

放線菌線状プラスミドにコードされた制御遺伝子群の解析 および抗生物質生産への応用

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

Streptomyces 属放線菌には A-factor, virginia butanolide などのシグナル分子を介した二次代謝制御系が存在しており、抗生物質生産を厳密にコントロールしている。*Streptomyces rochei* 7434AN4 株は 2 つの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)を生産し、それらの生合成および制御遺伝子は線状プラスミド pSLA2-L 上にコードされていた (図 1)¹。我々は今までに *srrX* (シグナル分子 SRB 合成遺伝子)→*srrA* (SRB リセプター)→*srrY* (転写活性化因子)→LC, LM という *S. rochei* 二次代謝制御カスケードの存在を明らかにした²⁻⁴。本研究では (1) SRB の単離・構造決定・構造多様性の解析、(2) 制御遺伝子改変による潜在的二次代謝のゲノムマイニング、に取り組み、二次代謝制御機構の側面から新規生理活性物質の探索を目指す。

方法

代謝産物プロファイル解析は薄層クロマトグラフィー(TLC)および高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて行った。代謝産物の精製には Sephadex LH20 ゲル濾過クロマトグラフィーおよびシリカゲルクロマトグラフィーを用いた。代謝産物の構造解析には日本電子製 LA-500 核磁気共鳴装置(NMR)および Thermo Fisher Scientific 製 LTQ Orbitrap XL ハイブリッド型質量分析装置を用いた。

結果

1. SRB の単離・構造決定・構造多様性の解析

昨年度我々は、*S. rochei* の LC, LM 生産を誘導する 2 つのシグナル化合物 SRB1 ($C_{15}H_{24}O_5$), SRB2 ($C_{16}H_{26}O_5$) を取得し、NMR, MS により化学構造を決定した。C-1' 位水酸基の立体化学は化学合成により決定した (図 2)⁵。本化合物の構造多様性を調べるべ

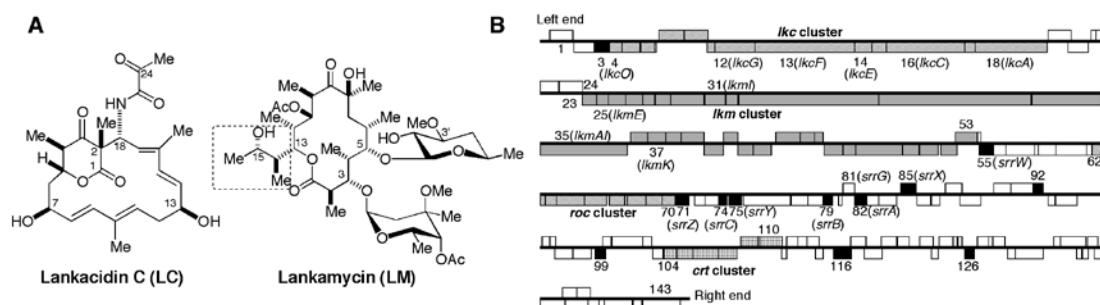


Figure 1. (A) Chemical structure of lankacidin C (LC) and lankamycin (LM) isolated from *Streptomyces rochei* 7434AN4.
(B) Gene organization of a linear plasmid pSLA2-L.

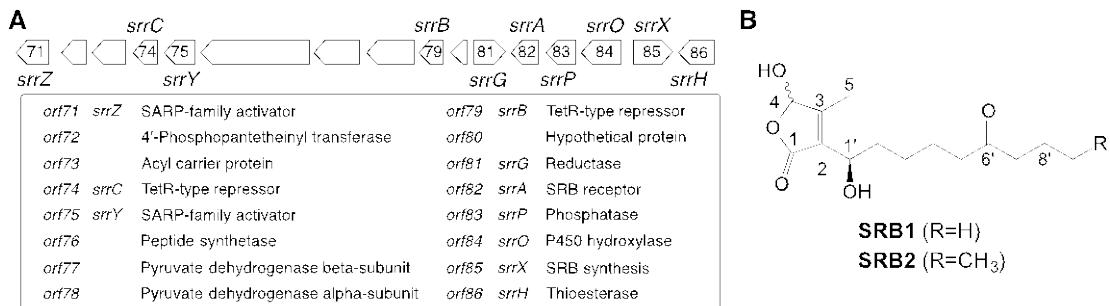


Figure 2. (A) The biosynthetic gene cluster for the signaling molecules SRB1 and SRB2 on pSLA2-L.
(B) Structure of SRB1 and SRB2 isolated from *S. rochei*.

