

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、バクテリア工学、代謝工学、コンビナトリアル生合成法や人工的生合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、エバメクチン生産菌である *Streptomyces avermitilis* と *Nocardia farcinica* 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、二次代謝産物の生合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。一方ではバクテリア工学、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、二次代謝生合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。

<2008年度の研究の当初計画>

- ① ストレプトマイシン生産菌 *Streptomyces griseus* と他の2種の放線菌との比較により導きだされた放線菌に特有な遺伝子の形態分化に及ぼす影響の網羅的解析および非翻訳領域にある RNA 遺伝子の網羅的解明を目指す。
- ② これまでに大腸菌で醗酵生産させた種々の生理活性を發揮するクルクミンおよびその非天然型を含む誘導体を他研究機関との共同で医薬を目指したスクリーニングを行う。
- ③ *S. avermitilis* のゲノム解析から鉄代謝異常治療薬として利用されている nocardamine の生合成遺伝子群の解析結果から、生合成経路の人為的な改変により非天然型 nocardamine の創製が可能であることを見出した。nocardamine の生理活性の改変を目的に、種々のジアミン誘導体を有機合成によって調製し、それらを用いて非天然型 nocardamine の創製を試みる。
- ④ *S. avermitilis* のゲノムは、およそ20%が欠失可能である。昨年度、異臭物質 2-methylisborneol の生合成遺伝子およびその酵素を世界で初めて明らかにすることができた。これらの遺伝子の評価を上記ゲノム縮小株で行い、極めて有効な解析が可能であることを実証した。本年度も他の異種生合成遺伝子群の発現および解析系の評価を継続する。
- ⑤ *S. avermitilis* のゲノム解析から新たに見出された二次代謝産物生合成遺伝子群の解析を継続する。Sesquiterpene 化合物の pentalenene から生成されると考えられる pentalenolactone 生合成遺伝子解析から、その構造が新規であることが推定された。また Baeyer-Villiger 反応を触媒すると考えられる monooxygenase についても大腸菌での大量発現が期待できるため、*in vitro* での酵素反応の評価を行う。
- ⑥ *N. farcinica* の二次代謝産物生産に関わると推定される遺伝子クラスターを、ゲノムエンジニアリングにより人為的に制御可能に改変し、その産物を特定する。そのために必要な遺伝子操作ツールの開発も併せて行う。
- ⑦ 次世代シーケンサーによる *Nocardia* のゲノム解析を試みる。

<2008年度の成果>

- ① *S. griseus* ゲノムの DNA アレイにより A-ファクターの制御下に

ある約600遺伝子を同定した。これら個々の遺伝子につき、遺伝子破壊を行い、転写因子 AdpA の直接的影響を調べた。また、菌体外プロテアーゼの網羅的解析を行った。さらに、small non-coding RNA を網羅的に拾い上げ、その転写および破壊による形質の変化を解析したが、形質については明確な結論を得られなかった。

