

Title	寄生虫治療薬イベルメクチン生産細菌の一次代謝遺伝子改変による抗生物質生産への影響
Sub Title	Effects of primary metabolism modification for antibiotic production in engineered <i>Streptomyces avermitilis</i>
Author	土居, 志織(Doi, Shiori)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019. )
JaLC DOI	
Abstract	<p><i>Streptomyces</i>属放線菌は多種多様な二次代謝産物を生産する産業微生物として知られ、これらの二次代謝産物は、抗生物質や農薬などの有用な化合物として利用されている。二次代謝産物は一次代謝産物を前駆物質として、また、一次代謝経路で生産されるエネルギーや補酵素を利用して合成される。したがって<i>Streptomyces</i>属放線菌の工業レベルでの二次代謝産物の生産は、生合成遺伝子群の発現のみならず、前駆体として利用される一次代謝産物の供給に大きく依存すると考えられる。そこで本研究では、<i>S. avermitilis</i>大規模染色体欠失株SUKA38株の種々の一次代謝遺伝子改変株を作成し、各欠失株に抗生物質生合成クラスターを導入、HPLC分析により生産量を定量した。この結果、解糖系におけるfructose-6-phosphate(F-6-P)からfructose-1,6-bisphosphate(F-1,6-bisP)への反応を触媒する6-phosphofructokinaseの2重遺伝子欠失株 (<math>\Delta</math>pfkA1/<math>\Delta</math>pfkA3) で顕著にクロラムフェニコール(Cp)生産が増加した。pfkAは3つのパラログからなるが、3重遺伝子欠失株は得られなかったため、必須遺伝子であると推測された。<math>\Delta</math>pfkA1/<math>\Delta</math>pfkA3株では生育の減少が観察されたため、乾燥菌体重量を測定し、specific productionを算出した。その結果、<math>\Delta</math>pfkA1/<math>\Delta</math>pfkA3株では最終的に、親株に対してCp生産が2倍となった。一方で、erythrose-4-phosphate(E-4-P)の生成反応を触媒するtransaldolaseの2重遺伝子欠失株 (<math>\Delta</math>tal1/<math>\Delta</math>tal2) で顕著なCp生産の減少がみられた。Cp生合成では、前駆体としてペントースリン酸経路の中間体E-4-Pを利用するため、talの欠失によるE-4-Pの供給の低下が示唆された。上記を検討するために、フラックス比解析を行った。フラックス比解析の結果から、<math>\Delta</math>pfkA1/<math>\Delta</math>pfkA3二重遺伝子破壊により解糖系へのフラックスが減少し、これに伴いペントースリン酸経路側へのフラックスが増加したことで、Cp生産が大きく上昇したと示唆された。SUKAによるCp生産はCp生産菌である<i>S. venezuelae</i>と比較し10倍であり、本アプローチによりそこからさらに1.7倍Cp生産量が増加している。したがって、本研究による一次代謝フラックスの制御が効率的な有用二次代謝生産への応用に有用であることが証明された。</p> <p><i>Streptomyces</i> species are valuable for industrial purposes, such as for the synthesis of drugs. Thus, there is commercial interest in improving the production of its secondary metabolite, chloramphenicol. In this study, we created Embden–Meyerhof (EM) and pentose phosphate (PP) pathway disruptants in genetically engineered <i>Streptomyces avermitilis</i>. This study aimed to enhance the production of secondary metabolites by examining optimum metabolic flux. We investigated the effects of primary gene deletions in this bacterial strain by introducing a secondary biosynthetic gene cluster into <i>S. avermitilis</i> SUKA38. We introduced single, double, and triple gene mutants, and the triple gene mutants proved to be lethal. The results of our study indicate that pfkA1/pfkA3 double deletion in <i>S. avermitilis</i> SUKA38 is better suited for chloramphenicol production compared with its wild-type strain, SUKA38. Chloramphenicol production was greatest for the genetically engineered strains compared with the wild-type strains. We conclude that genetically engineered <i>S. avermitilis</i> has the potential for increasing the production of valuable secondary metabolites, which will have both commercial and industrial implications.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190205">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190205</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

研究代表者	所属	法学部	職名	助教(有期)(自然科学)	補助額	300 (A) 千円
	氏名	土居 志織	氏名(英語)	DOI Shiori		
研究課題(日本語)						
寄生虫治療薬イベルメクチン生産細菌の一次代謝遺伝子改変による抗生物質生産への影響						
研究課題(英訳)						
