

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25650136

研究課題名(和文) 放線菌における系統分類と生産物質のデータベース化と新規生産株の簡易検出法の開発

研究課題名(英文) Isolation of novel antibiotic-producing Actinobacteria using with phylogenetic information

研究代表者

北川 航 (Kitagawa, Wataru)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員

研究者番号：60415669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：放線菌ロドコッカス・エリスロポリスには同属同種でありながら、異なる抗生物質生産性を示す多くの株が知られている。これらの株の16S rRNA遺伝子配列による分類は不可能であったが、gyrB遺伝子、さらには数株の完全ゲノム解析も行い、進化系統的な分類を可能にし、さらには物質生産系の合成遺伝子群を明らかにした。MLSTを含め更に解析を進め、最終的にはgyrB遺伝子のみで抗生物質生産性と一致する系統分類が可能である事がわかった。これらの結果から新たな候補株を取得した場合、gyrB配列によってその生産物の新規性も判断できると結論した。これら配列と生産物をデータベース化して利用する事が可能になった。

研究成果の概要(英文)：Numbers of antibiotic-producing strains have been identified from an Actinobacteria, Rhodococcus erythropolis. Each of the strain produces different antibiotic, whereas they are close relatives. The 16S rRNA gene sequence analysis did not classify them because of the high identity. The gyrB sequence analysis for 21 strain was performed to see the phylogenetic relation. In addition, complete genome analysis was done for the 4 of them. The MLST analysis was also tested with rpoB, recA, trpB, atpD and gyrB. These analysis demonstrated that classification by gyrB or rpoB are good match with antibiotic classification. Based on these results, we concluded that the novelty of the product can be judged by the gyrB or rpoB sequence when new candidates are obtained. Construction of database with these information helps to identify novel antibiotics and its producers.

研究分野：応用微生物学

キーワード：Rhodococcus gyrB antibiotics phylogeny バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

放線菌は抗生物質を初めとした様々な生理活性物質を生産する。特にストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属細菌の生産率は非常に高く、自然界で分離される同属細菌のうち 60-70% は何らかの物質を生産していると言われている。これまでにこれら細菌から莫大な量のスクリーニングが行われ、多くの有用物質が発見されてきたが、現在では新規物質を発見することは非常に難しくなってきた。その最も大きな理由として既存の物質を再単離するケースがあげられる。スクリーニングによって高い抗菌活性を示した場合でも、その対象物質を抽出・精製し、NMR などで構造を決定した後によく既知物質である、と判明する場合も少なくない。数多くの物質が単離・解析されている現在、これまでの手法では既知物質再単離の比率が高く、上記の様な無駄な労力を費やしてしまう危険性は高くなる一方である。これを回避する 1 つの手として 16S rRNA 遺伝子配列を利用する方法が採用されている。スクリーニングで新たに活性株が得られた後、16S rRNA 遺伝子配列を解析し、既知の生産菌と同じまたは非常に近い配列が得られた場合は「生産物質も同一」と判断し、以降の解析(対象物質の精製・構造決定など)には使用しない、という判別手法で、既存(近縁)種を更なる解析に用いずに済むことになる。しかし同種の微生物でも株によって異なる物質を生産している場合、有用物質生産菌をみすみす廃棄してしまう事にもなる。

同属同種であって株レベルで異なる微生物間において、全く異なる抗生物質を生産する事は考えられるのであろうか? 実際に我々はロドコッカス (*Rhodococcus*) 属細菌においてこのような例を報告している。*R. erythropolis* には多数の抗生物質生産菌が存在し、同属同種でありながら異なる抗生物質を生産していた(引用論文献)。これら株は、16S rRNA 遺伝子配列もほぼ完全に一致していることから、実際に近縁な微生物群であると確認された。新規生産菌を見落とさないためには、異なる手法で判別する手段が必要となる。

2. 研究の目的

16S rRNA 遺伝子以外の手法で近縁種を判別し、その分類と生産する物質の違いとの相関が得られれば、これをデータベース化する事で新規抗生物質生産菌を簡便に判別する事が可能になると考えられる。本研究では 16S rRNA 遺伝子よりも進化速度の速いハウスキーピング遺伝子に着目し、その遺伝子配列と生産物と関連について調べ、データベース化するとともに新規生産菌の簡易取得法の確立を目指す。

