



Title	放線菌ゲノム編集技術によるlavencidin生合成機構の解明とグローバルレギュレーター改変による二次代謝活性化への応用
Author(s)	大塚, 遼
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/105398
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

博士学位論文

放線菌ゲノム編集技術による lavencidin 生合成機構の
解明とグローバルレギュレーター改変による
二次代謝活性化への応用

大塚 遼

2026 年 1 月

大阪大学大学院工学研究科

目次

第1章 緒論

1-1 節 研究背景

1-1-1 天然物探索の意義と現状	4
1-1-2 放線菌とその二次代謝	5
1-1-3 休眠二次代謝の活性化に向けたアプローチ	7
1-1-4 Wbl ファミリータンパク質の保存性と二次代謝活性化への応用可能性	8
1-1-5 放線菌における遺伝子改変技術	9

1-2 節 研究目的と本論文の構成

11

第2章 Target-AID 塩基編集技術を用いた lavencidin 生合成機構に関する研究

2-1 節 緒言

13

2-2 節 実験材料および機器

16

2-3 節 実験方法

22

2-4 節 実験結果

2-4-1 *S. coelicolor* A3(2)株に対する塩基編集技術の有効性評価

33

2-4-2 *S. lavendulae* FRI-5 株の塩基編集による遺伝子不活化

34

2-4-3 塩基編集による lavencidin 生合成遺伝子の同定

38

2-4-4 *In silico* 解析による lavencidin 生合成経路の解明

43

2-5 節 考察

2-5-1 Target-AID 技術を利用した放線菌の塩基編集

52

2-5-2 Lavencidin の基本骨格構造の生合成機構

52

2-5-3 Lavencidin の基本骨格生合成後の修飾機構

53

2-6 節 結言

53

第3章 グローバルレギュレーターの不活化による二次代謝プロファイル変動の解析

3-1 節 緒言

54

3-2 節 実験材料および機器

54

3-3 節 実験方法

62

3-4 節 実験結果

3-4-1 *Streptomyces* 属放線菌における *wblA* 塩基配列の比較解析

72

3-4-2	放線菌の色素系抗生物質生産に対する <i>wblA</i> 不活化の影響.....	74
3-4-3	<i>S. lavendulae</i> FRI-5 株の <i>wblA</i> 不活化による二次代謝変化.....	77
3-4-4	他種放線菌の <i>wblA</i> 不活化による二次代謝プロファイルの変動.....	85
3-5 節	考察	
3-5-1	<i>wblA</i> の塩基配列保存性.....	99
3-5-2	<i>S. lavendulae</i> - <i>mwblA</i> 株にて見出された化合物 4 、 6 の生合成機構.....	100
3-5-3	化合物 7 の推定生合成機構.....	101
3-6 節	結言	102
第 4 章	総括.....	103
論文.....		105
学会発表.....		106
参考文献.....		107
謝辞.....		121

第1章 緒論

1-1 節 研究背景

1-1-1 天然物探索の意義と現状

生物由来の天然化合物は、古来より医薬・農薬・香料・工業材料など多様な分野で人類社会に貢献してきた (Solecki, 1975)。特に、微生物由来の二次代謝産物は、一次代謝と異なり生育に必須ではないが、生態的適応や種間競争を担う多様な化学構造を生み出すことから、化学的・生物学的に極めて価値が高い (Bérdy, 2012)。1929 年にアレクサンダー・フレミングによって発見された penicillin を契機に、20 世紀半ばには放線菌や糸状菌などの微生物を対象としたスクリーニング研究が世界的に盛んとなり、多くの抗菌薬が相次いで発見された (Hutchings *et al.*, 2019)。これにより抗生物質研究は黄金期を迎え、感染症治療や公衆衛生の飛躍的な向上に寄与した (Lewis, 2012)。一方で、1990 年代以降、従来型の微生物培養や抽出スクリーニングによって新たな基本骨格を持つ天然物が得られる頻度は急速に低下した (図 1) (Hopwood, 2007、Silver, 2011、Lewis, 2020)。抗菌薬の開発が停滞するなか、耐性菌や新興感染症が世界的課題として顕在化し、既存薬では対応困難な病原体 [MRSA (methicillin 耐性 *Staphylococcus aureus*)、VRE (vancomycin 耐性 *Enterococcus*)、ESBL (基質特異性拡張型 β -lactamase) 産生菌など] の出現が医療現場を圧迫している (Thind and Hollomon, 2018)。このような状況下、新規作用機序をもつ生理活性物質の探索は、依然として生命科学および創薬分野の最重要課題である。現在上市されている低分子医薬品のうち、約 6 割は天然物またはその類縁体に由来しており (Cragg and Newman, 2013)、天然物探索は依然として創薬の基盤技術である。とりわけ、天然物は化学的合成では模倣が難しい多環式骨格や多様な官能基を有するため、化合物ライブラリーでは得られない新規性を提供する (Chopra and Dhingra, 2021)。したがって、これまでに知られていない潜在的な天然物資源を掘り起こすための手法の開発が求められている。

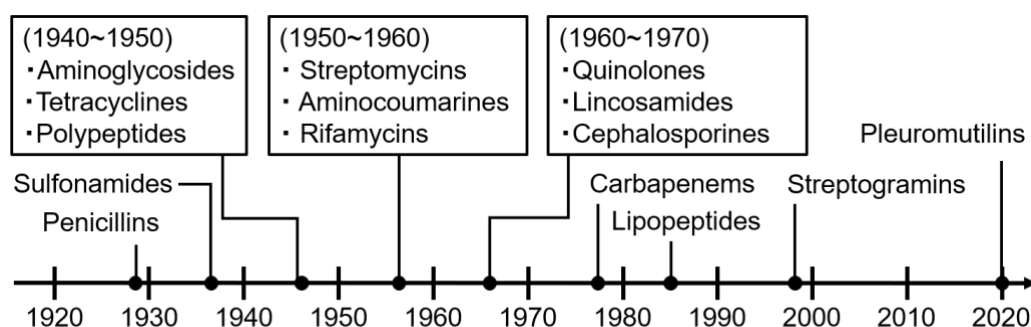
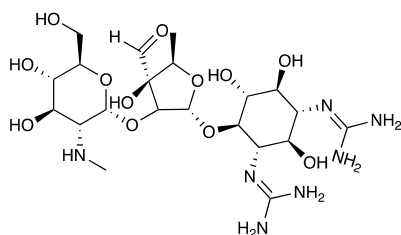


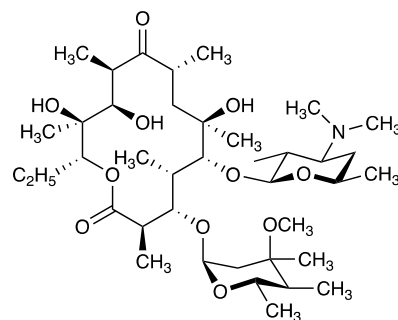
図 1. 生理活性物質の発見の経緯

1-1-2 放線菌とその二次代謝

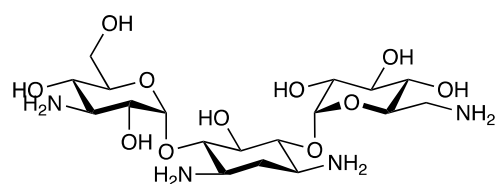
天然物探索の主要な供給源の一つが、*Streptomyces* 属をはじめとする放線菌である (Baltz, 2019)。放線菌はグラム陽性・高 GC 含量の真正細菌であり、菌糸状の形態を示すことから真菌に類似した複雑な生活環を有する (Hopwood, 2007)。特筆すべきは、その卓越した二次代謝産物生産能である。これまでに報告された微生物由来の生理活性物質のうち、約 4 割以上は放線菌由来であり (Bérdy, 2012)、抗菌薬、抗腫瘍薬、免疫抑制剤、殺虫剤など多岐にわたる生理活性物質が発見されてきた。代表的な放線菌由来化合物として、*Streptomyces griseus* 由来の streptomycin (Schatz and Waksman, 1944)、*Saccaropolyspora erythraea* 由来の erythromycin (Omura, 2002)、*Streptomyces kanamyceticus* 由来の kanamycin (Umezawa *et al.*, 1957)、*Streptomyces roseosporus* 由来の daptomycin (Raja *et al.*, 2003)、*Streptomyces mediterranei* 由来の rifamycin (Sensi, 1959)、*Streptomyces avermitilis* 由来の avermectin (Burg *et al.*, 1979)、などが挙げられ (図 2)、低分子または中分子の医薬品を社会に提供する上で重要な化合物として利用されている。21 世紀に入り、次世代シーケンシング技術 (Loman and Pallen, 2015) に代表されるゲノム解析技術の進展により *Streptomyces* 属の全ゲノム配列が次々と解読された。代表的な *Streptomyces coelicolor* A3(2) 株の解析では約 30 個の二次代謝産物生合成遺伝子クラスター (biosynthetic gene cluster: BGC) が同定され (Bentley *et al.*, 2002)、他種でも平均して 20~40 クラスターが存在することが明らかとなっている (Baltz, 2017) (表 1)。しかし、約 8 割の BGC は通常の培養条件下では発現しない休眠状態にあるか、検出水準以下でしか発現していない (Walsh and Fischbach, 2010、Mao *et al.*, 2018)。多剤耐性菌の出現と相まって、これら休眠 BGC の発現を活性化し、新たな二次代謝産物を発見する戦略が盛んに行われている (Rutledge and Challis, 2015)。



Streptomycin
(*S. griseus*)

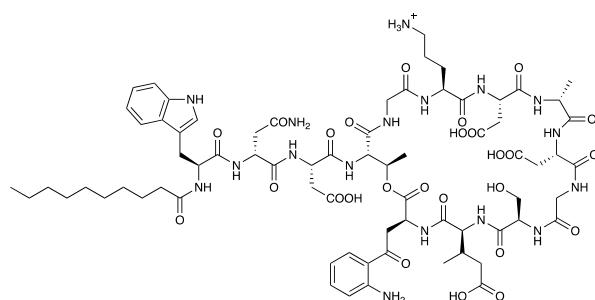


Erythromycin
(*Saccaropolyspora erythraea*)



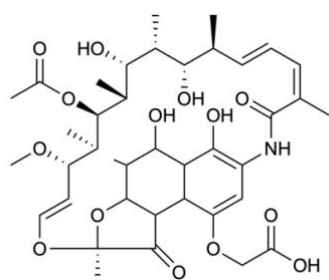
Kanamycin

(*Streptomyces kanamyceticus*)



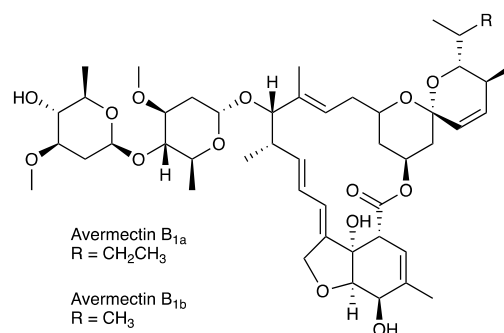
Daptomycin

(*S. roseosporus*)



Rifamycin

(*Streptomyces mediterranei*)



Avermectin

(*S. avermitilis*)

図 2. 代表的な放線菌由来の生理活性物質

表 1. 放線菌の二次代謝産物生合成遺伝子群の個数

菌株	二次代謝産物生合成遺伝子群の個数	参考文献
<i>S. coelicolor</i> A3(2)株	30	Bentley <i>et al.</i> , 2002
<i>S. avermitilis</i> 株	38	Ikeda <i>et al.</i> , 2003
<i>Saccaropolyspora erythraea</i> NRRL23338 株	25	Oliynyk <i>et al.</i> , 2007
<i>S. griseus</i> IFO13350 株	36	Ohnishi <i>et al.</i> , 2008
<i>Streptomyces tunisialis</i> DSM 105760 株	34	Ayed <i>et al.</i> , 2020
<i>Streptomyces xanthii</i> CRXT-G-22 株	48	Hu <i>et al.</i> , 2021
<i>Streptomyces liliiviolaceus</i> BH-SS-21 株	57	Li <i>et al.</i> , 2022

1-1-3 休眠二次代謝の活性化に向けたアプローチ

これまでに、休眠 BGC の発現を活性化するための数多くの手法が開発されてきた。特に *Streptomyces* 属放線菌において、標的 BGC のネイティブプロモーターをより強力なプロモーターに置換することは、BGC を強制的に覚醒させるための効果的な手法である (Gust *et al.*, 2003、Luo *et al.*, 2013、Ji *et al.*, 2018、Bauman *et al.*, 2019)。また、休眠 BGC を *Streptomyces albus* や *Streptomyces lividans* などの二次代謝バックグラウンドの低い異種発現用宿主株に導入する手法も確立されている (Malpartida and Hopwood, 1984、Blodgett *et al.*, 2005、Jones *et al.*, 2013、Xu *et al.*, 2016)。そのほかにも、他種微生物との共培養による代謝物の生産誘導 (Schroeckh *et al.*, 2009、Onaka *et al.*, 2011、König *et al.*, 2013) や、培養条件 (培地、培養期間、温度、酸素供給など) の検証 (Bode *et al.*, 2002、Scherlach and Hertweck, 2006、Lincke *et al.*, 2010、Tanaka *et al.*, 2010)、リボソームや RNA ポリメラーゼの薬剤耐性変異導入により、二次代謝産物生産を活性化させるリボソーム工学 (Li *et al.*, 2015、Zhang *et al.*, 2020、Thong *et al.*, 2016) といった手法により、様々な新規化合物が同定されてきた。

転写制御因子の改変は、もう一つの効果的な方法である。Streptomyces Antibiotic Regulatory Protein (SARP) ファミリー転写制御因子は、*Streptomyces* 属における二次代謝産物生合成遺伝子の発現を制御する経路特異的制御因子の一種である (Yan and Xia, 2024)。SARP 遺伝子を過剰発現させることで、その BGC による二次代謝産物の生産が促進されたほか (Chen *et al.*, 2008、Li *et al.*, 2019、Yan *et al.*, 2022)、新規化合物の同定にも至った (Koomsiri *et al.*, 2019、Wu *et al.*, 2021、Du *et al.*, 2016)。SARP 以外にも、LuxR 型制御因子の過剰発現は avermectin (Luo *et al.*, 2025)、pikromycin (Mo and Yoon, 2016)、tetracenomycin (Nie *et al.*, 2022) の生産を促進し、MarR 型制御因子の過剰発現は actinorhodin (Xu and Li, 2020) と daptomycin (Zhang *et al.*, 2015) の生産を促進することが報告されている。一方、TetR 型制御因子の破壊により、jadomycin (Zhang *et al.*, 2013) と erythromycin (Wu *et al.*, 2016) の生産に繋がった事例も知られる。これらの経路特異的なアプローチに加えて、グローバルレギュレーターの過剰発現や破壊といった多面的なアプローチも休眠二次代謝を活性化させるために有効である (Liu *et al.*, 2021、Wolański *et al.*, 2025)。グローバルレギュレーターは複数の BGC 発現や形態分化、酸化ストレス応答など細胞内の広範な表現型を制御し、特定の BGC のみではなく複数の代謝経路を横断的に制御している点においてグローバル性を示す。*Streptomyces coelicolor* においては、cyclic AMP 受容体タンパク質 Crp の過剰発現により actinorhodin と calcium-dependent antibiotic の生産量が増大し (Gao *et al.*, 2012)、負の制御因子 DasR の欠失によっても actinorhodin と undecylprodigiosin の生産量が 3 倍から 4 倍に増大した (Rigali *et al.*, 2008)。さらに、

