

線状プラスミド pSLA2-L にコードされた二次代謝遺伝子群の機能解析とその応用

●木梨 陽康 ◆荒川 賢治

広島大学大学院先端物質科学研究科

<研究の目的と進め方>

Streptomyces rochei 7434AN4 株は3つの線状プラスミド pSLA2-L, M, S をもち、ポリケチド抗生物質、ランカサイジン (LC) およびランカマイシン (LM) を生産する。pSLA2-L の全塩基配列決定 (210,614bp) によって、その上には2つの I 型 PKS (polyketide synthase) 遺伝子群 (lankacidin synthase, *lkc*; lankamycin synthase, *lkm*) に加えて、mithramycin synthase 様 II 型 PKS 遺伝子群 (*roc*)、カロテノイド生合成遺伝子群 (*crt*) および多くの制御遺伝子が見つかった。それ故、pSLA2-L はその 3/4 を二次代謝遺伝子群が占める極めて特異的な線状プラスミドである。本研究の目的は、pSLA2-L 上にコードされたこれらの二次代謝関連遺伝子群の機能を明らかにし、その成果を新規誘導体の創製や生産性の向上に結びつけることである。特に、抗生物質生産と胞子形成に関わる複雑な二次代謝制御カスケードの全貌を明らかにし、LC の骨格形成を司るモジュラー・反復混合型ポリケチド生合成系を証明することである。

<2007 年度の研究の当初計画>

(1) 二次代謝制御カスケードの解析

pSLA2-L 上には6個の *tetR* 様リセプター遺伝子 (*orf74*, *orf79*, *orf82*, *orf92*, *orf99*, *orf126*) と3個の SARP (Streptomyces antibiotic regulatory protein) 様制御遺伝子 (*orf51*, *orf55*, *orf75*) があり、それらは g-butyrolactone (GB) 生合成遺伝子 *srrX* (*orf85*) とともに複雑な二次代謝制御カスケードを形成している。昨年度の *in vitro* 転写実験によって、*SrrA* (*orf82*) が GB リセプターであり、これに GB が結合すると activator 遺伝子 *srrY* (*orf75*) のプロモーターから離れてその転写抑制が解除され、抗生物質生産に至るといった中心的な流れが明らかになってきた。今年度は抗生物質生産を負に制御する *srrB* (*orf79*) および正に制御する *srrY* の下流の遺伝子を同定するとともに、胞子形成を正に制御する *srrC* (*orf74*) の下で働いている遺伝子群を明らかにする。

(2) ランカサイジンおよびランカマイシンの生合成機構の解析

LC のモジュラー・反復混合生合成を証明するため、KR ドメイン破壊と *lkcFG* 融合または II 型 thioesterase 遺伝子 (*orf25*) 破壊を組み合わせた株、あるいは *lkcC* 中のタンデム ACPs の破壊株など、様々な破壊株を作製して目的の代謝産物を単離する。2つの P450 遺伝子 (*orf26*, *orf37*) および2つの糖転移酵素遺伝子 (*orf31*, *orf40*) の二重破壊株を作製し、蓄積する生合成中間体の *in vitro* 変換実験によって、LM の詳細な生合成経路を明らかにする。

(3) pSLA2-M の全塩基配列決定と胞子形成機構の解析

pSLA2-M (100kb) のみをもつ *S. rochei* K3A12 株は胞子を形成するが、プラスミドを全くもたない 3-44 株は気中菌糸形成に止まった。この結果は、気中菌糸形成までの遺伝子 (群) は染色体上にコードされているが、胞子形成を完成させる遺伝子 (群) は pSLA2-M 上にあることを示した。pSLA2-M の全塩基配列決定によって胞子形成に関わる遺伝子を同定するとともに、

pSLA2-L, M, S および染色体の構造的関係を明らかにして、線状染色体と線状プラスミドの起源・進化に関する知見を得る。

<2007 年度の成果>

(1) 二次代謝制御カスケードの解析

これまで解析してきた *srrA*, *srrB*, *srrC* に加えて、他の3つの *tetR* 遺伝子 *orf92* (*srrE*), *orf99* (*srrD*), *orf126* (*srrF*) の破壊株を作製して、その形質を解析した。3つの破壊株はいずれも LC, LM を生産したが、気中菌糸を作らず bald の phenotype を示したので、胞子形成を正に制御していることが分かった。