く、2,3-ジヒドロ SRB および 6'-デオキソ SRB を合成し、SRB 合成遺伝子 *srrX* 破壊株への添加実験を行った。その結果、2,3 位二重結合は SRB の抗生物質生産誘導活性において重要であり、6' 位ケト基は誘導活性に無関係であることが分かった。SRB 合成遺伝子 *srrX* の周辺にはデヒドロゲナーゼ遺伝子 *srrG* (*orf81*)、SRB リセプター遺伝子 *srrA* (*orf82*)、ホスファターゼ遺伝子 *srrP* (*orf83*)、P450 水酸化酵素遺伝子 *srrO* (*orf84*)、チオエステラーゼ遺伝子 *srrH* (*orf86*) などがコードされており(図 2)、SRB 生合成への関与が示唆された。これらの網羅的遺伝子破壊による SRB 生合成経路の解析も進めている。

2. 制御遺伝子改変による潜在的二次代謝のゲノムマイニング

*tetR*型リプレッサー遺伝子 *srrB* の破壊株は LC, LM を大量生産しており、*srrB* は SRB 制御カスケードにおいて抗生物質生産を負に制御していることが示唆された。そこで *S. rochei* における潜在的二次代謝産物のゲノムマイニングの一環として制御遺伝子に注目し、主要生合成産物の LC, LM 生合成経路も同時に遮断させた変異株を作製した。代謝産物解析を行ったところ、通常生産していない化合物の蓄積が認められ、主生成物の UV 活性化合物はアゾキシアルケン化合物であることが分かった。アゾ結合の形成機構など興味深い点が多く、今後取り込み実験や推定生合成遺伝子の破壊・タンパク発現などにより解析していく予定である。

結論

制御遺伝子および主生産の抗生物質生合成遺伝子の人為改変を試みたところ、通常生産しない化合物の蓄積が認められた。放線菌は 1 菌株当たり 20 個以上の二次代謝生合成遺伝子群を有するが、そのうち通常培養にて生産が認められるのは 2 割程度であり、7-8 割は「ゲノムに埋もれている」という状況である。本アプローチによって潜在的二次代謝を覚醒することで、有用二次代謝産物の獲得が期待できる。

文献

- 1) Mochizuki, S., Hiratsu, K., Suwa, M., Ishii, T., Sugino, F., Yamada, K., Kinashi, H. (2003) The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism. *Mol. Microbiol.* **48**: 1501-1510.

- 2) Arakawa, K., Mochizuki, S., Yamada, K., Noma, T., Kinashi, H. (2007) γ -Butyrolactone autoregulator-receptor system involved in lankacidin and lankamycin production and morphological differentiation in *Streptomyces rochei*. *Microbiology* **153**: 1817-1827.
- 3) Yamamoto, S., He, Y., Arakawa, K., Kinashi, H. (2008) γ -Butyrolactone-dependent expression of the SARP gene *srrY* plays a central role in the regulatory cascade leading to lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*. *J. Bacteriol.* **190**: 1308-1316.
- 4) Suzuki, T., Mochizuki, S., Yamamoto, S., Arakawa, K., Kinashi, H. (2010) Regulation of lankamycin biosynthesis in *Streptomyces rochei* by two SARP genes, *srrY* and *srrZ*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **74**: 819-827.
- 5) Arakawa, K., Tsuda, N., Taniguchi, A., Kinashi, H. (2012) The butenolide signaling molecules SRB1 and SRB2 induce lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*. *ChemBioChem* **13**: 1447-1457.