の作用により、145kb 離れた 2 箇所の認識配列 RsA, RsB で相同組換えを起こし、rolling circle 型の複製が起こる事により生じたと考えられる(図1)。

本研究では、この株が持つ *zouA* 遺伝子と RsA, RsB を他種、他属の細菌株の二次代謝産物生合成遺伝子に適用し(以下 ZouA 法と呼ぶ)、遺伝子増幅と生産物の生産量増加を達成し、またどのような機構によって遺伝子増幅が生じるのかを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、最終的に 3 株の抗生物質等生産菌の生合成遺伝子クラスターに着目した。具体的には kanamycin 生産株と同属の *Streptomyces* sp. MM630-62F2 株の caprazamycin 生合成遺伝子クラスター (*cpz* cluster)、kanamycin 生産株とは遠縁のグラム陰性菌である大腸菌の cellulose 生合成遺伝子クラスター (*bcs* cluster)、および大腸菌同様グラム陰性菌の *Photorehabdus kharii* DSM3369 株の darobactin 生合成遺伝子クラスター (*dar* cluster) である。これらの生合成遺伝子に ZouA 法を適用し、生合成遺伝子クラスターの増幅をゲノムシーケンズおよび qPCR で確認し、また抗生物質等の生産量を確認した。

また、上記の過程で ZouA タンパク質発現用のプラスミドを作製することになるので、発現精製、活性評価系の構築を目指した。

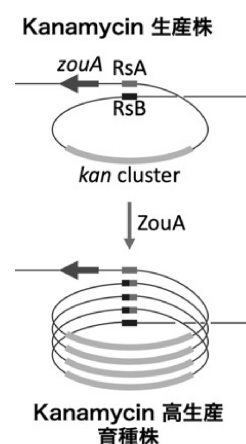


図1 Kanamycin 生産株が持つ遺伝子増幅機構。

4. 研究成果

(1) *Streptomyces* sp. MM630-62F2 株の *cpz* cluster

まず本菌株について、遺伝子操作系を確立した。ゲノムの遺伝子改変については2回相同組換え法を用いた。Selection marker としては hygromycin と apramycin への耐性、counterselection marker としては *Pseudomonas stutzeri* 由来の cytosine deaminase 遺伝子 *codA* による 5-fluorocytosine 感受性が使用できることを見出した。

図2の要領で作製した ZouA 法適用株を apramycin で選抜したところ、目的の遺伝子領域 (repeating unit) が増幅した株は得られたものの、目的の菌株の選抜に mg/ml オーダーの apramycin を必要とすること、また遺伝子増幅によらない耐性株も得られることが判明した。今回使用した apramycin 耐性遺伝子 *acc(3)-IV* (図2では *aac* と表記) が kanamycin に対しても軽度の耐性を与える事を経験的に知っていたため、この ZouA 法適用株を kanamycin で選抜したところ、50 µg/ml 程度の kanamycin で目的の増幅株を効率よく選抜することができた。得られた株は 30 コピーの *cpz* cluster を保持しており、親株と比較して 5 倍以上の caprazamycin 生産性を確認した。

続いて、conventional な育種で得た caprazamycin 高生産変異株に ZouA 法を適用した。ところが期待に反して caprazamycin 生産性は低下する結果となった。予想された事ではあるが、抗生物質の高生産には生合成遺伝子クラスターの多コピー化のみならず、基質の確保や高生産に対する自己耐性の強化等の要因も必要であると考えられた。

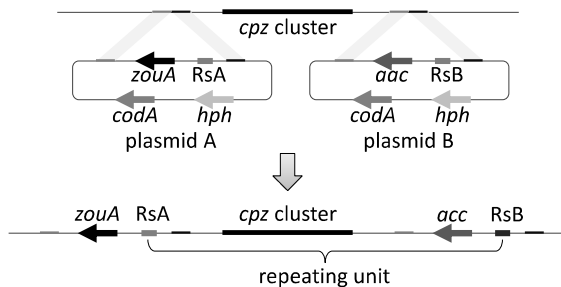


図2 Caprazamycin 生産菌の caprazamycin BGC (*cpz* cluster) への ZouA 法の適用方法。 *aac*: apramycin 耐性遺伝子, *hph*: hygromycin B 耐性遺伝子, *codA*: cytosine deaminase (5-fluorocytosine 感受性化) 遺伝子。

