

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780071

研究課題名(和文) プテノライド型誘導因子による放線菌二次代謝の分子機構

研究課題名(英文) Regulation of Streptomyces secondary metabolism by a butenolide-type autoregulator

研究代表者

木谷 茂 (Kitani, Shigeru)

大阪大学・生物工学国際交流センター・准教授

研究者番号：10379117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プテノライド型シグナルが放線菌の二次代謝をどのように誘導するのか？という分子機構の解明、シグナルが機能する放線菌の探索とシグナル系操作による休眠二次代謝の覚醒を目的とした。有用駆虫薬エバメクチン生産菌において、シグナル、その受容体とホモログ、シグナル生合成酵素による相互制御ネットワークがエバメクチン生産を調節していることを明らかにした。また、受容体遺伝子破壊やシグナル添加が休眠化合物の生産を覚醒できることが分かった。プテノライド型シグナルを産生する放線菌を同定したことより、シグナルを活用した放線菌分子育種が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Autoregulators elicit secondary metabolism by binding to the cognate receptors in actinomycetes. In this study, I report the molecular mechanism for the regulation of secondary metabolism by a butenolide-type autoregulator as another type of signaling molecule, the identification of actinomycetes producing the autoregulator, and the useful method for finding sleeping compounds in the genome. I demonstrated that the regulatory network composed of autoregulator, receptor, receptor-homologues, and autoregulator biosynthetic enzymes controls antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. Furthermore, gene inactivation of the receptor (homologue) genes or exogenous addition of the autoregulator led to increased production of silent compounds. These findings indicated that a butenolide-type autoregulator is a key molecule for not only understanding secondary metabolism in actinomycetes but also activating the numerous useful silent natural products.

研究分野：応用微生物

キーワード：抗生物質生産 放線菌 エバメクチン *Streptomyces avermitilis*

1. 研究開始当初の背景

放線菌の二次代謝は、ホルモン様低分子シグナルにより誘導され、多彩な生物活性物質を産み出す。60%の放線菌群で二次代謝を誘導するブチロラクトン型シグナル経路の研究を通じて、研究代表者は、他の放線菌群で機能する新規シグナル物質(プテノライド型シグナル)を、二次代謝に関する情報が豊富であり、かつ有用駆虫薬エバメクチンの生産菌でもある放線菌 *Streptomyces avermitilis* より単離・構造決定し、制御カスケードの存在を報告した。本カスケードの詳細は、放線菌二次代謝制御に学問的ブレークスルーをもたらすと同時に、休眠遺伝子群の強制発現による新規生物活性物質の生産誘導など、産業への展開価値が高いと考えられる。したがって、研究代表者は、(i) プテノライド型シグナルの制御カスケードを明らかにすれば、ブチロラクトン型シグナル単独では成し得なかった、生物活性物質の生産性向上や未発掘の有用遺伝子資源を発見できる、(ii) プテノライド型シグナルの物質生産への有効性を示せば、両シグナルの培養液への添加により、有用物質生産能力を覚醒する方法が提案できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、(i) 放線菌二次代謝の新たな制御系の分子メカニズムを明らかにするべく、プテノライド型シグナルがどの分子経路を経て、生物活性物質の生産を誘導するのか?という制御カスケードの解明、(ii) プテノライド型シグナルが産業利用に資する可能性を追求するため、プテノライド型シグナルが機能する放線菌の探索とシグナル添加による二次代謝の覚醒、を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、プテノライド型シグナル制御系を解明する放線菌として、*S. avermitilis* を主要研究対象菌とした。また、プテノライド型シグナル制御系解明の手掛かりとなり得るブチロラクトン型シグナル産生菌 *Streptomyces virginiae* と *Streptomyces lavendulae* FRI-5、またシグナル未同定菌 *Kitasatospora setae* も対象とし、ホルモン様シグナルによる放線菌二次代謝制御系の総合的な理解と有用物質生産への応用にも取り組んだ。

ゲノム情報を精査し、シグナル受容体(様)遺伝子を推定した後、各遺伝子破壊株を構築、代謝物生産プロファイルや形態分化などの詳細な表現型解析に基づき、各遺伝子の機能を明らかにした。極微量しか生産しないプテノライド型シグナルは、シグナル受容体のDNA結合能がシグナルに影響する現象に基づき、ゲルシフトアッセイ法によりその活性量を測定した。プテノライド型シグナルを産生する放線菌を同定するため、シグナル生合成に関わる遺伝子を破壊した *S. avermitilis*

