

放線菌ゲノム情報に基づく二次代謝産物の生産

●堀之内 末治¹⁾ ◆鮎 信学¹⁾ ◆池田 治生²⁾ ◆石川 淳³⁾

1) 東京大学大学院農学生命科学研究科 2) 北里大学生命科学研究科 3) 国立感染症研究所

<研究の目的と進め方>

放線菌が有する多様な二次代謝酵素の反応機構の解明および改変を行い、パルスウェイ工学、代謝工学、コンビナトリアル生成法や人工的生成遺伝子クラスターの一員として利用することにより、既知有用物質の増産はもとより、「非天然型」化合物の微生物生産を達成し、新規な生理活性や特性を有する医薬、工業原料の開発を目指す。この目的のために、エバーメクチン生産菌である *Streptomyces avermitilis* と *Nocardia farcinia* のゲノム情報およびストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus* のゲノム情報に基づき、二次代謝産物の生成遺伝子クラスターの抽出およびそれぞれの酵素の反応機構の解明、改変を行う。本研究では特に、化合物としてフラボノイド、ポリケタイドとテルペン類、酵素として P-450 を中心とした酸化還元酵素に力を注ぐ。一方ではパルスウェイ工学、ゲノム工学の手法を用いて、安定的かつ大量な物質生産を行うために汎用性のある宿主の開発を目指す。同時に、二次代謝生成の調節と栄養増殖から二次代謝のための増殖へと切替わるグローバルな調節機構の解明を行い、その知見を有用物質生産の効率化のためにフィードバックする。

<2007年度の研究の当初計画>

- ① *Streptomyces griseus* の DNA microarray により、A-ファクター制御下にある全遺伝子を網羅する。さらに、これまで同定してきた A-ファクターカスケード内の転写因子の直接の標的遺伝子も網羅する。
- ② これまでコンビナトリアル生成法により、80 種の天然型および 36 種の非天然型フラボノイドの発酵生産に成功している。フラボノイドとは環状化が異なるスチルペンの天然型、非天然型の発酵生産を目指す。
- ③ コンビナトリアル生成法に利用可能な III 型ポリケタイド合成酵素を生物界に広く求め、その反応機構を明らかにする。
- ④ 昨年度よりゲノム解析情報から物質生産を機能化させた *S. avermitilis* の大規模欠失株（染色体の約 20% を欠失）の作製がほぼ完了している。本欠失株を用いて、これまで生成の詳細が不明であった nocardamin および pentalenolactone の生成に関し解析を行う。
- ⑤ ゲノムエンジニアリングによる *Nocardia* ゲノムに存在する二次代謝産物生産遺伝子クラスターの活性化を継続する。
- ⑥ 抗菌および抗がん活性を有する nocobactin の生成遺伝子クラスターの同定と生成経路の解明を行う。

<2007年度の研究成果>

- ① *S. griseus* の約 600 種の全転写因子遺伝子から成る DNA microarray により、A-ファクター制御カスケードに含まれる二次代謝、形態分化に関する複数の遺伝子を同定した。これら遺伝子の生化学的解析を推し進める。
- ② A-ファクターの全生成経路を解明した。
- ③ 大腸菌に「人工的生成遺伝子クラスター」を導入することにより、多くの天然型および非天然型フラボノイドやイソフラボンの生産に成功した。この成果は、新しい微生物利用技術の方向性を示すモデルケースである。
- ④ 糸状菌である *Neurospora crassa* が有する III 型ポリケタイド合成酵素は、ペンタケタイドの芳香族カルボン酸の生成を触媒する新規酵素であることを明らかにした。また、これまで不明であったクルクミン（カレーの黄色色素；別名「ウコン」）につき、イネからの III 型ポリケタイド合成酵素を発見し、解

