

放線菌における物質生産のための合成生物学

小松 護, 池田 治生*

20世紀末から各種の生物ゲノム解析が相次いで完了し、現在までに3000を超える生物種のゲノム解析が完了している。生物の設計図であるゲノムが明らかにされると人類の最大の興味は、化学合成したゲノムによる自律複製・増殖する生物の作成である。J. Craig Venter率いる米国Venter研は2010年5月に*Science*誌電子版に*Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0の合成を発表した¹⁾。これは「ゲノムをデザインする」という目標達成に大きな原動力となり、かつきわめて応用性の高い成果である。応用性を考えた場合、「人類に役立つ生物の創成」であり、有用物質生産においては代謝経路のデザイン、さらに新規代謝経路の挿入などによる非天然型代謝産物の生産など、多大な期待が持たれるものである。

物質生産マシナリーとしての放線菌

二次代謝産物は色素や香気成分など医薬品としてきわめて重要な抗生物質を含む生物活性物質が知られている。二次代謝は細菌、糸状菌や植物が保有する代謝経路の一つであり、生命維持活動には直接関与しない代謝経路として一次代謝とは異なる範疇の代謝系として定義されている。放線菌の二次代謝産物のいくつかは抗生物質や生物活性物質として工業的に生産され、我々の社会生活に多大な貢献をしている。

放線菌はゲノム上に20~30数種の二次代謝産物生合成遺伝子群を保有しているが、多くは休眠状態である²⁾。生合成遺伝子群の発現によって物質生産が観察されるが、それらの生産は互いにどのように関連しているか、というような疑問に関しては明確な回答はほとんど報告がない。筆者らがゲノム解析を行った*Streptomyces avermitilis*³⁾は抗寄生虫抗生物質エバーメクチンの工業生産菌である。エバーメクチンの他、同じポリケチド化合物であるオリゴマイシンを生産する。本菌におけるエバーメクチンの生産は特定の培地でのみ観察されるが、その生産量はきわめて高い。一方、オリゴマイシンの生産は多くの培地においても良好に観察され、唯一、エバーメクチンが生産される条件ではその生産性がきわめて低い。それぞれの化合物は同じ前駆体を利用してポリケチド骨格を形成するため、生合成過程において前駆体の利用の競合を生じ、上記のような結果が得られるものと推

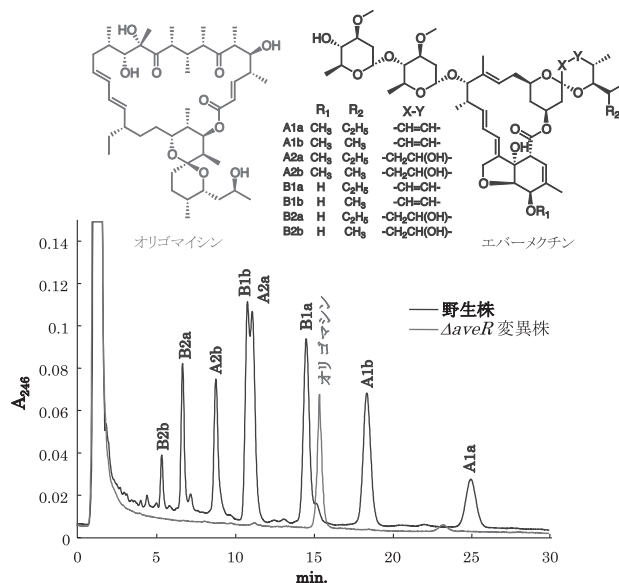


図1. *S. avermitilis* 野生株および Δ aveR変異株の菌体内培養物のHPLC分析

察される。筆者らは*S. avermitilis*のゲノム解析以前にエバーメクチンおよびオリゴマイシンの生合成遺伝子群を単離・同定していた^{4,5)}。エバーメクチン生合成遺伝子群は生合成遺伝子群内にある調節遺伝子aveRによって正に調節されている⁶⁾。したがって、aveRの欠失変異株はエバーメクチン生合成に関わる遺伝子の発現が停止するためエバーメクチンを生産しない。さらにaveR欠失によるエバーメクチン生産の停止とともに、オリゴマイシンの生成量は飛躍的に上昇する(図1)。