aco 株を用いた()。同時に、ブチロラクトン型シグナルを産生する放線菌を検出するため、シグナル生合成遺伝子破壊株2種(*S. virginiae barX*株と *S. lavendulae* FRI-5 *farX*株)を用いた()。また、シグナル産生放線菌の調査対象として、独立行政法人製品評価技術基盤機構・バイオテクノロジーセンター(NBRC)に寄託されている放線菌と研究代表者が保有する植物内生放線菌を用いた。放線菌培養液の酢酸エチル抽出物をこれらのシグナル生合成欠損株3種に添加し、酢酸エチル抽出物に生産誘導される二次代謝物をHPLCにより解析することで、放線菌集団におけるプテノライド型シグナルとブチロラクトン型シグナルの産生分布状況を調査した。シグナル物質の放線菌培養液への外部添加が二次代謝に与える影響を調査するため、プテノライド型シグナル1種(エバノライド)とブチロラクトン型シグナル2種(VBとIM-2)を各種放線菌の培養液に添加し、変動する代謝物成分をHPLCにより解析した。

4. 研究成果

研究の主な成果

(1) 二次代謝制御におけるシグナル受容体の機能解析

研究代表者は、*S. avermitilis* のエバメクチン生産誘導因子としてプテノライド型シグナルであるエバノライドを同定している。このエバノライドの受容体としてAvaR1を見出しているが、エバメクチン生産制御におけるその詳細な機能は明らかではない。また、*avaR1* 遺伝子の隣接領域には、エバノライド生合成遺伝子である *aco* と *cyp17* に加え、2つの *avaR1* 相同遺伝子 *avaR2* と *avaR3* が位置する。遺伝子破壊株の表現型解析により、AvaR3はエバメクチン生産、胞子形成、菌糸断片化を正に調節する因子であることを明らかにしているが()、AvaR2の生理的機能は不明なままであった。したがって、遺伝子破壊株解析や生化学的解析などにより、AvaR1とAvaR2の二次代謝制御における役割を明らかにすることにした。

大腸菌で発現させ精製したAvaR1タンパク質は、*aco* 遺伝子上流領域だけではなく、*avaR1*、*avaR2*、*avaR3* の各遺伝子上流領域にも特異的に結合した。これらの結合DNA配列から、AvaR1が認識する保存配列を見出すことができた。したがって、AvaR1がこれらの遺伝子の転写を調節することが示唆された。次に、*avaR1* 破壊株のエバメクチン生産量を測定したところ、予想に反し、野生型株と比較して破壊株の生産量に変化は観察されなかった。しかしながら、AvaR1結合DNA配列がエバノライド生合成遺伝子上流領域に位置するため、AvaR1がエバノライド生合成を調節するのではないかと推測した。そこで、*avaR1* 破壊株の表現型を精査した結果、エバノライド生合成遺伝子 *aco* の転写量が増加す

ると共に、エバノライド生産量が増大していた。以上の結果から、AvaR1 はエバノライドの生産を負に調節する因子であることが明らかになった。低分子シグナル制御系が、そのシグナル分子の生合成自体を生産制御する例は、近年知られてきており、研究代表者は *S. lavendulae* FRI-5 の IM-2 制御系においても、同様の制御メカニズムを確認した。

次に、*avaR2* 破壊株の表現型を解析した結果、エバメクチン生産は 20%低下し、胞子形成能は 70%低下した。*avaR2* と *avaR1* の機能関連を調べるべく、*avaR1/avaR2* 二重破壊株を構築したが、明瞭なエバメクチン生産の変化は観察されなかった。また、転写解析により、AvaR2 は *avaR* 遺伝子と *aco* 遺伝子に対しては負の、エバメクチン生産経路特異的制御因子 *aveR* に対しては正の転写調節をすることが分かった。したがって、エバノライドと 3つの *avaR* 遺伝子から構成される相互転写ネットワークが、エバメクチン生産を巧妙に制御していることが本研究より明らかとなった。また、二次代謝を制御する新たな因子として、エバメクチン生産を正に制御する DeoR 型制御因子 SdrA を同定したが、エバノライド制御系との関連は現在のところ、不明である。

(2) シグナル受容体の遺伝子破壊が及ぼす休眠二次代謝への影響

放線菌シグナル受容体の主要二次代謝産物への生産制御については、研究されているが、その他の二次代謝産物に関する生産制御研究は少なく、その関連性は不明である。そこで、研究代表者がこれまでに構築したシグナル受容体(様)遺伝子破壊株の代謝物を詳細に解析することで、シグナル受容体の二次代謝制御への機能関与を広範囲に検証することにした。

avaR3 破壊株の代謝物プロファイルを精査した結果、野生型株のピークと比較して、*avaR3* 遺伝子破壊に依存して顕著に増大するピークを1つ見出した。当該ピークを精製し、MS解析とNMR解析によりその化学構造を同定したところ、セルロース生合成阻害剤フトキサゾリンであることが分かった。*S. avermitilis* のゲノム情報を *in silico* 解析したが、フトキサゾリン生合成を担う遺伝子群は見出せなかったことから、フトキサゾリン生合成の新規経路が存在することが期待される。同様に、シグナル未同定菌である *K. setae* において、シグナル受容体遺伝子 *ksbC* を機能解析したところ、新規 β -カルボリン化合物キタセタリンとその類縁体を同定することに成功した。微生物からの β -カルボリン化合物の発見は珍しく、ブテノライド型シグナル制御系が本化合物の生産制御に関与することは興味深い。以上の結果から、シグナル受容体の遺伝子破壊は休眠二次代謝を覚醒することが明らかとなり、新規物質の発見に繋がる有用ツールとなり得ることが

