

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780068

研究課題名（和文） 薬剤耐性付与による放線菌からの RNA ポリメラーゼ変異株の分離と新抗生物質の探索

研究課題名（英文） Isolation of RNA polymerase mutants of actinomycetes through the acquisition of drug resistance and discovery novel antibiotics

研究代表者

保坂 毅（HOSAKA TAKESHI）

信州大学・ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点・助教

研究者番号：50391206

研究成果の概要（和文）：リファンピシン耐性を付与する *rpoB* 変異（RNA ポリメラーゼ β -サブユニットをコードする遺伝子における変異）を利用して放線菌細胞内の RNA ポリメラーゼ（転写）を改変することで、放線菌の潜在的な二次代謝産物の生産能力を効率よく活性化できることを明らかにした。この原理を通常の培養では抗生物質をほとんど生産しない *Streptomyces* 属放線菌に活用して、実際に新しい抗生物質ピペリダマイシンを発見することにも成功した。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrated the pragmatic method for efficiently activating unexpressed or poorly expressed actinomycetes gene to synthesize secondary metabolites through a mutation that confers resistance to rifampicin targeting the RNA polymerase; a specific mutation in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase β -subunit) dramatically altered gene expression in actinomycetes by modulating the transcriptional apparatus (i. e., RNA polymerase). This method allowed the discovery of piperidamycin, a novel antibiotic produced by *Streptomyces* sp. 631689, which rarely produces antibiotics in any type of culture media.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2011 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

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

1. 研究開始当初の背景

ゲノム生物学の飛躍的な進歩に伴い、多種多様な微生物の全ゲノム配列が次々と解読されている。その解析結果から、微生物、とりわけ代表的な抗生物質生産菌である放線菌においては、二次代謝産物の生産に繋がる遺伝子の多くが潜在的に存在していること

が判ってきた。このような潜在遺伝子は、当然ながらこれまで利用されることなく見過ごされてきた部分であるが、抗生物質をはじめとする様々な生理活性を示す有用な二次代謝産物の生産に関与している可能性がある。従って、国内外の多くの研究者が放線菌における潜在遺伝子の有用性に着目し、その

活性化と利用に向けた技術開発に取り組み始めている。

リファンピシンは、細菌の RNA ポリメラーゼに作用して、RNA 合成の開始反応を阻害する抗生物質である。細菌におけるリファンピシン耐性の表現型は、RNA ポリメラーゼの β -サブユニットをコードする遺伝子 (*rpoB* 遺伝子) 内の突然変異により現れることが知られている。興味深いことに、放線菌において、リファンピシン耐性を付与する特定の *rpoB* 変異が生じると、二次代謝産物の生産性が著しく増大する現象が見出された。

2. 研究の目的

本研究は、放線菌を対象に、これらが保有する潜在的な二次代謝産物合成遺伝子 (潜在能力) を最大限に活用することで、放線菌の高度利用を目指そうとするものである。背景で述べたように、リファンピシン耐性を付与する特定の *rpoB* 変異が、放線菌の潜在能力発現において重要な役割を果たし得ることが判ってきた。本研究では、“放線菌の潜在的な抗生物質生産能力の活性化における *rpoB* 変異の有効性の検証”，および“RNA ポリメラーゼ変異による潜在遺伝子活性化のメカニズムの解明”，以上 2 点の課題に取り組み、放線菌の潜在能力発現における RNA ポリメラーゼ変異の重要性とその利用のための論理的基盤を構築し、新しい抗生物質を発見することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 放線菌からのリファンピシン耐性変異株の取得と *rpoB* 変異の特定

本研究では、通常の培養では抗生物質生産を示さない放線菌を実験材料とした。これら放線菌に対するリファンピシンの最小生育阻止濃度 (MIC) を決定し、MIC の 2 倍～数十倍濃度のリファンピシンを含む放線菌用寒天培地を用いた薬剤耐性選抜法によりリファンピシン耐性変異株を取得した。取得したリファンピシン耐性変異株は寒天培地にて適宜培養し、得られた培養物を黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* 209P) を検定菌とした抗菌試験に供した。抗菌物質生産が認められたリファンピシン耐性変異株を抗生物質生産活性化変異株とした。また、これら変異株の *rpoB* 遺伝子をシーケンシングし、抗生物質生産の活性化に関わる *rpoB* 変異を特定した。

