
放線菌の線状ゲノムの構造と機能の多様性

研究課題番号 16208010

平成16-18年度科学研究費補助金

基盤研究(A) 研究成果報告書



平成19年5月

研究代表者 木梨 陽康

広島大学大学院先端物質科学研究科

はしがき

科学研究費補助金、基盤研究（A）の研究課題「放線菌の線状ゲノムの構造と機能の多様性」は、平成16年度から18年度までの3年間にわたって行われた。本年3月この研究を終了するにあたり、3年間の研究成果をここにまとめて報告する。

放線菌は多くの抗生物質を生産し、糸状菌に似た複雑な形態分化を行い、加えて線状染色体をもつという極めて興味深い土壌細菌である。本研究ではその中で、ストレプトマイシン生産菌である *Streptomyces griseus* の線状染色体のダイナミックな構造変化および放線菌の代表株である *S. coelicolor* A3(2)の線状染色体と巨大線状プラスミド SCP1 との相互作用を解析した。さらに、*S. rochei* 7434AN4 株が有する線状プラスミド pSLA2-L 上にコードされた様々な二次代謝遺伝子群の機能解析を行った。その結果、次のような成果を得ることができた。

1. *S. griseus* 2247 株の線状染色体は不安定で両末端が容易に欠失し、欠失末端同士が非相同組み換えを起こして環状化するが、この他にもアーム置換・巨大パリンドロームの形成など様々な構造変化を起こして、生き残りを計っていることが明らかになった。
2. *S. coelicolor* 2106 株は2つの巨大線状 DNA をもつが、それらは野生型染色体と線状プラスミド SCP1 が一点交差して生じたキメラ染色体であることが明らかになった。
3. 上記の事実から、大腸菌型の環状染色体と線状プラスミドが一点交差して線状染色体が生まれ、線状染色体同士あるいは線状染色体と線状プラスミドが一点交差して染色体の複数化が起こったことが示唆された。また、線状ゲノムの両末端にある末端逆位配列が、末端欠失を組み換え修復するための相同配列を提供していることが示唆された。
4. 線状プラスミド pSLA2-L 上のランカサイジンおよびランカマイシン生合成遺伝子クラスターを解析し、ランカサイジンの特異的な 17 員環炭素-炭素骨格の形成機構を明らかにした。また、ランカマイシン生合成における初発物質および 8,15 位の水酸化遺伝子を明らかにした。
5. 様々な二次代謝制御遺伝子の破壊株の解析によって、*S. rochei* では *S. griseus* の A-ファクター制御カスケードに較べて極めて複雑な制御系が働いていることが明らかになった。その中で、*srrX* → *srrA* → *srrY* のシグナル伝達経路が中心的役割を果たしていることが分かった。

これらの研究成果は、本科学研究費補助金があつて初めてなし得たものであり、ここに記して感謝する。また、研究成果は多くの共同研究者および学生とともに得られたものであり、関係した全ての方々に感謝する。

平成19年5月

研究代表者 木梨陽康

広島大学大学院先端物質科学研究科

研究組織

研究代表者 木梨 陽康 (広島大学大学院先端物質科学研究科教授)

研究分担者 荒川 賢治 (広島大学大学院先端物質科学研究科助手)

交付決定額 (配分額)

(金額単位千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	21,400	6,420	27,820
平成17年度	9,100	2,730	11,830
平成18年度	8,000	2,400	10,400
総計	38,500	11,550	50,050

研究発表

(1) 学会誌等

1. Mochizuki, S., Hiratsu, K., Suwa, M., Ishii, T., Sugino, F., Yamada, K., and Kinashi, H.
The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism.
Mol. Microbiol., 48, 1501-1510 (2003)
2. Bentley, S. D., Brown, S., Murphy, L. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Parkhill, J., Barrell, B. G., McCormick, J. R., Santamaria, R. I., Losick, R., Yamasaki, M., Kinashi, H., Chen, C. W., Chandra, G., Jakimowicz, D., Kieser, H. M., Kieser, T., and Chater, K. F.
SCP1, a 356,023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2).
Mol. Microbiol., 51, 1615-1628 (2004)
3. Uchida, T., Ishihara, N., Zenitani, H., Hiratsu, K., and Kinashi, H.
Circularized chromosome with a large palindromic structure in *Streptomyces griseus* mutants.
J. Bacteriol., 186, 3313-3320 (2004)
4. Yamasaki, M., and Kinashi, H.
Two chimeric chromosomes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) generated by single crossover of the wild-type chromosome and linear plasmid SCP1.
J. Bacteriol., 186, 6553-6559 (2004)
5. 木梨陽康

ミニレビュー，放線菌の潜在機能研究の新展開，はじめに。

日本農芸化学会誌, 78, 1062-1062 (2004)

6. 木梨陽康

放線菌のゲノム構造と生物機能の多様性。

日本農芸化学会誌, 78, 1067-1069 (2004)

7. 荒川賢治, 望月進, 杉野文規, 石井達也, 児玉和也, 木梨陽康

ランカサイジン生合成遺伝子群の機能解析および大員環形成機構の解明。

第46回天然有機化合物討論会要旨集, pp. 485-490 (2004)

8. Arakawa, K., Sugino, F., Kodama, K., Ishii, T., and Kinashi, H.

Cyclization mechanism for the synthesis of macrocyclic antibiotic lankacidin in *Streptomyces rochei*.

Chem. Biol., 12, 249-256 (2005)

9. Arakawa, K., Kodama, K., Tatsuno, S., Ide, S., and Kinashi, H.

Analysis of the loading and hydroxylation steps in lankamycin biosynthesis in *Streptomyces rochei*.

Antimicrob. Agents Chemother., 50, 1946-1952 (2006)

10. 荒川賢治, 児玉和也, 鈴木夏実, 井手彩洋子, 木梨陽康, 株本浩樹, 有澤章

14員環マクロライド抗生物質ランカマイシンのスターターユニットおよび水酸化反応の解析。

第48回天然有機化合物討論会要旨集, pp. 451-456 (2006)

11. Arakawa, K., Mochizuki, S., Yamada, K., Noma, T., and Kinashi, H.

γ -Butyrolactone autoregulator-receptor system involved in lankacidin and lankamycin production and morphological differentiation in *Streptomyces rochei*.

Microbiology, 153, 1817-1827 (2007)

12. Chater, K. F., and Kinashi, H.

Streptomyces linear plasmids: their discovery, functions, interactions with other replicons, and evolutionary significance.

Microbiology Monographs, Microbial Linear Plasmids, ed. by Meinhardt, F., and Klassen, R., Springer, Heidelberg, Germany, 2007, in press.

(2) 口頭発表

2004年

・木梨陽康, 内田哲也, 山崎雅之: 放線菌のゲノム構造と生物機能の多様性. 日本農芸化学会大会シンポジウム「放線菌の潜在機能研究の新展開」, 2004年3月, 広島

・児玉和也, 荒川賢治, 木梨陽康: 線状プラスミド pSLA2-L 上のランカマイシン生合成遺伝子群中の cytochrome P450 様遺伝子の機能解析. 日本農芸化学会大会, 2004年3月, 広島

- ・荒川賢治, 児玉和也, 木梨陽康 : 17 員環ポリケタイド抗生物質ランカサイジンの大員環形成反応. 日本農芸化学会大会, 2004 年 3 月, 広島
- ・山崎雅之, 木梨陽康 : *Streptomyces griseus* の代表株の染色体構造と末端配列の比較. 日本農芸化学会大会, 2004 年 3 月, 広島
- ・立野智資, 野間武法, 山田耕平, 荒川賢治, 木梨陽康 : 線状プラスミド pSLA2-L 上の *afsA* 様オートレギュレーター遺伝子の機能解析. 日本農芸化学会大会, 2004 年 3 月, 広島
- ・荒川賢治, 児玉和也, 木梨陽康 : 17 員環ポリケチド抗生物質ランカサイジンの大員環形成反応. 日本放線菌学会大会, 2004 年 7 月, 淡路島
- ・児玉和也, 荒川賢治, 木梨陽康 : ランカマイシン生合成における cytochrome P450-dependent 水酸化酵素の機能解析. 日本放線菌学会大会, 2004 年 7 月, 淡路島
- ・立野智資, 児玉和也, 荒川賢治, 木梨陽康 : ランカサイジン生合成における繰り返し型タイプ I-PKS の解析. 日本放線菌学会大会, 2004 年 7 月, 淡路島
- ・秋山俊輔, 山崎雅之, 木梨陽康 : *Streptomyces violaceoruber* JCM4979 株における SCP1 プラスミドラダーの解析. 日本放線菌学会大会, 2004 年 7 月, 淡路島
- ・K. Arakawa, S. Mochizuki, F. Sugino, K. Kodama, S. Tatsuno, T. Ishii, and H. Kinashi: Unusual macrocyclization mechanism and iterative type-I PKSs in the lankacidin biosynthesis. Bioorganic and Natural Product Symposium-Celebrating the 70th Birthday of Professor Heinz G. Floss, Aug. 2004, Seattle, USA
- ・荒川賢治, 望月進, 杉野文規, 石井達也, 児玉和也, 木梨陽康 : ランカサイジン生合成遺伝子群の機能解析および大員環形成機構の解明. 第 46 回天然有機化合物討論会, 2004 年 10 月, 広島

2005年

- ・立野智資, 杉野文規, 荒川賢治, 木梨陽康 : ランカサイジン生合成における繰り返し型ポリケチド合成酵素の機能解析. 日本農芸化学会大会, 2005 年 3 月, 札幌
- ・荒川賢治, 赫宇曦, 木梨陽康 : 線状プラスミド pSLA2-L 上にコードされたリプレッサー型制御遺伝子の機能解析と抗生物質生合成研究への応用. 日本農芸化学会大会, 2005 年 3 月, 札幌
- ・赫宇曦, 荒川賢治, 木梨陽康 : 放線菌 *Streptomyces rochei* における抗生物質生産制御システムのヒエラルキー解析. 日本農芸化学会大会, 2005 年 3 月, 札幌
- ・K. Arakawa, K. Kodama, and H. Kinashi: Unique macrocyclization catalyzed by amine oxidase in the lankacidin biosynthesis. 229th ACS National Meeting, Apr. 2005, San Diego, USA
- ・K. Arakawa, K. Kodama, and H. Kinashi: Functions of two cytochrome P-450 hydroxylase genes involved in lankamycin biosynthesis. 229th ACS National Meeting, Apr. 2005, San Diego, USA

- ・ H. Kinashi: Dynamic structural changes and evolution of *Streptomyces* linear chromosomes. 105th ASM General Meeting Symposium "Linear Chromosomes and Linear Plasmids in Bacteria", June 2005, Atlanta, USA
- ・ 荒川賢治, 赫宇曦, 山田耕平, 野間武法, 木梨陽康: 放線菌 *Streptomyces rochei* における制御遺伝子群の網羅的解析および抗生物質生合成経路解明への応用. 日本放線菌学会大会, 2005年9月, 高岡
- ・ 赫宇曦, 荒川賢治, 木梨陽康: 線状プラスミド pSLA2-L 上にコードされたリプレッサー型制御遺伝子 *srrB* の機能解析. 日本放線菌学会大会, 2005年9月, 高岡
- ・ G. Khodakaramian, 荒川賢治, 木梨陽康: Analysis of giant linear plasmids and phytotoxic metabolites from potato scab disease-inducing *Streptomyces* species. 日本放線菌学会大会, 2005年9月, 高岡
- ・ K. Arakawa, K. Kodama, and H. Kinashi: Functions of two cytochrome P-450 hydroxylase genes involved in lankamycin biosynthesis. Pacifichem 2005, Dec. 2005, Honolulu, USA
- ・ K. Arakawa, S. Tatsuno, K. Kodama, F. Sugino, and H. Kinashi: Unique macrocyclization mechanism and iterative type-I PKSs involved in the lankacidin biosynthesis. Pacifichem 2005, Dec. 2005, Honolulu, USA

2006年

- ・ 赫宇曦, 石田壮, 荒川賢治, 木梨陽康: 線状プラスミド pSLA2-L 上にコードされた制御遺伝子 *srrA* の機能解析. 日本農芸化学学会大会, 2006年3月, 京都
- ・ 荒川賢治, 児玉和也, 鈴木夏実, 株本浩樹, 有澤章, 木梨陽康: 14員環マクロライド化合物ランカマイシンのスターターユニットの起源および P450 水酸化酵素の機能解析. 日本農芸化学学会大会, 2006年3月, 京都
- ・ 村田正彦, 久枝幸代, 内田哲也, 木梨陽康: *Streptomyces griseus* 402-2 株における染色体逆位の解析. 日本農芸化学学会大会, 2006年3月, 京都
- ・ 荒川賢治, 立野智資, 木梨陽康: ランカサイジン生合成における繰り返し式タイプ I 型ポリケチド合成酵素の機能解析. 日本放線菌学会大会, 2006年7月, 木更津
- ・ 山本章治, 赫宇曦, 荒川賢治, 木梨陽康: *Streptomyces rochei* 抗生物質生合成における *srrX-srrA* 依存性のオートレギュレーターカスケード制御, 日本放線菌学会大会, 2006年7月, 木更津
- ・ G. Khodakaramian, 荒川賢治, 木梨陽康: A novel potato pathogenic compound isolated from an Iranian *Streptomyces scabies* strain. 日本放線菌学会大会, 2006年7月, 木更津
- ・ 立野智資, 荒川賢治, 木梨陽康: 徹底的な遺伝子破壊によるランカサイジン生合成中間体の単離の試み. 日本放線菌学会大会, 2006年7月, 木更津
- ・ 村田正彦, 久枝幸代, 内田哲也, 木梨陽康: トランスポゾンを介した放線菌染色体逆位機構

の解析. 日本放線菌学会大会, 2006年7月, 木更津

- ・野間武法, 安東李恵, 岡田行代, 荒川賢治, 木梨陽康: 線状プラスミド pSLA2-L 上にコードされた *tetR* 型リプレッサー遺伝子の解析. 日本放線菌学会大会, 2006年7月, 木更津
- ・荒川賢治, 児玉和也, 鈴木夏実, 井手彩洋子, 木梨陽康, 株本浩樹, 有澤章: 14 員環マクロライド抗生物質ランカマイシンのスターターユニットおよび水酸化反応の解析. 第 48 回天然有機化合物討論会, 2006年10月, 仙台

2007年

- ・荒川賢治, 立野智資, 木梨陽康: ランカサイジン生合成におけるモジュラー・反復混合型ポリケチド合成酵素の機能解析. 日本農芸化学会大会, 2007年3月, 東京
- ・立野智資, 荒川賢治, 木梨陽康: 新たな視点からのモジュラー・反復混合ポリケチド生合成仮説の証明. 日本農芸化学会大会, 2007年3月, 東京
- ・山本章治, 赫宇曦, 荒川賢治, 木梨陽康: *Streptomyces rochei* の抗生物質生産における2つの ArpA ホモログの役割. 日本農芸化学会大会, 2007年3月, 東京
- ・望月進, 山本章治, 山田耕平, 荒川賢治, 木梨陽康: pSLA2-L 上にコードされた SARP 遺伝子 *srrY-srrZ* 間の階層性と SrrZ タンパク質の機能の解析. 日本農芸化学会大会, 2007年3月, 東京
- ・木梨陽康: 放線菌の線状ゲノムの発見とその構造, 機能および進化に関する総括的研究 (学会賞受賞講演). 日本放線菌学会大会, 2007年5月, 尾道
- ・荒川賢治, 児玉和也, 鈴木夏実, 井手彩洋子, 板倉康浩, 有澤章, 株本浩樹, 木梨陽康: 14 員環マクロライド抗生物質ランカマイシンの生合成機構の解析. 日本放線菌学会大会, 2007年5月, 尾道
- ・望月進, 山本章治, 荒川賢治, 木梨陽康: *Streptomyces rochei* の抗生物質生合成における SARP 蛋白質の機能解析. 日本放線菌学会大会, 2007年5月, 尾道
- ・立野智資, 荒川賢治, 木梨陽康: ランカサイジン生合成におけるモジュラー・反復混合ポリケチド生合成機構の解析. 日本放線菌学会大会, 2007年5月, 尾道
- ・楊英杰, 望月進, 黒川透, 高島弘律, 荒川賢治, 木梨陽康: *Streptomyces rochei* の線状プラスミド pSLA2-M の構造と機能の解析. 日本放線菌学会大会, 2007年5月, 尾道

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

- ・木梨陽康, 荒川賢治: 遺伝子破壊による抗生物質生産微生物の生産方法およびこれを用いて得られる抗生物質生産微生物、並びに抗生物質代謝中間体の生産方法. 特願2005-061184, 2005年3月

研究成果

1. 放線菌の線状ゲノムの構造および再編成機構の解析

(1) *Streptomyces griseus* 301-22 株染色体に形成された巨大パンドローム構造の解析 (論文 3)

S. griseus 2247 株の線状染色体は不安定で自然誘発的にあるいは様々な変異処理によって容易に末端欠失が起こる。欠失サイズは 20-550kb とまちまちで、欠失のホットスポットは存在しなかった。欠失株の多くでは欠失末端同士が非相同組み換えによって結合し、染色体が環状化していた(J. Bacteriol., 181, 5711-5717 (1999); Biosci. Biotechnol. Biochem., 67, 1101-1108 (2003))。環状化以外の構造変化を探るために、さらに多くの変異株の取得を試みた。

その中の 301-22-L,M 株では左右の染色体末端が欠失し、そこに新たな断片が生じていたので、両末端の欠失後も線状染色体を維持していると推定された。しかし詳細な構造解析の結果、この株では次のような複雑な構造変化が起きていることが明らかになった。すなわち、(i) 左右の染色体アーム上にあるリポ蛋白様 ORF 間の相同組み換えによって、染色体の左アームが右アームに乗り移り(アーム置換)、(ii) その結果生じた異常に長い末端逆位配列(TIR)もまた末端欠失に曝され、TIR 内の異なる場所で閉環して巨大なパンドローム構造が形成されていた。坂口らは、放線菌の線状プラスミドの両 TIR が末端蛋白やその他の結合蛋白の相互作用によって並列にならび、これが柄の部分となって DNA 全体は racket frame 構造をとると提唱した。この仮説は Losick らによる *Streptomyces lividans* 染色体の両末端の *in situ* hybridization によって支持された。301-22 株染色体では TIR の先端が閉じているので、私たちはこの構造を 'closed racket frame' と命名した。

301-22-L,M 株染色体のパンドロームの先端部のクローン化を試みたが、成功しなかった。そこで、親株 2247 の対応する領域をクローン化し、塩基配列を決定した。両変異株のパンドローム構造の先端に対応する位置に、片側のホモロジーの長さが 14bp, 24bp の inverted repeats が見付き、これらが closed racket frame の形成に関与したと思われた。すなわち、欠失末端に inverted repeat があるとヘアピン構造が形成され、これが複製によって伸びたところで反対側の TIR と組み換え修復を起こして、closed racket frame が生じたものと思われた。このように大きなパンドローム配列は大腸菌などでは複製不能なので、放線菌には特別な複製装置が働いていることが示唆された。

(2) *Streptomyces griseus* 402-2 株の染色体逆位の解析 (投稿準備中)

S. griseus 402-2 株染色体を *Asel* で消化しパルスフィールド電気泳動で解析したところ、*Asel*-B,D 断片の代わりに *Asel*-B',D'断片が生じ、その他の断片に変化はなかった。*DraI* 消化物についても同様の結果が得られた。これらの結果から、*Asel*-H,K,J,I 断片を挟んで *Asel*-B と *Asel*-D の間で約 2.5Mb にわたる染色体逆位が起きたことが示唆された。402-2 株の *Asel*-B',D' 上の逆位の接合部と親株の *Asel*-B,D 上の対応する領域をクローン化し、制限酵素地図・塩基配列の比較を行った。その結果、トランスポゾンが逆位に関与していることが推定された。親株

ではこの配列が1コピーあるのに対して、402-2 株では2コピーあった。それ故、トランスポゾンが染色体の 2.5Mb 離れた所に逆向きに転座した後、初めのコピーと相同組み換えを起こして逆位が生じたことが示唆された。

これを証明するため、親株のトランスポゾンの全塩基配列と 402-2 株の2コピーのトランスポゾンの両末端の塩基配列を決定した。また親株における第2のコピーの挿入点の塩基配列も決定した。トランスポゾンには両末端に direct repeat (DR)があり、その塩基配列はコピーごとに異なる。それ故、もし2コピーのトランスポゾン間で組み換えが起こればキメラ DR が生じるはずである。親株と変異株の3つのトランスポゾンの両末端配列を比較したところ、予想通り後者にはキメラ DR (GTGAC---GGAGA, GGAGA---GTGAC)が生じていた。またトランスポゾンを切断しない酵素 *ScaI*+*NotI* で消化し、3つのコピーをパルスフィールド・ゲル上で巨視的に確認した。また、親株のトランスポゾンの全塩基配列(6.5kb)を決定し、その中に *transposase*, *resolvase/recombinase*, *transmembrane protein*, *ABC transporter*, *GntR-family transcriptional regulator* 遺伝子を同定した。こうして、放線菌において初めて発見された染色体逆位の形成機構を明らかにした。

(3) *Streptomyces coelicolor* 2106 株のキメラ染色体の構造解析 (論文4)

S. coelicolor 2106 株は約 1850kb の巨大線状プラスミド SCP1'-*cysD* をもつ。このプラスミドおよび染色体の制限酵素地図の比較から、この株では8668kbの野生型染色体と356kbのSCP1が組み換えを起こして、SCP1'-*cysD* と新たな染色体が生じたことが示唆された。SCP1'-*cysD* が様々な curing 処理によっても除去できなかったことから、これはプラスミドというより生存に必須な染色体であると考えられた。2106 株の線状染色体と SCP1'-*cysD* の接合部および後者の両末端の塩基配列を決定し、これらが染色体と SCP1 の一点交差によって生じたキメラ染色体(7181, 1843kb)であることを最終的に確認した。染色体と SCP1 の組み換え点にホモロジーはなく、組み換えによってそれぞれに 15bp と 55bp の欠失が起きていた。このように線状染色体と線状プラスミドが一点交差して2つのキメラ染色体が生じたことは、線状染色体の複数化のモデルと捉えることができ、ゲノム進化を考える上で極めて興味深い(後述)。

(4) *Streptomyces violaceoruber* JCM4979 株の SCP1 プラスミドドラダーの解析(投稿準備中)

S. violaceoruber JCM4979 株は大きさが約 35kb ずつ異なる 390-630kb の一連の線状プラスミドをもつ。線状プラスミド SCP1(356kb)と環状プラスミド SCP2(31.3kb)がプラスミドドラダーにハイブリダイズしたので、これらのプラスミドは SCP1 に SCP2 が異なるコピー数組み込まれて生じたものと推定された。しかし、各プラスミドの大きさの違いが SCP2 のサイズと完全には一致しなかった。その後、Chater らは、私たちをはじめ多くの研究者と共同して SCP1 の全塩基配列を決定し (論文2)、また SCP2 の全塩基配列も Altenbuchner らによって明らかにされた。これらの塩基配列を利用して、プラスミドドラダー中の SCP1-SCP2 接合部の配列と

比較することによって、プラスミドラダーの構造を推定した。その結果、SCP2から stability region が欠失した 28kb 領域と SCP1 の 8kb 領域からなる 36kb DNA が増幅単位となって、SCP1 上で異なるコピー数増幅してラダーを生じたことが明らかになった。それ故、一連の線状プラスミドは、増幅領域以外は複製開始点を含めて SCP1 と全く同じ構造をしている。このように極めて類似したプラスミドが同一細胞内で共存できることはたいへん興味深く、これらのプラスミド DNA には incompatibility が働いていないことが示唆された。

(5) ゲノム進化および末端逆位配列(TIR)の機能に関する仮説の提唱 (論文 3,4,6,12)

S. griseus 2247 株の線状染色体は不安定で自然誘発的あるいは様々な変異処理によって末端欠失が起こる。欠失株の多く(404-23, N2, N0.9, N0.83 株)では染色体が環状化していた。融合した欠失末端同士にホモロジーはなく、環状化が非同相組み換えによって起きたことが分かった。このように放線菌の染色体は線状でも環状でも複製維持される。これは放線菌が、大腸菌型の両方向複製装置と線状プラスミド・ウィルス型の末端複製装置の両方を備えているためである。この結果は、大腸菌型の環状染色体と線状プラスミドが一点交差して、線状染色体が生じたことを示唆した。一方、*S. coelicolor* 2106 株の2つのキメラ染色体の構造は、線状染色体と線状プラスミドが一点交差して、線状染色体の複数化が起こったことを示唆した。生物はこのように、「環状染色体 → 線状染色体 → 線状染色体の複数化」とゲノム構造を進化させることによって、増大するゲノム情報量に対応してきたと思われる。

S. griseus の線状染色体は末端欠失にともなって、環状化以外の構造変化も示した。MM9 株では左右の染色体アーム上にある2つのリポ蛋白様 ORF(ORF-L,R)が相同組み換えしてアーム置換が起こり、450kb という巨大な TIR をもつ線状染色体に変化していた(J. Bacteriol., 185, 1120-1124 (2003))。上述したように、301-22 株では TIR 内で閉環して巨大パリンドローム構造が形成されていた。*S. griseus* 線状染色体のダイナミックな構造変化を図1にまとめて示した。

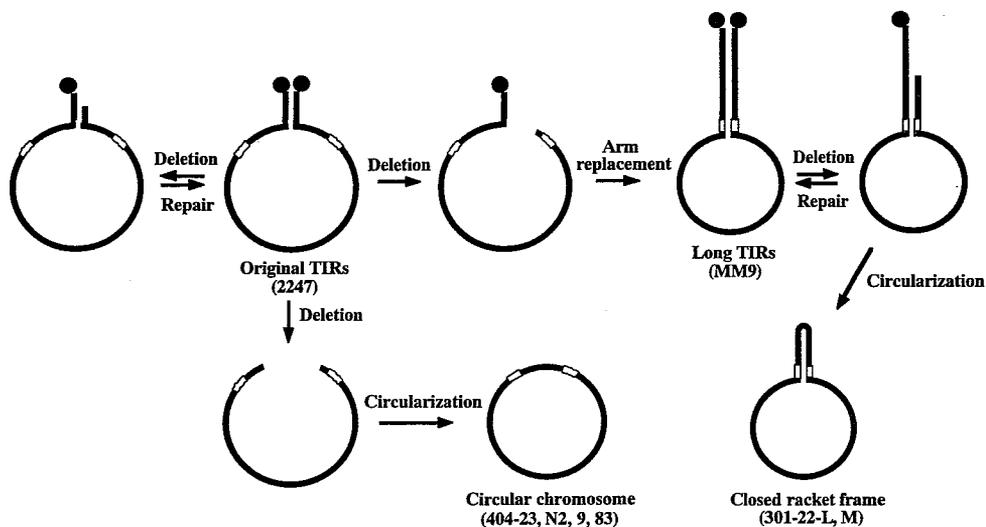


図1. *S. griseus* 2247 株の線状染色体のダイナミックな構造変化と TIR の機能

このような様々な構造変化から、放線菌の生存戦略と TIR の機能について次のようなことが推定された。

放線菌の線状染色体は常に末端欠失に曝されているが、欠失が一方の TIR の範囲内にある場合は、もう一方の完全な TIR を用いた組み換え修復によって末端が回復する。このような修復はしばしば起きているが、全く同じ末端構造が回復されるので、通常はこれに気がつかない。放線菌の線状レプリコンの両末端にある TIR は、相同組み換えのための相同配列を保証していると考えられる。TIR を越えて欠失が進んだ場合に、もし両アーム上に相同配列があれば、MM9 株のように組み換え修復によってアーム置換が起こる。この場合は染色体の一部が失われるが、より大きな TIR が形成されて末端が回復する。放線菌染色体は様々な長さの TIR をもつが、このような TIR の多様性はアーム置換によって生じたものと思われる。両末端が欠失した場合はもはや末端を回復することはできないので、404-23, N2, No.9, No.83 株のように欠失末端同士が非相同組み換えを起こして環状化する。アーム置換によって形成された異常に長い TIR も末端欠失に曝されるが、欠失末端に形成されたヘアピン構造がきっかけとなって組み換え修復が起こり、closed racket frame 構造が形成される。

このように、*S. griseus* の線状染色体は末端欠失が起きたときに、様々な戦略を用いて末端の回復をはかり、それが不可能な場合は染色体を環状化させて欠失が必須領域へ拡大するのを防いでいる。*S. griseus* の線状染色体のこのようなダイナミックな構造変化は、染色体構造の可塑性と生物の適応能力をあらためて私たちに認識させてくれた。

2. pSLA2-L 上にコードされた二次代謝遺伝子群の機能解析

(1) ランカサイジンの生合成機構の解析(論文 7,8)

S. rochei 7434AN4 株の線状プラスミド pSLA2-L の全塩基配列(210,614bp)決定によって、その上にはランカサイジンおよびランカマイシンの 2 つの I 型ポリケチド生合成(polyketide synthase, PKS)遺伝子クラスター、構造未知の II 型ポリケチド化合物の生合成クラスター、カロテノイド生合成クラスターおよび多くの二次代謝制御遺伝子がコードされていることが明らかになった。それ故、pSLA2-L はその 2/3 を二次代謝関連遺伝子が占める極めて特異的な線状プラスミドである。

特に、ランカサイジン(LC)の生合成は、特異的な 17 員環炭素一炭素骨格の形成と、モジュラー・繰り返し混合ポリケチド生合成という 2 つの特徴をもつ。第 1 の特徴を明らかにするため、次のような実験を行った。lankacidin synthase E (*lkcE=orf14*, amine oxidase)遺伝子を破壊したところ、この株は LC を生産せず別の代謝産物(LC-KA05)を蓄積した。これを単離し構造解析したところ、C2-C18 結合をもたない線状化合物であることが分かった。intact な *lkcE* 遺伝子を破壊株に導入したところ、LC-KA05 は LC にまで変換された。これらの結果から、*LkcE* によって LC-KA05 の C18 アミドがイミドに酸化され、それを C2 が求核攻撃して特異的な 17 員環が形成されたことが明らかになった(論文 7,8)。

第2の特徴については次のような解析を行った。LC 骨格の生合成にはグリシンをスターターとして8個の酢酸分子の縮合が必要であるのに対して、*lkc* クラスター中には縮合反応を担う ketosynthase(KS)ドメインが5個しか存在しない。この矛盾を説明するために、私たちは LkcC-KS が4回繰り返して(iteratively)使われ、LkcA-KS, LkcF-KS1,KS2, LkcG-KS は1回のみ(modularly)使われるというモジュラー・反復混合ポリケチド生合成(modular-iterative mixed polyketide biosynthesis)仮説を提唱した。繰り返し縮合の後、LkcF-KR1, KR2によって7,5位のケトンが還元されると、LCの化学構造と完全に一致する。この仮説を証明するために、3つのKRドメイン(LkcC-KR, LkcF-KR1,2)の活性中心にある Ser, Tyr の点変異株を作製したが、これまでのところ期待した代謝産物は得られていない(未発表)。

そこで、*lkc* クラスター以外の遺伝子が LC 生合成に関与していないことを証明するため、クラスター全体を *S. lividans* に導入することを試みた。クラスター全体は大きすぎるので2つに分け、*lkcA-E* を染色体に組み込み、*lkcF-O* をプラスミドに乗せて導入した。その結果、*S. lividans* は lankacidinol A を生産したので、*lkc* クラスターは LC 骨格形成に必要な全ての遺伝子をコードしていることが証明された。また、LC ではなく lankacidinol A が作られたことは、後者の前者への変換に必要な酸化および脱アセトキシ反応を行う酵素が *S. rochei* 染色体にはコードされているが、*S. lividans* 染色体にはコードされていないことが示唆された(投稿準備中)。