Streptomyces ansochromogenes においては、グローバルレギュレーター AdpA の破壊により ovoidomycin の生合成が活性化された (Xu *et al.*, 2017)。このように、転写活性化を企図したグローバルレギュレーターの改変は、個々の BGC に依存しない包括的な代謝変動手法であるため、*Streptomyces* 属放線菌における休眠二次代謝の活性化に有望な手法である。

1-1-4 Wbl ファミリータンパク質の保存性と二次代謝活性化への応用可能性

Streptomyces 属放線菌の二次代謝は、培養条件や栄養状態、細胞密度、さらには形態分化など、複数の要素によって厳密に制御されている (Liu *et al.*, 2013、Sun *et al.*, 2017、Van Wezel and McDowall, 2011)。さらに二次代謝は局所的な経路特異的制御因子と、全体的な細胞応答を司る複数のグローバルレギュレーターによって階層的に制御されている (Bibb, 2005、Van Der Heul *et al.*, 2018)。そのようなグローバルレギュレーターの 1 つである WhiB-like (Wbl) ファミリータンパク質は、放線菌 (*Streptomyces* 属、*Mycobacterium* 属、*Corynebacterium* 属など) にのみ保存されている (Bush, 2018)。*Streptomyces coelicolor* において、Wbl ファミリータンパク質の特性が最初に解析されたのち (Chater, 1972、Davis and Chater, 1992)、*Mycobacterium* 属や他種 *Streptomyces* 属においても複数のホモログが同定された (Cole *et al.*, 1998、Soliveri *et al.*, 2000)。それ以降、ゲノム配列決定により、放線菌門全体にわたって Wbl ホモログが広く普及していることが明らかとなった (Nah *et al.*, 2021)。Wbl ファミリータンパク質は 5 種類の主要な相同タンパク質クラスに大別されており、それぞれの Wbl タンパク質が細胞分裂や酸化ストレス応答、熱ストレス応答、抗生物質耐性などの役割を担う (Bush, 2018)。WblA はその中でも代表的なクラス IV タンパク質であり、多くの *Streptomyces* 属放線菌において形態分化を正に制御し、抗生物質生産を負に制御する (Fowler-Goldsworthy *et al.*, 2011、Kim *et al.*, 2012、Yu *et al.*, 2014)。*Streptomyces coelicolor* においては、*wblA* の過剰発現により actinorhodin や undecylprodigiosin、calcium-dependent antibiotic の生産が抑制され (Kang *et al.*, 2007)、逆に *wblA* の欠損によりこれらの抗生物質生産が著しく増加した (Kim *et al.*, 2011、Lee *et al.*, 2010)。さらに、他種放線菌においても *wblA* ホモログの破壊により抗生物質生産の増大や新規代謝物の生産が誘導される研究例が多数存在する (表 2)。このように、WblA は代謝制御範囲が広く、改変による代謝変動の再現性も高いことから、これまでに研究されていない他の放線菌に対しても *wblA* を欠損させることで休眠 BGC を活性化させ、新規代謝物を発見できることが期待される。

表 2. *wblA* の破壊による抗生物質生産の増大または新規物質の発見例

菌株	抗生物質	生産量 (倍)	参考文献
<i>S. coelicolor</i> M145 株	Actinorhodin	増大 (5.6 倍)	Lee <i>et al.</i> , 2010
<i>Streptomyces peucetius</i> OIM-1 株	Daunorubicin	増大 (1.7 倍)	Noh <i>et al.</i> , 2010
<i>Streptomyces</i> sp. CK4412 株	Tautomycetin	増大 (3.2 倍)	Nah <i>et al.</i> , 2012
<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC14672 株	Moenomycin A	増大 (2.5 倍)	Yan <i>et al.</i> , 2020
<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL15998 株	Daptomycin	増大 (1.5 倍)	Huang <i>et al.</i> , 2017
<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC15439 株	Pikromycin	増大 (3.5 倍)	Yan <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces</i> sp. CB03234 株	Tiancimycins	増大 (13.9 倍)	Nguyen <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptomyces ansochromogenes</i> 7100 株	Tylosin analogs (cryptic)	活性化	Lu <i>et al.</i> , 2015

1-1-5 放線菌における遺伝子改変技術

放線菌の遺伝子機能解析には、従来から相同組換えに基づく遺伝子破壊法が用いられてきた (Kieser *et al.*, 2000、Herrmann *et al.*, 2012、Siegl *et al.*, 2010)。PCR targeting 法などを利用すれば目的遺伝子を欠損させることが可能であるが、この方法はコスミドライブラリの構築や複数段階の組換え操作を必要とする。その後、より効率的な手法として CRISPR-Cas9 技術が開発され (Jinek *et al.*, 2012)、放線菌にも応用されるようになった (Tong *et al.*, 2015、Tong *et al.*, 2020、Cobb *et al.*, 2015、Whitford *et al.*, 2023)。この技術は、single guide RNA (sgRNA) によって認識された標的 DNA 配列に Cas9 が二本鎖切断を導入し、宿主による非相同末端結合または相同組換えを介した修復によって目的遺伝子を欠失させる。しかし、CRISPR-Cas9 技術のゲノム編集効率は宿主の修復機構の効率に依存し、真核生物と違って放線菌のような原核生物においては、その修復効率は著しく低く、細胞死のリスクが生じていた (Tong *et al.*, 2018)。この課題を克服するために、CRISPR-Cas9 技術から派生したゲノム編集技術である塩基編集 (base editing) 技術が注目されている。塩基編集技術は、Cas9 の nuclease 活性を不活化した dCas9 (または nCas9) と塩基編集酵素の融合タンパク質を利用して、二本鎖切断を伴わずに特定の DNA 塩基に点変異を導入できる (Komor *et al.*, 2016)。近年、塩基編集技術

の一種である Target-AID (Activation-Induced cytidine Deaminase) 技術が開発された (Nishida *et al.*, 2016)。この技術は、塩基編集酵素として *Petromyzon marinus* 由来の Activation-induced cytidine deaminase (PmCDA1) を使用し、標的塩基配列中の cytosine 残基を uracil へと脱アミノ化し、その後 DNA 複製によってこれを thymine 残基へと置換させる (図 3)。これにより人為的に終止コドンを導入することで宿主による DNA 修復を介さずに遺伝子を不活化することができる。Target-AID 技術は放線菌においても利用されているが (Tong *et al.*, 2019、Zhao *et al.*, 2020、Wang *et al.*, 2024、Luo *et al.*, 2025)、この技術は主に *Streptomyces coelicolor* A3(2) 株で有効性が示されているに留まっている。多くの他種 *Streptomyces* 属放線菌においては、発現系・形質転換効率・DNA 修復系・細胞毒性などの宿主特性が障壁となっており (Alberti and Corre, 2019)、他種放線菌における機能未同定遺伝子の機能解析への応用例は依然として限られている (Li *et al.*, 2020)。

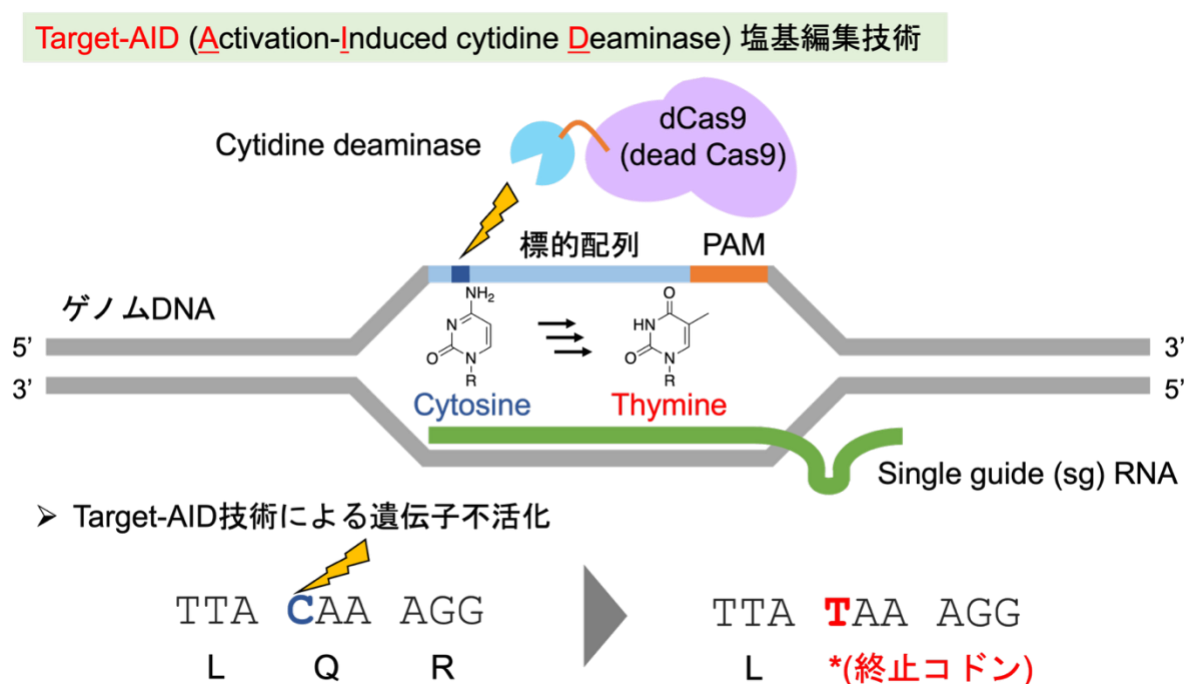


図 3. Target-AID 技術による標的遺伝子不活化

1-2 節 研究目的と本論文の構成

1-2-1 研究目的

本博士論文研究では、天然物探索の基盤技術のひとつとして、Target-AID 技術の活用法を、様々な *Streptomyces* 属放線菌を対象とした二次代謝研究へと拡大することを目的とした。まず当研究室で見出された *Streptomyces lavendulae* FRI-5 株が生産する lavencidin の生合成機構を明らかにし、続いて様々な株の *wblA* を不活化し、新規二次代謝産物の発見を試みた。

1-2-2 本論文の構成

本論文は、以下の内容で構成される。

第 1 章では、放線菌における天然物探索の重要性、二次代謝制御、遺伝子改変技術の課題について概説した。その中で、休眠 BGC の活性化が新規天然物探索に有用であり、そのアプローチとしてグローバルレギュレーター WblA の改変に着目する意義を論じた。

第 2 章では、放線菌の生合成遺伝子同定ツールとしての Target-AID 技術の適用範囲を拡大させるため、まず *S. coelicolor* A3(2)株と *S. lavendulae* FRI-5 株の二次代謝産物生合成遺伝子を塩基編集により不活化し、Target-AID 技術が複数の *Streptomyces* 属放線菌にて有効性をもつことを実証する。次に、*Streptomyces lavendulae* FRI-5 株の推定 lavencidin 生合成遺伝子を不活化し、lavencidin BGC を同定すると共に、*in silico* 解析から lavencidin の生合成経路を明らかにする。以上の結果をもとに、放線菌の遺伝子機能解析における Target-AID 技術の応用可能性について議論する。

第 3 章では、Target-AID 技術によるグローバルレギュレーターの改変が放線菌の二次代謝活性化に寄与することを示すため、種々の *Streptomyces* 属放線菌に対して Target-AID 技術により *wblA* 遺伝子を不活化し、不活化株における二次代謝変動を解析する。次に、*Streptomyces virginiae* NBRC12827 株の *wblA* 不活化株にて見出された新規代謝物の構造解析と、生合成遺伝子の同定に焦点を当てる。これらの結果から、*wblA* の不活化が放線菌の二次代謝に及ぼす影響について考察する。

第4章では第2章と第3章で得られた結果をまとめ、これらの結果から Target-AID 技術に基づく二次代謝活性化法の有用性、ならびに放線菌天然物探索の将来展望について総括する。

第2章 Target-AID 塩基編集技術を用いた lavencidin 生合成機構に関する研究

2-1 節 緒言

S. lavendulae FRI-5 株においては、放線菌ホルモン IM-2 により indigoidine (1)、D-cycloserine、showdomycin、minimycin の 4 種の二次代謝産物の生産が制御されている (Hashimoto *et al.*, 1992、Kurniawan *et al.*, 2014)。さらに本菌株は、ゲノムマイニングと休眠 BGC の異種発現により、ジオール構造を有するポリケタイドである lavendiol を生産することが明らかとなっている (Pait *et al.*, 2018)。また近年、同株に対して OSMAC (One Strain Many Compounds) アプローチ (Bode *et al.*, 2002) を適用することで、新規ポリエンマクロライド系抗生物質 lavencidin (2) および既知類縁体 RKGS-A2215A (3) が同定された (図 4) (Bode *et al.*, 2002、Yoshioka *et al.*, 2021)。

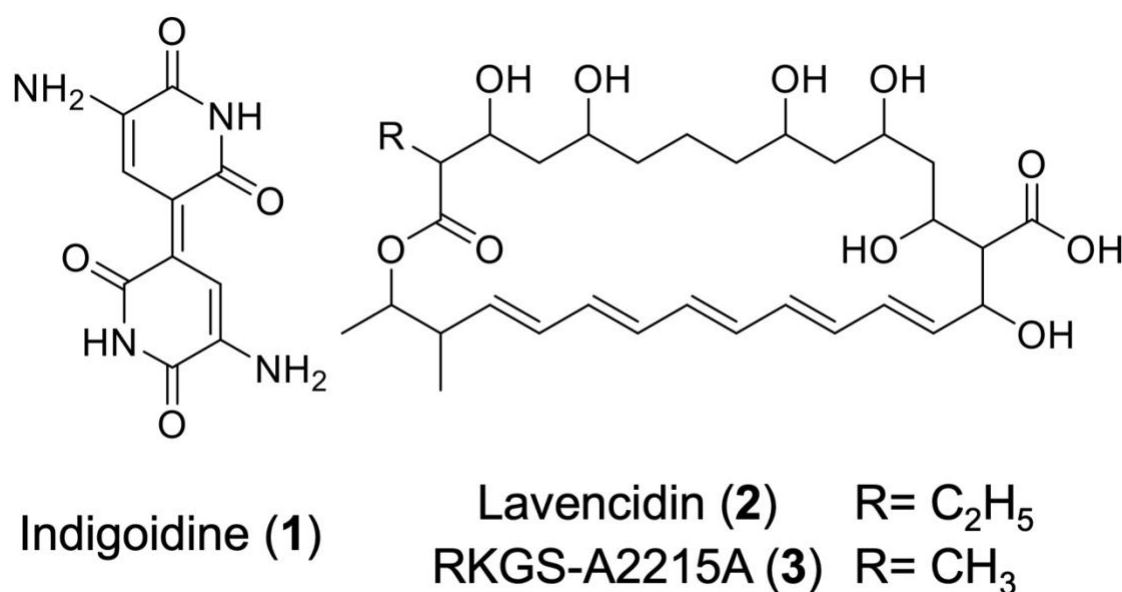


図 4. indigoidine (1) と lavencidin (2)、RKGS-A2215A (3) の化学構造

Lavencidin や lavendiol などのポリケタイドは、ポリケタイド合成酵素 (PKS) が酢酸ユニットを伸長することで生合成される (Robbins *et al.*, 2016)。PKS はその構造にもとづき I 型から III 型の 3 種類に分類される。I 型 PKS は複数のドメインが一つのポリペプチド上に連なった巨大なタンパク質およびそれらの複合体、II 型 PKS は異なる機能を持つ複数のタンパク質の集合体、III 型は ketosynthase (KS) ドメインからなる小型のタンパク質である。Lavencidin

