

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 25 年 5 月 7 日現在

機関番号：35302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658029

研究課題名（和文）ロドコッカス属細菌における二次代謝産物生成遺伝子群の誘導条件の探索とその応用

研究課題名（英文）Application and exploring of the induction condition of secondary metabolites producing genes in *Rhodococcus jostii* RHA1

研究代表者

原 啓文 (HARA HIROFUMI)

岡山理科大学・工学部・准教授

研究者番号：80511071

研究成果の概要（和文）：土壌由来放線菌・*Rhodococcus jostii* RHA1 株に存在する二次代謝産物生成遺伝子群の誘導条件の探索を行った。9 種類のポリケチド合成酵素および非リボソーム性ペプチド合成酵素の誘導条件の探索を行った結果、液体培地または固体培地で特定の条件に応答して二次代謝産物生成遺伝子群の誘導が認められた。今後、特定の条件下で生産される二次代謝産物の化学構造を特定し、新規化合物の特定を試みる。

研究成果の概要（英文）：

Rhodococcus jostii RHA1 was grown on a broad range of aromatic compounds and vigorously degrades environmental pollutants, such as polychlorinated biphenyls (PCBs). Based on the genome analysis of RHA1, many secondary metabolites genes including polyketide synthase (PKS) and non-ribosomal dependent peptide synthase (NRPS) were found on chromosome and plasmids, as same as other actinomycetes. In this study, induction conditions of these genes were investigated to understand what is a role of secondary metabolites from these genes on particular conditions. Type I, type III, PKS-NRPS hybrid, and NRPSs on plasmid were mainly induced on solid medium. On the other hands, type II PKSs were induced on liquid medium. For understanding of the secondary metabolism in actinomycetes, we are now trying to analyze chemical composition of these secondary metabolites.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	540,000	3,740,000

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：放線菌、ロドコッカス属、ゲノム、抗生物質生産、転写誘導

1. 研究開始当初の背景

土壌細菌である放線菌は、抗生物質を始めとする多種多様な二次代謝産物を生産することで知られるグラム陽性細菌である。近年、

放線菌群の中で抗生物質生産菌として知られている *Streptomyces* 属のゲノム配列が解読・公表された (Bentley *et al.*, 2002, Ikeda *et al.*, 2003, Ohnishi *et al.*, 2008)。こ

これらのゲノム解析から、*Streptomyces* 属細菌は1種類の二次代謝産物を生合成する遺伝子群のみを有しているのではなく、PKS および NRPS を含む 20~30 種類の二次代謝産物を生合成する遺伝子群を有していることが明らかとなった。一方、同じ放線菌群に属する *R. jostii* RHA1 株は、ポリ塩化ビフェニルやフタル酸エステル類を含む難分解性芳香族化合物を分解する菌として単離・解析され、2006年に全ゲノム解析が解読・公表された。驚くべきことに、RHA1 株には PKS および NRPS を含む約 30 の二次代謝産物生合成遺伝子群が存在することが明らかとなり、網羅的転写解析から難分解性芳香族化合物による二次代謝産物生合成遺伝子群の転写活性化が確認された。この結果は、RHA1 株に存在する二次代謝産物生合成遺伝子群が難分解性環境汚染物質の存在のような何らかの環境ストレスを感知して転写誘導されることを示唆している。一方 *Streptomyces griseus* の網羅的転写解析から、生育条件（液体および固体培地）の違いで二次代謝産物生合成遺伝子群を含む全 ORF の転写パターンが異なっていることが明らかとなり（論文執筆中）、一種の菌株が何らかの環境条件の違いを認識して異なる二次代謝産物を生合成している可能性が強く示唆された。現在までロドコッカス属細菌からの二次代謝産物は報告されていないことは、ロドコッカス属細菌が環境汚染物質分解を始めとするバイオレメディエーションへの応用を主眼として解析されたのに対して、二次代謝産物について現在まで全く解析されていないことを意味している。

2. 研究の目的

ロドコッカス属細菌は、環境保全やバイオテクノロジーにおいて高い重要性を持つ、高 G+C の好気性グラム陽性の放線菌である。また、放線菌群は抗生物質を始めとする多種多様な二次代謝産物を生産することで知られ、発酵工業や医薬品業界においても重要な菌群である。*R. jostii* RHA1 株は環境汚染物質の一つであるポリ塩化ビフェニル (PCB) を含む幅広い難分解性芳香族化合物を好氣的に分解する高い能力を有し、現在までバイオレメディエーションへの応用を目指し分解酵素遺伝子や転写制御因子を含む詳細な解析がなされてきた。

2006年、ロドコッカス属において世界で初めての例として、本菌株の全ゲノム配列が解読・公表された (McLord *et al.*, 2006)。RHA1 株は、1つの線状染色体と3つの線状プラスミドからなる全長 9.7 Mb、9,145 個のオープンリーディングフレーム (ORF) を有しており、機能予測からポリケタイド合成酵素