3. 研究の方法

これまでに報告されている抗生物質等物

質生産株について、これら株の 16S rRNA 遺伝子、*gyrB* (DNA ジャイレースサブユニット B) 遺伝子、*rpoB* (RNA ポリメラーゼ サブユニット) 遺伝子の配列、さらに生産物質の名称と構造の情報を収集する。本研究では全ての放線菌を対象にする事は作業が膨大すぎて不可能であるので、*Streptomyces* 属、*Rhodococcus* 属に焦点を絞って行う。*Streptomyces* 属はよく知られているように最も物質生産性の高い細菌のグループであり、これまでにかなりの数の菌株、物質が報告されている。*Streptomyces* 属を対象とすることにより、これまでに蓄積された多数の報告から質の良いデータベースを作成する事が出来ると考えている。*Rhodococcus* 属はこれまで抗菌物質生産菌としては知られていなかったが、本研究代表者の研究により、近年非常に物質生産能が高い事が明らかにされ、さらにタンパクや物質生産の次世代微生物宿主として注目されているグループである(引用文献 -)。

次に 16S rRNA 遺伝子、*gyrB* 遺伝子および *rpoB* 遺伝子配列のそれぞれで分子系統樹を作成する。一般的に 16S rRNA 遺伝子配列による系統解析は広い微生物種を同時に扱う場合に有用であるが、同一種など、より詳細な分類が要求される場合は解像度が低く応用出来ない。またゲノム中に多コピー存在し、さらにこれらのコピーに配列多様性がある場合も多く、詳細な分析に適さない。作成した系統樹を基に、系統関係と生産物質を体系的にまとめた物をリスト化する。加えてゲノム解析なども行い、これらの遺伝子がこの判別に有用であったかを検討する。

系統樹およびリストを基に、どの遺伝子のどの領域の配列が物質生産性と最も相関するかを判断し、その領域を増幅する PCR プライマーを設計する。このとき *gyrB* や *rpoB* のように進化速度の速い(微生物間で配列多様性に富む)遺伝子の場合、16S rRNA のようにユニバーサルなプライマー(全原核微生物の対象遺伝子を増幅できるプライマー)を設計することは困難であるため、*Streptomyces* 属にあるいは *Rhodococcus* 属にそれぞれ特異的なプライマーを設計する必要がある。また既知物質生産株との配列相同性が何%以下であれば新規物質を生産する事が期待できるかの判断基準を設定する。

4. 研究成果

(1) ロドコッカスにおける抗生物質生産: 自身の保有する菌株の生産する抗生物質および系統分類に使用できる遺伝子の調査を主として行い、その他の菌株について、あるいは種内多様性の他の同様の現象・状況については論文調査を主として行った。その結果、ロドコッカスではこれまでに 1 株で複数の抗菌活性物質を生産する例は無いことがわかった。これは系統分類と相関させるためには好都合であった。しかしストレプトマイセス

に関してはこれは当てはまらなかった。

(2) ドラフトゲノム解析：ロドコッカス属細菌における抗生物質生産の多様性と進化系統関係についてその遺伝的背景の詳細を知るため、*Rhodococcus erythropolis* の6株についてドラフトゲノム解析を行った(引用文献)。その結果平均して6.6 Mbの染色体、100 - 550 kbの線状 plasmid を0 - 2本、5 - 100 kbの環状 plasmid を1 - 3個保持しており、染色体の相同性は極めて高いものの(99%以上)、plasmid はその多様性や組み合わせのバリエーションに富んでいることが明らかとなった。系統分類の指標となる16S rRNA 遺伝子は多コピーでそれぞれゲノム内ヘテロ性を持つ事が明らかとなった。これらの配列は99%以上一致していたが、わずかな塩基の差と上記ヘテロ性の組み合わせの差を比較することでそれぞれの株を個別に識別できることが分かった。しかし通常行われる、ゲノム鋳型を鋳型にし、16S rRNA を共通して増幅する Primer を用いて PCR およびシーケンシングする方法では、これらを個別に認識することは出来無いたことが改めて明らかとなった。

