

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450155

研究課題名(和文)放線菌二次代謝制御因子の解析および多面発現制御による生合成プラットフォームの構築

研究課題名(英文) Analysis of secondary metabolite regulatory system and construction of the biosynthetic platform by multiple regulatory control

研究代表者

荒川 賢治 (Arakawa, Kenji)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：80346527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4株が生産する2つの抗生物質ランカサイジン・ランカマイシンの二次代謝制御システムに注目し、ゲノムマイニングを指向した有用物質生産系の構築を目指した。本研究により(1)シグナル分子制御カスケードは2つ目のリプレッサー *srrB*により負に制御されており、抗生物質生産の一過的発現に有効なこと、(2)本菌染色体における線状構造は、プラスミド pSLA2-L、-Mに依存していること、(3)プラスミドにコードされた制御遺伝子および主要二次代謝の変異により染色体上の二次代謝が活性化され、通常培養では見出されない化合物が蓄積すること、を見出した。

研究成果の概要(英文)：We carried out comprehensive analysis of the regulatory system in *Streptomyces rochei* 7434AN4, especially for improvement of antibiotic production and genome mining. Second repressor gene *srrB* negatively regulates lankacidin and lankamycin production by binding SARP gene *srrY*. The *tpg-tap* gene pair coded on the linear plasmids, pSLA2-L and pSLA2-M, is essential for the maintenance of linear topology of the *Streptomyces rochei* chromosome. Furthermore, multiple gene inactivation of the regulatory gene together with main biosynthetic machinery resulted in activation of silent secondary metabolite gene clusters.

研究分野：生物有機化学

キーワード：放線菌 抗生物質 制御遺伝子 ゲノムマイニング 線状染色体 ポリケチド 生合成 アゾキシアルケン

1. 研究開始当初の背景

放線菌は、微生物由来二次代謝産物の7割近くを生産する有用土壌微生物である。放線菌二次代謝産物に関して、近年では生合成遺伝子の改変による非天然型抗生物質の創製も盛んに行われており、創薬の研究シーズとして期待される。放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は、2つのポリケチド抗生物質ランカサイジン(LC)・ランカマイシン(LM) (図1)を生産し、3つの線状プラスミド pSLA2-L, -M, -S を保持している。その中でも pSLA2-L は、LC, LM 生合成遺伝子の他にもこれらの制御遺伝子や構造未知の type-II 型ポリケチド (*roc*)・カロテノイド (*crt*) 生合成遺伝子群も有しており、二次代謝生産と制御の相関性が興味深い [Mochizuki *et al.*, *Mol. Microbiol.* 48, 1501-1510 (2003)].

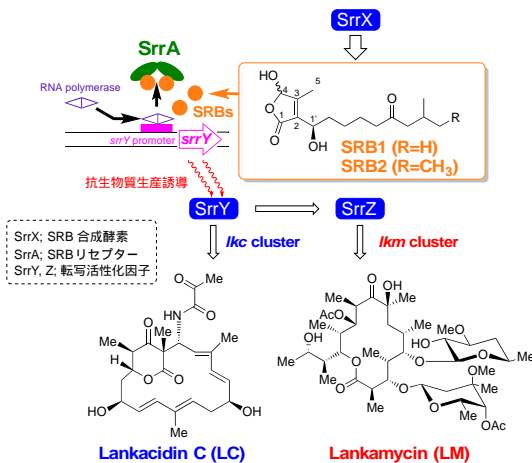


図1 LC, LMの化学構造と*S. rochei*制御カスケード

我々は今までに 17員環カルボサイクリックポリケチド化合物 LC の生合成における特異な炭素炭素結合形成反応の先導的説明およびモジュール反復機能型 PKS の分子基盤解析、14員環マクロライド化合物 LM の生合成経路解析、LC, LM 生合成の制御カスケード解析、LC, LM 生産をナノモルオーダーで誘導するシグナル分子 SRB (*Streptomyces rochei* butenolide)の単離・構造決定、を行ってきた。

本研究の開始に先立ち、二次代謝制御シス

テムの改変により休眠二次代謝が顕著に誘導されることを見出した。また二次代謝・形態分化においてプラスミド-染色体間でのクロストークが強く示唆された。我々はさらに、次世代シーケンサーによる *S. rochei* 染色体の塩基配列解析にも着手した。以上の準備状況のもと、放線菌二次代謝・制御系およびゲノム相関性の総合解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究課題では *S. rochei* の二次代謝制御システムに注目し、制御遺伝子群の網羅的解析による二次代謝シグナルカスケードの解明を目指す。また本菌のゲノム進化を明らかにすべく、染色体ゲノムの全塩基配列決定も遂行する。さらに多面発現制御により獲得した休眠二次代謝産物の生合成機構解析を行い、ゲノムマイニングを指向した有用物質生産系の構築を目指す。