(PKS) や非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) を含む多くの二次代謝産物生合成遺伝子群の存在が明らかとなった。さらにビフェニルを含む各種芳香族化合物で生育した菌体の転写変動を全 ORF に対応するマイクロアレイを用いて網羅的に調べたところ、PKS および NRPS を含む二次代謝産物生合成遺伝子群の転写変動が認められた (Edmilson *et al.*, 2006, Hara *et al.*, 2007)。この結果はロドコッカス属細菌で PKS や NRPS を含む二次代謝産物生合成遺伝子群が転写されていることを意味しており、RHA1 株が何らかの二次代謝産物を生合成していることを示唆している。

上記の背景から、放線菌群に属するロドコッカス属細菌である RHA1 株の二次代謝産物生合成遺伝子群の誘導条件の探索を試みた。

3. 研究の方法

RHA1 株には、複数の PKS および NRPS が存在しており、それぞれが遺伝子クラスターを形成している。始めに、それぞれの PKS および NRPS 遺伝子クラスターの内部に構造遺伝子を破壊しないように同一転写方向に GFP 遺伝子を挿入した。

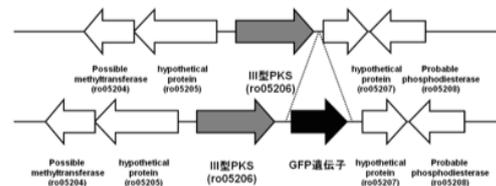


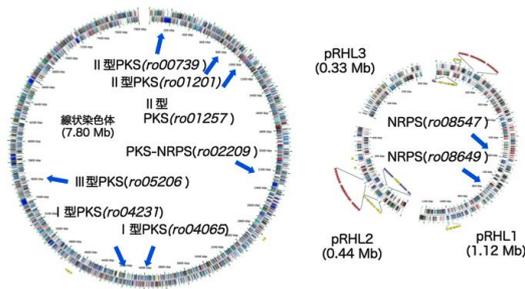
図1 III型PKS遺伝子(ro05206)クラスターへのGFP遺伝子の挿入

RHA1 株では pK18*mobsacB* を用いた効率的な 2 回組換え体の作製方法が確立されており (van de Geize *et al.*, 2003)、本法によって GFP を挿入した遺伝子組換え体を作製する。得られた GFP 挿入組換え体を、LB 培地の濃度を変更し貧栄養・富栄養および塩濃度を変更した培地、ビフェニル、フタル酸などの各種環境汚染物質を含む最少塩培地から窒素源やリン酸源を抜いた飢餓状態など、液体・固体培養によって培養することで、GFP 挿入組換え体が蛍光を示す条件を探索した。

4. 研究成果

本研究では、I 型 PKS (*ro04065*, *ro04231*)、II 型 PKS (*ro00739*, *ro01201*, *ro01257*)、III 型 PKS と相同性を示す脂肪酸生合成遺伝子 (*ro05206*)、PKS-NRPS 融合遺伝子 (*ro02209*) およびプラスミドに存在する NRPS (*ro08547*, *ro08649*) の 9 種類の二次代謝産物生合成遺伝子群の誘導条件を探索した。

放線菌 *Rhodococcus jostii* RHA1株にあるPKSとNRPS



以下の表に、栄養源・浸透圧による影響と、炭素・窒素・リン酸源による影響を示す。数字は、同じ誘導条件で培養した野生株との蛍光強度の比を表し、蛍光強度比が2以上を有意な値として示している。

栄養源・浸透圧による影響

	菌株	培地	富栄養 (LB)			貧栄養 (1/5 LB)		
			低浸透圧 (NaCl: 0.17%)	中浸透圧 (NaCl: 0.50%)	高浸透圧 (NaCl: 1.50%)	低浸透圧 (NaCl: 0.17%)	中浸透圧 (NaCl: 0.50%)	高浸透圧 (NaCl: 1.50%)
I型PKS	ro04065	液体	-	-	-	-	-	-
		固体	-	12.69	14.44	-	12.68	-
	ro04231	液体	-	-	-	-	-	-
		固体	-	-	12.09	14.80	13.77	13.74
II型PKS	ro00739	液体	18.57	139.3	12.10	-	-	-
		固体	-	-	-	-	-	16.89
	ro01201	液体	12.49	-	-	-	-	-
		固体	-	-	-	-	-	13.00
ro01257	液体	12.01	16.16	12.60	-	-	-	
	固体	-	-	-	-	128.4	-	
III型PKS	ro05206	液体	-	-	-	-	-	-
		固体	-	-	-	12.28	-	-
PKS-NRPS	ro02209	液体	-	-	-	-	-	-
		固体	-	12.28	-	17.54	-	-
プラスミドにあるNRPS	ro08547	液体	-	-	-	-	-	-
		固体	-	-	-	12.63	-	-
	ro08649	液体	-	-	-	-	-	-
		固体	-	-	-	-	-	-