析したことにより、全生成経路を確定した。

- ⑤ *Azotobacter vinelandii* のフェノール性脂質（alkylresorcinol と alkylpyrone）の生成に与る III 型ポリケタイド合成酵素の反応を詳細に解析し、新しい触媒機構を提唱できた。
- ⑥ *Streptomyces* から生産される siderophore (nocardamin 類) はヘモクロマトーシスの治療薬として利用されている。*S. avermitilis* の nocardamin は 4 つの生成遺伝子産物によって L-Lys, succinyl-CoA から生成することをこれまでに明らかにした。生成段階の初発の段階の L-Lys decarboxylase を欠失させ、さらにオペロンを形成しているため以降の生成遺伝子の発現が可能な状態の構築を試みた。最終的に作製した変異株は外部より L-Lys が脱炭酸された 1,5-diaminopentane を加えることによって nocardamin を生成した。さらに 2-methyl-1,5-diaminopentane を添加培養することによって、新規な構造を有する非天然型の trimethyl-nocardamin の生成を確認することができた。
- ⑦ 多くの *Streptomyces* 属が生産する pentalenolactone の生成の詳細はこれまで不明であった。Farnesyl-PP から pentalenene 生成 (PtlA)、メチル基のカルボン酸化 (PtlI) さらに 11 位の水酸化 (PtlH) までの経路が明らかになってきたが、さらにその次の段階の水酸化還元 (PtlF) の段階を明らかにすることができた。上記のうち、PtlH が触媒する水酸化反応は Fe^{2+} , α -ketoglutarate および O_2 存在下で達成されるめづらしい dioxygenase である。大腸菌で高発現させた本酵素を用い、その結晶構造を解析することができ、水酸化の反応機構を詳細に推定した。
- ⑧ 古くから geosmin と 2-methylisoborneol は「土臭気」あるいは湖水などの「異臭」物質と知られていたが、それらの生成に関しては長い間不明であった。Geosmin の生成に関しては既に我々によって既に明らかにされたが、2-methylisoborneol に関しては不明であった。2-Methylisoborneol は geosmin と同様に放線菌のみならず cyanobacteria, myxobacteria さらには糸状菌などからも生成される化合物である。微生物ゲノム解析情報からこれまでの相同性を指標とする検索ではなく、機能ドメインを検索する新たな方法でいくつかの候補遺伝子を選び、それらの遺伝子を有する菌株からの 2-methylisoborneol の生成、当該遺伝子の異種放線菌における発現による 2-methylisoborneol の生成、さらには大腸菌で得た酵素を用いた試験管内での反応解析によって 2-methylisoborneol の生成を明らかにした。
- ⑨ 二次代謝産物の生成遺伝子と推定される *nfa7170*, *nfa22030*, *nfa50330* および *nfa50630* のプロモーターをゲノムエンジニアリングによって誘導型に置換し、当該遺伝子の誘導発現を行った。
- ⑩ ゲノム解析で発見された *nbtA-H* と *nbtS-T* クラスターのうち *nbtA* (thioesterase)、*nbtE* (NRPS) および *nbtS* (salicylate synthase) の破壊を行い、これらのクラスターが nocobactin 生成を支配していることを明らかにした。さらに Δ *nbtE* に蓄積された中間体の構造から、nocobactin の生成経路をほぼ解明できた。

<国内外での成果の位置づけ>

- ① コンビナトリアル生成法による植物由来のポリケタイド化合物の微生物生産においては、世界を圧倒している。また、種々の工夫を凝らし、非天然型化合物の高効率生産も達成できて

いる。

- ② 放線菌の二次代謝、形態分化のスイッチとなる A- ファクター制御カスケードの解析においても、世界の追従を許していない。こうした制御システムを物質生産へ応用する方策を思案中である。
- ③ コンビナトリアル生合成に利用可能な III 型ポリケタイド合成酵素の反応機構の解明において、新規な酵素を 3 種発見し、その新規な反応を解明するなど、この分野でも世界的なレベルにある。
- ④ Nocardamin: これまで nocardamin の生合成は詳細に検討はされていないため、その生合成を改変した非天然型 nocardamin の生成等は検討されていなかった。すでに nocardamin は医薬品として使用されており、本研究で新たに創製される化合物の生物活性が期待できる。
- ⑤ Pentalenolactone: PtlH は dioxygenase と相同であり、Fe²⁺ 存在下 a-ketoglutarate および O₂ を基質として 1-deoxypentalenic acid の 11b 位に立体選択的に水酸基を導入する。これら一連の dioxygenase による水酸化の機構は不明であった。今回、PtlH の単結晶および基質誘導体との複合結晶の構造解析はこれらの dioxygenase の反応を理解する上で有用な情報を提供することができる。
- ⑥ 2-Methylisoborneol: DNA あるいはペプチド配列の相同性からは遺伝子産物の機能を特定することができない場合が多々ある。微生物由来の terpene 化合物の生合成に関しては terpene cyclase が植物など真核細胞生物のそれらと配列の相同性が乏しく十分な解析に至っていない。今回、我々が見いだした monoterpene cyclase は微生物では初めての報告例である。今回の一連の微生物由来の terpene cyclase 遺伝子の解析は、今後多くの微生物からの terpene 化合物の生合成を解析する上で多くの有用な情報を提供できる。
- ⑦ nocobactin 類縁物質には抗 HDAC 剤など有用な生物活性を持つものが多く、その生合成経路の解明は、新規な誘導体の創製に応用できると考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>
研究計画通り、おおむね順調に進捗している。