を含むポリエンマクロライド系化合物は複数のモジュールからなる I 型 PKS によって生合成され、各モジュールは開始モジュールを除き KS、acyltransferase (AT)、acyl carrier protein (ACP) の必須ドメインを含む (Staunton and Weissman, 2001)。これに加えて、ketoreductase (KR)、dehydratase (DH)、enoylreductase (ER) などの修飾ドメインを含むこともある。最後のモジュールには化合物を ACP から脱離させるための thioesterase (TE) や reductase (R) ドメインが存在する。*S. erythraea* が生産する erythromycin A を例にとると (Staunton and Wilkinson, 1997)、開始モジュールを含む 7 個のモジュールからなる PKS (Deoxy Erythromycin-B Synthase; DEBS) により、1 分子の propionyl-CoA、6 分子の methylmalonyl-CoA を用いて基本炭素骨格が伸長される。次に、TE ドメインによりポリケタイド鎖が環化しながら PKS から放出されることで 6-deoxyerythronolide B が生じる (図 5)。その後、hydroxylase による水酸化、glycosyltransferase による糖付加、methyltransferase によるメチル化を経て、erythromycin A が最終産物として生合成される (図 6)。

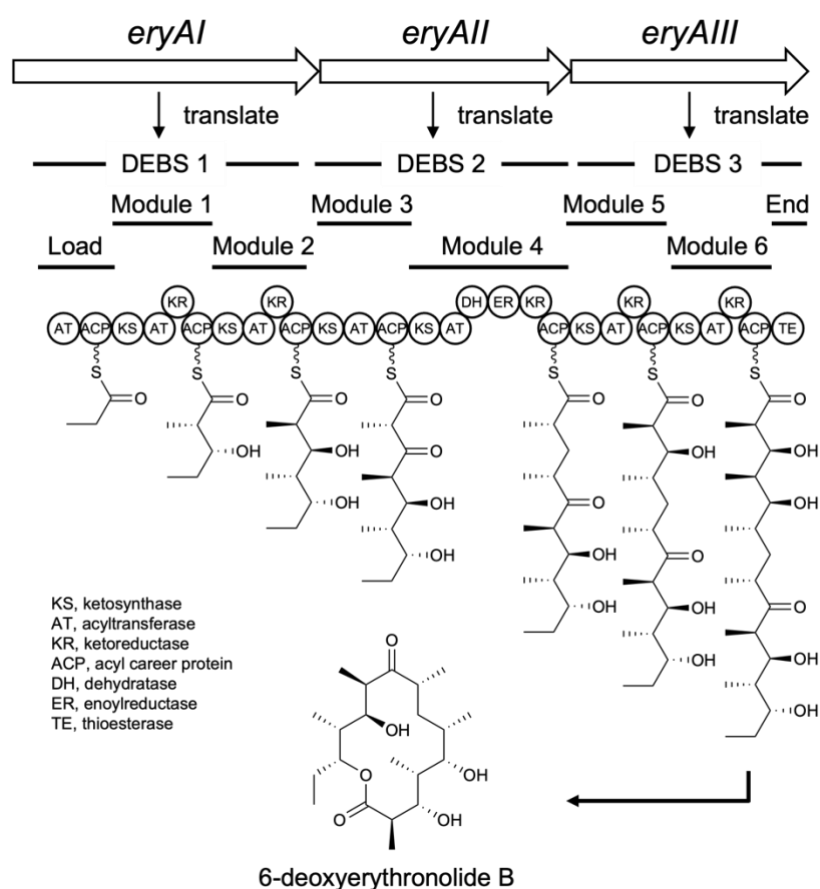


図 5. Erythromycin A の前駆体である 6-deoxyerythronolide B の生合成経路 (Staunton and Wilkinson, 1997)

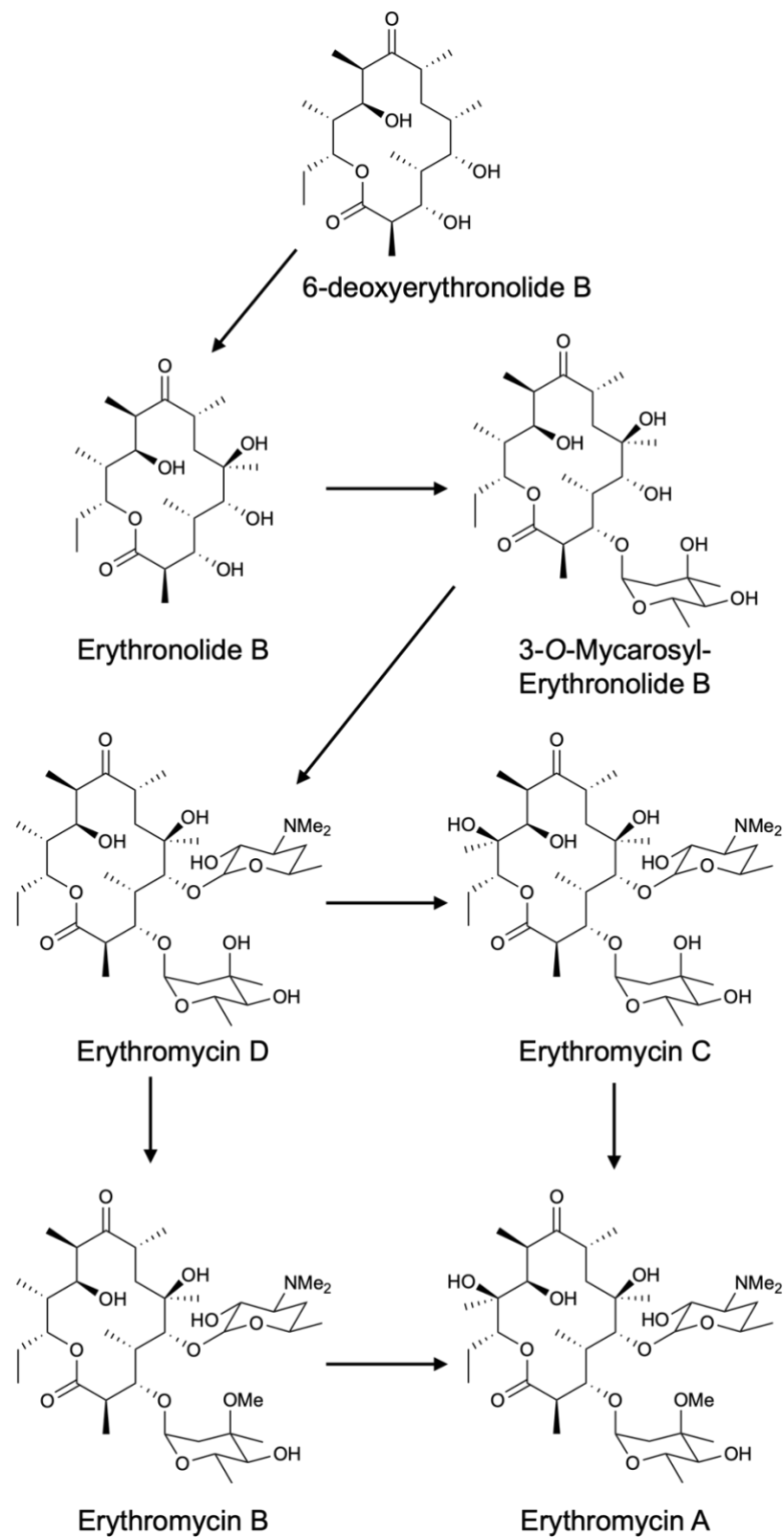


図 6. 6-deoxyerythronolide B から erythromycin A に至る修飾過程 (Staunton and Wilkinson, 1997)

Lavencidin と RKGS-A2215A は共通して共役ペンタエン構造、複数のヒドロキシ基、側鎖カルボキシ基を有しており、両化合物は酵母に対する生育阻害活性に加え、ヒトがん細胞株に対して数 μM オーダーの IC_{50} を示す。興味深いことに、lavencidin と RKGS-A2215A の生物活性は C-2 部位のアルキル鎖の長さに依存する傾向が観察されており (Yoshioka *et al.*, 2021)、生合成経路の分子レベルでの解明は、これらの構造改変を通じた新規抗真菌・抗腫瘍化合物の創出に直結する。Lavencidin 生合成に関わる BGC は、ゲノム配列情報からの推定はなされていたものの、実験的証明には至っていない。

本章では、Target-AID 技術を利用した遺伝子不活化により lavencidin BGC を決定することを目的とした。最初に、すでに BGC の全容が解明されている、*S. coelicolor* A3(2)株が生産する青色色素系抗生物質 actinorhodin の生合成遺伝子 *actI-ORF2* を Target-AID 技術により不活化し、不活化株における actinorhodin 生産の消失をもって同技術の有効性を確認した。次に、Target-AID 技術が *S. lavendulae* FRI-5 株でも機能することを検証するために、本菌株の indigoidine 生合成遺伝子 *lbpA* を不活化し、不活化株の indigoidine 生産を解析した。最後に、*S. lavendulae* FRI-5 株の推定 lavencidin 生合成遺伝子 *ladA5* 遺伝子を同様に不活化し、当該遺伝子が lavencidin 生合成に関与するか検証すると共に、lavencidin 生合成 BGC を *in silico* にて解析し、各遺伝子の機能に基づき lavencidin の生合成経路を明らかにすることを目指した。

2-2 節 実験材料および機器

2-2-1 菌株

- ・当研究室保有の菌株

Escherichia coli DH5 α 株

E. coli ET12567/pUZ8002 株

S. coelicolor A3(2)株

S. lavendulae FRI-5 株

2-2-2 プラスミド

pCRISPR-dCas9 (Tong *et al.*, 2015、図 7) [Addgene (<http://n2t.net/addgene:125687>) より購入した。RRID:Addgene_125687]

pMK-RQ (Thermo Fisher Scientific、Waltham、米国)

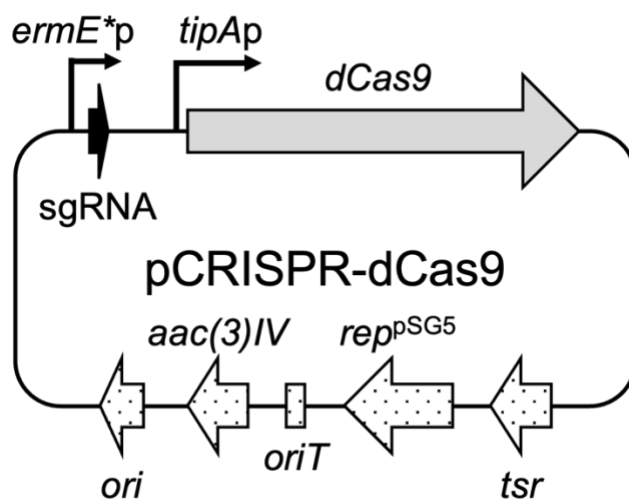


図 7. pCRISPR-dCas9 のプラスミドマップ

2-2-3 試薬

試薬は以下の表に示すメーカーより購入した製品を使用した。

試薬	メーカー
LB 培地 (Lennox)、Tween80、HPLC 用蒸留水、HPLC 用 acetonitrile、ギ酸、 <i>n</i> -butanol、	ナカライテスク (京都、日本)
寒天、D(-)-mannitol、NaCl、D(+)-glucose、sucrose、L-glutamine、MgCl ₂ ·6H ₂ O、CaCl ₂ ·2H ₂ O、kanamycin sulfate、chloramphenicol、nalidixic acid、可溶性デンプン、CaCO ₃ 、NaOH、Dimethyl sulfoxide、KCl、K ₂ SO ₄ 、ZnCl ₂ 、FeCl ₃ ·6H ₂ O、CuCl ₂ ·2H ₂ O、MnCl ₂ ·4H ₂ O、Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O、(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	富士フィルム和光純薬 (大阪、日本)
Cutsmart Buffer、HindIII-HF、NdeI、NcoI-HF、NEBuffer2、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	New England Biolabs (Ipswich、米国)
Difco ISP Medium 2、トリプトン、酵母エキス、カザミノ酸、PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent	Thermo Fisher Scientific (Waltham、米国)

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase	タカラバイオ（滋賀、日本）
KOD FX Neo、KOD One™ PCR Master Mix-Blue	東洋紡（大阪、日本）
Go Taq Green Master mix	プロメガ（東京、日本）
Thiostrepton	Sigma-Aldrich（St. Louis、米国）
TES	同仁化学研究所（熊本、日本）
Apramycin sulfate	LKT Laboratories（St. Paul、米国）
DNA プライマー、一本鎖オリゴ DNA	ユーロフィンジェノミクス（東京、日本）、Thermo Fisher Scientific（Waltham、米国）
きな粉	富士食糧（東京、日本）

2-2-4 培地

・大腸菌用培地

LB 培地		SOC 培地	
LB 培地（Lennox）	20 g	トリプトン	20 g
pH 未調整	/1 L	酵母エキス	5 g
		NaCl	0.5 g
		KCl	186 mg
		pH 7.0	/1 L
		↓オートクレーブ滅菌	
		1 M glucose 溶液	20 mL
		2M MgCl ₂ ·6H ₂ O 溶液	5 mL
			/1.025 L

・放線菌用培地

MS 培地		MS2 培地	
きな粉	16 g	きな粉	20 g

D (-)-mannitol	16 g
寒天	16 g
水道水	/1 L

pH 未調整

↓オートクレーブ滅菌(2回)

2M MgCl ₂ ·6H ₂ O 溶液	5 mL
4 M CaCl ₂ ·2H ₂ O 溶液	15 mL

/1.02 L

ISP2 寒天培地

Difco ISP Medium 2	38 g
--------------------	------

pH 未調整 /1 L

R5寒天培地

Sucrose	103 g
K ₂ SO ₄	250 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10.1 g
Glucose	10 g
カザミノ酸	100 mg
10×Trace element solution*	200 μL
酵母エキス	5 g

D (-)-mannitol	20 g
寒天	20 g
水道水	/1 L

pH 未調整

オートクレーブ滅菌(2回)

2×YT 培地

トリプトン	16 g
-------	------

酵母エキス 10 g

NaCl 5 g

pH 7.2 /1 L

*10×Trace element solution

ZnCl ₂	400 mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	2 g
CuCl ₂ · 2H ₂ O	100 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	100 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	100 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	100 mg
	/1 L

TES	5.7 g
pH 7.2	/1 L
寒天 (pH 調整後)	22 g
↓オートクレーブ滅菌	
1 M NaOH 溶液	7 mL
/1.007 L	

ISP2 液体培地		B 培地	
Glucose	4 g	酵母エキス	7.5 g
酵母エキス	4 g	Glycerol	7.5 g
麦芽エキス	10 g	NaCl	1.25 g
pH 7.2	/1 L	pH 6.5	/1 L

A2M 培地	
可溶性デンプン	20 g
きな粉	15 g
酵母エキス	2 g
CaCO ₃	4 g
pH 6.2	/1 L

2-2-5 合成オリゴヌクレオチド

名称	塩基配列 (5'-3')
dCas9-Fw	ACGGCGTCAGAGAAGGGAGCGGACA
dCas9-Re	GAGCCGCCGCCGCCGTCGCCGCCGAG
PmCDA1-Fw	CTCGGCGGCGACGGCGGCGGCGGCTC