SrrA 蛋白の結合領域を *in vitro* binding 実験によって検索し、*srrX*, *srrY*, *srrW* (*orf55*) の3つの制御遺伝子の promoter 領域を取得した。gel retardation によって SrrA と *srrY* の結合を確かめ、foot printing によって *srrY* のプロモーター領域に SrrA の結合サイトを同定した。そこには 26-bp のパンドローム配列が見つかり、ArpA を初めとする GB リセプター蛋白の結合配列とよく似ていた。さらに、SrrA の結合に対する g-butyrolactone 画分 (SRB) の影響を調べ、野生株の SRB は SrrA を乖離させるが、*DsrrX* 変異株の相当する画分はその活性がなく、またリガンド結合に必須な Trp 残基を Ala に変えた Arp^{W119A} は SRB を添加しても乖離しなかった。こうして、*srrX* → *srrA* → *srrY* の中心的なシグナル伝達経路を分子レベルで確かめることができた。

(2) ランカサイジンおよびランカマイシンの生合成機構の解析

pSLA2-L 上のランカサイジン生合成 (*lkc*) クラスター中には縮合反応を司る KS ドメインが5個しかないので、生合成酵素のどれかが繰り返し機能し、合計8回の縮合反応を行っているとは推定された。*lkc* クラスターを *lkcA-E* と *lkcF-O* の2つに分け、前者を *S. lividans* の染色体に組み込み、後者をプラスミド上にのせて導入したところ、ランカサイジン A が生産された。この結果は、*lkc* クラスターが骨格合成に必要な全ての遺伝子を持っていることを示した。さらに、ランカサイジン A を LC にまで変換する酵素は *S. rochei* 染色体上にコードされているが、*S. lividans* 染色体上にはないことが示唆された。

lkc クラスターの中で、*lkcA* は骨格形成の開始に関わる NRPS-PKS 融合遺伝子であり、*lkcG* は伸長反応の終結に関わる遺伝子であるので、繰り返し反応の候補から除外された。*lkcF-G* 融合株を作製したところ、この株も親株と同量の LC を生産したので、*lkcF* も候補から除外された。その結果、消去法によって、*lkcC* が4回繰り返し縮合反応することが示唆された。

LkcC-KS が4回繰り返し使われることを直接証明するため、3つの KR ドメイン (LkcC-KR, LkcF-KR1,2) のアミノ酸置換変異株を作製したが、期待した代謝中間体は得られなかった。そこで、LkcF と LkcG の間の中間体の受け渡しを容易にした *lkcFG* 融合株と KR 破壊を組み合わせた株を作製し、また間違えた中間体を取り除く編集機能をもつ II 型 thioesterase 遺伝子 (*orf25*) を破壊した株に KR 変異を導入した。しかし、いずれの破壊株からも期待した生合成中間体は得られなかった。

次に、*lkcC*中にタンデムに存在する2つのACPドメインが繰り返しに関与している可能性を探るため、それぞれを別個に破壊した株、ACP2を欠かさせた株、両者を破壊した株を作製した。最後の破壊株以外は、生産量が約半分に落ちたもののLCを生産したので、2つのACPsは並列に働いていて、繰り返しには関与していないことが分かった。

(3) pSLA2-Mの全塩基配列決定と胞子形成機構の解析

pSLA2-Mのコスミド・ライブラリー (Supercos1) およびプラスミド・ライブラリー (pUC19) を作製し、また両末端は別個にクロン化して、pSLA2-Mの全ての領域をカバーするクロンを得た。これらのクロンを用いて全塩基配列を決定中であり、両末端には352 bpの末端逆位配列 (terminal inverted repeat, TIR) が見つかった。しかし、両末端のTIRの塩基配列の相同性は91% (321/352) と低かったため、左右のTIR間には相同組み換えによるhomogenizationが起きていないことが示唆された。

(4) ジャガイモそうか病の病原因子および病原性転移の解析

ジャガイモそうか病の病原因子を検索している過程で、*S. rochei* GK18株がthaxtominとは異なる新たな毒性物質を生産していることを見つけた。活性物質を単離・構造決定したところ既知抗生物質borrelidinと同定されたが、この物質の植物に対する活性はこれまで報告されていない。thaxtominを生産しない株がそうか病を引き起こすことが報告されているので、borrelidinがそうか病に関与している可能性がある。また、いくつかの放線菌株から単離された線状プラスミドのthaxtominおよびborrelidin生産への関与についても、生合成プロンプを作製して解析を始めたところである。