3. 研究の方法

(3-1) 二次代謝制御シグナルカスケードの網羅的解析

SRB リセプター SrrA は、SARP 遺伝子 *srrY* およびリプレッサー遺伝子 *srrB* の転写抑制をしており、抗生物質生産を制御していることが予備的実験により明らかとなっている。そこでこれら制御遺伝子の多重破壊株の作製や RT-PCR による網羅的発現解析を行い、抗生物質生産における制御遺伝子間の相関性をより詳細に解析する。また、2つの SARP 遺伝子 *srrY*, *srrZ* は、それぞれ LC, LM 生合成クラスターの転写活性化に関与するが、標的遺伝子は未解明のままである。そこでこれらの標的遺伝子を発現タンパクと遺伝子ライブラリーとのゲルシフト解析などで明らかにする。また、リプレッサー *srrB* を破壊すると LC, LM 大量生産株が取得できた [Arakawa *et al.*, *Microbiology* 153, 1817-1827 (2007)]. この知見は、本菌の休眠二次代謝産物のゲノム

マイニングに応用可能であることを示唆しており、興味深い。そこで *srrB* 変異を含む多重変異株を構築し、二次代謝プロファイルを調べる。

(3-2) *S. rochei* 染色体塩基配列のアセンブルおよび ORF 解析

我々は、2011 年度から Illumina 次世代シーケンサーによる *S. rochei* 染色体の塩基配列解析に着手した。Contig 配列およびコスミドライブラリー、PCR 反応を組み合わせアセンブル作業を進めたところ、100 kb 以上の contig が 35 本（最長 Contig 長; 407 kb）得られ、他の contig とあわせたカバー長は 8.85 Mb であった。そこで本課題では、PacBio 次世代シーケンスデータとのハイブリッドアセンブルおよび ORF 解析を進める。

(3-3) 線状レプリコンの塩基配列解析に基づいたゲノム構造に関する研究

本菌の染色体塩基配列解析を行うにあたり、線状プラスミドをもたない 2-39 株のゲノム構造解析を行ったところ、野生株の染色体テロメア領域とハイブリダイズせず、2-39 株の染色体環状化が示唆された。そこでジャンクシオンクローンの取得および染色体環状化の原因遺伝子について明らかにする。

(3-4) *lkcA* 遺伝子破壊株が高蓄積するポリケチド化合物の構造解析

LC の生合成初発反応を司る NRPS-PKS ハイブリッド遺伝子 *lkcA* の遺伝子破壊株は、LC 非生産であり、さらに UV 活性化化合物を高蓄積していた。これらの構造解析を行うとともに、生合成遺伝子の探索を行う。

(3-5) 制御遺伝子破壊株から取得したアゾキシアルケン化合物の生合成起源

我々は「シグナル分子制御系」「主要二次代謝生合成」の人為的改変による休眠二次代

謝の覚醒（いわゆるゲノムマイニング）を試みている。本課題では制御遺伝子としてリプレッサー遺伝子 *srrB* に注目し、これに加えて主要二次代謝、すなわち LC, LM 生合成遺伝子への変異を行った。標的遺伝子は、前者においては PKS の KR ドメイン *lkcF-KR1*、後者においてはチオエステラーゼ遺伝子 *lkmE* を選択した。いずれも単独破壊株では該当化合物の生産は消失もしくは激減した。構築した三重変異株は、通常培養では生産しない化合物 KA57-A を蓄積した。そこで本化合物の単離・構造決定・生合成について解析する。

4. 研究成果

(4-1) 二次代謝制御シグナルカスケードの網羅的解析

S. rochei シグナルカスケードについて、*srrX* (SRB 合成酵素遺伝子) – *srrA* (SRB リセプター遺伝子) – *srrY* (SARP 遺伝子) [– LC 生産] – *srrZ* (SARP 遺伝子) – LM 生産、という主要経路を明らかにしている (図 1)。本課題ではリプレッサー遺伝子 *srrB* の制御カスケードへの関与を調べた。

各制御遺伝子破壊株における *srrA*, *srrB*, *srrY* の転写・抗生物質生産の継時変化解析を行ったところ、*SrrA* は *srrY*, *srrB* の発現制御をしており、培養中期にこれらの転写抑制が解除され、発現した *SrrB* が後期になると *srrY* 発現を再び抑制する、ということが分かった。以上により、2 つのリセプター遺伝子 *SrrA*, *SrrB* による巧妙な抗生物質の一過的生産が見出せた。また、*srrB* 破壊株は LC, LM を過剰蓄積するが、通常非生産の代謝産物も検出できた。現在代謝産物の単離・構造決定を進めている。

