

植物稀少有用化合物の生産を指向した放線菌休眠二次代謝覚醒化システムの確立

申請代表者 荒川 賢治

広島大学大学院統合生命科学研究科

准教授

所内共同研究者 森田 洋行

天然物創薬学領域

教授

■背景・目的

生薬資源の確保が困難になってきた今日にあつて、和漢薬等の有効成分の効率的生産法の開発や稀少有用成分高含量植物の生産法の開発は益々重要な課題である。その方策の一つとして、酵母等に天然物の生合成遺伝子を組み込むことで、稀少有用化合物を効率的に生産する方法などが挙げられる。一方、これらの生産性の向上を図る上で、導入した生合成遺伝子を効率的に高生産可能なシグナル分子や制御タンパク質の開発、および現在一般的に用いられている酵母等の宿主よりも高生産を可能にする宿主の探索も必要である。本研究では、放線菌を新たなモデル宿主として着目する。放線菌は微生物の中でも比較的早くゲノム解読が完了しており、2002年のモデル放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2) の全塩基配列決定を契機として、現在では1,000株以上のゲノムが公開されている。特筆すべき点は、1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を有するが、約8割はゲノムの中に「休眠している状態」である。これらの休眠遺伝子を覚醒する試みが世界中の天然物生合成研究者によって試みられているが、休眠遺伝子を覚醒可能なシグナル分子や制御タンパク質を開発できれば、その休眠遺伝子部位に植物由来稀少有用化合物の生合成遺伝子を組み込むことで、放線菌を用いた稀少有用化合物の高生産系の開発に繋がることが期待される。そこで本研究では、シグナル分子と制御タンパクに注目し、その先行研究として、放線菌休眠遺伝子の覚醒化を目指した。

■結果・考察

[課題1] シグナル分子による休眠遺伝子覚醒化の実証および分子基盤の解明

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株は2つの抗生物質ランカサイジン、ランカマイシン (図1A) を生産し、その生産誘導はブテノライド骨格を有するSRB (*Streptomyces rochei* butenolides) により引き起こされる。本分子は、今まで知られているシグナル分子 (図1B) と構造が異なり、異種放線菌で二次代謝誘導を引き起こす可能性が示唆された。そこで、概略図2に示した通り、シグナル分子による休眠二次代謝遺伝子覚醒化を目指した。シグナル分子SRBもしくはその炭化水素を簡略化したC10-SRB, C8-SRBを添加し、その代謝産物のプロファイル変化をSRB添加、非添加で比較検討し、SRBによる代謝誘導を調べた。各種単離放線菌への添加実験では、69株中11株における抗菌性の変化を確認した。この

ことは、本誘導システムが放線菌二次代謝産物のゲノムマイニングに有効である可能性を示すものであり、さらなるその他新規分離源サンプルへの適用により、新規分子骨格を有する代謝産物の獲得が期待できる。

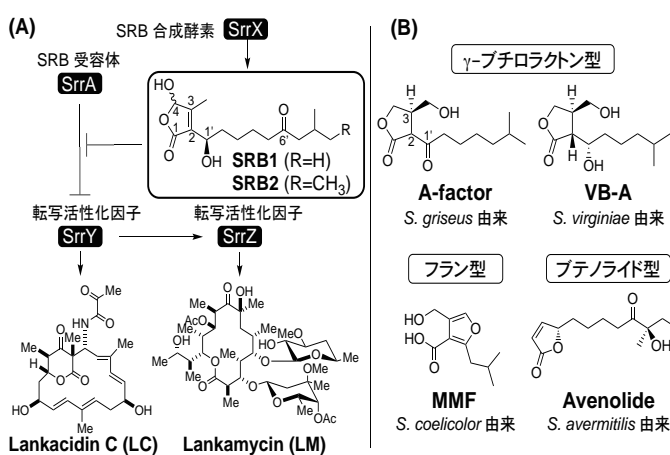


図1 (A) *S. rochei* 二次代謝カスケードおよびシグナル分子SRBの化学構造 (B) *Streptomyces* 属放線菌シグナル分子の化学構造

種目 (特定研究)