<国内外での成果の位置づけ>

SCP1の発見以来、不思議なことに線状プラスミドの二次代謝に関する報告は、他のグループからは殆ど現れなかった。しかし最近になって、及川らは私たちと共同してpKSL上にコードされたlasalocid, echinomycinクラスターを解析し、Shenらはneocarzinostatin, leinamycin, C-1027等の抗癌抗生物質の生合成クラスターが線状プラスミド上に乗っていることを明らかにした(いずれも未発表)。また、芳香族化合物の分解や植物病原性への関与も報告されて、線状プラスミドが微生物の二次代謝に広く関わっていることが次第に明らかになってきた。それを反映して、Springer社からMicrobiology Monographs, Vol. 7, Microbial Linear Plasmidsが出版され、私もChaterとともにその第一章Streptomyces Linear Plasmidsを担当した。

放線菌の二次代謝制御カスケードとしては別府・堀之内らによる*S. griseus*のA-ファクター制御カスケードの研究が最も有名である。A-ファクターは、ただ一つのリセプターArpAおよび活性化因子AdpAを通じて、ストレプトマイシン生産および胞子形成を正に制御する。これに対して、私たちの*S. rochei*の系では、g-butyrolactoneが抗生物質生産を正に、胞子形成を負に制御している。また、GBリセプターSrrAの他にSrrB, SrrC等のTetR型リプレッサーやSrrY, SrrW, SrrZ等のSARPも関与するなど、極めて複雑な制御系を構成している。この点では、Cundliffeらが研究しているtylosin生産菌*S. fradiae*の系や、山田・仁平らによるvirginiamycin生産菌*S. virginiae*の系に似ていると言える。しかし、どちらの場合も、制御カスケードの全貌は明らかになっていない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

LC生合成のモジュラー・反復混合ポリケチド生合成仮説を証

明するために、今年度も多くの遺伝子破壊株を作製し代謝産物を徹底的に解析したが、鍵となる代謝中間体はついに得られなかった。生合成中間体の単離には世界中で誰も成功しておらず、従来とは異なる全く新しい方法論が必要であると思われる。制御カスケードの全貌の解明に向けては、分子レベルのデータが着実に蓄積してきており、その基本骨格が次第に明らかになってきた。しかし、SARP蛋白であるSrrYの単離が困難であるため、その結合領域が同定できていないので、この問題を解決する必要がある。

<今後の課題>

上述したことと重複する部分もあるが、今後の課題を以下に箇条書きにする。

1. *S. rochei*における抗生物質生産および胞子形成を含めた二次代謝制御カスケードの全貌を明らかにする。そのためには、まず*ssrY*および*srrC*遺伝子の下流で働いている遺伝子を同定する必要がある。また、胞子形成の正の制御遺伝子である*srrC*と負に働いている*srrX*との関係を明らかにしなければならない。
2. pSLA2-Mの全塩基配列を決定し、さらに*S. rochei*染色体自身も解析して、線状ゲノムの起源・進化に関する知見を更に深める。また、pSLA2-M上の胞子形成に関わる遺伝子を同定し、その機能を明らかにする。
3. *S. scabies*から新たに単離したborrelidinのジャガイモそうか病への関与を解明し、また線状プラスミドのthaxtominおよびborrelidin生産における役割を明らかにする。

<成果公表リスト>

1. 0705071034
Arakawa, K., Mochizuki, S., Yamada, K., Noma, T., and Kinashi, H.: g-Butyrolactone autoregulator-receptor system involved in lankacidin and lankamycin production and morphological differentiation in *Streptomyces rochei*. *Microbiology*, 153, 1817-1827 (2007)
2. 0801221257
Chater, K. F., and Kinashi, H.: Streptomyces linear plasmids: their discovery, functions, interactions with other replicons, and evolutionary significance. *Microbiology Monographs Vol. 7, Microbial Linear Plasmids*, ed. by Meinhardt, F., and Klassen, R., Springer, Berlin/Heidelberg, Germany, 2007, p. 1-31.
3. 0801221231
木梨陽康: 放線菌の線状レプリコンの再編成とゲノム進化. *化学と生物*, 45, 619-626 (2007)
4. 0801221216
Tatsuno, S., Arakawa, K., and Kinashi, H.: Analysis of modular-iterative mixed biosynthesis of lankacidin by heterologous expression and gene fusion. *J. Antibiot.*, 60, 700-708 (2007)
5. Yamamoto, S., He, Y., Arakawa, K., and Kinashi, H.: g-Butyrolactone-dependent expression of the *Streptomyces* antibiotic regulatory protein gene *srrY* plays a central role in the regulatory cascade leading to lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*. *J. Bacteriol.*, 190, in press (2008)

研究室のホームページを次に公開している。http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/hosenkin_lab/hosen_lab.html.