PmCDA1-Re	TACCCGGGGATCCTCTAGAAAGCTTTCAGGCGACGAGCAG
ssDNA-actI-ORF2	CGGTTGGTAGGATCGACGGCACCAGTACGGCGCCAGGCCGGTTTT AGAGCTAGAAATAGA
ssDNA-lbpA	CGGTTGGTAGGATCGACGGCCCAGTCCTTCGGCATCAACGGTTTT AGAGCTAGAAATAGA
ssDNA-ladA5	CGGTTGGTAGGATCGACGGCCCAGTACGCCCGCTTCGCGGGTTTT AGAGCTAGAAATAGC
cPCR-check-Fw	GCAAGGACTTCCAGTTCTACAAGGT
cPCR-check-Rv	GCTTCAGGGTCTTCTCGAGCCA
actI-ORF2-Fw	AGTCCGCGGCGGTCTCAGCGGAGCCGT
actI-ORF2-Rv	GATCTCGACTACGTTCCGCTGGAGG
lbpA-Fw	CAACCGGGTCGTGGTCTTCGAGCGG
lbpA-Rv	GATCGGCGCCTGGAGGGTGCGCTCG

2-2-6 使用機器

・遠心分離機

- 機器 1-1：トミー精工社製 MDX-310
 機器 1-2：トミー精工社製 MX-301
 機器 1-3：トミー精工社製 MX-305
 機器 1-4：エッペンドルフ社製 Centrifuge 5418R
 機器 1-5：クボタ社製 高速大容量冷却遠心機 7780II

・培養器

- 機器 2-1：タイテック社製 BR-43FL
 機器 2-2：タイテック社製 BR-3000LF
 機器 2-3：アズワン社製 ICV-450
 機器 2-4：アズワン社製 IC-150MA
 機器 2-5：アズワン社製 XMI-10D

・分光光度計

- 機器 3-1：島津製作所社製 UV2600

- ・遠心エバポレーター

機器 4-1: トミー精工社製 CC105

- ・卓上小型振盪器

機器 5-1: タイテック社製 Wave-SI2

- ・超音波洗浄器

機器 6-1: アズワン社製 MCD-6

2-3 節 実験方法

2-3-1 基本操作

2-3-1-1 大腸菌の形質転換

1. 大腸菌 *E. coli* DH5 α 株または *E. coli* ET12567/pUZ8002 株のコンピテントセル（自製）に、プラスミド溶液 1 μ L、または Gibson Assembly 反応産物全量を添加し、氷上にて 20 分間、静置した。
2. 42°Cにて 45 秒間、静置した。
3. SOC 培地 500 μ L を添加し、37°Cにて 1 時間、静置した。（機器 2-3）
4. 5,510 $\times$ g にて 3 分間、遠心し、上清を除去したのち、抗生物質入りの LB 寒天培地に塗布した。（機器 1-4）
5. 37°Cにて一晩、静置した。（機器 2-3）

2-3-1-2 放線菌の孢子懸濁液の調製

1. 0.1 % (v/v) Tween80 溶液 5 mL を放線菌を十分に生育させた MS2 培地上に滴下し、孢子を綿棒により掻き取った。
2. 孢子懸濁液を適量の脱脂綿を詰めた 5 mL チップにて濾過したのち、50 mL 容チューブに集液した。
3. 1. ~ 2. の操作を再度繰り返した。
4. 孢子懸濁液を 2,330 $\times$ g にて 10 分間、遠心した。（機器 1-5）
5. 上清を捨て、0.1 % (v/v) Tween80 溶液 5 mL に、再懸濁した。
6. 懸濁液を 2,330 $\times$ g にて 10 分間、遠心した。（機器 1-5）
7. 上清を捨て、孢子を 20 % (v/v) glycerol 溶液 500 μ L に、懸濁した。

8. 懸濁液を 2 mL 容チューブに移し、-80℃にて保存した。

2-3-1-3 接合伝達法による放線菌の形質転換 (Kieser, 2000)

1. 放線菌に導入するプラスミドにより *E. coli* ET12567/pUZ8002 株を形質転換し、その glycerol 懸濁液を調製した。
2. Glycerol 懸濁液 5 μ L を LB 培地 5 mL (apramycin 50 μ g/mL と chloramphenicol 30 μ g/mL、kanamycin 25 μ g/mL を含む) (試験管) に植菌し、37℃、180 spm にて一晩、培養した。(機器 2-1)
3. 前培養液 100 μ L を抗生物質入りの LB 培地 10 mL (100 mL バッフルフラスコ) に植菌し、37℃、180 rpm にて OD₆₀₀ = 0.4~0.5 になるまで培養した。(機器 2-1)
4. 培養液を 4℃、2,330 $\times$ g にて 10 分間、遠心した。(機器 1-5)
5. 上清を捨て、LB 培地 10 mL に再懸濁した。
6. 3.~4.を再度繰り返した。
7. 上清を捨て、LB 培地 1 mL に懸濁した。
8. 放線菌の孢子 1.0×10^8 個を 2 $\times$ YT 培地 500 μ L に懸濁し、50℃にて 10 分間、静置したのち、氷上にて冷却した。
9. 7.の懸濁液 500 μ L を 8.の孢子懸濁液に混合し、16,880 $\times$ g にて 1 分間、遠心した。(機器 1-4)
10. 上清を捨て、沈殿を残液に懸濁した。
11. 懸濁液全量を MS 培地 (10 mM MgCl₂·6H₂O と 60 mM CaCl₂·2H₂O を含む) に塗布し、30℃にて 16~20 時間、静置した。(機器 2-4) (*S. lavendulae* FRI-5 株の場合は 28℃、機器 2-5)
12. 滅菌水 1 mL (apramycin 50 μ g/mL と nalidixic acid 50 μ g/mL を含む) を培地表面に塗布し、30℃にて数日間、培養した。(機器 2-4) (*S. lavendulae* FRI-5 株の場合は 28℃、機器 2-5)

2-3-1-4 形質転換体のプラスミド除去

1. プラスミドを変異株から除去するため、標的配列内の目的部位に塩基置換が検出された変異株を、抗生物質を含まない ISP2 培地に塗布し、37℃にて 1 週間、静置した。(機器 2-3)
2. 生育した菌株を ISP2 培地と ISP2 培地 (apramycin 50 μ g/mL と nalidixic acid 50 μ g/mL を含む) に塗布し、28℃にて 4 日間、静置した。(機器 2-4)

3. 孢子懸濁液調製用に菌株を増殖させるため、抗生物質を含まない ISP2 培地に生育した apramycin 感受性株を ISP2 液体培地 5 mL (試験管) に植菌し、28℃にて 2 日間、振盪培養した。(機器 2-1)
4. 孢子を形成させるため、培養液 100 μ L を MS2 培地に塗布し、28℃にて 1 週間、静置した。(機器 2-5)
5. 孢子を回収し、孢子懸濁液を調製した。

2-3-1-5 *S. lavendulae* FRI-5 株の前培養液の調製

1. *S. lavendulae* FRI-5 株の孢子 1.0×10^8 個を B 液体培地 70 mL (500 mL バッフルフラスコ) に植菌し、28℃、120 rpm にて 36 時間、培養した。(機器 2-2)
2. 培養液を 50 mL 容チューブに移し、4℃、2,330 $\times g$ にて 10 分間、遠心した。(機器 1-5)
3. 上清を捨て、等量 (70 mL) の B 培地に懸濁した後、4℃、2,330 $\times g$ にて 10 分間、遠心した。(機器 1-5)
4. 上清を捨て、再度、等量の B 培地に懸濁し、15 mL 容チューブに 10 mL ずつ分注し、-80℃にて保存した。

2-3-2 塩基編集ベクターの構築

2-3-2-1 融合遺伝子の挿入

1. *P. marinus* 由来のシチジндеアミナーゼ遺伝子 (*PmCDAI*) (GS リンカー、SH3 ドメイン、および 3 $\times$ FLAG タグを含む)、ウラシル DNA グリコシラーゼ阻害遺伝子 (*UGI*)、およびタンパク質分解タグ (LVA) (表 3) を放線菌用にコドン最適化し、融合遺伝子 (*CDA-UL_{str}*) として pMK-RQ に挿入した pMQ-CDA-UL_{str} を構築するよう GeneArt Gene Synthesis (Thermo Fisher Scientific、Waltham、米国) に依頼した。

表 3. コドン最適化した遺伝子の塩基配列

名称	塩基配列 (5'-3')
<i>PmCDAI_{str}</i>	ATGACCGACGCCGAGTACGTCCGCATCCACGAGAAGCTGGACATCTACACCTT CAAGAAGCAGTTCTTCAACAACAAGAAGTCCGTCAGCCACCGCTGCTACGTCC TGTTTCGAGCTGAAGCGCCGGGGCGAGCGCCGCGCCTGCTTCTGGGGCTACGCC GTCAACAAGCCGCAGTCCGGCACCGAGCGGGGCATCCACGCCGAGATCTTCTC CATCCGCAAGGTCGAGGAGTACCTGCGCGACAACCCGGGCCAGTTCACGATCA ACTGGTACTCCAGCTGGTCCCCGTGCGCCGACTGCGCCGAGAAGATCCTCGAG

	TGGTACAACCAGGAGCTGCGCGGCAACGGCCACACGCTGAAGATCTGGGCCTG CAAGCTGTACTACGAGAAGAACGCCCGCAACCAGATCGGCCTGTGGAACCTCC GCGACAACGGCGTCGGCCTGAACGTCATGGTGTCCGAGCACTACCAAGTGCTGC CGCAAGATCTTCATCCAGTCCTCGCACAACCAGCTGAACGAGAACCCTGGCT CGAGAAGACCCTGAAGCGGGCCGAGAAGCGCCGCTCCGAGCTGTCCATCATGA TCCAGGTCAAGATCCTGCACACCACCAAGTCGCCGGCCGTC
<i>UGI_{str}</i>	ATGACCAACCTGTCCGACATCATCGAGAAGGAGACCGGCAAGCAGCTGGTCAT CCAGGAGTCCATCCTGATGCTCCCCGAGGAGGTCGAGGAGGTCATCGGCAACA AGCCCGAGTCCGACATCCTGGTCCACACCGCCTACGACGAGTCCACCGACGAG AACGTGATGCTGCTGACCTCCGACGCGCCCGAGTACAAGCCGTGGGCGCTCGT GATCCAGGACTCCAACGGCGGAGAACAAGATCAAGATGCTG
<i>LVA_{str}</i>	CTCGTCGCC
リンカー領域 (GS リンカー、SH3 ド メイン、3×FLAG タ グ)	GGCGGCGGCGGCTCCGGCGGCGGCGGCAGCGCCGAGTACGTGCGCGCCCTGTT CGACTTCAACGGCAACGACGAGGAGGACCTGCCGTTCAAGAAGGGCGACATCC TGCGCATCCGCGACAAGCCCGAGGAGCAGTGGTGAACGCCGAGGACTCCGAG GGCAAGCGCGGCATGATCCCGGTGCCGTACGTGAGAAAGTACTCCGGCGACTA CAAGGACCACGACGGGGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACG ACGACAAGTCCCGCCTCGAGTCGGGCGACTACAAGGACCACGACGGGGACTAC AAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGAGCCGC

2. pMQ-CDA-UL_{str} を鋳型として、プライマーペア PmCDA1-Fw/PmCDA1-Re を用いて *PmCDA1_{str}* を含む 1,288 bp の断片を PCR 増幅した (表 4 と表 5)。

表 4. PCR 反応液組成

鋳型 DNA	0.5 μL
10 μM Forward primer	1.0 μL
10 μM Reverse primer	1.0 μL
dNTP mixture (2.5mM each)	4.0 μL
5 × PrimeSTAR GXL Buffer (Mg ²⁺ plus)	10 μL
PrimeSTAR GXL DNA Polymerase (1.25 U/μL)	0.5 μL
dH ₂ O	33 μL

/50 μL

表 5. PCR 反応条件

98°C	2 分	} 35 サイクル
98°C	15 秒	
55°C	45 秒	
72°C	1 分/kbp	
12°C	∞	

4. 3.と同様の条件にて、プライマーペア dCas9-Fw/dCas9-Re を用いて pCRISPR-dCas9 から dCas9 を含む 4.0 kb の PCR 断片を増幅した。

5. pCRISPR-dCas9 を *NdeI* と *HindIII* により処理した（表 6）。

表 6. 制限酵素処理の反応液組成

pCRISPR-dCas9	4 μL
Cutsmart Buffer	2 μL
20 U/ μL <i>NdeI</i>	0.4 μL
20 U/ μL <i>HindIII</i>	0.4 μL
dH ₂ O	13.2 μL

/20 μL

6. 次に、Gibson Assembly 反応液を調製した（表 7）。

表 7. Gibson Assembly 反応液組成

<i>NdeI</i> 、 <i>HindIII</i> にて処理した pCRISPR-dCas9	0.5 μL
3.と 4.の DNA 断片	各 0.5 μL

7. 50°Cにて 15 分間、静置した。
8. 反応液全量を *E. coli* DH5 α 株に導入し、LB 寒天培地（apramycin 50 μ g/mL を含む）にて 37°C、一晩、静置した。
9. 生育した菌体よりプラスミドを抽出し、DNA 塩基配列解析により目的プラスミドを得た。これを pLK101 とした。

2-3-2-2 一本鎖オリゴヌクレオチドの挿入

1. pLK101 を *Nco*I により線状化した。
2. *actI-ORF2*、*lbpA*、および *ladA5* の各遺伝子の配列より、以下の基準に基づきそれぞれの遺伝子の不活化に用いる標的配列を設計した。
 - ①オンターゲットスコア（値が高いほど編集効率が高い。）
 - ②オフターゲットスコア（値が高いほど標的配列の結合特異性が高く、オフターゲット効果が低い。）
 - ③Target-AID 技術が編集可能な DNA 領域内（PAM 配列から 16~20 塩基）に、glutamine コドン（鋳型鎖の cytosine 残基の thymine 残基への置換にて終止コドンに変換する）、または tryptophan コドン（相補鎖の cytosine 残基の thymine 残基への置換にて終止コドンに変換する）が存在する。

・設計した標的配列

標的遺伝子	塩基配列 (5'-3') (PAM 配列は赤字で表記)	オンターゲット スコア	オフターゲット スコア
<i>actI-ORF2</i>	ACCAGTACGGCGCCAGGCCGAGG	36	48
<i>lbpA</i>	CCAGTCCTTCGGCATCAACGAGG	66	99
<i>ladA5</i>	CCAGTACGCCCCGCTTCGCGGCGG	69	93

3. *Nco*I サイトの上流および下流 20 塩基の塩基配列の間に、*actI-ORF2* 標的配列 20 塩基を挟んだ計 60 塩基の一本鎖オリゴ DNA (ssDNA-*actI-ORF2*、ssDNA-*lbpA*、および ssDNA-*ladA5*) を設計し、ユーロフィンジェノミクス（東京、日本）より購入した。

- ・設計した一本鎖オリゴ DNA

塩基配列 (5'-3') (標的配列 20 塩基を赤字で表記)

CGGTTGGTAGGATCGACGGCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGC

4. 一本鎖オリゴ DNA を終濃度 0.2 μM となるよう調製した (表 8)。

表 8. 0.2 μM 一本鎖オリゴ DNA 組成

100 μM 一本鎖オリゴ DNA	1 μL
NEBuffer2	50 μL
dH ₂ O	449 μL
/500 μL	

5. 次に、Gibson Assembly 反応液を調製した (表 9)。

表 9. Gibson Assembly 反応液組成

<i>Nco</i> I にて処理した pLK101	1 μL
0.2 μM 一本鎖オリゴ DNA	1 μL
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	2 μL
/4 μL	

6. 50°C にて 1 時間、静置した。
7. 反応液全量を *E. coli* DH5 α 株に導入し、LB 寒天培地 (apramycin 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む) にて 37°C、一晚、静置した。(機器 2-3)
8. 生育した菌体よりプラスミドを抽出し、DNA 塩基配列解析を経て、目的プラスミドを得た。これらをそれぞれ pTarget-ACT、pTarget-lbpA、pTarget-ladA5 とした。