<今後の課題>

- ① *S. griseus* の A- ファクター制御カスケードを構成するとして DNA microarray によって同定された多くの遺伝子につき、今後は手間と時間の掛かる生化学的実験を行う。
- ② 微生物によって発酵生産できた非天然型を含むポリケタイド化合物の生理活性を検討する。
- ③ 変換が期待できる diamine 誘導体を有機合成によって調製し、非天然型 nocardamin の創製を展開する。
- ④ *Nocardia* における高コピー数のベクタープラスミドの開発が必要である。

<成果公表リスト>

1. 0704241351
N. Funa, T. Awakawa and S. Horinouchi: Pentaketide resorcylic acid synthesis by type III polyketide synthase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 282, 14476-14481 (2007)
2. 0704181210
T. Higashi, Y. Iwasaki, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: A-factor and phosphate-depletion signals are transmitted to the grixazone biosynthesis genes via the pathway-specific transcriptional activator GriR. *J. Bacteriol.* 189, 3515-3524 (2007)
3. 0704181402
S. Horinouchi: Mining and polishing of the treasure trove in the bacterial genus *Streptomyces*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71, 283-299 (2007)
4. 0801101153
S. Horinouchi and T. Beppu: Hormonal control by A-factor of morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* 83, 277-295 (2007)

5. 0702071218
J. Kato, N. Funa, H. Watanabe, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: Biosynthesis of γ -butyrolactone autoregulators that switch on secondary metabolism and morphological development in *Streptomyces*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 2378-2383 (2007)
6. 0801101142
Y. Katsuyama, N. Funa and S. Horinouchi: Precursor-directed biosynthesis of stilbene methyl ethers in *Escherichia coli*. *Biotechnol. J.* 2, 1286-1293 (2007)
7. 0708221629
Y. Katsuyama, N. Funa, I. Miyahisa and S. Horinouchi: Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. *Chemistry & Biology* 14, 613-621 (2007)
8. 0801101205
Y. Katsuyama, M. Matsuzawa, N. Funa and S. Horinouchi: *In vitro* synthesis of curcuminoids by type III polyketide synthase from *Oryza sativa*. *J. Biol. Chem.* 282, 37702-37709 (2007)
9. 0612261736
Y. Katsuyama, I. Miyahisa, N. Funa and S. Horinouchi: One-pot synthesis of genistein from tyrosine by coinubation of genetically engineered *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 1143-1149 (2007)
- 10.0708221642
H. Nishida, Y. Ohnishi, T. Beppu and S. Horinouchi: Evolution of γ -butyrolactone synthases and receptors in *Streptomyces*. *Environ. Microbiol.* 9, 1986-1994 (2007)
- 11.0704191049
H. Suzuki, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: Arylamine *N*-acetyltransferase responsible for acetylation of 2-aminophenols in *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* 189, 2155-2159 (2007)
- 12.0708221654
H. Suzuki, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: GriC and GriD constitute a carboxylic acid reductase involved in grixazone biosynthesis in *Streptomyces griseus*. *J. Antibiot.* 60, 380-387 (2007)
- 13.0705071059
A. Tanaka, Y. Takano, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: AfsR recruits RNA polymerase to the afsS promoter: a model for transcriptional activation by SARPs. *J. Mol. Biol.* 369, 322-333 (2007)
- 14.0801171809
Miyayama, N. Funa, T. Awakawa and S. Horinouchi: Direct transfer of starter substrates from type I fatty acid synthase to type III polyketide synthases in phenolic lipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 871-876 (2008)
- 15.0702071304
Z. You, S. Omura, H. Ikeda and D. E. Cane: Pentalenolactone biosynthesis: molecular cloning and assignment of biochemical function to PtlF, a short-chain dehydrogenase from *Streptomyces avermitilis*, and identification of a new biosynthetic intermediate. *Arch. Biochem. Biophys.* 459, 233-240 (2007)
- 16.0801241413
Z. You, S. Omura, H. Ikeda, D. E. Cane and G. Jogl: Crystal structure of the non-heme iron dioxygenase PtlH in pentalenolactone biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 282, 36553-36560 (2007)