

2P-225 放線菌 *Streptomyces rochei* のランカサイジン生合成変異株が蓄積する代謝産物の構造および生合成・制御機構の解析

曹志生, 吉田 竜平, 片岡 憂祐, 木梨 陽康, 〇荒川 賢治
(広島大院・先端物質)
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

放線菌 *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、それらの生合成遺伝子群は全長 210 kb の線状プラスミド pSLA2-L 上に存在している。LC 生合成解析の一環として我々は様々な生合成遮断株を作製しているが、NRPS-PKS ハイブリッド遺伝子 *lkcA* の変異株代謝産物解析を行ったところ、UV 吸収をもつ化合物 A, B の蓄積が認められた。両化合物をゲル濾過、シリカゲルクロマトグラフィー、HPLC を用いて精製し、精密構造解析を行った。化合物 A の UV 吸収スペクトルからペンタエン構造の存在が示唆され、さらに分子量 670、組成式 $C_{35}H_{58}O_{12}$ であり、NMR スペクトルはポリエチン化合物 pentamycin の文献値と一致した。以上により化合物 A は 28 員環ポリエチンマクロライド pentamycin と同定できた。抗カビ活性により生産量を調べたところ、親株と比較して 250 倍以上高生産していることが分かった。また化合物 B の ESI-MS スペクトルでは単一の分子量 214、組成式 $C_{10}H_{16}O_4$ が得られたものの、 ^{13}C -NMR スペクトルでは 20 本のシグナルが検出された。NMR 解析を行ったところ、citrediol および *epi*-citrediol の 2:1 の混合物であることが分かった。これらはいずれも化学構造上 LC の生合成中間体とは考えにくく、本株での蓄積要因に興味を持たれる。これらの生合成機構や制御システムに関する知見も併せて報告する。

Structural elucidation, biosynthesis, and their regulatory system of the secondary metabolites produced by the blocked mutant of lankacidin biosynthesis of *Streptomyces rochei*

Zhisheng Cao, Ryuhei Yoshida, Yusuke Kataoka, Haruyasu Kinashi, 〇Kenji Arakawa
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Streptomyces*, antibiotics, biosynthesis, regulation

2P-227 抗生物質ランカサイジン生産におけるピロロキノリンキノン要求性酵素の機能解析

〇山内 佑介, 藪内 優, 鈴木 敏弘, 木梨 陽康, 荒川 賢治
(広島大院・先端物質)
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

放線菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株はポリケチド抗生物質ランカサイジン (LC) を生産し、その生合成遺伝子クラスターは pSLA2-L 上に存在する。LC クラスター内に補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) 生合成遺伝子が含まれており、遺伝子破壊実験により、ランカサイジン生合成には PQQ が必須であることが明らかになっている。また、PQQ 要求性酵素にはトリプトファン残基を含む繰り返し配列 (Trp-motif) が存在しており、pSLA2-L 上の ORF を調べたところ、*orf23* 遺伝子産物に Trp-motif が見つかった。*orf23* は LC クラスター近傍に位置しており、PQQ 要求性デヒドロゲナーゼ遺伝子と高い相同性を有していた。そこで、*orf23* 破壊株の代謝産物解析を行ったところ、*Orf23* は C-24 位水酸基の酸化反応に関与していることが示唆された。さらに *orf23* の生化学的諸性質を明らかにするため、タンパク大量発現系の構築を行い、形質転換体に基質 lankacidinol を添加したところ、PQQ 存在下で lankacidin C への変換が認められた。さらに基質特異性、金属要求性、至適 pH などの生化学的パラメーターについて調べるため、PMS を用いた比色法により解析した。基質について lankacidinol、iso-lankacidinol、lankacidinol A、D-glucose などを調べたところ、比色法においても、PQQ および Ca^{2+} 存在下で lankacidinol の有意な反応進行が認められた。

Characterization of a PQQ-dependent enzyme involved in lankacidin biosynthesis

〇Yamauchi Yusuke, Yabuuchi Yu, Suzuki Toshihiro, Kinashi Haruyasu, Arakawa Kenji
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words pyrroloquinoline quinone, *Streptomyces*, antibiotics, biosynthesis