(2) 放線菌から取得した *rpoB* 変異株が生産する抗生物質の単離・精製および構造解析

(1) の検討で得られた活性化 *rpoB* 変異株が生産する抗生物質を培養抽出物から単離・精製 (オープンカラムクロマトグラフィーや HPLC を使用) し、NMR (核磁気共鳴) や MS (質量分析) により構造解析を行った。

(3) *rpoB* 変異による放線菌の潜在的な二次代謝産物 (抗生物質) 生産能力の活性化機構の解析

(1) および (2) の検討から代表的な活性化 *rpoB* 変異株を選び解析を行った。*rpoB* 変異株とその親株を液体培養し、対数増殖期と定常期の菌体から RNA ポリメラーゼを調製した。特定遺伝子のプロモーター領域への結合能を指標に、野生型 RNA ポリメラーゼと変異型 RNA ポリメラーゼの機能を比較解析した。変異型 RNA ポリメラーゼの特質を明らかにすることで、*rpoB* 変異と潜在的な二次代謝産物生産 (抗生物質生産) 能力の活性化との関連を考察した。

4. 研究成果

(1) 放線菌 *Streptomyces* sp. 631689 の潜在能力活性化による新抗生物質の発見

抗生物質非生産性の放線菌 *Streptomyces* sp. 631689 から 45 菌株のリファンピシン耐性変異株を取得し、それらの抗生物質生産性を調べるとともに *rpoB* 変異を特定した。その結果、*rpoBH437L* や *rpoBH437D*、*rpoBH437R*、*rpoB437Y* といった変異を有する変異株が顕著な抗生物質生産を示すことが明らかとなった (図 1)。すなわち、特定の *rpoB* 変異により、生産量が低レベルで検出できなかった *Streptomyces* sp. 631689 の抗生物質生産性を検出可能なレベルまで向上させることに成

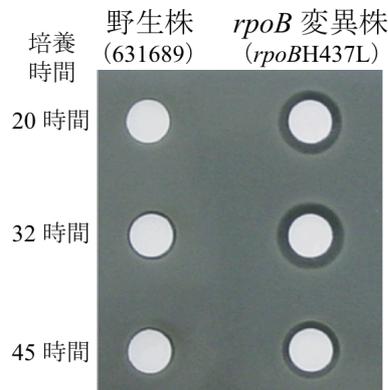


図 1 *rpoBH437L* 変異による *Streptomyces* sp. 631689 の抗菌物質生産活性化

功した。さらに、これら変異株が生産する抗生物質を単離・精製し、構造解析を行ったところ、ピペリジン 4 分子を包含する新奇な構造を持つ抗生物質 (ピペリダマイシンと命名) であることが明らかになった (図 2)。本研究の成果は、リファンピシン耐性を付与する *rpoB* 変異を活用して放線菌の潜在的な二次代謝産物生産能力を活性化すれば、従来にはない新しいタイプの抗生物質を発見できることを世界で最初に実験的に証明したものであり、国際的評価が極めて高い学術誌 Nature Biotechnology 誌に掲載された [雑誌論

文①：Hosaka *et al.* 2009]。

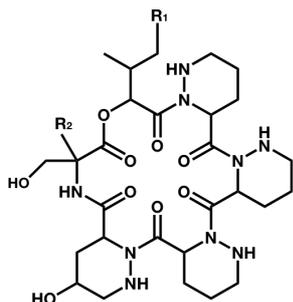


図2 *Streptomyces* sp. 631689 から取得した *rpoB* 変異株が生産する抗生物質ピペリダマイシンの構造

(2) 抗生物質非生産性放線菌の潜在能力活性化におけるリファンピシン耐性変異 (*rpoB* 変異) の有効性検証

(1) の検討により、リファンピシン耐性を付与する *rpoB* 変異を利用して放線菌の潜在的な抗生物質生産力 (潜在能力) を活性化すれば、新しい抗生物質を発見できることが明らかになった。しかし、本アプローチによる新抗生物質の発見例は、ピペリダマイシンでの一例にとどまっていた。そこで、放線菌からの抗生物質探索研究における本アプローチの真価を明らかにするために以下の検討を行った。