このことはエバーメクチン生合成に利用されていた前駆体がオリゴマイシンの生合成に十分に供給されたため、多量のオリゴマイシンを蓄積したものと考えられる。同様な結果は*S. avermitilis*のrpsL(S12リボソームタンパク質遺伝子)の変異株でも観察される。rpsL変異の多くはエバーメクチンの生成を低下あるいは停止させる。それに伴い、オリゴマイシンの生成量は飛躍的に上昇した⁷⁾。なお、野生株にオリゴマイシン生合成遺伝子群の欠失、あるいは挿入変異によってその生成を停止させた場合、エバーメクチンの生産量は野生株で生成していたオリゴマイシンの量程度分増加する⁵⁾。これらのことは細胞内の

*著者紹介 北里大学北里生命科学研究所・大学院感染制御科学府(教授) E-mail: ikeda@ls.kitasato-u.ac.jp

前駆体は均等にそれぞれの二次代謝産物の生合成に利用されているのではなく、発現状態の優位のものに優先的に利用されているものと理解できる。

異種生合成遺伝子群発現のための宿主の構築

Streptomyces 属からは多種多様な構造ならびに生物活性を有する二次代謝産物が生産されるが、その遺伝学的な解析は生合成経路の解明、あるいは生合成遺伝子の発現調節などの研究にとって重要であり、かつそれらの成果は工業的な応用への期待が大きい。すべての *Streptomyces* 属の菌株が遺伝学的な解析に利用できるわけではなく、遺伝的な不安定性さや、さらには遺伝子導入や遺伝子破壊などで組み換えDNAを細胞内に導入する操作がまったくできない菌株が多々ある。このような場合、汎用性のある宿主に生合成遺伝子群を導入し、生合成経路の評価や遺伝子発現を検討することが期待できる。これまで *Streptomyces lividans* 1326 や *Streptomyces albus* J1074 などの菌株が異種発現の宿主として利用されている。これらの菌株は二次代謝産物の生産がほとんど認められないことやDNAの導入が比較的容易であることなどから利用されてきた。これらの菌株は工業生産株でもなく、二次代謝産物生合成における前駆体の供給に関してはまったく未知である。筆者らは *S. avermitilis* のゲノム解析を終了した時点で、本菌が工業利用株であることから二次代謝産物生成における前駆体供給がきわめて効率よく行われているものと判断し、内在性の二次代謝産物生合成のみならず異種菌株や生物の二次代謝産物生合成に適していると考えた。幸いなことに本菌株は効率よくDNAを導入にすることができる数少ない *Streptomyces* 属の菌株であること、また、溶原化ファージの部位特異的組み換えを利用した大型DNA断片の染色体への導入が整備されている。さらに Cre/loxP による部位特異的な組み換えシステムが効率良く利用できることによってオペロンを構成している遺伝子群の初発あるいはその下流の遺伝子をインフレームで欠失させることが可能である。また、ゲノム解析が完了しているため、網羅的な発現パターンの解析あるいは物質生産にとって不要な遺伝子の選別および除去が可能である。先にも述べたように、エパーメクチンとオリゴマシンの生成では前駆体の競合によって物質生産はどちらかに偏ることが判っている。異種生合成遺伝子群を発現、それに引き続く物質生産を効率よく進めるため、内在性の二次代謝産物生合成遺伝子群は停止あるいは欠失させることにより、細胞内前駆体プールを導入した異種生合成に効率よく利用させることが望ましい。このような観点から、*S.*