分かった。

(3) シグナル外部添加が与える二次代謝への影響

ブチロラクトン型を始めブテノライド型シグナルを各種放線菌の培養液に添加した場合、二次代謝にどのような影響が生じるかは示されていない。ホルモン様シグナル分子の実用的応用性を検証するため、各種シグナルを各種放線菌に投与し、二次代謝産物生産の変化を HPLC により解析した。

放線菌 50 種の培養液に、エバノライド、VB、IM-2 の各シグナルを添加したところ、7種の放線菌にて二次代謝プロファイルがシグナル依存的に変化した。しかし、培養再現性を検討したところ、最終的にエバノライドの逐次的な添加により2種の放線菌にて二次代謝プロファイルが安定的に変化した。したがって、エバノライドを含むシグナル物質の外的な培養液添加は、休眠二次代謝を覚醒する可能性が示された。

(4) シグナル産生活性を示す放線菌の同定

放線菌の二次代謝制御において、いずれの放線菌がブテノライド型またはブチロラクトン型のシグナルを産生するかは、興味深い。また、以前の研究からブチロラクトン型シグナルは放線菌の 60%が産生するデータを得ているが、残り 40%がブテノライド型シグナルを産生するかは定かではない。したがって、シグナル欠損株を駆使し、シグナル型の分布を調査することにした。

以前の研究では、シグナル産生能を検出するため、シグナルを産生するオリジナル野生型株に対する二次代謝誘導能を指標にしていた。しかしながら、エバノライドの単純添加は、エバメクチン生産を誘導しないため、この方法では、その活性を検出することができない。そこで、シグナル生合成遺伝子を破壊したシグナル生合成欠損株を利用することにした。シグナル生合成欠損株では、シグナルが生産されず、誘導される二次代謝物も生産しない。この欠損株に、シグナル物質を含んでいると推定される各種放線菌の培養抽出物液を加え、二次代謝物生産が誘導されることを指標にして、シグナル産生活性を検出することにした。NBRC に寄託されている 39 株と研究代表者が保有する植物内生放線菌 14 株を液体培養し、培養液の酢酸エチル抽出物中に含まれるシグナル活性を3種類のシグナル生合成欠損株にて測定した。その結果、13株、つまり25%の放線菌がエバノライド産生活性を示すことが明らかとなり、ブテノライド型シグナルはエバメクチン生産菌以外も広く分布することが示された。また、40%の放線菌が複数のタイプのシグナル分子を産生することも分かった。次に、ブテノライド型シグナル産生活性を示す一部の放線菌にて、その遺伝子情報を解析した結果、シグナル受容体遺伝子またはシグナル生合成

遺伝子と相同性を示す遺伝子が存在することが明らかとなった。したがって、これらの放線菌は、ブテノライド型シグナル制御系の普遍性を証明するモデル放線菌になると考えられる。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究から、ブテノライド型シグナルによる二次代謝制御は、シグナル受容体とそのホモログ、またシグナル生合成酵素が相互かつ密接に関連することにより、成立していることが明らかとなった。研究が進んでいるブチロラクトン型シグナル制御系と比較した場合、その複雑さは際立っている。したがって、エバノライド制御系、または本研究で見出したブテノライド型シグナル産生活性を示す放線菌の二次代謝制御系をより詳細に解明することで、放線菌二次代謝の新たな制御モデルを提唱することができると考えられる。

また、シグナル受容体の遺伝子破壊や培養液へのシグナル外部添加が休眠二次代謝を覚醒できることを、本研究により初めて示した。これらの方法を幅広い放線菌に適用することにより、これまでにない新規有用物質の獲得がより一層進むことが期待される。

<引用文献>

Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, Herawati E, Iguchi H, Nishitomi K, Uchida M, Nagamitsu T, Omura S, Ikeda H, and Nihira T. Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 108:16410-5. 2011.

Kitani S, Doi M, Shimizu T, Maeda A, and Nihira T. Control of secondary metabolism by *farX*, which is involved in the γ -butyrolactone biosynthesis of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. Arch Microbiol. 192:211-20. 2010.