(3) *gyrB* クローニング primer の設計：ドラフトゲノム解析から DNA ジャイレース遺伝子(*gyrB*)についてはそれぞれ1コピーであり、やはり塩基配列の相同性は高いものの各株で個別の置換塩基があり、*gyrB* 遺伝子配列解析のみで株レベルの識別が出来ることが確認された。配列中で塩基置換の部位にホットスポットの様なものはなく、またそのほとんどがアミノ酸置換に関わらないサイレントな変異であることがわかった。*gyrB* の PCR-シーケンシング解析においては出来るだけ長い遺伝子配列を対象にすることが有効であると思われるため、*Rhodococcus erythropolis* 用に改めて有効な PCR Primer を設計した。

(4) ロドコッカス *gyrB* 遺伝子による系統解析：ロドコッカス属細菌は近年抗生物質生産菌としても認識されてきていることから、また公開データベースにもストレプトマイセス属細菌と比べて数が少ない事から、本属の *gyrB* 遺伝子を広く解析した。すでに抗生物質(抗菌タンパク・ペプチドを含む)を生産する事が明らかになっている25株に加え、非生産株約30株の遺伝子解析を取得した。また公開データベースからも30株程度取得したが、短い部分配列である場合が多く、極めて保存性の高い本遺伝子において詳細な解析には不向きな場合(データ)が多かった。系統解析の結果、同じ抗生物質を生産するグループは系統的に極めて近い集団である事が改めて示された(1,233塩基にわたって完全に同一の配列)。しかしその他の株は特に目立ったブランチを形成せず、それぞれお互いに少しずつ離れた系統である事が示された。これらの株は抗生物質生産菌とは認識されていないが、もし活性がある株であれば *gyrB*

配列のみで既知の生産菌とは区別されずであり、判別法としては少なくともロドコッカスでは可能である事が示された。

(5) 抗生物質生産系遺伝子の解析：ランダムトランスポゾン変異導入による抗生物質非生産株の解析から、またこれまでのドラフトゲノム解析から、代表的な抗生物質生産株の3株についてその生合成系遺伝子を同定した。その結果、それぞれ全く関連の無い抗生物質を全く相同性の無い生合成遺伝子で生産している事が明らかになった(引用文献)。このことは種内多様性の広さを示している。

(6) ロドコッカスの株レベルの分類とその利用：それぞれ異なる物質生産性を示す *Rhodococcus erythropolis* 4株の完全ゲノムを決定した。これによりこれまで分類の候補としていた *gyrB* や *rpoB* だけでなく、16S rRNA 遺伝子の完全長やコピー数を明らかにする事が出来、16S rRNA 遺伝子については株毎に異なる、intragenome heterogeneity があることも明確に示された。これらの情報、およびゲノム未解析ながら *gyrB*, *rpoB* 等の部分配列を得ている株の情報から、これまでに得ていたものよりも更に詳細に進化系統関係と抗生物質生産性について解析を進める事が出来た。更に *recA* (DNA recombinase), *trpB* (tryptophan synthase beta), *atpD* (ATP synthase beta), を合わせた5遺伝子による Multi Locus Sequence Typing (MLST) 解析を本種ゲノム解析株を含む21株で行った。結果としては *gyrB* と *rpoB* はほぼ同じ解像度を持ち、MLST と同等の解像度が1遺伝子で達成されるというものであった。また *R. erythropolis* 種内(同じく21株)の *gyrB* 1000塩基あたりの変異率は5.8であり、*Pseudomonas putida* の103、*Bacillus cereus* の77.9と比べ、極めて低い事が明らかになった。これは *R. erythropolis* が極めて進化的に近縁であり、この非常に近縁株同士で異なる抗生物質を生産している事から、株内の機能的多様性は非常に大きいものと思われる。実際ゲノム解析した4株ではゲノムサイズの約4-5%が他の株には存在しない独自の配列であり、これらの独自配列がロドコッカス特有の物質分解性、物質生産性の多様性を支えているものと思われる。

(7) データベース化：ロドコッカスについてはこれらの情報を元に分類またデータベース化が可能であった。しかし抗生物質生産菌として知られるストレプトマイセスについては同一の株において複数の抗生物質生産をする株が極めて多く、また培地条件などにより生産物が異なる事から、同様の手法による分類とデータベース化は困難であると結論付けた。

<引用文献>

Kitagawa, W. & Tamura, T. Three types of antibiotics produced from *Rhodococcus erythropolis* strains. *Microbes. Environ.*

23, 167-171 (2008).