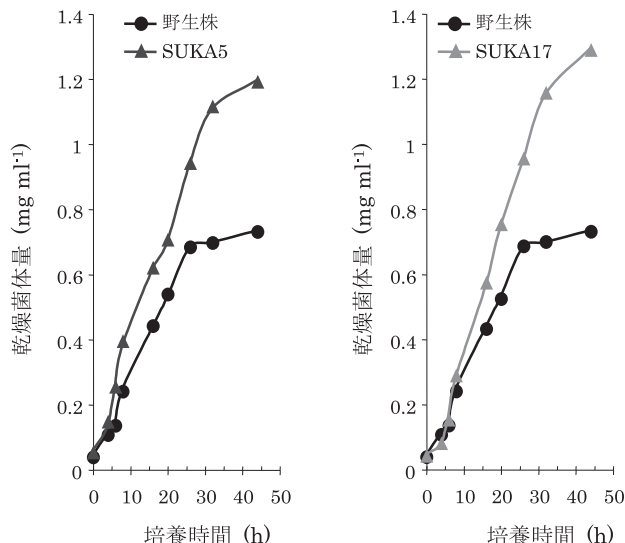


図2. *S. avermitilis* 野生株および大規模欠失株 SUKA5 および SUKA17 の生育曲線

avermitilis の染色体を再構成させた宿主を構築するに至った⁸⁾。すなわち、前駆体供給に関わる一次代謝系の遺伝子はまったく欠失・改変を行わず、内在性の主生産物の生合成遺伝子群を欠失させることによって、*S. avermitilis* が本来保有する前駆体プールを導入した異種生合成に効率よく利用されることを期待し、染色体の左側 1.5 Mb および *Streptomyces* 属に共通なコア領域に存在する、内在性二次代謝産物生合成遺伝子群、合計 130 kb 程度を欠失させた。最終的に染色体を 81.46% まで縮小した大規模欠失株は一次代謝に関する遺伝子を改変していないため、グルコースと無機塩からなる最少培地で生育が可能である。また、その生育と形態分化も野生株に比べて早く、さらに菌体量も増加していることは興味深い(図2)。

得られた大規模欠失株は、野生株と同様にDNAの導入が良好であったため、数種の異種二次代謝産物生合成遺伝子群を導入し、それぞれの化合物の生産を確認した⁸⁾。

一般に二次代謝産物生合成遺伝子群には生合成遺伝子群の個々の遺伝子の発現を活性化する調節遺伝子が存在する場合が多い。これらの調節遺伝子の発現を制御する上位の制御系は不明な点が多い。もっとも詳細に検討されたストレプトマシン生産菌 *Streptomyces griseus* ではストレプトマシン生合成遺伝子群の調節遺伝子 *strR* は AraC-family 制御タンパク質に分類される AdpA によって制御されており、*adpA* の発現は通常、上流に結合する ArpA によって停止している。低分子遺伝子発現調節物質 A-factor の細胞内濃度が上昇し ArpA に結合、そし

てDNAからArpAが解離して*adpA*の転写が活性化される⁹⁾。セファマイシンC生産菌*Streptomyces clavuligerus*では、セファマイシンC生合成遺伝子群の調節遺伝子は*ccaR*であるが、ある種の σ -因子によって転写が調節されている。培養前期ではanti- σ -因子タンパク質(SCLAV_2541)が σ -因子に結合し、複合体を形成するため*ccaR*の転写は開始されない。対数増殖後期にanti- σ -因子アンタゴニスト(SCLAV_2542)の遺伝子が発現し、 σ -因子/anti- σ -因子タンパク質複合体が解離する。さらに遊離した σ -因子によって*ccaR*の転写が開始され、セファマイシンCの生合成遺伝子が発現する¹⁰⁾。したがって、異種生合成遺伝子群の発現には、個々の生合成遺伝子群内の調節遺伝子を制御する上位の制御系が原株と等しく稼働していることが必須である。*S. avermitilis*にはAdpAと相同性の高いAraC-family制御タンパク質の遺伝子*bdpA*が存在し、その遺伝子産物BdpAがAdpAと同様な働きをするため、*strR*を活性化しストレプトマイシンを生産する⁸⁾。なお、*bdpA*の発現は*adpA*とは異なり、内在性の低分子遺伝子調節物質¹¹⁾によって制御されることはなく、培養初期から発現しているため、大規模欠失株でのストレプトマイシンの生産は*S. griseus*よりも早く開始される(図3)。同様に*S. avermitilis*でのセファマイシンCの生合成は、anti- σ -因子タンパク質遺伝子(*sclav_2541*)およびそのanti- σ -因子アンタゴニスト(*sclav_2542*)のそれぞれのオルソログ*rsbW2*(*sav4615*)および*rsbV*(*sav4614*)が*S. avermitilis*に存在し、それ