Lee YJ, Kitani S, and Nihira T. Null mutation analysis of an *afsA*-family gene, *barX*, that is involved in biosynthesis of the γ -butyrolactone autoregulator in *Streptomyces virginiae*. Microbiology 156:206-10. 2010.

Miyamoto KT, Kitani S, Komatsu M, Ikeda H, and Nihira T. The autoregulator-receptor homologue AvaR3 plays a regulatory role in antibiotic production, mycelial aggregation and colony development of *Streptomyces avermitilis*. Microbiology 157:2266-75. 2011.

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4件)

Daduang R, Kitani S, Sudoh Y, Pait IGU, Thamchaipenet A, Ikeda H, Igarashi Y, and Nihira T. 29-Deoxymaklamicin, a new maklamicin analogue produced by a genetically engineered strain of *Micromonospora* sp. NBRC 110955. J Biosci Bioeng. In press. 2015. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.004. 査読有り

Kurniawan YN, Kitani S, Maeda A, and Nihira T. Differential contributions of two SARP family regulatory genes to indigoidine biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* FRI-5. Appl Microbiol Biotechnol. 98:9713-21. 2014. DOI: 10.1007/s00253-014-5988-9. 査読有り

Ulanova D, Kitani S, Fukusaki E, and Nihira T. SdrA, a new DeoR family regulator involved in *Streptomyces avermitilis* morphological development and antibiotic production. Appl Environ Microbiol. 79:7916-21. 2013. DOI: 10.1128/AEM.02843-13. 査読有り

Aroonsri A, Kitani S, Hashimoto J, Kosone I, Izumikawa M, Komatsu M, Fujita N, Takahashi Y, Shin-ya K, Ikeda H, and Nihira T. Pleiotropic control of secondary metabolism and morphological development by KsbC, a butyrolactone-autoregulator receptor homologue in *Kitasatospora setae*. Appl Environ Microbiol. 78:8015-24. 2012. DOI: 10.1128/AEM.02355-12. 査読有り

[学会発表](計9件)

Daduang R, 木谷 茂, Thamchaipenet A, 五十嵐 康弘、新家 一男、池田 治生、仁平 卓也、植物内生放線菌由来スピロテトロン酸系抗生物質マクラマイシン生合成遺伝子群の機能解析、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 28 日、岡山大学(岡山市・岡山県)

木谷 茂、上口 達也、Thamchaipenet A、五十嵐 康弘、仁平 卓也、タイ王国由来海洋放線菌からの新規生理活性物質の探索、日本放線菌学会大会 2014 年度大会、2014 年 6 月 19 日、つくばカピオ(つくば市・茨城県)

木谷 茂、Kurniawan YN、前田 亜紗、土井 理至、仁平 卓也、 γ -Butyrolactone autoregulator system of secondary metabolism in *Streptomyces lavendulae* FRI-5、第 17 回国際放線菌学会、2014 年 10 月 8 日~10 月 12 日、クシャダス(トルコ)

木谷 茂、微生物ゲノムに潜む休眠生理活性物質の生産覚醒、(公社)新化学技術推

進協会 第3回新化学技術研究奨励賞受賞講演(招待講演) 2014年5月30日、新化学技術推進協会(東京都)

上田 祥平、木谷 茂、Aroonsri A、池田治生、仁平 卓也、放線菌由来 -カルボリン化合物キタセタリン生合成遺伝子クラスターの同定、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 28 日、明治大学(川崎市・神奈川県)

Suroto DA、木谷 茂、宮本 聖子、池田 治生、仁平 卓也、放線菌 *Streptomyces avermitilis* 二次代謝制御遺伝子破壊株において生産誘導される化合物の単離と構造解析、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 29 日、明治大学(川崎市・神奈川県)

木谷 茂、福島 絵里子、野村 崇文、仁平 卓也、バージニアマイシン生産制御機構におけるオートレギュレーターレセプターホモログの機能解析、日本放線菌学会 2013 年度大会、2013 年 9 月 5 日、メルパルク広島(広島市・広島県)

Sultan SP、木谷 茂、宮本 聖子、池田 治生、仁平 卓也、抗寄生虫薬エパーメクチン生産菌における放線菌ホルモン受容体 AvaR1 の機能解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学(仙台市・宮城県)

木谷 茂、Aroonsri A、新家 一男、池田治生、仁平 卓也、放線菌ホルモン制御系の攪乱による新規 -カルボリン化合物 kitasetaline の単離とその生合成遺伝子の同定、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 25 日、東北大学(仙台市・宮城県)

[その他]

大阪大学生物工学国際交流センター分子微生物学研究室ホームページ

<http://www.nihiralab.sakura.ne.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木谷 茂 (KITANI, Shigeru)

大阪大学・生物工学国際交流センター・准教授

研究者番号：10379117