国内各地の土壌から 244 菌株の放線菌を定法に従い分離した。これらの放線菌を 3 種類の代表的な放線菌寒天培地を用いて培養し (1~7 日間)、抗菌試験に供した。いずれの培地および培養時間においても抗菌物質生産を示さなかった 11 菌株を抗生物質非生産性放線菌として選抜した。これら 11 菌株の放線菌からリファンピシン耐性変異株を取得し、各変異株の抗生物質生産性を評価した。その結果、リファンピシン耐性付与により、11 菌株中 6 菌株の潜在的な抗生物質生産能を活性化できたことが明らかになった (表 1)。

表 1 薬剤耐性付与による抗生物質非生産性放線菌の潜在的抗生物質生産力の活性化

| 菌株 | 近縁種 (16S rRNA 遺伝子の配列相同性) | 抗生物質生産活性化頻度 (%) [活性化菌株数/供試菌株数] | |
|---------|---|-----------------------------------|----------------|
| | | リファンピシン耐性変異株 | ストレプトマイシン耐性変異株 |
| THSU-1 | <i>Streptomyces</i> sp. 10-6 (99.9%) | 0 [0/100] | 0 [0/100] |
| THSU-2 | <i>Streptomyces</i> sp. 10-6 (99.7%) | 43 [43/100] | 1 [1/100] |
| THSU-3 | <i>Streptomyces thermocarboxydus</i> DSM44294 (99.9%) | 38 [38/100] | 7 [7/100] |
| THSU-4 | <i>Streptomyces</i> sp. 10-6 (99.9%) | 6 [6/100] | 4 [4/100] |
| THSU-5 | <i>Streptomyces sangleri</i> (100%) | 25 [25/100] | 0 [0/66] |
| THSU-6 | <i>Kilusatorpora arboriphila</i> (99.9%) | 34 [26/76] | 0 [0/25] |
| THSU-7 | <i>Streptomyces</i> sp. E85 (99.9%) | 0 [0/77] | 0 [0/7] |
| THSU-8 | <i>Nocardia nigritensis</i> (99.1%) | 3 [2/62] | 0 [0/100] |
| THSU-11 | <i>Streptomyces</i> sp. JL164 (99.2%) | - ^{a)} | 0 [0/67] |
| THSU-12 | <i>Streptomyces glauciniger</i> (99.5%) | 0 [0/100] | 0 [0/100] |
| THSU-15 | <i>Nocardia nova</i> strain S559 (99.9%) | - ^{a)} | 0 [0/100] |

^{a)} 変異株を取得できなかった。

Streptomyces sp. THSU-2 や THSU-3 のように約 4 割もの高頻度で抗生物質生産を示すリファンピシン耐性変異株が出現したケースもあった。興味深いことに、同検討をストレプトマイシン耐性変異を活用して行ったところ、活性化に成功した菌株は 11 菌株中 3 菌株で、活性化菌株の出現もリファンピシン耐性変異活用の場合と比べて低頻度であった。以上の結果からみても、抗生物質非生産性放線菌の潜在能力活性化にリファンピシン耐性変異の活用が極めて有効であることが明らかになった。

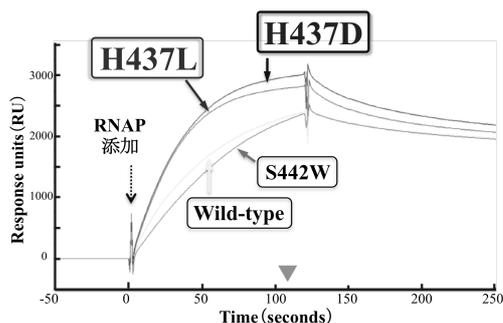
特に著しい抗生物質生産の活性化が認められた *Streptomyces* sp. THSU-2 のリファンピシン耐性変異株について *rpoB* 変異の特定を行った。その結果、活性化菌株は *rpoBD427V* や *rpoB437R*, *rpoBH437Y* といった変異を有することが明らかになり、抗生物質非生産性放線菌の潜在能力を引き出す *rpoB* 変異も特定できた。

一方、本検討により、様々な放線菌から数多くの活性化リファンピシン耐性変異株 (*rpoB* 変異株) を取得できたが (延べ 150 菌株)、活性化により新たに生産が認められた抗生物質の単離・精製および構造解析には至らなかった。この課題に取り組むことで、ピペリダマイシンに続く新抗生物質発見を達成できるものと考え、現在、本課題についてさらに検討を進めている。

(3) *rpoB* 変異による放線菌の潜在的な抗生物質生産能力活性化機構の解析

本検討では、*Streptomyces* sp. 631689 の野生株、ピペリダマイシン生産の活性化が認められた *rpoBH437L* 変異株や *rpoBH437D*, *rpoB* 変異を有するがピペリダマイシン生産力を獲得できなかった *rpoBS442W* 変異株を用いた。各菌株の対数増殖期および定常期における菌体から RNA ポリメラーゼを調製し、特定遺伝子 (放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の抗生物質生産や気菌糸形成に関わる遺伝子) のプロモーター領域への結合能を表面プラズモン共鳴装置 (Biacore 3000) を用いて解析した。その結果、ピペリダマイシン生産を示した *rpoB* 変異株の定常期における RNA ポリメラーゼは、それら遺伝子のプロモーターへの結合力が野生型 RNA ポリメラーゼよりも強いことが明らかになった (図 3、ピペリダマイシン生産を示さない *rpoBS442W* 変異株の RNA ポリメラーゼの結合力は野生型と同レベルであった)。厳密な証明にはほど遠いが、*rpoBH437L* および *rpoBH437D* 変異型 RNA ポリメラーゼがピペリダマイシン生合成遺伝子の発現制御に関わるプロモーターへの高い親和力を獲得したことで、同遺伝子の転写が促進し、結果的にピペリダマイシン生産の活性化が起き

たものと考察した。放線菌には多種多様なシ



リガンド：dsDNA (*actII-orf4p*) [*Streptomyces coelicolor* A3(2)]

アナライト：25 nM RNA ポリメラーゼ(定常期の菌体から調製)

図3 野生型および *rpoB* 変異型 RNA ポリメラーゼのプロモーターへの結合力

グマ因子が存在することから、野生型と *rpoB* 変異型の RNA ポリメラーゼホロ酵素では、機能しているシグマ因子が異なるため、プロモーターへの親和力が変化したとも推察できる。実際に *rpoB* 変異によりどのような仕組みで放線菌の抗生物質生産が活性化されるのか、詳細については、放線菌基準株 *Streptomyces coelicolor* A3(2) から取得した *rpoB* 変異株なども用いて、現在も解析を進めている。

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)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- ① Imai, Y., Fujiwara, T., Ochi K., Hosaka, T., Development of the ability to produce secondary metabolites in *Streptomyces* through the acquisition of erythromycin resistance, *The Journal of Antibiotics*, 査読有, 2012, in press.
DOI:10.1038/ja.2012.16
- ② 保坂毅, 今井優, 藤原達也, 放線菌の転写及び翻訳系の改変による潜在能力の開発と抗生物質の探索, 信州大学農学部紀要 (*Journal of the Faculty of Agriculture Shinshu University*), 査読有, 48 巻, 2012, 9-16.
URL:<http://karamatsu.shinshu-u.ac.jp/publications/kiyou/>
- ③ Tanaka Y., Hosaka T. and Ochi K., Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthesis gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *The Journal of Antibiotics*, 査読有, Vol. 63, 2010, 477-481.
DOI:10.1038/ja.2010.53
- ④ 越智幸三, 保坂毅, 亀山眞由美, 村松秀行, 村上果菜, 鶴海泰久, 小谷真也, 吉田充, 藤江昭彦, 微生物の「休眠遺伝子」を目覚めさせて新抗生物質を発見, 農林水

産技術研究ジャーナル, 査読有, 33 巻, 2010, 22-25.