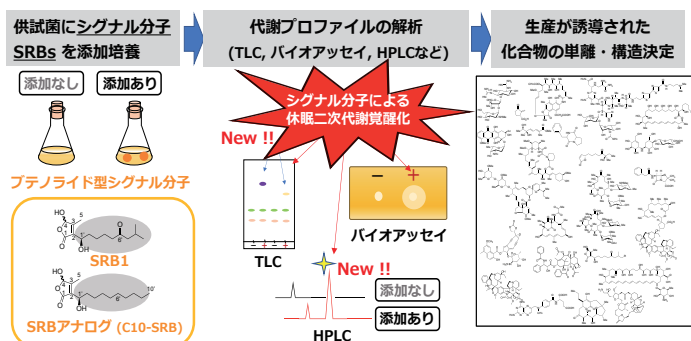


図2 SRB による休眠遺伝子覚醒化システムの概略図

[課題2] 膜透過性ポリリジンタグによる制御タンパクの修飾および細胞内送達

二次代謝誘導を制御する制御タンパクに着目し、本研究では activator と repressor に注目した。まずは高発現系を構築し、次いでタンパクの結晶化に賦す。得られた結晶構造を解析し、タンパク表面のカチオン性残基を調べ、ポリリジンタグを導入しうるアミノ酸残基を選定し、さらにリガンド結合やDNA結合領域の特定を氏、二次代謝制御タンパクの分子基盤を解明する (図3A)。さらに、我々は図3B 記載のように膜透過性ポリリジンタグの融合化を検証する。そして、膜透過性ポリリジンタグを融合させた制御タンパクを供試菌に添加して細胞内に送達させ、二次代謝プロファイルの変動を解析する。

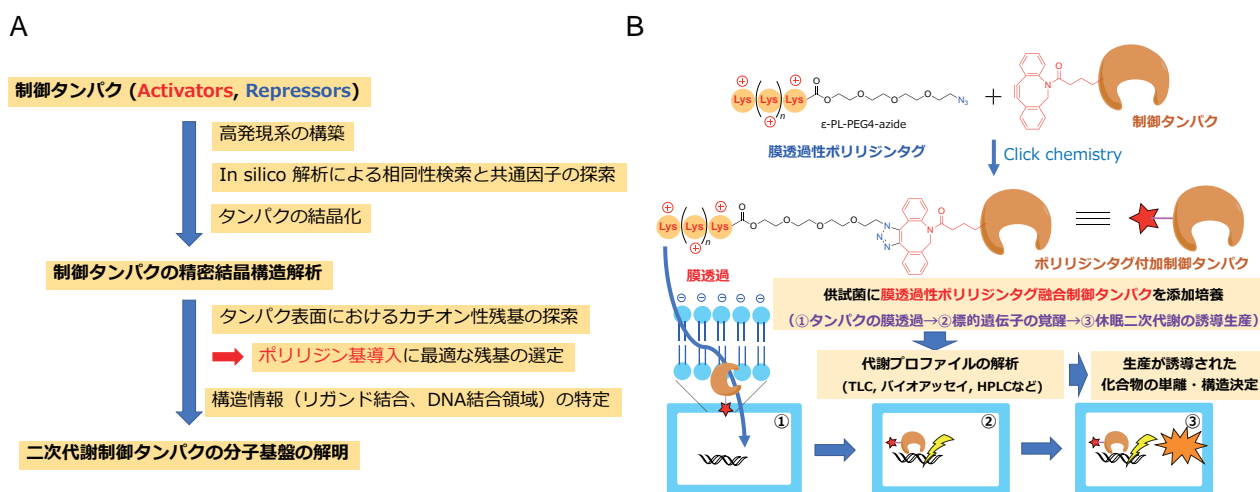


図3 二次代謝制御タンパクの分子基盤解明のフローチャート (A) および膜透過性ポリリジンタグの融合化 (B)

本研究では、森田博士には専門分野である結晶構造解析を担当していただいている。まず、repressor については、[課題1]でも掲げたシグナル分子 SRB の特異的受容体 SrrA を大腸菌にて異種発現し、高純度に精製した SrrA を用いて結晶化を行った結果、微結晶を得ることに成功した。現在、結晶化条件の最適化を進めているところである。一方、activator に関しては、SARP 型転写アクティベーターに注目し、まず、標的遺伝子配列の機能解析を完了(Biosci. Biotechnol. Biochem. 2010)した *Streptomyces rochei* の SARP (*Streptomyces* antibiotic regulatory protein) 型アクティベータータンパク SrrY, SrrZ に取り組んだ。まず、SrrZ を異種の放線菌である *Streptomyces lividans* に導入したところ、その形質転換体は青色色素 actinorhodin を生産した (図