2-3-3 *S. coelicolor actI-ORF2* 変異株の構築と変異株の actinorhodin 生産解析

2-3-3-1 *actI-ORF2* 変異導入株の DNA 塩基配列解析

1. 2-3-1-4 の方法にて pTarget-ACT を *S. coelicolor* A3(2)株に導入した。
2. MS 培地上に出現した形質転換体候補株を ISP2 培地 (apramycin 50 µg/mL と nalidixic acid 50 µg/mL を含む) に植菌し、30°Cにて数日間、培養した。(機器 2-4)
3. dCas9-デアミナーゼ融合タンパク質を発現させるため、apramycin 耐性株を ISP2 培地 (apramycin 50 µg/mL と nalidixic acid 50 µg/mL、thiostrepton 20 µg/mL を含む) に植菌し、30°Cにて数日間、培養した。(機器 2-4)
4. 生育した菌株を爪楊枝の先端で掻き取り、PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent 10 µL に懸濁した。
5. 懸濁液を 95°Cにて 10 分間、処理したのち、20,380×g にて 1 分間、遠心した。(機器 1-1)
6. 上清 0.5 µL を鋳型 DNA として (表 10 と表 11)、プライマーペア cPCR-check-Fw/cPCR-check-Re により dCas9 と *PmCDAI_{str}*を含む 2.0 kbp 前後の DNA 断片を PCR 増幅した。

表 10. コロニーPCR 反応液組成

10 µM Forward primer	0.3 µL
10 µM Reverse primer	0.3 µL
Go Taq Green Master mix	7.5 µL
dH ₂ O	6.9 µL
/15 µL	

表 11. コロニーPCR 反応条件

98°C	2 分	30 サイクル
98°C	30 秒	
55°C	30 秒	
72°C	50 秒	
12°C	∞	

7. pTarget-ACT 保持株の *actI-ORF2* 標的部位を含む 500 bp の DNA 断片を actI-ORF2-Fw と actI-ORF2-Rv により PCR 増幅し、DNA 塩基配列解析に供した (表 4 と表 5)。

2-3-3-2 *actI-ORF2* 変異株の actinorhodin 生産解析

1. 前項の 7.にて *actI-ORF2* 標的部位に変異が導入された菌株を *mactI-ORF2* 株とした。
2. *mactI-ORF2* 株を R5 培地に植菌し、30℃にて 4 日間、静置培養した。（機器 2-4）

2-3-4 *S. lavendulae-lbpA* 変異株の構築と変異株の indigoidine 生産解析

2-3-4-1 Thiostrepton 応答性活性化因子 TipA の探索

1. *S. coelicolor* A3(2)株の thiostrepton 応答性活性化因子 TipA (SCO3413) のアミノ酸配列を基に、*S. lavendulae* FRI-5 株ゲノム配列を遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX Ver.11 (<https://www.genetyx.co.jp/>) を用いて、ClustalW によるアラインメント解析を行い、SCO3413 と相溶性が高い推定 TipA タンパク質を探索した。

2-3-4-2 *lbpA* 変異株の構築

1. 2-3-1-4 の方法にて pTarget-lbpA を *S. lavendulae* FRI-5 株に導入した。
2. 形質転換体候補株を ISP2 培地 (apramycin 50 µg/mL と nalidixic acid 50 µg/mL を含む) に植菌し、28℃にて数日間、菌株を視覚的に判別できるまで培養した。
3. dCas9-デアミナーゼ融合タンパク質を発現させるため、apramycin 耐性株を ISP2 培地 (apramycin 50 µg/mL と nalidixic acid 50 µg/mL、thiostrepton 5 µg/mL を含む) に植菌し、28℃にて数日間、菌株が視覚的に判別できるまで培養した。
4. 形質転換体よりゲノム DNA 溶液を調製し、その 0.5 µL を鋳型 DNA として *lbpA* 標的配列を含む 2.0 kbp の DNA 断片を lbpA-Fw と lbpA-Rv により PCR 増幅し（表 12 と表 13）、その DNA 塩基配列を解析した。

表 12. PCR 反応液組成

dH ₂ O	4.3 µL
2×PCR Buffer for KOD FX Neo	10 µL
2 mM dNTPs	4 µL
10 µM Forward primer	0.4 µL
10 µM Reverse primer	0.4 µL

鋳型 DNA	0.5 μ L
1U/ μ L KOD FX Neo	0.4 μ L
/ 20 μ L	

表 13. PCR 反応条件

94°C	2 分	35 サイクル
98°C	10 秒	
55°C	30 秒	
68°C	30 秒	
12°C	∞	

2-3-4-3 *lbpA* 変異株の indigoidine 生産解析

1. 前項の 4.にて *lbpA* 標的部位に変異が導入された菌株を *mlbpA* 株とした。
2. 第 2 章 2-3-5 の方法にて、*mlbpA* 株から pTarget-*lbpA* を除去した後、孢子懸濁液を調製した。
3. 野生型株と *mlbpA* 株の孢子 1.0×10^8 個を ISP2 寒天培地（100 mM L-glutamine を含む）に植菌し、28°Cにて 2 日間、静置培養した。（機器 2-5）

2-3-4-4 IM-2 による indigoidine 生産誘導

1. 野生型株と *mlbpA* 株の前培養液を総 OD₆₀₀ = 30 になるよう B 培地 70 mL（500 mL バッフルフラスコ）に植菌し、28°C、120 spm にて 7 時間、培養した。（機器 2-2）
2. 培養開始 5 時間後に IM-2-C₅（終濃度 1.2 ng/mL-培地）を添加した。陰性対照として同量の methanol を加えた。
3. 培養液を 16,880 $\times$ g にて 1 分間、遠心した。（機器 1-4）
4. 上清 1 mL をフィルター（0.2 μ m 孔径）にて濾過し、590 nm における吸光度（A₅₉₀）を測定した。（機器 3-1）

2-3-5 *S. lavendulae* FRI-5 株の推定 lavencidin BGC の探索

1. 当研究室が保有する *S. lavendulae* FRI-5 株のゲノム配列（アクセッション番号: LC815377）を、二次代謝 BGC 探索プログラム antiSMASH（Blin *et al.*, 2025）（<https://antismash-db.secondarymetabolites.org/>）に供し、推定 lavencidin BGC を見出した。

2-3-6 *S. lavendulae-ladA5* 変異株の構築と変異株の lavencidin 生産解析

1. 2-3-4-1 と同様の方法にて pTarget-ladA5 を *S. lavendulae* FRI-5 株に導入し、*ladA5* 変異株を構築した。これを *mladA5* 株とした。
2. *mladA5* 株の前培養液 1 mL を A2M 培地 70 mL (500 mL バッフルフラスコ) に植菌し、28℃、160 rpm にて 24 時間、培養した。（機器 2-2）
3. 培養上清 5 mL を 15 mL 容チューブに回収し、*n*-butanol 2.5 mL を添加したのち、30 分間、攪拌した。（機器 5-1）
4. 4℃、2,330 ×g にて 15 分間、遠心した。（機器 1-5）
5. *n*-butanol 層 500 μL を遠心エバポレーターにて濃縮乾固した。（機器 4-1）
6. 乾固物を DMSO 200 μL に溶解し、溶液 20 μL を逆相 HPLC 解析に供した。（HPLC 解析条件 1）

<HPLC 解析条件 1>

機器：Agilent 1200 series（アジレント社製）

カラム：Cadenza CD-C18 4.6×75 mm（インタクト社製）

移動相：A：0.1%（v/v）ギ酸含有水/B：acetonitrile

流速：1.2 mL/分

移動相の濃度勾配

時間（分）	A（%）	B（%）
0-3	85	15
3-25	85-15	15-85
25-29	15	85
29-32	15-85	85-15

2-4 節 実験結果

2-4-1 *S. coelicolor* A3(2)株に対する塩基編集技術の有効性評価

2-4-1-1 *actI-ORF2* 標的配列の DNA 塩基配列解析

S. lavendulae FRI-5 株のゲノム配列情報から推定 *lavencidin* BGC が見出されていたことから、当該 BGC の不活化による *lavencidin* BGC の同定を試みた。相同組換えや部位特異的組換え、CRISPR-Cas9 技術を使用して遺伝子破壊を試みたが、いずれの手法も推定 *lavencidin* BGC の改変には至らなかった (data not shown)。そこで、Target-AID 法に基づく当該 BGC の生合成遺伝子の不活化に利用可能な塩基編集ベクターを構築することにした。これまでの先行研究から、sgRNA 発現におけるプロモーター活性がゲノム編集効率において重要な因子であることが示唆されている (Zhao *et al.*, 2020、Tong *et al.*, 2019)。そこで、本研究では先行研究 (Tong *et al.*, 2019) で開発されたベクターで sgRNA の発現に用いられていた強力な構成的プロモーターである *ermE*^{*}p により sgRNA を発現させることにした。また、別の先行研究 (Nishida *et al.*, 2016、Zhao *et al.*, 2020) で使われていた PmCDA1 と、変異効率の向上に寄与するウラシル DNA グリコシラーゼ阻害剤 (UGI) (Zhigang *et al.*, 1991)、およびタンパク質分解タグ LVA (Andersen *et al.*, 1998) を dCas9 との融合タンパク質として発現させることにした。さらに、dCas9-デアミナーゼ融合タンパク質の翻訳を容易にするため、dCas9 タンパク質の場合と同様に、デアミナーゼから LVA までの融合領域も放線菌での発現用にコドン最適化し、発現量を調節可能な *tipA* プロモーターを融合タンパク質の上流に配置した。構築した塩基編集ベクターの *S. coelicolor* A3(2)株に対する有効性を検証するため、当該菌株が生産する青色色素系抗生物質 actinorhodin の生合成遺伝子 *actI-ORF2* を不活化することを試みた。*S. coelicolor* A3(2)株は actinorhodin の他に赤色抗生物質 undecylprodigiosin も生産する (Bentley *et al.*, 2002)。したがって、*actI-ORF2* 遺伝子の不活化により変異株においては actinorhodin 生産が消失し、undecylprodigiosin のみを生産することから、目視で容易に確認可能な評価系であると考えた。dCas9-CDA-UL_{str}は、sgRNA の配列が 20nt である場合、プロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列の上流-16~-20 塩基内で cytosine 残基から thymine 残基への塩基置換を誘導する (Zhao *et al.*, 2020)。そこで、*actI-ORF2* の PAM 配列から-18 位と-19 位の cytosine 残基を thymine 残基に変換し、終止コドン (TGG から TAG、TGA、TAA) を導入するよう sgRNA を設計し、塩基編集ベクター pTarget-ACT を構築した。pTarget-ACT を *S. coelicolor* A3(2)株に導入し、形質転換体選抜用培地に出現したコロニーから無作為に選抜した 50 菌株を、抗生物質を含む ISP2 培地に塗布した。このうち、actinorhodin 生産の消失を示した 49 菌株から 14 菌株を選抜し、塩基配列解析に供した結果、14 菌株全てにおいて標的配列内にストップ変異 (TAG または

TAA コドン) が導入されていることが分かった (図 8)。予想に反して、1 菌株においては-18 位と-19 位に加え、PAM 配列から-13 位の cytosine 残基も thymine 残基に変換されていた。これらの結果は、塩基編集プラスミド pLK101 が *S. coelicolor* A3(2)株の標的配列において、上流-16~-20 塩基内の cytosine 残基を thymine 残基に変換できることに加えて、PAM 配列からより近位にある cytosine 残基も thymine 残基に変換できることを示唆している。

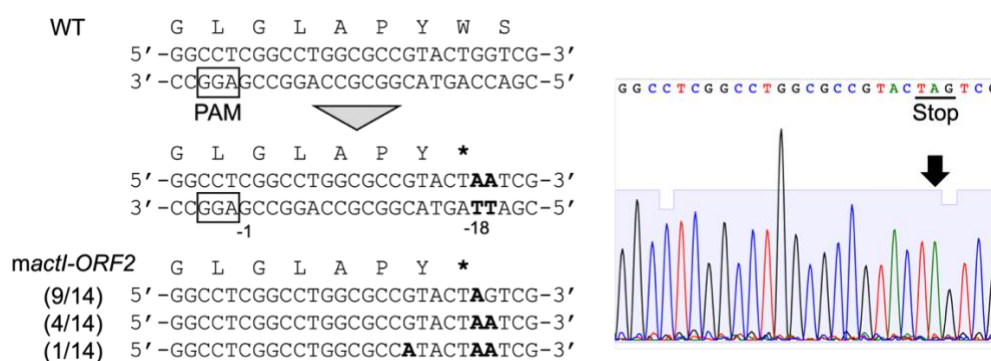


図 8. *actI-ORF2* の DNA 塩基配列解析。PAM 配列は黒枠で囲まれている。塩基配列下部の数字は PAM 配列からの塩基数を表す。また、変異箇所を太字、終止コドンを*で示した。変異株の塩基配列左側に示されている数字は、対応するストップ変異が導入された菌株数と、塩基配列解析に供した菌株の総数との比率を表す。右図は TAG ストップ変異が導入された 1 菌株のサンガーシーケンシングクロマトグラムであり、変異箇所を黒矢印で示している。

2-4-1-2 *actI-ORF2* 不活化株の actinorhodin 生産解析

actI-ORF2 にストップ変異が導入された菌株 (*mactI-ORF2* 株) において actinorhodin 生産が消失したか解析するため、塩基配列解析に供した 14 菌株を R5 培地に塗布し、その表現型を観察した。その結果、14 菌株全てにおいて actinorhodin 生産が消失し、赤色色素 undecylprodigiosin のみを生産していた (図 9)。一方、野生株および sgRNA を挿入していない pLK101 を導入した野生株は、actinorhodin と undecylprodigiosin の両方を生産していた。これは、pTarget-ACT の導入によって actinorhodin の生合成が停止したが、undecylprodigiosin の生産には影響がないことを示唆している。

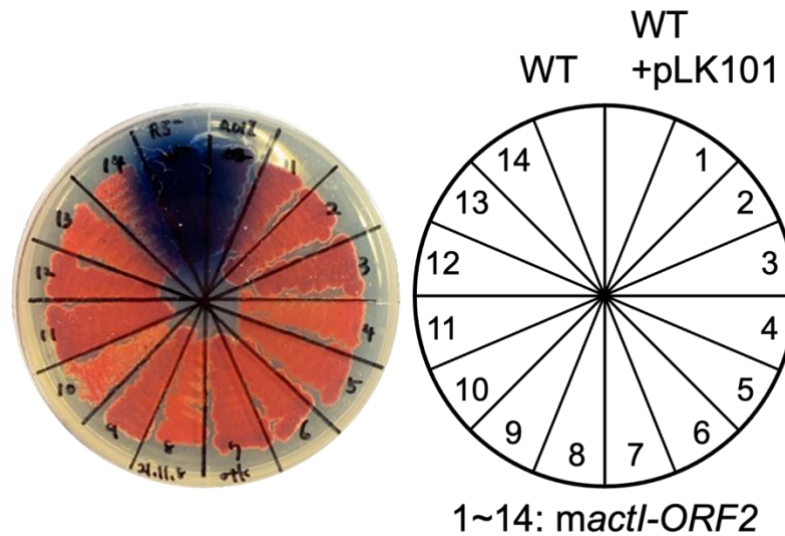


図 9. *mactI-ORF2* 株における色素系抗生物質生産。WT は野生株、WT+pLK101 は pLK101 を導入した野生株、*mactI-ORF2* 株は *actI-ORF2* 株にストップ変異を導入した菌株を表す。各菌株を R5 培地に塗布し、30℃にて 4 日間培養した。プレートは底面から撮影した。