(2) 大腸菌株の *bcs* cluster

まずは大腸菌 *Escherichia coli* BL21-AI 株を用いて cellulose 生合成に関与する *bcs* cluster の増幅を試みた。ゲノム DNA 中の *bcs* cluster の一方の端に *RsA*、他方に *RsB* および *acc(3)-IV* を挿入し、また大腸菌の実験室株は遺伝子変異のため cellulose 非生産であるため、cluster 内にレポーター遺伝子として *gfp* を導入した。pET ベクターを用いて *zouA* を T7 promoter 制御下で発現させたところ、*bcs* cluster の増幅と GFP の緑色蛍光の増大が確認された。ただし *culster* 増幅は inducer である arabinose を添加しなかったときに限られたことから、ZouA の発現は基底レベルで差し支えなく、高発現は却って宿主の生育に阻害的に作用するのかもしれない。

本実験では ZouA タンパク質の単離精製も目指したが、完全長 (約 160kDa) の ZouA タンパク質の発現を確認するには至らなかった。その原因として、*zouA* 遺伝子の GC 含量が高い事や、上述の ZouA 発現による増殖阻害が考えられる。

また申請時には図3の要領で ZouA 活性検出用プラスミドを作製する事を計画していたが、2つのプラスミドを共存させた株は kanamycin に対する明確な耐性化を示さず、また repeating unit が多コピー化したプラスミドを有する株が優先化する事もなかった。

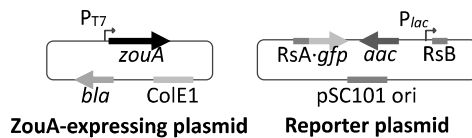


図3 大腸菌を用いた ZouA 活性の検出。左; pET ベクター由来の ZouA-expressing plasmid, 右; 低コピープラスミド pSC101 由来の Reporter Plasmid。

3) グラム陰性菌 *Photorhabdus kharii* DSM3369 株の *dar* cluster

Darobactin 産生株であるグラム陰性菌 *Photorhabdus kharii* DSM3369 株の darobactin 生合成に關与する *dar* cluster へ ZouA 法を適用した。本菌株の遺伝子操作系を確立し、ゲノム DNA 中の上流に RsA, 下流に RsB および *acc(3)-IV* を挿入し、p15A 系のプラスミドに arabinose promoter 制御下の *zouA* 遺伝子を導入した。Kanamycin を用いて遺伝子増幅株の選抜したところ、得られた株の遺伝子クラスターのコピー数は 50 を超え、darobactin 生産能は親株の 2.5 倍に達した。放線菌以外の細菌において ZouA 法による抗生物質の生産性向上が確認されたのは今回の例が初めてである。グラム陰性菌は放線菌とは遠縁であり、本株に ZouA 法の適用が可能であったことは、ZouA 法が細菌全般に適用できる事を期待させる。

4) 真核生物における適用可能性の検討

加えて、真核生物（真菌）における ZouA 法の適用可能性について、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて検討を開始した。*zouA* 遺伝子の発現方法や RsA と RsB に挟まれた領域の塩基長、多コピー化株選抜のための薬剤耐性遺伝子等について検討を行っているが、現在までに多コピー化を達成するには至っていない。このうち薬剤耐性遺伝子については bleomycin (BLM) 耐性遺伝子 *tImA* に着目している。この遺伝子は細胞生物学分野で *ShBle* と呼ばれている BLM 結合タンパク質をコードしており、野生型は高い BLM 耐性を宿主に付与するが、結合部位に変異を導入する事で耐性度を下げられる事が分かった。これを使用し大腸菌へ ZouA 法を適用したところ、BLM による多コピー化株の選抜に成功したことから、出芽酵母においても多コピー化株選抜に *tImA* を使用できると考えている。

以上のように、本研究においては kanamycin 生産株が持つ遺伝子領域増幅機構を利用する ZouA 法を利用して、同属の放線菌のみならず遠縁のグラム陰性菌に対しても適用可能であることを明確に示した。遺伝子増幅のみで 2.5~5 倍の抗生物質高生産を達成したことから、ZouA 法により得られた株をさらに conventional な育種に供することで、より抗生物質を高生産する派生株を得ることができると考えている。

また、本研究では真核生物への展開として出芽酵母への適用検討も開始した。遺伝子増幅の達成には至っていないが、多コピー化株の選抜に *tImA* 遺伝子が使用できる目途がついたので、今後は ZouA に細胞核局在化シグナルを付加するなど、真核生物における DNA 複製の特性を考慮した検討を進めていく予定である。

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〕

微生物化学研究所ウェブサイト
<https://www.bikaken.or.jp>

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

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