(4-2) *S. rochei* 染色体塩基配列のアセンブルおよび ORF 解析

イルミナ GA-II 次世代シーケンサー解析

により、100 kb 以上の contigs を 35 本までアセンブルしたが、短いものを含めると総計 170 本以上あり、ゲノム構成の全体像を把握するのは困難であった。そこで PacBio RS-II 次世代シーケンサーの解析を組み合わせたところ、contigs が 8 本まで集約できた。両末端配列以外は 16S-23S-5S rDNA オペロンであったため、PCR walking による連結を試み、最終的に全長 8.36 Mb であること、さらに二次代謝生成遺伝子クラスターは 33 個存在していることを明らかにした（ゲノム配列および論文に関しては投稿準備中）。

(4-3) 線状レプリコンの塩基配列解析に基づいたゲノム構造に関する研究

S. rochei において、pSLA2-L, -M の脱落に伴い線状染色体が環状化することを発見し、その原因がプラスミド上のゲノム末端複製因子 *tap-tpg* 遺伝子であることを明らかにした。このことはプラスミド上の線状ゲノム維持機構が、染色体のトポロジー保持にも関与していることを示唆している（発表論文）。

(4-4) *lkcA* 遺伝子破壊株が高蓄積するポリケチド化合物の構造解析

lkcA 遺伝子破壊株が高蓄積する UV 活性化化合物について、構造解析に賦したところ、28 員環ポリエンマクロライド抗生物質ペンタマイシン (PM) および直鎖状ポリケチド化合物シトレジオール・*epi*-シトレジオールであった（図 2）。PM の生合成クラスター (*pem*) は、*Streptomyces avermitilis* が生産する類縁化合物フィリピンの生合成クラスター (*pte*; 全長 80.4 kb) と比較したところ、染色体右末端 500 kb より内側にあることが示唆された。また、これらの生合成はプラスミド上のシグナル分子制御系とは独立していることが、シグナル分子合成酵素 *srrX* との二重破壊株解析により明らかとなった（発表論文）。

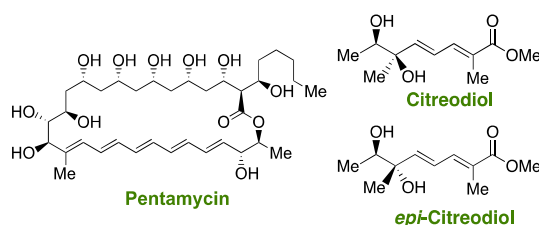


図 2 *lkcA* 遺伝子破壊株が高蓄積するポリケチド化合物

(4-5) 制御遺伝子破壊株から取得したアゾキシアルケン化合物の生合成起源

srrB, *lkcF-KR1*, *lkmE* 三重変異株を取得し、この株からアゾキシアルケン化合物 KA57-A を獲得した（図 3）。本化合物 KA57-A ($[M+Na]^+=239$) は特徴的な構造を有しており、アゾ結合の形成機構や生合成起源など興味深い点が多い。

そこで標識化合物の取り込み実験による生合成起源の探索を行った。標識酢酸の取り込み実験により、*cis*-1-ヘキセニル基 (C1'-C6') は脂肪酸由来であり、C-1 位は酢酸の 2 位炭素由来であることが示唆された。一方、C2-C4 位はアラニン由来と考えられたが、 $[3-^{13}C]$ アラニンの C-4 位への取り込みが認められなかった。そこで $[2,3,3-^2H_3]$ DL-serine を添加したところ、KA57-A の H-4 位にのみ重水素の取り込みが認められた。また $[1,1-^2H_2]$ 1-hexylamine を添加し、常法に従って精製したところ、KA57-A の他に分離困難な夾雑物が認められ ($[M+Na]^+=243$)、分子式は $C_{10}H_{20}^2H_2N_2O_3$ と示唆された。これは $[1',1'-^2H_2]1',2'$ -dihydro-KA57-A に相当しており、 2H -NMR における後者の高磁場シグナルは本化合物に対応すると考えられる。重水素標識ヘキシルアミン添加時の夾雑物の蓄積は、KA57-A 生合成における 1',2'-不飽和化がアゾキシ結合形成後に生じることを意味している（発表論文）。

