

人工的生合成遺伝子クラスターを賦与した放線菌によるフラボノイド化合物の発酵生産

堀之内 末治
(東京大学大学院 農学生命科学研究科)

研究目的

我々のグループはこれまでに抗生物質生産菌として工業的に重要な放線菌の二次代謝・形態分化の調節機構について研究を行い、A-ファクター制御カスケードの提唱、「真核」型蛋白リン酸化によるシグナル伝達の発見により微生物学に大きなインパクトを与えてきた。その過程で、それまで植物にしか存在しないとされてきたカルコン合成酵素 (CHS) を放線菌に発見し、炭素鎖伸長、炭素鎖認識、環化を行う驚くべき酵素であることを明らかにした。CHS は植物ではカルコンを合成しており、カルコンは花の色など多くのフラボノイド化合物の中間体である。この研究を契機に、種々の生理活性を有し、多くの用途があるフラボノイド化合物を放線菌で発酵生産し、引続いてこれに combinatorial biosynthesis 法を適用して多くの非天然型フラボノイド化合物のライブラリーを構築することによっていろいろな生理活性を発揮する物質を探索することを目標に定めた。本研究計画内では、強力プロモーターの下流に植物由来の4種の遺伝子をタンデムに連結して人工遺伝子クラスターを創出し、放線菌でのカルコンの発酵生産を目標とする。

研究方法

放線菌または大腸菌においてカルコンを発酵生産させるために、植物由来の4種の遺伝子から成る「人工生合成遺伝子クラスター」を構築した。図1には、放線菌での発現を目指した発現用ベクターを示してある。本生合成遺伝子クラスターの特徴として、①高コピー数プラミド上の放線菌内での強力プロモーター *PtipA* の利用、②先頭の遺伝子への強固なりボソーム結合配列 (GGAGG) の付加、③引続く3つの遺伝子の開始コドン (ATG) と直前の遺伝子の終止コドン (TGA) のオーバーラップ (TGATG)、④放線菌宿主として遺伝解析で汎用される *S. lividans* と我々が長年 A-ファクター研究に用いてきた *S. griseus* を使用、を挙げることができる。大腸菌での発現のためには、pIJ6021 の替わりに pET26 ベクターを使用した。

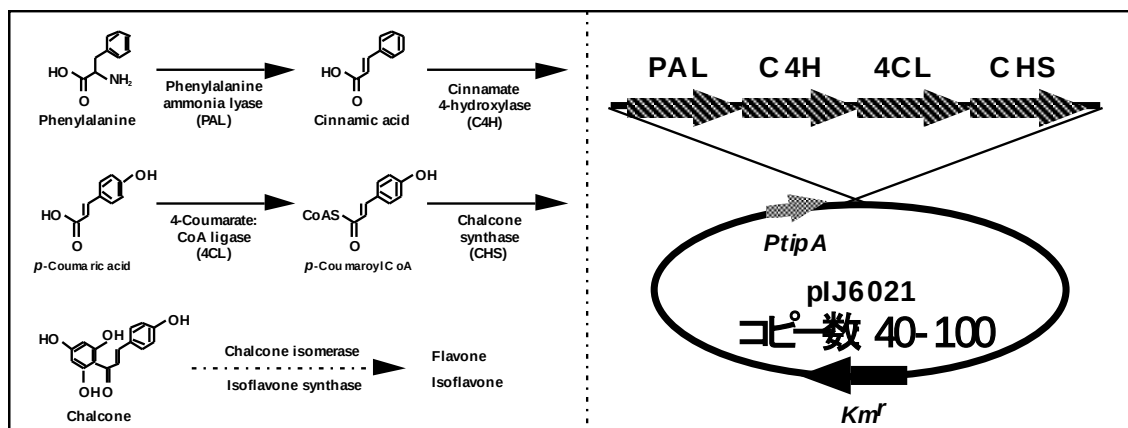


図1. 放線菌でのカルコン生産のための遺伝子および発現用ベクターの構造

研究結果

pET26 上に構築した人工合成遺伝子クラスターを大腸菌 BL 2 1 株に導入し、チロシン 2 mM を含む M9 培地で 30℃、2 日間培養した。培養液を 80%アセトンと酢酸エチルで抽出し、抽出物を乾固した。得られたサンプルを 0.1%酢酸を含むメタノールに溶解し、ODS カラムを装備した高速液体クロマトグラフィーにて分析した。図 2 に示すように、標準物質の naringenin chalcone と同じ保持時間を示すピーク 1 とこれとも少し異なるピーク 2 が同定された。これらのピークはベクター pET26 のみを有する大腸菌の抽出物には観察されないことから、ピーク 1 が naringenin chalcone、ピーク 2 が chalcone と推定される。Naringenin は非酵素的に容易に chalcone へ変換される。現在、ピーク 1 とピーク 2 を LC-MS などの機器分析により構造確認を行っている。

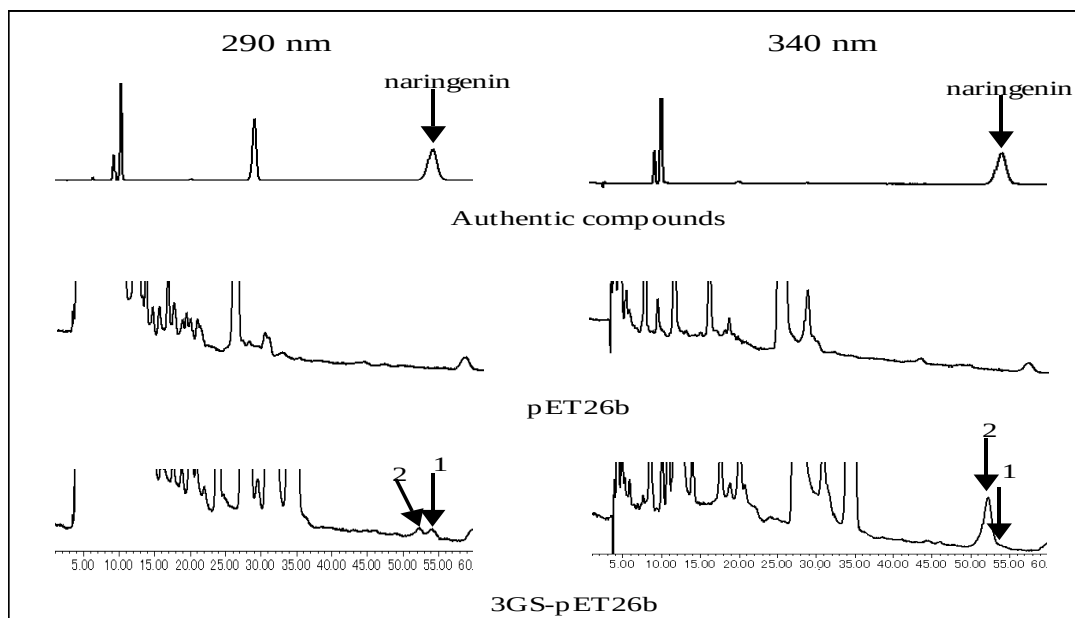


図 2. 人工合成遺伝子クラスターを有する大腸菌の培養液の HPLC 分析

まとめ

当初の計画通り、植物由来の遺伝子を組合わせた人工合成遺伝子クラスターを有する大腸菌において、まだ少量ではあるが chalcone を発酵生産できた。今後は、生産量の向上、さらには放線菌細胞での生産を追及する。