- ② コンビナトリアル生合成法にて多くの植物ポリケタイドを大腸菌で醗酵生産できた。特にイネ由来のクルクミンの生合成酵素の反応機構を明らかにした意義は大きい。なお、副次的成果として、ウコンにおけるクルクミンの全生合成経路を明らかにした。現在、生産されたクルクミン等の非天然型化合物の生理活性は、共同研究先で鋭意探索中である。
- ③ *S. avermitilis* の nocardamin 生合成に関し、昨年度は生合成段階の初発の段階の L-Lys decarboxylase 遺伝子を欠失させた組換え体に 2-methyldiaminopentane を添加し、2-(trimethyl)-nocardamin の生成を達成した。本年度は、5種の基質を合成し、欠失組換え体に添加培養を行った。2つの基質 3-methyldiaminopentane, 3-hydroxyldiaminopentane は nocardamin 誘導体に変換されることを確認し、新規な化合物、3-(trimethyl) および 3-(trihydroxyl)-nocardamin の創製を達成した。
- ④ *S. avermitilis* のゲノム縮小株での異種生合成遺伝子群の発現のため、streptomycin, kasugamycin, ribostamycin, pladienolide, echinomycin および tetracycline の生合成遺伝子群の単離を計画し、streptomycin, kasugamycin, pladienolide の生合成遺伝子群全体を含むクロンの取得に成功した。Streptomycin の生産は認められたが kasugamycin および pladienolide はゲノム縮小株では生産が認められなかった。しかしながら、これらの遺伝子群内の制御遺伝子を強制的に発現させることによって代謝産物の生成を確認した。
- ⑤ *S. avermitilis* の *ptlD* 遺伝子群の解析の結果、PtlD は分子状の酸素を基質として5員環炭素骨格を6員環 lactone に変換する Baeyer-Villiger 反応を触媒する酵素であることが明らかにした。また本酵素によって生成する中間体は新規骨格を有し、neopentalenolactone D と命名した。
- ⑥ *N. farcinica* ゲノムに存在する二次代謝産物生産に関わると推定される4つの遺伝子クラスターのプロモーターを誘導型に置換し、制御可能とした。さらに *Nocardia* における高コピー数のベクタープラスミドを開発した。
- ⑦ *Brasiliardin*, *brasilinolide*, *nocardiolactone* など多様な二次代謝産物を生産する *N. terpenica* のゲノムを次世代シーケンサーで解析し、約1800コンティグ (計5 Mb) を得た。得られたコンティグは配列既知である *brasilicardine* 生合成遺伝子クラスターを完全に網羅しており、さらにゲノムの90%以上を網羅していると推定され、多くのPKSやNRPS遺伝子も見出された。

<国内外での成果の位置づけ>

- ① 微生物による flavonoids, stilbenoids, curcuminoids の生産例は、微生物に人工的二次代謝遺伝子クラスターを導入して、非天然型を含む有用物質を生産させるモデルケースとして極めて意義深い。
- ② 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た化合物の生物活性が期待できる。

- ③ ゲノム縮小株を用いた異種生合成遺伝子発現: 物質生産のためのゲノム縮小株の検討は本邦が初めてであり、他の放線菌では検討がなされていない。主生産物生合成遺伝子群など含むおよそ20%のゲノム縮小施したにもかかわらず二次代謝には全く影響がないことは初めての知見である。
- ④ *ptl*遺伝子群: *PtlD*はdioxxygenaseと相同なBaeyer-Villiger反応を触媒する酵素である。放線菌からのBaeyer-Villiger反応を触媒する酵素の単離は初めてであり、今後本酵素の諸性質を解析することによって有用変換酵素としての利用も期待できる。
- ⑤ 次世代シーケンサーを用いた*de novo*シーケンシングによるゲノム情報取得のモデルとなることが期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

- ① 非天然型nocardaminの生成においては5種の基質のうち2種のみが新規化合物の生成を確認することができたが、残りの3種、3,3-dimethyl-, 2,4-dimethyl-, 3-phenyldiaminopentaneは最終産物への変換が確認できなかった。生合成酵素の基質特異性など種々の理由が考えられるが、分子軌道計算によるシュミレーションによる推定構造の化合物の力学的妥当性を考慮するべきであった。実際に3-phenyldiaminopentaneから生成すると考えられる化合物はFeイオンとの錯体形成に大きな歪みを生じることが計算値から明らかになった。
- ② ゲノム縮小株での異種二次代謝産物生合成遺伝子群の発現のため、数種の二次代謝産物生合成遺伝子群のクローン化を行ったが、現在までにすべてのクローンの取得に至っていない。ほとんどの生合成遺伝子群が25 kbあるいはそれ以上の大きさのため、全体を含んだクローンの取得は効率的ではない。より効果的なクローン化技術の開発は今後とも開発しなければならない。また、pladienolide生合成遺伝子群のクローン化はBACベクターを基本にしたものを使用して全長75 kbの生合成遺伝子群の単離に成功しており、今後BACベクターを用いたクローン化も検討する。
- ③ *Nocardia*のゲノムエンジニアリングによる二次代謝遺伝子の誘導発現において、ターゲットとする二次代謝産物の特定には至らなかった。培養条件等の検討が必要である。