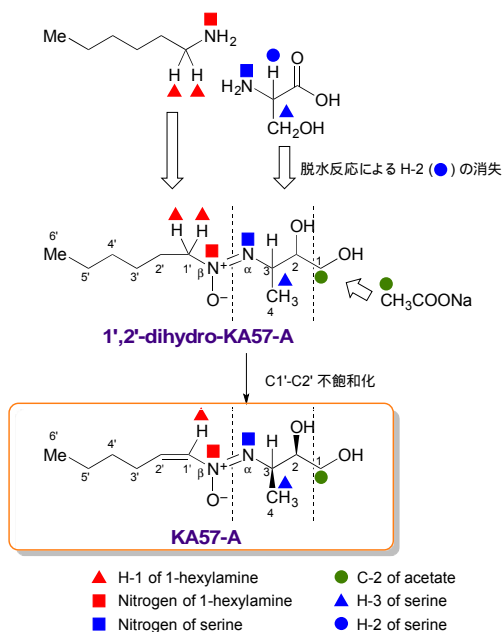


図3 KA57-Aの化学構造と推定生成成起源

本研究の成果は、雑誌論文として9件報告した。さらに本成果の基盤研究および応用志向の両面が評価され、(一財)バイオインダストリー協会から発酵と代謝研究奨励賞を授与された。

一方、国際共同研究に関して、報文こそなかったものの着実に進展しており、X線結晶に基づいた高機能分子設計(イスラエル・ワイズマン研究所 Ada Yonath 教授との共同研究)および分子構造シミュレーションに基づいた抗がん剤標的分子デザイン(カナダ・アルバータ大学 Jack Tuszynski 教授との共同研究)を進めている。

放線菌の3大特徴である二次代謝生合成、形態分化、線状ゲノム、を理解すべく、シグナル分子制御システムの解明も有機的に組み合わせることで、本研究のさらなる統合深化を目指す所存である。

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9件)

H. Kunitake, T. Hiramatsu, H. Kinashi, K. Arakawa

“Isolation and biosynthesis of an azoxyalkene compound produced by a multiple gene disruptant of *Streptomyces rochei*”
ChemBioChem, **16**, 2237-2243 (2015).

DOI: 10.1002/cbic.201500393 査読あり

Y. Nindita, Z. Cao, Y. Yang, K. Arakawa, Y. Shiwa, H. Yoshikawa, M. Tagami, A. Lezhava, H. Kinashi

“The *tap-tpg* gene pair on the linear plasmid functions to maintain a linear topology of the chromosome in *Streptomyces rochei*”
Mol. Microbiol., **95**, 846-858 (2015).

DOI: 10.1111/mmi.12904 査読あり

Z. Cao, R. Yoshida, H. Kinashi, K. Arakawa

“Blockage of the early step of lankacidin biosynthesis caused a large production of pentamycin, citreodiol, and *epi*-citreodiol in *Streptomyces rochei*”

J. Antibiot., **68**, 328-333 (2015).

DOI: 10.1038/ja.2014.160 査読あり

K. Arakawa

“Genetic and biochemical analysis of the antibiotic biosynthetic gene clusters on the *Streptomyces* linear plasmid”
Biosci. Biotechnol. Biochem., **78**, 183-189 (2014).

DOI: 10.1080/09168451.2014.882761 査読なし

Y. Nindita, T. Nishikawa, K. Arakawa, G. Wang, K. Ochi, Z. Qin, H. Kinashi

“Chromosome circularization of the model *Streptomyces* species, *Streptomyces coelicolor* A3(2)”

FEMS Microbiol. Lett., **347**, 149-155 (2013).

DOI: 10.1111/1574-6968.12228 査読あり

[学会発表](計47件)

荒川賢治、「放線菌二次代謝生合成・制御

遺伝子の分子基盤解析および有用物質発酵生産への応用」, 2015 年度発酵と代謝研究奨励賞受賞講演(2015 年 10 月 14 日・神奈川県・パシフィコ横浜)

K. Arakawa

”Manipulation of the *Streptomyces* regulatory network for engineering natural product biosynthesis”, 1st US-Japan Seminar on the Biosynthesis of Natural Products for Young Researcher (2014 年 3 月 3 日・招待講演・東京都・東京工業大学)

荒川賢治、「放線菌線状プラスミドにコードされた抗生物質生合成クラスターの遺伝学的・生物有機化学的解析」, 日本農芸化学会・中四国支部第 38 回講演会(2014 年 1 月 25 日・受賞講演・香川県・香川大学)

荒川賢治、「放線菌二次代謝制御システムの解析および物質生産への応用」, 第 65 回日本生物工学会大会シンポジウム・二次代謝生合成系の人為制御による「ものづくり」への応用(2013 年 9 月 19 日・招待講演・広島県・広島国際会議場)

荒川賢治、「放線菌線状プラスミドにコードされた抗生物質生合成・制御遺伝子の網羅的解析および物質生産への応用」, JBA 発酵と代謝研究会シンポジウム 放線菌によるヒト・動物医薬と農薬への貢献 - 探索と選抜、機能解析から新規開拓へ - (2013 年 9 月 11 日・招待講演・東京都・東京大学)

[その他]

研究室のホームページ

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/5lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒川賢治 (ARAKAWA KENJI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：80346527

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：