種目（特定研究）

4)。このことは SrrZ による actinorhodin 生産誘導を示唆しており、 ϵ -PL タグ融合型 SrrZ が細胞壁と細胞膜をダイレクトに透過できれば、**遺伝子操作を必要としない休眠遺伝子覚醒の新しいアプローチ**になる。本課題では、大腸菌での大量発現系の構築を目指した。本酵素のタンパク発現は放線菌発現系でのみ可溶性画分での発現が認められていたが、タンパクの機能解析に賦すレベルのタンパク量の調達は困難であった。そこで、発現レベルの向上を目指し、大腸菌発現系で様々なベクター系を試した。しかし、可溶性画分への良好な発現は現段階では認められなかった。コドン usage の検討も含め、徹底的な条件検討を行っていく予定である。

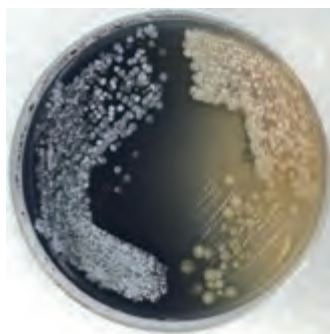


図4 SARP 型アクティベーター-SrrZ による *Streptomyces lividans* での actinorhodin 生産 (左:SrrZ 発現、右:空ベクター)

■結論

以下に将来展望と期待できる効果を示す。

生物資源の遺伝情報の中には**眠った医薬シーズの存在**が示唆され、健康長寿や農林水産業、環境保全など「持続可能な開発目標 (SDGs)」への還元が期待される。本研究では「シグナル分子 SRB の添加有無」の比較プロファイル解析に焦点を当てるため、**通常培養非生産の休眠二次代謝産物の検出と生物活性評価**が可能となる。新薬の開発本手法は、シグナル分子の系外からの添加に基づくため、**遺伝子組換えを要しない二次代謝誘導システム**である。このことは、屋外（開放系）試験が非制限であることを示しており、海外を含めた大規模利用が可能である。なお、課題1「シグナル分子による代謝活性化」に用いる SRB は、我々が世界で初めて見いだしたブテノライド型シグナル分子であり、従来のシグナル分子 (図1) と構造が異なる。我々は、SRB に関する構造特性や生化学的性質、さらに誘導体を含めた合成経路を確立しており、他グループの追随を許していない。将来的には、**微生物分離源の開拓**にて新規性の高い放線菌群を単離し、それらの**休眠二次代謝の活性化**を組み合わせる、という相乗効果により、新規化合物獲得の可能性が指数関数的に増強できる。その結果、課題2にて新薬候補となる抗原虫活性を有する新規化合物が見いだされることが大いに期待できる。

従来法においてはベクターによる強制発現が多用されている。しかし、ベクターの場合、宿主・ベクター系の相性により複製・形質転換効率が変動するため、各供試菌体における一律でのタンパク発現量の制御は困難である。ブチロラクトン型は 60%、avenolide 型は 24%の放線菌で利用されており、SRB に代表されるブテノライド型は稀少な構造と考えられる。また、放線菌のゲノム解析を行うと、一菌株あたり複数のシグナル分子受容体が存在しており、**異なる分子骨格のシグナル分子を認識する**可能性が示唆される。先行研究として、SRB を系外から添加したところ、84 株中 16 株において二次代謝生産の違い、11 株にて抗菌活性の変化が見られた。このことは、シグナル分子が各供試菌の細胞内に送達されること、さらに**休眠遺伝子の活性化に適用可能**であることを強く示唆している。さらに、シグナル分子は土壌中の自由拡散が可能と考えられ、

種目（特定研究）

植物・微生物間相互作用への関与が示唆される。本研究の遂行により、植物稀少有用化合物の生産も期待できる。**[課題 2]**にて取り組む**膜透過性タグ融合型タンパク**は、系外にて調製したタンパクを利用するため、細胞内制御を考える必要はなく、異種菌株の細胞内にも一律のタンパク量を送達可能である。結果・考察の項目でも述べたように、既に代表者らは、*Streptomyces lividans* TK64 に対する *S. rochei* 由来 SARP タンパク SrrZ の異種発現において、青色色素 actinorhodin の生産誘導を明らかにしている。このように**制御タンパクによる休眠二次代謝遺伝子の覚醒化**が期待できる。

さらに、本研究は放線菌の多様性に応じたシステム構築が可能であり、**[課題 1]** に関しては、ブテノライド骨格および C-2 位側鎖の**収束型合成スキーム**を既に構築済み (ChemBioChem 2012; Biomolecules 2020) であり、シグナル分子受容体の基質認識に即応した分子設計が可能である。さらに **[課題 2]** においては、ポリリジンタグを様々な制御タンパクに **click chemistry** にて縮合させるため、タグおよびタンパクの多様な組み合わせ設定が容易であり、本研究成果は、植物稀少有用化合物の生産に繋がることが期待される。