<今後の課題>

- ① 非天然nocardaminのうち3-hydroxyldiaminopentaneから生成した化合物は医薬品として利用されているdesferrioxamineと比べ水溶性が改善されている。また、水溶性が上昇したため化合物の単離精製がこれまでの方法では回収率が悪く、最終的な構造解析のためのスペクトルを取るに十分な量を得ることができていない。精製法を変更し、最終的な構造確認を行う。
- ② ゲノム縮小株にstreptomycin生合成遺伝子群を導入し、多量のstreptomycinの生産を確認した。*S. griseus*におけるstreptomycin生成過程の遺伝子制御は既に研究代表者によって低分子遺伝子発現調節物質A-factorを含む詳細な制御機構を明らかにしている。しかしながら、*S. avermitilis*では*S. griseus*の遺伝子発現調節機構は全く異なる。したがって、*S. avermitilis*では*S. griseus*とは異なった制御によってstreptomycinが生成していることが考えられる。Streptomycin生合成は*strR*の遺伝子発現調節が鍵であるが、それを制御する*adpA*遺伝子は*S. avermitilis*には見いだせない。これらのことから*S. avermitilis*における*strR*の発現を調節する遺伝子の探索は異種菌株における二次代謝の開始にとって重要な情報が得られるものと推察される。
- ③ 次世代シーケンサー解析において、より多くの情報を得るための解析手法の開発が必要である。

<成果公表リスト>

1. 0806161851
M. Komatsu, M. Tsuda, S. Omura, H. Oikawa and H. Ikeda : Identification and functional analysis of genes controlling biosynthesis of 2-methylisborneol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 74224-7427 (2008)
2. 0805091631
S. Hirano, K. Tanaka, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: Conditionally positive effect of the TetR-family transcriptional regulator AtrA on streptomycin production by *Streptomyces griseus*. *Microbiology* 154, 905-914 (2008)
3. 0805091654
M. Funabashi, N. Funa and S. Horinouchi: Phenolic lipids synthesized by type III polyketide synthase confer penicillin resistance on *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.* 283, 13983-13991 (2008)
4. 0801171809
A. Miyanaga, 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)
5. 0806031554
Y. Ohnishi, J. Ishikawa, H. Hara, H. Suzuki, M. Ikenoya, H. Ikeda, A. Yamashita, M. Hattori and S. Horinouchi: Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* 190, 4050-4060 (2008)
6. 0811271717
H. Suzuki, K. Marushima, Y. Ohnishi and S. Horinouchi: A novel pair of terminal protein and telomere-associated protein for replication of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 2973-2980 (2008)
7. 0810031144
Y. Katsuyama, M. Matsuzawa, N. Funa and S. Horinouchi: Production of curcuminoids by *Escherichia coli* containing an artificial biosynthesis pathway. *Microbiology* 154, 2620-2628 (2008)
8. 0801201521
Streptomyces griseus genome database <http://streptomyces.nih.go.jp/griseus/>
9. 0901032218
K. Machida, A. Arisawa, S. Takeda, T. Tsuchida, Y. Aritoku, M. Yoshida and H. Ikeda: Organization of the biosynthetic gene cluster for the polyketide antitumor macrolide, pladienolide, in *Streptomyces platensis* Mer-11107. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 2946-2952 (2008)
10. doi:10.1128/JB.01276-08
L. Xu, S. Fushinobu, H. Ikeda, T. Wakagi, and H. Shoun: Crystal structures of cytochrome P450 105P1 from *Streptomyces avermitilis*: conformational flexibility and histidine-liganded state. *J. Bacteriol.* (in press)
11. 0812181649
T. Hiratsuka, K. Furihata, J. Ishikawa, H. Yamashita, N. Itoh, H. Seto and T. Dairi: An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms. *Science* 321, 1670-1673 (2008)