Kitagawa, W. & Tamura, T. A quinoline antibiotic from *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824. *J. Antibiot.* **61**, 680-682 (2008).

Nakashima, N. & Tamura, T. A novel system for expressing recombinant proteins over a wide temperature range from 4 to 35 °C. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 136-148 (2004).

Kitagawa, W., Hata, M., Sekizuka, T., Kuroda, M. & Ishikawa, J. Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824, an aurachin RE antibiotic producer. *Genome Announc.* **2**, (2014).

Kitagawa, W., Ozaki, T., Nishioka, T., Yasutake, Y., Hata, M., Nishiyama, M., Kuzuyama, T., & Tamura, T. Cloning and heterologous expression of the aurachin RE biosynthesis gene cluster afford a new cytochrome P450 for quinoline N-hydroxylation. *ChemBioChem* **14**, 1085-1093 (2013).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

北川航, 田村具博、ロドコッカス属細菌における抗生物質生産、バイオサイエンスとインダストリー、**73** 巻 1 号 29 頁 ~ 32 頁 (2015) 査読なし

北川航、Studies on biodegradation of recalcitrant compounds and bioproduction of antibiotic compounds by *Rhodococci*、*Actinomycetologica*、**28** 巻 2 号 3 頁 ~ 10 頁(2014) 査読あり

北川航, 波田美弥子, 関塚剛史, 黒田誠, 石川淳、Draft genome sequence of *Rhodococcus erythropolis* JCM 6824, an aurachin RE antibiotic producer. *Genome Announc.* **2**, (2014). 査読あり doi: 10.1128/genomeA.01026-14

安武義晃, 北川航, 波田美弥子, 西岡大樹, 尾崎太郎, 西山真, 葛山智久, 田村具博、Structure of the quinoline N-hydroxylating cytochrome P450 RauA, an essential enzyme that confers antibiotic activity on aurachin alkaloids. *FEBS LETTERS* **588**, 105-110 (2013). 査読あり DOI: 10.1016/j.febslet.2013.11.016

北川航, 尾崎太郎, 西岡大樹, 安武義晃, 波田美弥子, 西山真, 葛山智久, 田村具博、Cloning and heterologous expression of the aurachin RE biosynthesis gene cluster afford a new cytochrome P450 for quinoline N-hydroxylation. *ChemBioChem* **14**, 1085-1093 (2013). 査読あり doi: 10.1002/cbic.201300167

〔学会発表〕(計 4 件)

北川航, 波田美弥子、新規認定宿主 *Rhodococcus erythropolis* のゲノム解析とゲ

ノム改変、日本放線菌学会 2015 年度大会、2015 年 9 月 8 日、富山国際会議場 (富山県富山市)

北川航、Insight into the relationship between antibiotic production and phylogenetic-classification of *Rhodococcus erythropolis* strains、17th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (ISBA17)、2014 年 10 月 09 日、Pine Bay Holiday Resort、クシャダス(トルコ)

北川航、ロドコッカス属放線菌による難分解性化合物分解と抗生物質生合成に関する研究、日本放線菌学会 2014 年度大会、2014 年 6 月 19 日、つくばカピオ (茨城県つくば市)

北川航, 尾崎太郎, 安武義晃, 西山真, 葛山智久, 田村具博、ロドコッカス属由来抗生物質 aurachin RE の生合成遺伝子解析、日本放線菌学会 2013 年度大会、2013 年 9 月 6 日、メルパルク広島 (広島県広島市)

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川航 (Kitagawa, Wataru)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員
研究者番号: 60415669

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし