

Functional analysis of transcriptional regulators for secondary metabolites production in *Actinomycetes* (放線菌における二次代謝産物生産を調節する転写因子の機能解析)

見崎 裕也 (細胞機能化学研究室)

第一章 序論

1940年代から現在に至るまで、数多くの抗生物質が天然の生物資源(植物、動物、微生物)から単離されてきた。ストレプトマイシンは放線菌から単離された最初の抗生物質であり、本物質の発見以来、多くの新しい生理活性物質が放線菌から得られているが、新規化合物の発見は減少傾向である。一方、放線菌ゲノム上には、一菌株あたり30種類以上の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在していることが次世代シーケンス解析により明らかになった。しかし、通常培養により検出される二次代謝産物は、一菌株あたり数種類程度であり、8-9割の二次代謝産物生合成が見いだせていない。この事実は、数多くの二次代謝産物が手付かずのままゲノム中に埋もれていることを示唆している(休眠二次代謝)。これらの未利用資源を発掘することができれば、新規二次代謝産物の獲得が期待できる(ゲノムマイニングアプローチ)。

放線菌における二次代謝産物生産は、種々の転写調節因子によって調節されている。これらの調節因子の働きを理解することで、新規生理活性物質の発見に貢献することが可能である。そこで、本研究では放線菌で広く見いだされているTetR型転写抑制因子とSARP(*Streptomyces antibiotics regulatory protein*)型転写活性化因子に注目し、解析を行った。

第二章 シュードレセプター様タンパク SrrB の機能解析 (参考論文 1)

Streptomyces 属放線菌における二次代謝産物の生産は、シグナル分子とシグナル分子レセプターからなる制御カスケードにより厳密に調節されている。*Streptomyces rochei* 7434AN4株における主要代謝産物ランカサイジン(LC)・ランカマイシン(LM)の生合成遺伝子及び転写調節遺伝子は、全長210,614 bpの線状プラスミドpSLA2-L上にコードされている。先行研究により、シグナル分子合成酵素SrrXにより生産されるシグナル分子SRB→TetR型シグナル分子レセプターSrrA→SARP型転写活性化因子SrrY(→LC)→SARP型転写活性化因子SrrZ(→LM)という制御カスケードが明らかにされている。興味深いことに、pSLA2-L上にはSrrAとの相同性を示すSrrBがコードされていた。SrrBはDNA結合因子とリガンド結合ドメインを有しており、高いpI値を有することからシュードレセプターに属することが示唆された。シュードレセプターはシグナル分子レセプターと異なり、シグナル分子を認識せず、カスケードの最終産物をリガンドとして認識する例が報告されている。本章ではsrrB遺伝子の機能解明を目指し、遺伝子破壊株を利用した二次代謝生産・転写発現の比較解析、DNase IフットプリントによるSrrB結合サイトの特定、転写開始点の決定、SrrBタンパクを使用したゲルシフトアッセイによるDNA結合親和性解析、を行った。

親株、 Δ srrA株、 Δ srrB株、 Δ srrA Δ srrB株を培養し、代謝プロファイルの経時変化測定を行ったところ、srrB変異によりLC生産量が9倍近く向上していた。このことから、SrrBがシグナル分子制御カスケードに関与していることが示唆された。DNase Iフットプリント解析の結果から、SrrAがsrrB遺伝子とsrrY遺伝子の上流に結合すること、SrrBがsrrYの上流に結合することが判明した。さらに、上述の4株におけるRT-PCR解析により、SrrBは、培養後期にsrrY発現を抑制し、二次代謝生産の巧妙な一過的発現制御を担うことが示唆された。また、SrrBのシグナル分子SRB感受性はSrrAと比較すると1/50程度であることをゲルシフト解析により見いだした。次いで、SrrBのリガンド結合性を検証するために、本菌のカスケード最終産物であるLC・LM、テトラサイクリン系抗生物質クロロテトラサイクリン、アミノグリコシド系抗生物質カナマイシン、 β -ラクタム系抗生物質アンピシリン、などを候補化合物として用いた。その結果、いずれの抗生物質もリガンドとして認識しないことが分かり、SrrBは既知のシュードレセプターとは異なる性質を持つことが示唆された。

第三章 転写活性化因子 SARP の強制発現による新規代謝産物の発掘 (参考論文 2)

抗生物質生産に至るには、複数の生合成遺伝子が協調して発現する必要があり、関連遺伝子が同一の転写単位上に存在しない場合、複数の転写単位を一括して発現させる因子が必要である。よく知られている例として、DNA結合型転写活性化因子SARPがある。*S. rochei*の場合では、LC生産を活性化するSrrY、LM生産を活性化するSrrZがSARPとして機能している。

本菌の染色体 (8.36 Mb) 上には 12 個の SARP が存在し (関連論文1)、これらの二次代謝誘導における機能に興味を持たれた。本章では、染色体上の SARP 遺伝子 *SRO_3163* に注目し、強制発現による二次代謝誘導を目指した。

チオストレプトン誘導型 *tipA* プロモーターを保有するプラスミド pIJ8600 に *SRO_3163* 遺伝子を連結し、プラスミド pYMR3163 を構築した。構築したプラスミドを *S. rochei* KA20 株 (LC・LM 非生産株) に形質転換し *S. rochei* KA20/pYMR3163 株を取得した。本菌株を培養し、代謝プロファイルを解析したところ、親株には見られない UV 活性化化合物 (YM3163-A) の存在が確認された。本化合物の単離・構造決定を目指し、*S. rochei* KA20/pYMR3163 形質転換体を 10 L 培養し、培養上清を酢酸エチル抽出した。抽出物を LH20 ゲル濾過およびシリカゲルクロマトグラフィーに供することで YM3163-A を 2.9 mg 取得した。ESI-MS 解析の結果から C₈H₁₁NO の示性式であることが推定された。¹³C NMR を測定したところ、15 本のシグナルが検出されたことから、ジアステレオマーの存在が示唆された。次いで、2 次元 NMR により構造解析し、YM3163-A の構造は 2-(cyclohex-2-en-1-ylidene)acetamide であることが分かった。また、本構造は化学合成により確認した。

YM3163-A は新規化合物であり、本化合物に類似した化合物の生合成起源や生合成遺伝子は報告例がなく、放線菌二次代謝マシナリーの新たな可能性を提唱することができた。*SRO_3163* の近傍には、フタロシンの生合成遺伝子が 3 つ存在する。しかし、フタロシンの化学構造は YM3163-A の化学構造とは関連がない。このことから *SRO_3163* は独立した SARP として、未同定の YM3163-A 生合成遺伝子クラスターを活性化していることが示唆された。

第四章 総括

本論文では、放線菌に広く見いだされている 2 つの転写調節因子に注目し、二次代謝産物生産調節機能の統合的理解を目指した。第二章では、制御カスケード中で転写抑制因子として機能するシュードレセプター *SrrB* の機能解明を行った。その結果、*SrrB* が典型的なシュードレセプターと異なり、制御カスケード中でリプレッサーとして機能するものの最終生産物 (LC・LM) によるフィードバック制御を受けないことを見だし、シュードレセプターの機能が多様化していることを示した。第三章では、*S. rochei* 染色体上に存在する転写活性化因子 SARP の強制発現により、休眠二次代謝を発掘し、新規化合物 YM3163-A の存在を特定した。

二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの大部分は、通常の実験室培養条件下では発現していない。多くの研究者が、微生物から新規天然物を発見するために、様々なゲノムマイニングアプローチを考案・提唱している。本論文では、制御カスケードの分子基盤を解明し、制御遺伝子を合目的に制御することで、転写調節因子の合理的制御による新規二次代謝生産の可能性を拓いた。加えて最近、転写活性化因子と転写抑制因子の二重変異株から 3 種類の γ -ブチロラクトン化合物の蓄積を見いだした (関連論文2)。これらの研究を通じて、*Streptomyces* 属放線菌の高い二次代謝生産性を改めて示すことができた。複雑な二次代謝制御ネットワークの分子基盤の包括的解明は、バイオテクノロジーを駆使した代謝系・制御系の合理的制御による有用生理活性天然物獲得への貢献が期待できる。

参考論文 (学位要件論文)

[1] Y. Misaki, S. Yamamoto, T. Suzuki, M. Iwakuni, H. Sasaki, Y. Takahashi, K. Inada, H. Kinashi, and K. Arakawa, "SrrB, a pseudo-receptor protein, acts as a negative regulator for lankacidin and lankamycin production in *Streptomyces rochei*", *Front. Microbiol.*, **11**:1089 (2020).

[2] Y. Misaki, Y. Nindita, K. Fujita, A. A. Fauzi, and K. Arakawa, "Overexpression of *SRO_3163*, a homolog of *Streptomyces* antibiotic regulatory protein, induces the production of novel cyclohexene-containing enamide in *Streptomyces rochei*", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **86**(2):177-184 (2022).

関連論文

[1] Y. Nindita, Z. Cao, A. A. Fauzi, A. Teshima, Y. Misaki, R. Muslimin, Y. Yang, Y. Shiwa, H. Yoshikawa, M. Tagami, A. Lezhava, J. Ishikawa, M. Kuroda, T. Sekizuka, K. Inada, H. Kinashi, and K. Arakawa, "The genome sequence of *Streptomyces rochei* 7434AN4, which carries a linear chromosome and three characteristic linear plasmids", *Sci. Rep.*, **9**(1):10973 (2019).

[2] Y. Misaki, Y. Takahashi, K. Hara, S. Tatsuno and K. Arakawa, "Three 4-monosubstituted butyrolactones from a regulatory gene mutant of *Streptomyces rochei* 7434AN4", *J. Biosci. Bioeng.*, in press. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2022.01.006