※数字はタンパク質量をあわせ、591 nmにおける野生株の蛍光強度を1.00としたときの値2.00以上を有意な値とした。

炭素・窒素・リン酸源による影響

	菌株	培地	ビフェニール		安息香酸		フタル酸		テレフタル酸	
			リン酸・窒素あり	リン酸・窒素なし	リン酸・窒素あり	リン酸・窒素なし	リン酸・窒素あり	リン酸・窒素なし	リン酸・窒素あり	リン酸・窒素なし
I型PKS	ro04065	液体	-	-	-	-	2.43	-	-	3.46
		固体	-	123.2	-	-	-	-	-	-
	ro04231	液体	-	-	-	-	2.13	-	-	2.82
		固体	-	119.3	-	-	-	-	-	-
II型PKS	ro00739	液体	-	-	-	12.77	-	-	-	-
		固体	-	-	-	-	-	12.00	-	-
	ro01201	液体	-	-	-	-	-	-	-	-
		固体	-	-	12.22	16.82	-	-	-	-
ro01257	液体	-	-	-	-	-	-	-	-	
	固体	-	-	-	-	-	-	-	-	
III型PKS	ro05206	液体	-	-	-	-	-	-	-	-
		固体	-	12.37	-	-	-	-	12.69	-
PKS-NRPS	ro02209	液体	-	-	-	-	-	-	-	-
		固体	-	-	-	-	12.65	-	12.19	-
プラスミドにあるNRPS	ro08547	液体	-	-	-	-	-	-	12.34	12.91
		固体	-	12.15	-	-	-	-	-	-
	ro08649	液体	-	-	-	-	12.61	-	-	-
		固体	-	12.31	-	-	-	12.40	-	-

※数字はタンパク質量をあわせ、591 nmにおける野生株の蛍光強度を1.00としたときの値2.00以上を有意な値とした。

栄養源や炭素源、飢餓状態を変化させた場合、上記の表に示すように I 型, III 型, PKS-NRPS, およびプラスミドに存在する NRPS は主に固体培地で転写誘導が認められるのに対して、II 型 PKS は主に液体培地で誘導が見られるという転写誘導の特徴を見出した。また、その転写誘導レベルは各培養条件に依存して変化することが明らかとなった。栄養源と浸透圧を変化させた場合、5倍以上野生株と比べて傾向強度が上昇しているものと

して、液体培地・富栄養・中浸透圧条件下で II 型 PKS である ro00739 が 39.3 倍、液体培地・富栄養・低浸透圧で 8.57 倍、固体培地・貧栄養・高浸透圧条件下で 6.89 倍、液体培地・富栄養・中浸透圧条件下で II 型 PKS である ro01257 が 6.18 倍、固体培地・貧栄養・中浸透圧条件下で 28.4 倍、固体培地・貧栄養・低浸透圧条件下で PKS-NRPS 融合遺伝子である ro02209 が 7.54 倍と高い誘導が認められた。一方、炭素・窒素・リン酸源を変化させた場合、ビフェニールを炭素源とした場合窒素飢餓状態の固体培養で I 型 PKS である ro04231 が 19.3 倍、安息香酸を炭素源とした場合窒素飢餓状態の液体培地で II 型 PKS である ro01257 が 5.52 倍野生株と比べて誘導されることが明らかとなった。これらの結果は、特定の条件下で何らかの二次代謝産物が生成されていることを示しており、何らかのストレス耐性に寄与していることが想像される。これらの遺伝子群から生成される化合物の構造は決定することは出来なかったが、ロドコッカス属細菌において、ポリケチド構造を有する化合物が液体・固体培地や飢餓状態などの環境条件を認識して生産されていることが推定でき、新規な結果であるといえる。

これらの研究成果から、RHA1 株は特定の条件下で特有の二次代謝産物を生成していることが明らかとなった。従って、ロドコッカス属細菌を含めた放線菌も RHA1 株と同様に、特定の条件下で特有の二次代謝産物を生成していることが予想される。本研究成果の応用として、ゲノム解析がなされていない土壌から単離された放線菌群を、今回特定した誘導条件で培養させることで、液体培地からは II 型 PKS から生成される二次代謝産物が、固体培地からはそれ以外の二次代謝産物生成遺伝子群から得られる産物が得られ、ゲノム解析を介し二次代謝産物生成遺伝子群を特定せずに、これまでに得られなかった新規な二次代謝産物が得られることが期待出来る。また、今回得られる成果からは、特定の条件下で生産される二次代謝産物の放線菌群における生理学的な役割が明らかに出来ることが期待され、なぜ原核微生物のうちの放線菌群だけが二次代謝産物を生成する能力を得ることが出来たのか問いに対して、何らかの示唆を与えられることが期待出来る。

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0件)

〔学会発表〕（計1件）

石田 浩一、李 文、原 啓文、ロドコッカス
属細菌における二次代謝産物生合成遺伝子
群の誘導条件の探索
生物工学会西日本支部 講演会、2012年7月
7日（土）、岡山大学津島キャンパス

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 啓文 (HARA HIROFUMI)

岡山理科大学・工学部・准教授

研究者番号：80511071