Effects of primary metabolism modification for antibiotic production in engineered <i>Streptomyces avermitilis</i>						
1. 研究成果実績の概要						
<p><i>Streptomyces</i> 属放線菌は多種多様な二次代謝産物を生産する産業微生物として知られ、これらの二次代謝産物は、抗生物質や農薬などの有用な化合物として利用されている。二次代謝産物は一次代謝産物を前駆物質として、また、一次代謝経路で生産されるエネルギーや補酵素を利用して生合成される。したがって <i>Streptomyces</i> 属放線菌の工業レベルでの二次代謝産物の生産は、生合成遺伝子群の発現のみならず、前駆体として利用される一次代謝産物の供給に大きく依存すると考えられる。そこで本研究では、<i>S. avermitilis</i> 大規模染色体欠失株 SUKA38 株の種々の一次代謝遺伝子改変株を作成し、各欠失株に抗生物質生合成クラスターを導入、HPLC 分析により生産量を定量した。この結果、解糖系における fructose-6-phosphate(F-6-P) から fructose-1,6-bisphosphate(F-1,6-bisP)への反応を触媒する 6-phosphofructokinase の 2 重遺伝子欠失株 (<math>\Delta</math>pfkA1/<math>\Delta</math>pfkA3) で顕著にクロラムフェニコール(Cp)生産が増加した。pfkA は 3 つのパラログからなるが、3 重遺伝子欠失株は得られなかったため、必須遺伝子であると推測された。<math>\Delta</math>pfkA1/<math>\Delta</math>pfkA3 株では生育の減少が観察されたため、乾燥菌体重量を測定し、specific production を算出した。その結果、<math>\Delta</math>pfkA1/<math>\Delta</math>pfkA3 株では最終的に、親株に対して Cp 生産が 2 倍となった。一方で、erythrose-4-phosphate(E-4-P)の生成反応を触媒する transaldolase の 2 重遺伝子欠失株 (<math>\Delta</math>tal1/<math>\Delta</math>tal2) で顕著な Cp 生産の減少がみられた。Cp 生合成では、前駆体としてペントースリン酸経路の中間体 E-4-P を利用するため、tal の欠失による E-4-P の供給の低下が示唆された。上記を検討するために、フラックス比解析を行った。フラックス比解析の結果から、<math>\Delta</math>pfkA1/<math>\Delta</math>pfkA3 二重遺伝子破壊により解糖系へのフラックスが減少し、これに伴いペントースリン酸経路側へのフラックスが増加したことで、Cp 生産が大きく上昇したと示唆された。SUKA による Cp 生産は Cp 生産菌である <i>S. venezuelae</i> と比較し 10 倍であり、本アプローチによりそこからさらに 1.7 倍 Cp 生産量が増加している。したがって、本研究による一次代謝フラックスの制御が効率的な有用二次代謝生産への応用に有用であることが証明された。</p>						
2. 研究成果実績の概要(英訳)						
<p><i>Streptomyces</i> species are valuable for industrial purposes, such as for the synthesis of drugs. Thus, there is commercial interest in improving the production of its secondary metabolite, chloramphenicol. In this study, we created Embden-Meyerhof (EM) and pentose phosphate (PP) pathway disruptants in genetically engineered <i>Streptomyces avermitilis</i>. This study aimed to enhance the production of secondary metabolites by examining optimum metabolic flux. We investigated the effects of primary gene deletions in this bacterial strain by introducing a secondary biosynthetic gene cluster into <i>S. avermitilis</i> SUKA38. We introduced single, double, and triple gene mutants, and the triple gene mutants proved to be lethal. The results of our study indicate that pfkA1/pfkA3 double deletion in <i>S. avermitilis</i> SUKA38 is better suited for chloramphenicol production compared with its wild-type strain, SUKA38. Chloramphenicol production was greatest for the genetically engineered strains compared with the wild-type strains. We conclude that genetically engineered <i>S. avermitilis</i> has the potential for increasing the production of valuable secondary metabolites, which will have both commercial and industrial implications.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
土居志織	一次代謝改変による二次代謝産物生産への影響	日本放線菌学会	2019年9月23日			
土居志織	中心代謝改変による有用物質生産への応用	日本農芸化学会	2020年3月26、27日			
土居志織, その他5名	Oryzadiamines A and B, alkaloids from <i>Oryza sativa</i> with yellow grain.	Tetrahedron Letters	2020			
土居志織, 小瀬村誠治	Repellent against earthworms from UV-B damaged plant.	日吉紀要	2020			
土居志織, その他4名	Metal chaperon, Nhpc, involved in the metallocenter biosynthesis of nitrile hydratase.	J. General and Applied Microbiology	in press			