2-4-2 *S. lavendulae* FRI-5 株の塩基編集による遺伝子不活化

2-4-2-1 TipA タンパク質の相同性解析

pLK101 にコードされる dCas9-デアミナーゼ融合タンパク質は、thiostrepton 誘導型プロモーター *tipAp* によって発現が調節されている (Murakami *et al.*, 1989)。*tipAp* が機能するには thiostrepton 応答性活性化因子 TipA が必要であり、*tipA* 遺伝子は *S. coelicolor* A3(2)株を含む多くの *Streptomyces* 属放線菌に保存されている (Tong *et al.*, 2015)。そこで、*S. coelicolor* A3(2)株にコードされる TipA (SCO3413) のアミノ酸配列と相同性の高い推定 TipA タンパク質を *S. lavendulae* FRI-5 株のゲノム配列より探索した。相同性解析の結果、SCO3413 と 69%の identity を有する推定 TipA タンパク質 (SLA_TipA) が *S. lavendulae* FRI-5 株ゲノムにコードされていることが分かった (図 10)。

SCO3413	1	MSYSVGQVAGFAGVTVRTLHHYDDIGLLVPSERSHAGHRRYS	DADLDRLQQILFYRELGF	60
SLA_TipA	1	MGYSVGQVAGFAGVTVRTLHHYDEIGLLSPSGRSGAGHRRYD	DADLDRLQRILFYRELGF	60
SCO3413	61	PLDEVAALLDDPAADPRAHLRRQHELLSARIGKLOKMAAAVEQ	AMEARSMGINLTPEEKF	120
SLA_TipA	61	PLDEVAVLLDDPESDPREHLRRQHALLSDRIARLQMAKAVEH	AMEAKKMGINLTPEERF	120
SCO3413	121	EVFGDFDPDQYEEEVRRERWGNTDAYRQSKEKTASYTKEDWQRIQ	DEADELTRRFVALMDA	180
SLA_TipA	121	EVFGDKDPEQYAEAAERRWGGTEAYAESQRRAAAYTKADWQRIQ	DEVADWGGRYAALVAA	180
SCO3413	181	GEPADSEEGAMDAAEEDHRQGIARNHYDCGYEMHTCLGEMYVSD	ERFTRNIDAAKPGLAAYM	240
SLA_TipA	181	GEPADGEAAMDLAEEHRRHICDRYIECGYEMHVCLGEMYVAD	ERFKAFYDGMGAGVAEHL	240
SCO3413	241	RDAILLANAVRHTP		253
SLA_TipA	241	RDSITANAVRKA-		252

図 10. SCO3413 の相同性解析。同一のアミノ酸残基を黒で表している。

2-4-2-2 *lbpA* 標的配列の DNA 塩基配列解析

S. lavendulae FRI-5 株は青色色素 indigoidine [図 4 (1)] を生産し、indigoidine は非リボソームペプチド合成酵素 LbpA によって生合成される (Pait *et al.*, 2017)。塩基編集ベクター pLK101 が *S. lavendulae* FRI-5 株のゲノム配列を編集可能か検証するため、*S. coelicolor* A3(2) 株の *actI-ORF2* の場合と同様に、代謝物生産を視覚的に判別可能な indigoidine 生合成遺伝子 *lbpA* を標的として選択した。sgRNA の特異性を高めるために、LbpA において一箇所のみコードされる thioesterase (TE) ドメイン内の glutamine コドン を標的とし、PAM 配列から -19 塩基上流に位置する cytosine 残基を thymine 残基に変換するよう sgRNA を設計した (図 11)。DNA 塩基配列解析の結果、LbpA の TE ドメインをコードする遺伝子領域に TAG ストップ変異が導入されていることが分かった (図 11)。

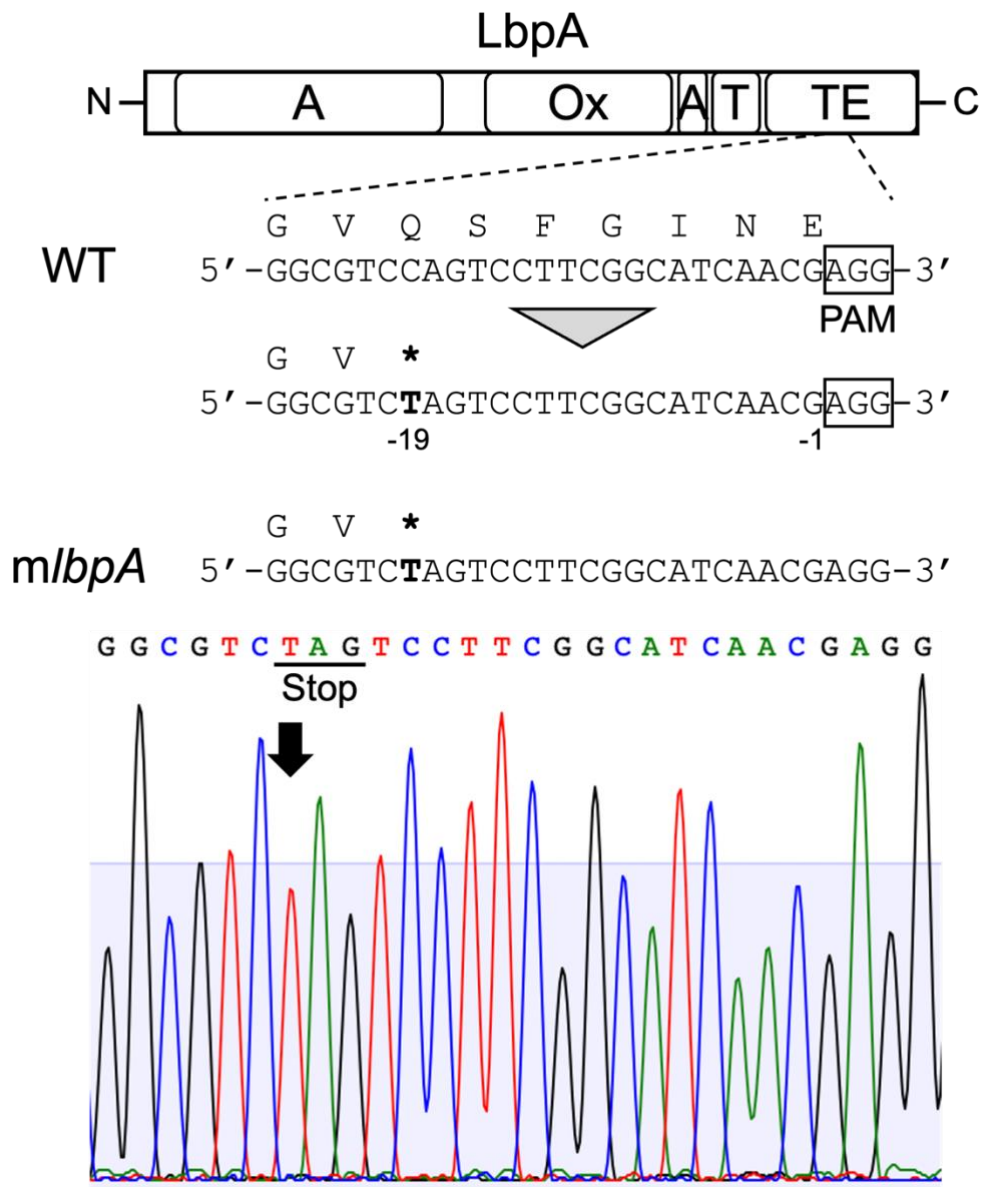


図 11. LbpA のドメイン構成と、pTarget-lbpA によって編集された *lbpA* の配列アラインメント。各ドメインを次のように表している: A, adenylation ドメイン; Ox, 酸化ドメイン; T, thiolation ドメイン; TE, thioesterase ドメイン。PAM 配列は黒枠で囲んでいる。予想される編集部位は、PAM 配列からの塩基数で示している。WT は野生株、*mlbpA* は *lbpA* 変異株を表す。翻訳したアミノ酸配列を、対応するヌクレオチド配列の上部に示した。変異塩基を太字で示し、*は終止コドンを表している。下図は TAG ストップ変異が導入された 1 菌株のサンガーシーケンシングクロマトグラムであり、変異箇所を黒矢印で示している。

2-4-2-3 *mlbpA* 株の indigoidine 生産解析

lbpA のストップ変異導入により当該遺伝子が不活化されているか検証するため、固体培地と液体培地を用いて得られた株 (*mlbpA* 株) を培養し、indigoidine 生産を解析した。その結果、L-glutamine を含む ISP2 培地上にて野生株は indigoidine を生産したのに対して、*mlbpA* 株では生産は観察されなかった (図 12)。さらに、indigoidine 生合成のオートレギュレーターとして用いられる放線菌ホルモン IM-2 存在下での液体培養においても、*mlbpA* 株の indigoidine 生産は消失していた (図 12)。したがって、pLK101 は *S. lavendulae* FRI-5 株においてもゲノム配列を編集可能であり、本菌株の遺伝子機能を解明するのに有用であると考えた。

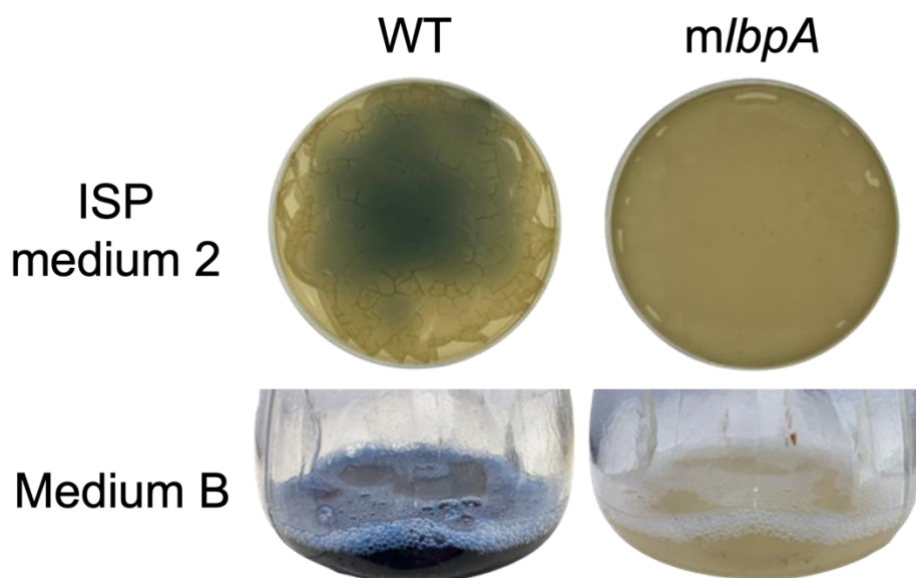


図 12. 固体培養（上部プレート）および液体培養（下部フラスコ）における *mlbpA* 株の indigoidine 生産。固体培養では、各菌株を ISP2 培地（100 mM L-glutamine を含む）上に塗布し、28℃にて 2 日間、静置した。液体培養では、各菌株を B 液体培地に植菌し、28℃にて 7 時間、振盪培養した。培養 5 時間後に、IM-2-C₅ を終濃度 1.2 ng/mL-培地になるよう添加し、さらに 2 時間培養した。

2-4-3 塩基編集による lavencidin 生合成遺伝子の同定

2-4-3-1 推定 lavencidin BGC の解析

Lavencidin の化学構造 (図 4) から、当該化合物は I 型 PKS によって生合成され、そのモジュール内に少なくとも 62 個の酵素ドメインが生合成に必要であると推測した。そこで、*S. lavendulae* FRI-5 株のドラフトゲノム配列（全長約 8.1 Mb、コンティグ数 3）を用いて、

antiSMASH 8.0 (Blin *et al.*, 2025) による *in silico* スクリーニングを実施した結果、全長 100.7 kb の推定 lavencidin BGC を見出した (図 13)。また、この領域のアノテーション解析と、公開データベースに記載されている遺伝子との相同性比較により、当該クラスターには 27 個のオープンリーディングフレーム (ORF) がコードされていると予測した (表 14)。クラスター中には 5 個の PKS 遺伝子 (*ladA1*、*ladA2*、*ladA3*、*ladA4*、*ladA5*) と、ポリケタイド生合成の修飾過程に関与していると考えられる遺伝子 (*ladB1*、*ladB2*、*ladB3*)、lavencidin 生産を制御していると考えられる遺伝子 (*ladR1*、*ladR2*、*ladR3*) が同方向にコードされていることが分かった。これらのクラスター化した調節遺伝子は、他のポリエンマクロライド系抗生物質の BGC にも見られる (Caffrey *et al.*, 2001、Chen *et al.*, 2003、Brautaset *et al.*, 2000、Li *et al.*, 2023)。

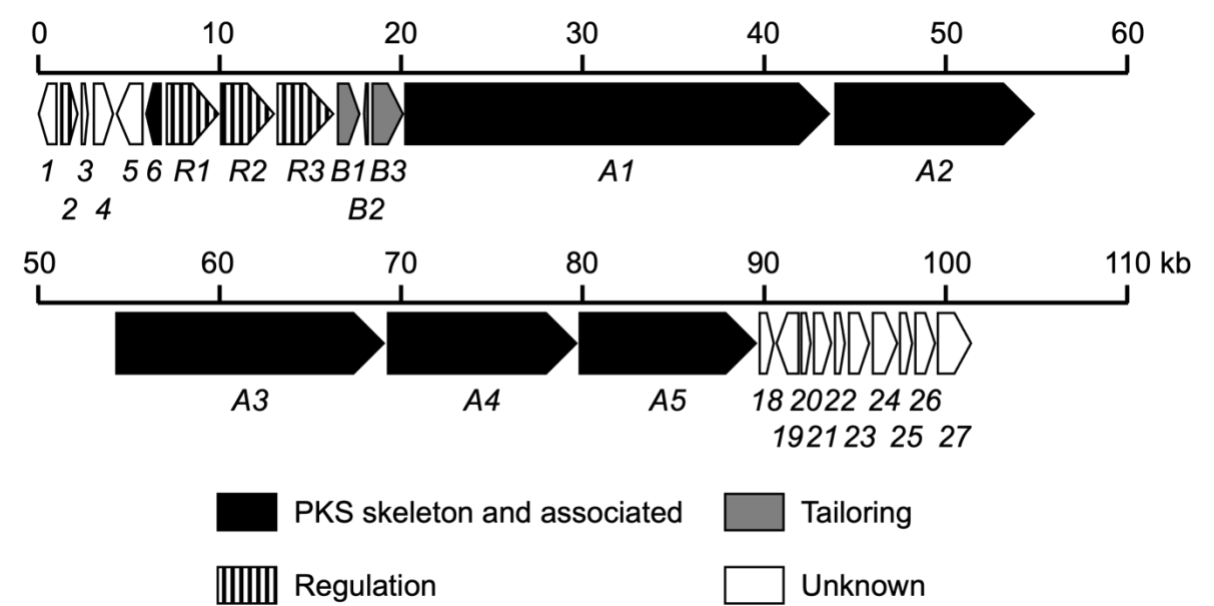


図 13. Lavencidin BGC の遺伝子構成。各矢印は転写方向と遺伝子の相対的な大きさを表している。lavencidin のコア生合成酵素遺伝子を黒色、修飾酵素遺伝子を灰色、制御遺伝子を縦縞、その他遺伝子を白色で示した。

表 14. Lavencidin BGC における各 ORF の推定機能

Gene	Size ^a	Proposed function	Homolog and origin ^b	Identity/ similarity (%)
------	-------------------	-------------------	---------------------------------	--------------------------------