ぞれの遺伝子産物がSCLAV_2541およびSCLAV_2542と同様な機能を有しているため、セファマイシンCが生産される⁸⁾。したがって、大規模欠失株に異種二次代謝産物生合成遺伝子群内の調節遺伝子を制御する調節遺伝子のオルソログが存在しなければ異種生産は達成できない。*Streptomyces platensis*のプラジエノライド生合成遺伝子群およそ75 kbを大規模欠失株に導入したが、プラジエノライドの生産はまったく観察されず、さらに生合成遺伝子群の制御遺伝子*pldR*の発現も確認されなかった⁸⁾。おそらく*S. avermitilis*には*pldR*の転写を活性化するオルソログが存在しないためと思われる。しかしながら、*pldR*を別途、強制発現させる(*ermE*プロモーターを利用)ことによって大規模欠失株でプラジエノライドの生成が確認することができた。このように上位の制御系のオルソログが存在しなくても生合成遺伝子群を制御する遺伝子が同定されていれば強制発現という方法で異種生合成遺伝子群を発現させることも可能である。

原株での生合成遺伝子群の発現は最適化されているのか？

異種生合成遺伝子群を*S. avermitilis*大規模欠失株で発現させ、ほとんどの生合成遺伝子群は発現し、それに対応する二次代謝産物の生成が確認された。ところで、それぞれの生合成遺伝子群をクローニングするときの染色体供与株である原株は探索スクリーニングで発見され、その後工業生産のために育種改良されていった菌株で

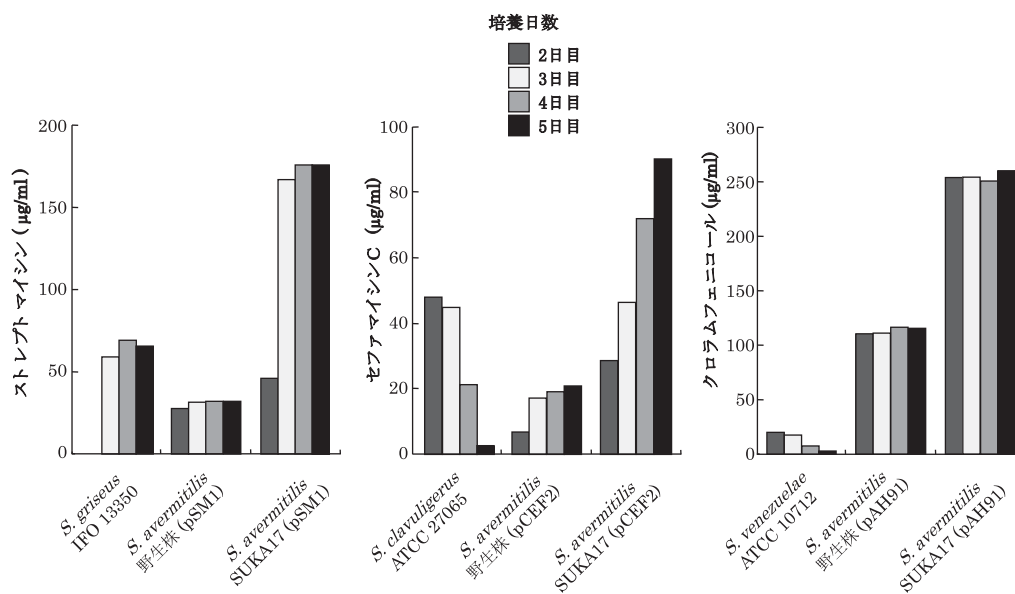


図3. *S. griseus* IFO 13350, *S. clavuligerus* ATCC 27065, *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 およびそれぞれの生合成遺伝子群を導入した*S. avermitilis*野生株および大規模欠失株のストレプトマイシン、セファマイシンCおよびクロラムフェニコールの生産量。