2P-226 放線菌 *Streptomyces rochei* の多重遺伝子変異株が生産する azoxyalkene の化学構造および生合成経路の解析

〇國武 博文, 平松 高広, 木梨 陽康, 荒川 賢治
(広島大院・先端物質)
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

【目的】放線菌は既知の 12,000 種の抗生物質のうち、約 7 割を生産する有用な土壌微生物であり、一株あたり 20 種類以上の二次代謝生合成クラスターを有する。*Streptomyces rochei* 7434AN4 株は 2 つの異なるポリケチド化合物ランカサイジン (LC)、ランカマイシン (LM) を生産するが、その他の二次代謝生産は認められず、通常培養条件下では silent である可能性が考えられる。本研究では、制御遺伝子の多発現制御による潜在的二次代謝クラスターのゲノムマイニングを目指した。

【方法及び結果】三重破壊株 KA57 株 (*ΔsrrBΔlkcEΔlkcF-KR1*) からの二次代謝産物の取得を行った。本株は LC, LM 生合成遺伝子に変異を施してあり、ポリケチド共通前駆体を他の二次代謝生産に利用させることが期待できる。本株を培養し、代謝産物を抽出したところ、235 nm に強い UV 吸収をもつ化合物が取得できた。Rf = 0.5 (CHCl₃-MeOH=15:1) の化合物 (KA57-A) を精製し、さらに ESI-MS、NMR などを用いて構造解析を行ったところ、本化合物は分子式 $C_{10}H_{20}N_2O_3$ の azoxyalkene 化合物であることが分かった。現在、標識アミノ酸の取り込み実験や遺伝子破壊などにより KA57-A の生合成解析を進めており、本発表ではその経緯について報告する。

Structural elucidation and biosynthetic pathway of azoxyalkene produced by a multiple gene disruptant of *Streptomyces rochei*

〇Hirofumi Kunitake, Takahiro Hiramatsu, Haruyasu Kinashi, Kenji Arakawa
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Streptomyces* sp., antibiotics, biosynthesis, regulation

2P-228 放線菌 *Streptomyces rochei* の抗生物質生産誘導を司るシグナル分子 SRB の生合成に関わる P450 酵素 SrrO の機能解析

〇波多江 希, 津田 直人, 木梨 陽康, 荒川 賢治
(広島大院・先端物質)
karakawa@hiroshima-u.ac.jp

ランカサイジン (LC)・ランカマイシン (LM) 生産菌 *Streptomyces rochei* 7434AN4 株のシグナル分子である SRB は、リセプター SrrA との結合を介してアクチベーター SrrY の転写を活性化し LC・LM 生産を厳密に制御している。当研究室ではこれまでに SRB1 および SRB2 の化学構造を決定し、これらが最小濃度 40 nM の濃度で LC・LM 生産を誘導することを明らかにした。本研究では SRB 合成酵素遺伝子 *srrX* 近傍の P450 遺伝子 *srrO* の機能に着目した。まず、*srrO* 破壊株の代謝産物解析を行ったところ、LC および LM を生産していた。そのシグナル分子を単離したところ、6'-deoxy-SRBs であった。このことは SrrO が SRB の C-6' 位の酸化に関与することを示している。また SRBs だけでなく 6'-deoxy-SRBs も LC・LM 生産の誘導活性を持つことが示唆された。

次に、SrrO の 6'-deoxy-SRB1 の変換反応を行った。*S. lividans* TK64 に SrrO 発現プラスミド (pNTT01) または空ベクター (pHSA81) を導入した形質転換体に対して、化学合成により得られた 6'-deoxy-SRB1 を添加し、変換反応を行った。質量分析において SrrO 形質転換体では基質 6'-deoxy-SRB1 の分子イオンピーク ($[M^+Na]^+$)=293) が消失し、生成物 SRB1 の分子イオンピーク ($[M^+Na]^+$)=307) が検出された。一方、コントロールでは基質の分子イオンピークが検出された。本発表ではその経緯について詳述する。

Functional analysis of a P450 enzyme SrrO involved in the biosynthesis of SRB molecule, an inducer of antibiotic production in *Streptomyces rochei*.

〇Nozomi Hadae, Naoto Tsuda, Haruyasu Kinashi, Kenji Arakawa
(Grad. Sch. Adv. Sci. Mat., Hiroshima Univ.)

Key words *Streptomyces*, antibiotics, biosynthesis, P450