<i>orf1</i>	350	YncE-family protein	IPZ70_15500 (MCF3181332), <i>Streptomyces polychromogenes</i>	91/95
<i>orf2</i>	296	LysR-family transcriptional regulator	(WP_189530920), <i>Streptomyces roseolilacinus</i>	94/96
<i>orf3</i>	124	VOC-family protein	(WP_028801116), <i>Streptomyces</i> sp. 142MFCol3.1	92/96
<i>orf4</i>	356	GNAT-family N-acetyltransferase	IPZ70_15520 (MCF3181336), <i>Streptomyces polychromogenes</i>	86/90
<i>orf5</i>	465	Calcium-binding protein	PL81_39170(KIF00795), <i>Streptomyces</i> sp. RSD-27	87/92
<i>orf6</i>	268	4'-Phosphopantetheinyl transferase	IPZ70_15535 (MCF3181339), <i>Streptomyces polychromogenes</i>	85/88
<i>ladR1</i>	941	LuxR-family transcriptional regulator	(WP_161228434), <i>Streptomyces</i> sp. SID8352	81/85
<i>ladR2</i>	970	LuxR-family transcriptional regulator	(WP_078950727), <i>Streptomyces lavendulae</i>	67/72
<i>ladR3</i>	1019	LuxR-family transcriptional regulator	(WP_030241028), <i>Streptomyces lavendulae</i>	74/81
<i>ladB1</i>	398	Cytochrome P450	Svu004 (AFY08532), <i>Streptomyces virginiae</i>	100/100
<i>ladB2</i>	70	Ferredoxin	(WP_161228517), <i>Streptomyces</i> sp. SID8352	85/91
<i>ladB3</i>	542	GMC oxidoreductase	ChoL (ABS32193), <i>Streptomyces virginiae</i>	99/99
<i>ladA1</i>	7749	Type I polyketide synthase	(WP_167456781), <i>Streptomyces lavendulae</i>	77/82
<i>ladA2</i>	3636	Type I polyketide synthase	(WP_100660765), <i>Streptomyces lavendulae</i>	75/81
<i>ladA3</i>	5133	Type I polyketide synthase	(WP_100660764), <i>Streptomyces lavendulae</i>	78/84
<i>ladA4</i>	3767	Type I polyketide synthase	(WP_100660763), <i>Streptomyces lavendulae</i>	79/84
<i>ladA5</i>	3375	Type I polyketide synthase	(WP_100660762), <i>Streptomyces lavendulae</i>	79/84
<i>orf18</i>	257	Type II thioesterase	(WP_045952057), <i>Streptomyces katrae</i>	91/96

<i>orf19</i>	397	Oxidoreductase	(WP_045952058), <i>Streptomyces katrae</i>	93/95
<i>orf20</i>	169	RidA-family protein	(WP_051840561), <i>Streptomyces lavendulae</i>	91/93
<i>orf21</i>	324	DUF4129 domain-containing protein	(WP_245691664), <i>Streptomyces katrae</i>	73/75
<i>orf22</i>	177	Hypothetical protein	GT031_31760 (MYV49999), <i>Streptomyces</i> sp. SID2888	74/79
<i>orf23</i>	367	Hypothetical protein	TNCT6_67860 (GED89701), <i>Streptomyces</i> sp. 6-11-2	94/96
<i>orf24</i>	447	DUF58 domain-containing protein	(WP_037661004), <i>Streptomyces griseofuscus</i>	84/90
<i>orf25</i>	220	Hypothetical protein	Hypothetical protein (WP_075662035), <i>Streptomyces acidiscabies</i>	75/80
<i>orf26</i>	353	Glycine/betaine ABC transporter ATP-binding protein	PL81_34430 (KIF01645), <i>Streptomyces</i> sp. RSD-27	96/97
<i>orf27</i>	598	Glycine/betaine ABC transporter permease	PL81_34425 (KIF01644), <i>Streptomyces</i> sp. RSD-27	91/94

^a Numbers refer to amino acid residues.

^b Parenthetical codes are National Center for Biotechnology accession number

2-4-3-2 *ladA5* の不活化と不活化株の lavencidin 生産解析

推定 lavencidin BGC が lavencidin 生産に関与していることを実証するために、PKS 中に一箇所のみコードされる TE ドメインを有する *LadA5* を Target-AID 技術により不活化することにした。*ladA5* を標的とする塩基編集ベクター pTarget-*ladA5* により *S. lavendulae* FRI-5 株を形質転換した結果、標的配列内に終止コドンが導入された変異株 (*mladA5* 株) を取得した (図 14A)。次に、*mladA5* 株における lavencidin 生産を検証するために、*mladA5* 株を A2M 液体培地にて培養し、その代謝物を逆相 HPLC により解析した。その結果、*mladA5* 株において lavencidin および RKGS-A2215A をはじめ、複数種類の化合物生産が消失していた (図 14B)。この結果は、*LadA5* が lavencidin と RKGS-A2215A 両方の生合成に関与していることを示しており、予想通りこの BGC が lavencidin の生合成を担うことが示唆され、この BGC を *lad* BGC とした。また、*mladA5* 株の代謝物プロファイルにおいては lavencidin 中間体は検出されなかった。多くの ACP 結合中間体や酵素結合中間体は遊離しにくく分解されやすいため、標準的な抽出・分析法では検出されないことが多い (Wilkening *et al.*, 2016)。一方、*Caenorhabditis elegans* のハイブリッド NRPS-PKS 系における TE ドメインを不活化した変異体において、複

数の中間体が検出されたことから (Feng *et al.*, 2021)、本研究においても抽出方法や分析方法を変更すれば中間体を検出できる可能性が考えられる。

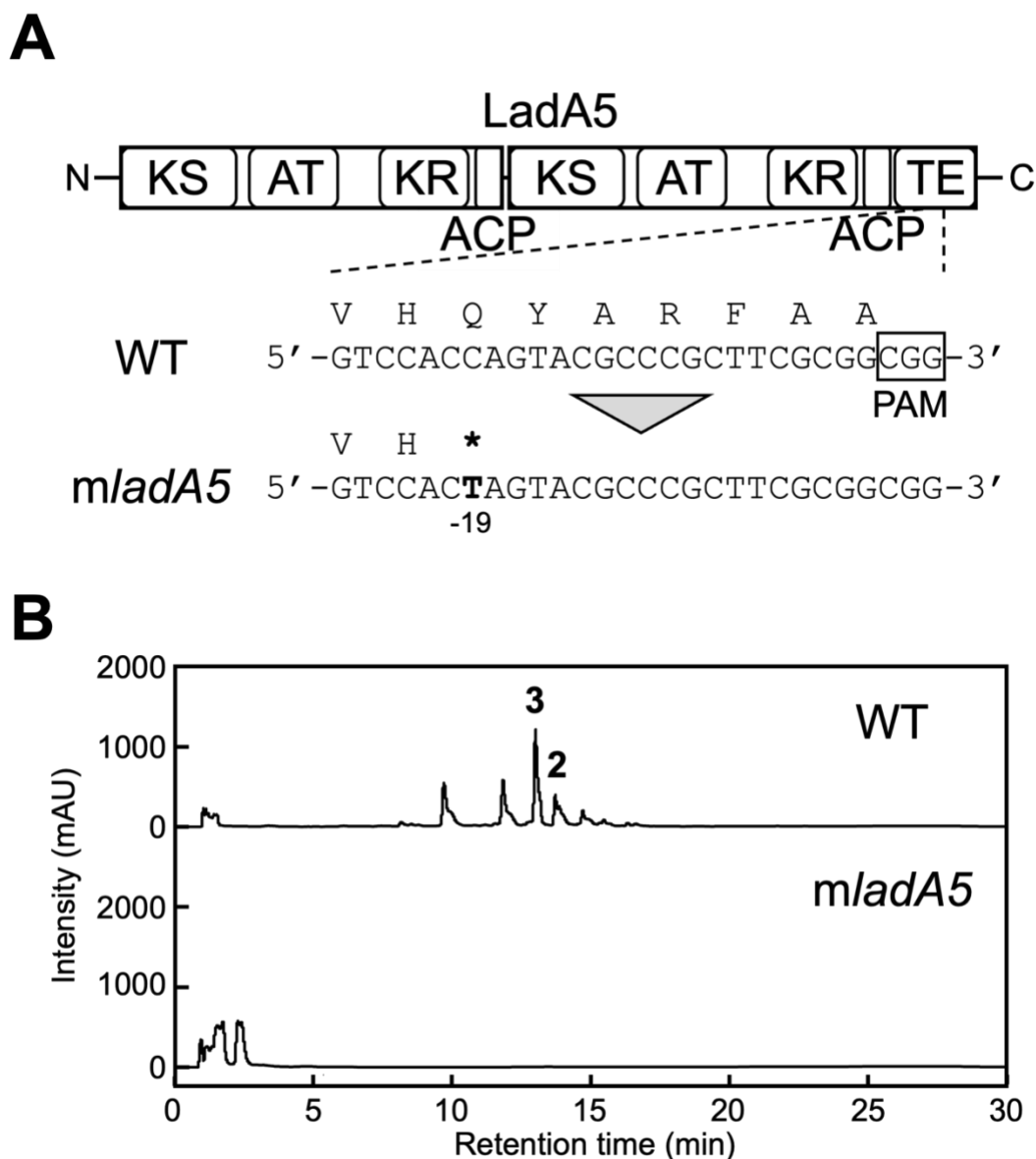


図 14. *mladA5* 株における lavencidin 生産。WT は野生株、*mladA5* 株は *ladA5* にストップ変異が導入された菌株を表す。翻訳されたアミノ酸配列は、対応するヌクレオチド配列の上部に示している。変異箇所を太字で示し、*は終止コドンを表している。(A) *LadA5* のドメイン構成と、pTarget-*ladA5* によって編集された *ladA5* の配列アラインメント。各ドメインを次のように表している: KS, ketosynthase; AT, acyltransferase; KR, ketoreductase; ACP, acyl carrier protein; TE, thioesterase。PAM 配列を黒枠で囲んでいる。予想した編集部位は、PAM 配列から

の塩基数で示している。(B) *mladA5* 株の代謝物の HPLC クロマトグラム。A2M 培養液を *n*-butanol にて抽出した。mAU は、290 nm におけるミリ吸光度単位を表す。lavencidin と RKGS-A2215A は、それぞれカラム保持時間 13.7 分と 13.0 分に溶出された。

2-4-4 *In silico* 解析による lavencidin 生合成経路の解明

2-4-4-1 Lavencidin 生合成経路の予測モデルの提案

Lavencidin の生合成経路におけるポリケタイド合成過程を予測するために、5 種類の PKS (LadA1 から LadA5) 中にコードされる機能ドメインをコンピューター上で解析した結果、予測したドメイン数より 2 個多い合計 64 個の酵素ドメインが 14 個のモジュールに渡って編成されていることが明らかとなった (図 15)。

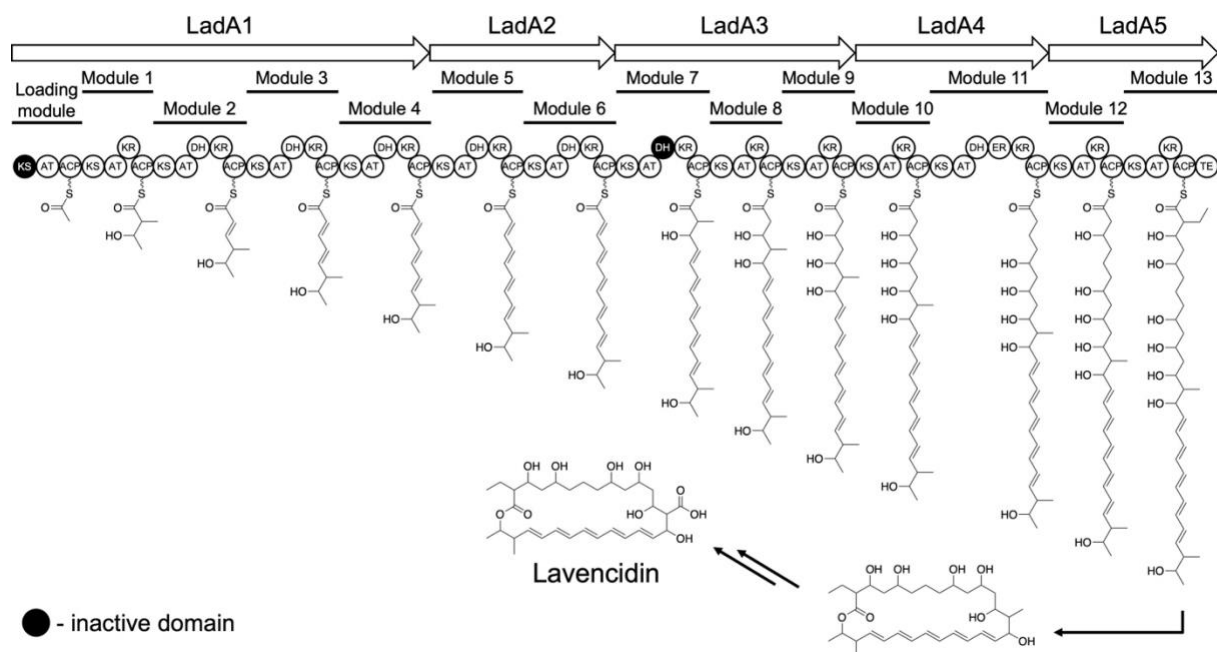


図 15. Lavencidin 生合成経路の予測モデル。PKS の各ドメインを次のように表している: KS, ketosynthase; AT, acyltransferase; KR, ketoreductase; ACP, acyl carrier protein; DH, dehydratase; ER, enoylreductase; TE, thioesterase。ローディングモジュールとモジュール 7 における不活性と推定される KS ドメインと DH ドメインは黒色で示している。

2-4-4-2 KS ドメインの *in silico* 解析

KS ドメインは、ポリケタイド骨格を伸長するための Claisen 縮合反応を触媒する役割をもつ (He *et al.*, 2000)。LadA PKS の KS ドメインに関しては、保存された活性部位 (Cys-His-

His の触媒トライアド) の解析により、ローディングモジュール (KSL) の KS ドメインは対応するアミノ酸を欠如しており、これらの保存モチーフが存在しないことが分かった (図 16)。これは、KSL が KS としての機能を失っている可能性が高いことを示唆している。対照的に、他の KS ドメイン (KS1 から KS13) は保存された活性部位を有しており、それらはすべて縮合段階で機能することを示している。

*				*				*			
KSL	145	RGEHGLALAA	154	AAVGRALATTRHPF	304	TATARPA	344				
KS1	166	TVDTACSSSL	175	VEAHGTGTRLGDPI	316	NIGHTQA	349				
KS2	166	TVDTACSSSL	175	VEAHGTGTRLGDPI	316	NIGHTQA	349				
KS3	166	TVDTACSSSL	175	VEAHGTGTTLGDPI	316	NIGHTQA	349				
KS4	167	TVDTACSSSL	176	VEAHGTGTTLGDPI	317	NIGHTQA	350				
KS5	166	TVDTACSSSL	175	VEAHGTGTTLGDPI	316	NIGHTQA	349				
KS6	165	TVDTACSSSL	174	VEAHGTGTRLGDPI	315	NIGHTQA	348				
KS7	166	TIDTACSSSL	175	VEAHGTGTTLGDPI	316	NIGHTQA	349				
KS8	167	TVDTACSSSL	176	VEAHGTGTTLGDPI	317	NIGHTQA	350				
KS9	166	TVDTACSSSL	175	VEAHGTGTALGDPI	316	NIGHTQA	349				
KS10	165	TVDTACSSSL	174	VEAHGTGTS LGDPI	315	NIGHTQA	348				
KS11	166	TVDTACSSSL	175	VEAHGTGTTLGDPI	316	NIGHTQA	349				
KS12	165	TVDTACSSSL	174	VEAHGTGTTLGDPI	315	NIGHTQA	348				
KS13	166	TVDTACSSSL	175	VEGHGTGTRLGDPI	316	NIGHTQA	349				
Consensus		DXXCSSXL		HGTGT		H					