LkcA は nonribosomal peptide synthetase(NRPS)と PKS の融合酵素であり、骨格合成の初発反応であるグリシンと酢酸の縮合反応を行うので、繰り返し縮合には関与していないと思われた。同様に、LkcG は TE ドメインをもち縮合反応の終結とラクトン形成を行うので、繰り返し反応の候補としては除外された。残った LkcC, LkcF の繰り返し反応を確かめるため、*lkcF* の3'末端と *lkcG* の5'末端を *in frame* で融合させた変異株を作製した。この株が親株と同じ量だけ LC を生産したので、LkcF も繰り返し反応に関与していないことが示唆された(投稿準備中)。これら全ての結果は LkcC が繰り返し使用されるという私たちの仮説を支持している。

(2) ランカマイシンの生合成機構の解析(論文 9,10)

ランカマイシン(LM)は有名なマクロライド抗生物質エリスロマイシンと構造がよく似ているが、13位にエチル基ではなく C2 単位長い 3-hydroxy-2-butyl 基をもつ。この構造から、*lkm*-PKS 中には酢酸をスターターとして認識する extra module の存在が予想されたが、pSLA2-L の全塩基配列決定によってその可能性は否定された。そこで、LkmA の loading module は 2-methyl-3-hydroxybutyrate あるいはその前駆体を認識すると推定された。[3-²H]isoleucine を合成して *S. rochei* の培養液に添加し、得られた LM の ²H-NMR を測定したところ、²H が 14 位に取り込まれていた。この結果はイソロイシンが methylbutyrate に変換された後、スターターとして取り込まれたことを示した。次に、2つの P450 hydroxylase 遺伝子(*orf27=lkmF*, *orf37=lkmK*)を破壊したところ、前者は 8-deoxylankamycin を、後者は 15-deoxylankamycin および 8,15-dideoxylankamycin を蓄積した。それ故、LkmF, LkmK がそれぞれ 8, 15 位の水酸化酵素である

ことが明らかになった。これらの結果から、2-methylbutyrate が初めに 8,15-dideoxylankanolide 骨格に取り込まれた後、15 位の水酸化、続いて 8 位の水酸化が起こることが示唆された。

(3) 二次代謝制御カスケードの解析 (論文 11)

pSLA2-L 上には 6 個の *tetR* 様リプレッサー遺伝子(*orf74*, *orf79*, *orf82*, *orf92*, *orf99*, *orf126*)と 3 個の SARP (*Streptomyces antibiotic regulatory protein*) 様制御遺伝子(*orf51*, *orf55*, *orf75*)および *afsA* ホモログである *orf85* がコードされている。これらの制御遺伝子の機能を明らかにするため、*srrX*(*orf85*), *srrA*(*orf82*), *srrB*(*orf79*), *srrC*(*orf74*)の単独破壊株および *srrX* と *srrA,B,C* との二重破壊株を作製し、抗生物質生産能および胞子形成能を調べた。その結果、*srrX* が γ -butyrolactone(GB)生合成遺伝子であること、この株の GB は *S. griseus* の A ファクターとは異なって抗生物質生産を正に、胞子形成を負に制御することが明らかになった。また、*srrA* が GB リセプターをコードしていて、SrrA 蛋白は GB とは全く逆に作用することが分かった。もう一つの *tetR* 型リセプター遺伝子 *srrC* は胞子形成を正に制御し、抗生物質生産には影響を与えなかった。一方、*srrB* は抗生物質を負に制御し、胞子には影響を与えなかった。このように *S. rochei* においては、*S. griseus* の A-ファクター制御カスケードに較べて極めて複雑な二次代謝制御系が働いていることが明らかになった(論文 11)。

次に、*srrX-srrA* によって構成される γ -butyrolactone-receptor 制御系の下流で働いている遺伝子を同定するため、*srrX*, *srrA* 破壊株および *srrX-srrA* 二重破壊株における遺伝子発現を S1 nuclease mapping を用いて調べた。その結果、これらの変異株における SARP 遺伝子 *srrY*(*orf75*) の発現と抗生物質生産性は完全に一致していた。ゲルシフト実験によって SrrA 蛋白の *srrY* プロモーター領域への結合が確認され、この結合は GB 分画の添加によって阻害された。さらに footprinting によって結合領域を特定したところ、2 つの結合サイトが確認され、サイト 1 には GB 結合サイトに共通するパ lindローム配列が存在し、サイト 2 には SARP 蛋白の結合領域に特徴的なリピート配列が見つかった。こうして、*srrX* \rightarrow *srrA* \rightarrow *srrY* のシグナル伝達経路が、*S. rochei* の二次代謝制御カスケードにおいて中心的な役割を果たしていることが明らかになった(投稿中)。