ある。したがって、それぞれの生合成遺伝子群の発現および代謝産物の生成は原株がもっともよい状態であると思われる。

ストレプトマシン生産菌 *S. griseus* から27の生合成遺伝子、制御遺伝子および自己耐性遺伝子を含むおよそ40 kbの断片を大規模欠失株導入した形質転換体はDNA供与株である *S. griseus* よりも2倍以上のストレプトマシンを生産した(図3)。また、セファマイシンC生産菌 *S. clavuligerus* から得た生合成遺伝子群を導入した *S. avermitilis* 大規模欠失株の形質転換体も同様に *S. clavuligerus* の野生株よりも生産量が多い(図3)。同様に、*S. clavuligerus* のクラブラン酸生合成遺伝子群およそ25 kbを導入した大規模欠失株も *S. clavuligerus* 野生株よりも多量のクラブラン酸を蓄積した(未発表)。さらにクロラムフェニコール生産菌 *S. venezuelae* の当該生合成遺伝子群を含むおよそ40 kbを導入した大規模欠失株は *S. venezuelae* 野生株に比べ10倍程度のクロラムフェニコールを生産した(図3)。

これらの結果は大規模欠失株が上記の物質の生合成遺伝子群の発現および生合成にとって原株よりも最適化されていると考えられる。しかしながら、*S. avermitilis* の野生株にはストレプトマシンなどの糖質経路から供給される前駆体で生合成されるアミノグリコシド化合物およびクロラムフェニコールなどのシキミ酸経路から供給される前駆体で生合成される化合物の生合成遺伝子群は保有していないため、それらの生合成遺伝子の発現や前駆体の供給が最適されていたわけではない。大規模欠失株のような人為的に内在性の二次代謝産物生合成遺伝子群の欠失によって、本来内在性の化合物の生合成に利用されていた前駆体が、新たに導入した生合成遺伝子群の発現によって生成した生合成酵素群によって効果的に利用されたものと思われる。実際に、ストレプトマイシン生合成遺伝子群を導入した *S. avermitilis* 野生株ではストレプトマシンの生成量は *S. griseus* よりも低い(図3)。大規模欠失株では異種生合成遺伝子群内の調節遺伝子を活性化する上位の制御系のオルソログが存在すれば、その生

合成遺伝子群が発現し、さらに生合成に関わる前駆体の供給が効果的に利用され、効率良い物質生産が認められるものと思われる。このことは、*S. avermitilis* で休眠状態と判断された多くの生合成遺伝子群についても、それらの生合成遺伝子群の調節遺伝子を活性化する制御遺伝子を有する *S. avermitilis* 以外の菌株での発現および生成を達成できることが予想される。一方、既存の菌株のゲノム解析から休眠と推定されている生合成遺伝子群についても調節遺伝子を活性化する制御遺伝子が *S. avermitilis* に存在すれば大規模欠失株での効果的な生産を達成することが期待できる。

終わりに

工業的生産に利用された *S. avermitilis* の大規模欠失株は物質生産にとって最適化されたゲノムを保有しているものと推察される。しかしながら、すべての異種生合成遺伝子群が効率よく発現するわけではなく、プラジエノライドの生合成のように生合成遺伝子群の調節遺伝子を上位で制御するオルソログが存在しない場合もある。今後、数種の *Streptomyces* 属菌株でも *S. avermitilis* と同様な大規模欠失株を構築することにより、上記の問題を回避することが期待できる。

文 献

- 1) Gibson, D. G. *et al.*: *Science*, **329**, 52 (2010).
- 2) Nett, M. *et al.*: *Nat. Prod. Rep.*, **26**, 1362 (2009).
- 3) Ikeda, H. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 526 (2003).
- 4) Ikeda, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9509 (1999).
- 5) Ikeda, H. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **175**, 2077 (1993).
- 6) Kitani, S. *et al.*: *Appl. Microb. Biotechnol.*, **82**, 1089 (2009).
- 7) Tanaka, Y. *et al.*: *Appl. Env. Microbiol.*, **75**, 4919 (2009).
- 8) Komatsu, M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2646 (2010).
- 9) Tomono, A. *et al.*: *J. Bacteriol.*, **187**, 5595 (2005).
- 10) Wang, L. *et al.*: *Microbiology*, **150**, 4137 (2004).
- 11) Kitani, S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16410 (2011).