URL:<http://www.afftis.or.jp/books/order/journal/yousi/3303.htm#7>

- ⑤ 越智幸三, 保坂毅, 田中幸徳, 放線菌の『休眠遺伝子』覚醒技術の開発, *バイオサイエンスとインダストリー*, 査読有, 67 巻, 2009, 413-417.

URL:http://www.jba.or.jp/publish/mokuji_shoroku/bi0908.html

- ⑥ Hosaka, T., Ohnishi-Kameyama, M., Muramatsu, H., Murakami, K., Tsurumi, Y., Kodani, S., Yoshida, M., Fujie, A. and Ochi, K., Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12, *Nature Biotechnology*, 査読有, Vol. 27, 2009, 462-464.
DOI:10.1038/nbt.1538

- ⑦ Sato, M., Takahashi, K., Ochiai, Y., Hosaka, T., Ochi, K. and Nabeta, K., Bacterial alarmone, guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp), predominantly binds the beta' subunit of plastid-encoded plastid RNA polymerase in chloroplasts, *ChemBioChem*, 査読有, Vol. 10, 2009, 1227-1233.

DOI:10.1002/cbic.200800737

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 保坂毅, 微生物の転写及び翻訳系の改変による潜在能力の顕在化と有用二次代謝産物の発掘, 日本農芸化学会大会産学官学術交流委員会フォーラム, 2012 年 3 月 24 日, 京都女子大学.
- ② 岩川千紘, 今井優, 越智幸三, 保坂毅, 放線菌の抗生物質高生産 *rpsL* (S12) 変異株の定常期に存在する翻訳活性化因子の解析, 日本農芸化学会大会, 2012 年 3 月 23 日, 京都女子大学.
- ③ Hosaka T., Fujiwara T., Sen K., Ochi K., Dramatic changes in phenotypic and biochemical properties of *Streptomyces* sp. 631689 by generating a spontaneous gentamicin-resistant mutation, International Union of Microbiological Societies: IUMS2011 年大会 (2011 年度日本放線菌学会大会), 2011 年 9 月 8 日, 札幌コンベンションセンター.
- ④ Imai Y., Fujiwara T., Sen K., Ochi K., Hosaka T., A spontaneous erythromycin resistance mutation in *Streptomyces lividans* elicits an ability to produce antibacterial compounds, International Union of Microbiological Societies: IUMS201 年大会 (2011 年度日本放線菌学会大会), 2011 年 9 月 8 日, 札幌コンベンションセンター.
- ⑤ 保坂毅ら他 4 名, リファンピシン耐性変異とストレプトマイシン耐性変異の活用

による抗生物質非生産性放線菌の潜在能力開発, 第 12 回静岡ライフサイエンスシンポジウム, 2011年3月4日, 静岡県立大学.

- ⑥ 保坂毅ら他 4 名, RNA ポリメラーゼ変異やリボソーム変異による放線菌の抗生物質生産活性化機構の解明, 第 12 回静岡ライフサイエンスシンポジウム, 2011 年 3 月 4 日, 静岡県立大学.
- ⑦ 保坂毅, 微生物の潜在遺伝子活性化による有用二次代謝産物の探索, 山梨大学学術研究会 2010, 2010年11月26日, 山梨大学.
- ⑧ 保坂毅ら他 6 名, 薬剤耐性付与による抗生物質非生産性放線菌の潜在能力活性化, 日本放線菌学会 2010 年度大会, 2010 年 9 月 3 日, タワーホール船堀 (東京) .
- ⑨ 保坂毅, 潜在遺伝子活性化による有用放線菌の創出, 平成 21 年度科学交流フォーラム第 11 回静岡ライフサイエンスシンポジウム, 2010 年 3 月 5 日, 静岡大学.
- ⑩ 保坂毅, 放線菌の潜在的な抗生物質生産力を活性化する RNA ポリメラーゼ変異とリボソーム変異, 日本農芸化学会中部支部第 157 回例会若手シンポジウム, 2009 年 11 月 14 日, 信州大学.

[その他]

ホームページ等

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.OULNjFkV.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

保坂 毅 (HOSAKA TAKESHI)

信州大学ファイバーナノテク国際若手研究者育成拠点・助教

研究者番号：50391206