図 16. LadA PKS の KS ドメインコア領域における保存モチーフの配列アラインメント。数字は各ドメイン内のアミノ酸位置を表す。アラインメント中の黒色箇所は同じアミノ酸、灰色箇所は少なくとも 70% のアミノ酸が一致する位置を表している。* は保存された活性部位 (Cys-His-His の触媒トライアド) を示す。

2-4-4-3 系統樹解析による AT ドメインの基質特異性評価

LadA PKS の各 AT ドメインがどの基質 (malonyl-CoA、methylmalonyl-CoA、ethylmalonyl-CoA など) を ACP に転移するかを明らかにするために、各 AT ドメイン内の保存された機能モチーフの配列アラインメント解析と系統樹解析を実施した。解析の結果、モジュール 2、3、4、5、6、8、9、10、11、および 12 の AT ドメインは malonyl-CoA に特異的であることが分かった (図 17、図 18A)。一方、ローディングモジュール、モジュール 1、7、および 13 の AT ドメインは、methylmalonyl-CoA を基質として認識する他の AT ドメインと進化的に近接していた (図 17)。しかし、系統樹における LadA1_ATL の位置は AT1、AT7、および AT13 の位

置とはわずかに異なり、保存モチーフ周辺のアミノ酸配列の一部は ATL、AT1、AT7、および AT13 間で異なることから（図 18B）、ATL は methylmalonyl-CoA ではなく他の基質を認識することが示唆される。実際、lavencidin および RKGS-A2215A の化学構造に基づくと、ローディングモジュールの基質は acetyl-CoA である。それ以降のモジュールにおいては、AT1, AT7, AT13 で取り込まれる基質は methylmalonyl-CoA および ethylmalonyl-CoA であり、上記のドメイン解析の結果と一致していた。

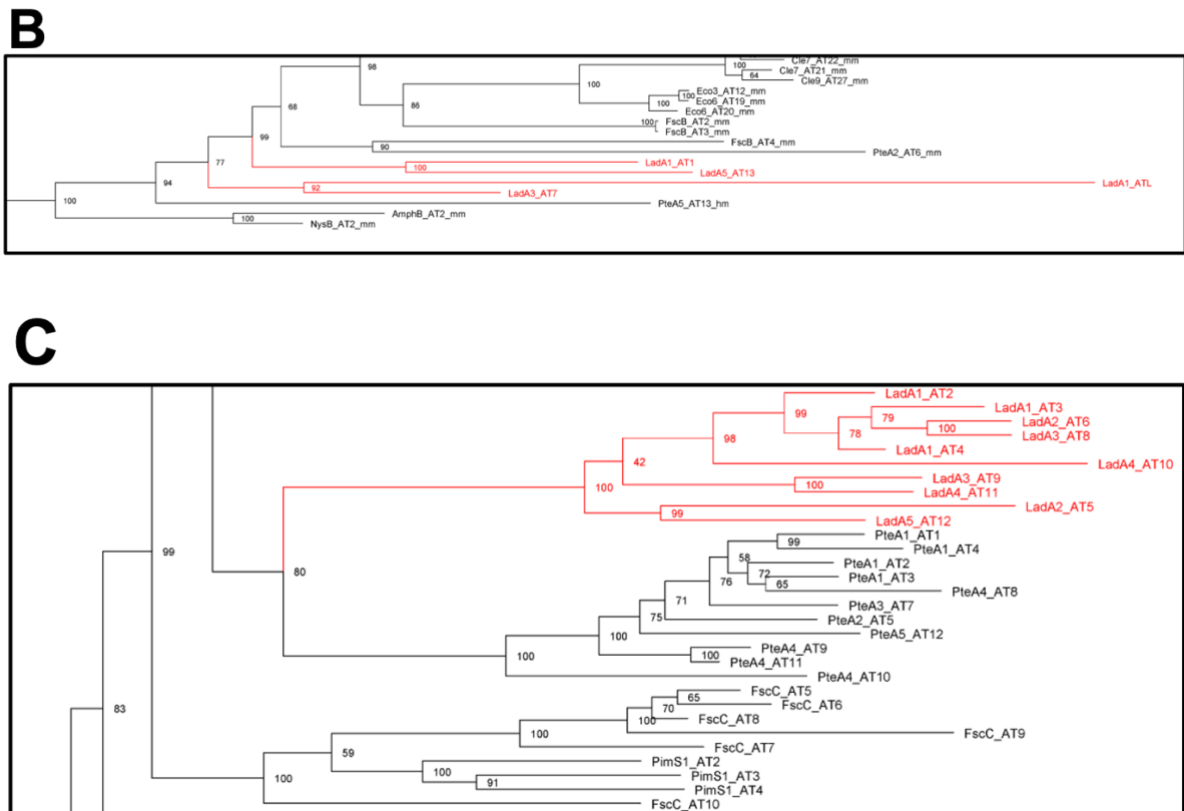


図 17. LadA PKS の AT ドメインの系統樹解析 (青山学院大学 理工学部 化学・生命科学科 岡村英治 助教により作成)。赤色箇所は lavencidin BGC 上の AT ドメインを表す。AT ドメインのアミノ酸配列は、二次代謝産物生合成遺伝子データベース DoBISCUIT (<https://www.nite.go.jp/nbrc/pks/>) および ClusterCAD (<https://clustercad.jbei.org/>) から取得した。これらのアミノ酸配列は、Geneious Prime 2023.2.1 (Biomatters Ltd.) にて実装された Clustal Omega (1.2.2) を使用して、配列数に応じて精密化反復の回数をソフトが自動調整するデフォルト設定を使用した。ベイズ系統樹は、CIPRES Science Gateway (<http://www.phylo.org/>) 上の MrBayes (ver. 3.2.7a) によって、以下のパラメータで実施した。aamodelpr=fixed(LG); ngen=20 000 000; rateopts = invgamma; nruns=2: nchains=4; temp=0.2; relburnin=yes; burninfrac=0.25。進化モデルは ModelTest-NG によって自動的に最適なものを選択した。系統樹は FigTree バージョン 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) を用いて図式化した。

(A) AT ドメイン系統樹の全体図。(B) LadA1_ATL、LadA1_AT1、LadA3_AT7、および LadA5_AT13 を含む AT ドメインの系統樹の部分図。(C) LadA1_AT2、LadA1_AT3、LadA1_AT4、LadA2_AT5、LadA2_AT6、LadA3_AT8、LadA3_AT9、LadA4_AT10、LadA4_AT11、および LadA5_AT12 を含む AT ドメインの系統樹の部分図。

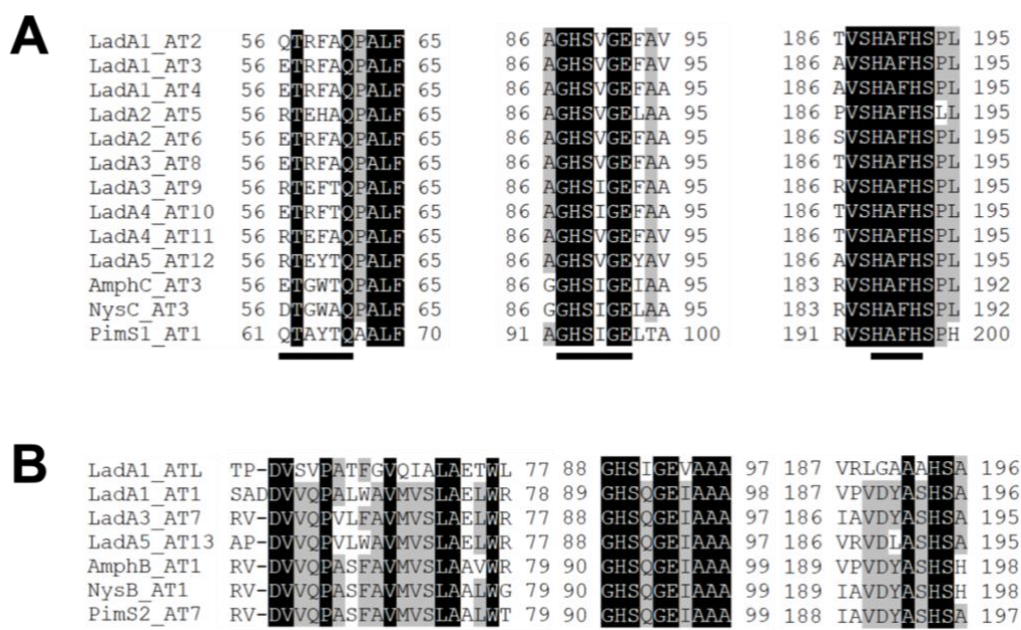


図 18. LadA PKS の AT ドメインにおけるアミノ酸配列のアラインメント解析。数字は各ドメイン内のアミノ酸位置を示す。アラインメント中の黒色箇所は同じアミノ酸、灰色箇所は少なくとも 70% のアミノ酸が一致する位置を表している。他種放線菌由来 AT ドメインと、それに対応する配列アクセッション番号を以下のように表している。AmphB/AmphC (AAK73513/AAK73514)、*Streptomyces nodosus* ATCC 14899 株の amphotericin 生合成遺伝子; NysB/NysC (AVX51107/AVX51108)、*Streptomyces noursei* ATCC 11455 株の nystatin 生合成遺伝子; PimS1/PimS2 (CAC20931/CAC20921)、*Streptomyces natalensis* ATCC 27448 株の pimarinic 生合成遺伝子。6、6、4 個のアミノ酸残基からなる 3 つの主要なモチーフに下線を引いた。

(A) LadA1_AT2、LadA1_AT3、LadA1_AT4、LadA2_AT5、LadA2_AT6、LadA3_AT8、LadA3_AT9、LadA4_AT10、LadA4_AT11、および LadA5_AT12 を含む AT ドメインにおける保存モチーフの配列アラインメント。(B) LadA1_ATL、LadA1_AT1、LadA3_AT7、および LadA5_AT13 を含む AT ドメインにおける保存モチーフの配列アラインメント。

2-4-4-4 ACP ドメインの *in silico* 解析

ACP ドメインは、ポリケタイド合成において基質を KS ドメインに受け渡す役割を担う (Lai *et al.*, 2006)。本ドメインに関しては、LadA PKS 中の 14 個の ACP ドメイン全てにお

いて、活性 Ser 残基周辺に 4'-phosphopantetheinyl 基結合部位としてシグネチャーモチーフを有していることから、正常に機能していると推定した（図 19）。

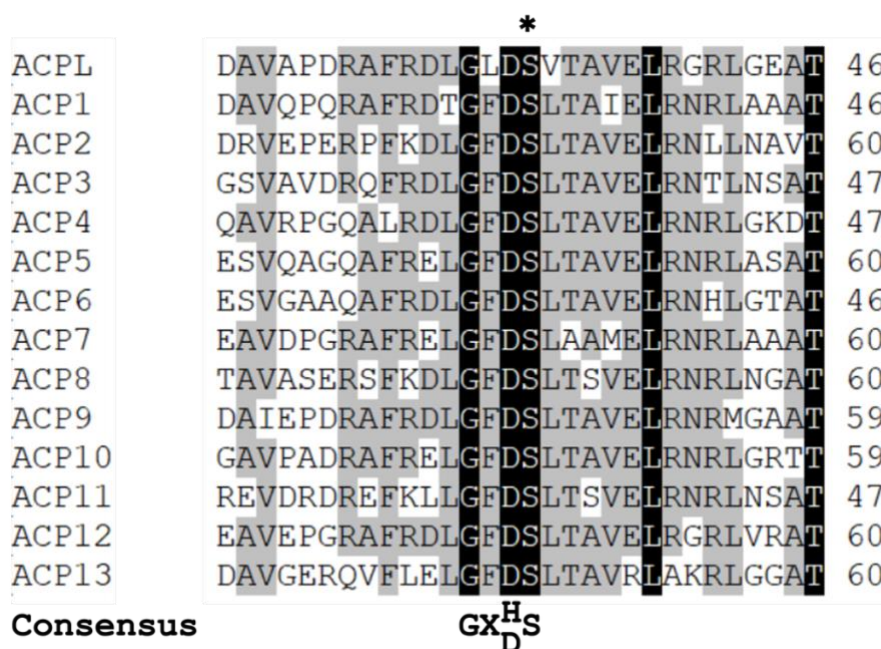


図 19. LadA PKS の ACP ドメインコア領域における保存モチーフの配列アラインメント。数字は各ドメイン内のアミノ酸位置を表す。アラインメント中の黒色箇所は同じアミノ酸、灰色箇所は少なくとも 70% のアミノ酸が一致する位置を表している。* は 4'-phosphopantetheinyl 基結合部位として機能する活性部位の Ser 残基を示す。

2-4-4-5 KR ドメインの *in silico* 解析

KR ドメインは、PKS 伸長鎖中間体の β -ケト基を NADPH 依存的に β -ヒドロキシ基へ還元する酵素である (Reid *et al.*, 2003)。解析の結果、13 個の KR ドメインすべてに NADP(H) 結合部位のコンセンサス配列と典型的な触媒トライアド (Ser-Tyr-Asn) が含まれていることが分かった (図 20)。これは、全ての KR ドメインがポリケタイド合成過程において機能していることを示唆している。

KR1	GTVLVTGGTGTGTHVARWL	20	HTAGALDDGV	95	SSIAGTVGNGGQGGYAAANA	153
KR2	GTVLVTGATGTLGRLVARHL	20	HAAGVTDDGI	96	SSVSATLGSGQANYAAANA	154
KR3	GTVLITGASGALGRLVARHL	20	HAAGVTDDGT	96	SSAAGILGSAGQANYCAANS	154
KR4	GTVLVTGASGLLGRHVARHL	20	HVAGVTDDGI	96	SSAAGVFGAAGQANYAAANA	154
KR5	GTVLVTGASGTLGRLVAHHL	20	HAAGVTDDGV	96	SSAAGVFGNPGQGNAAAANA	154
KR6	GTVLVTGATGALGRLVARHL	20	HAAGVLDDGL	96	SSLAGTEGTAGQANYAAANA	154
KR7	GTVLITGGTGALGRLVAAHF	20	HAAAVVAGGL	96	SSLAGTLGGAGQGAYAAAGNA	154
KR8	GTVLITGGTGALGAHVARHL	20	HAAGLPQFTP	96	SSVAAAWGSGSQAAYCAANA	154
KR9	GTVLITGGTGSLGGHTARWL	20	HAAGLPQFTT	96	SSVSGVWGSQSQAAYSAGNA	154
KR10	GTVLITGGTGALGAHVARWL	20	HAAGVGTPAM	95	SSIISGVWGAAGQAAYAVANA	153
KR11	GTVLVTGATGALGGLVARHL	20	HAAGVLDDGL	97	SSVAATLGSAQGQNYAAAANA	155
KR12	GTVLITGGTGALGGHVARLL	20	HTAGVDTPGL	98	SSIAGVWGAGGQAAYSAANA	160
KR13	GTVLVTGGTGHIGHHVARWL	20	HAAGTGTPAM	95	SSGAAAWGSGAQAGYAAANA	153
Consensus		GXGXXGXXXA				

図 20. LadA PKS の KR ドメインコア領域における保存モチーフの配列アラインメント。数字は各ドメイン内のアミノ酸位置を表す。アラインメント中の黒色箇所は同じアミノ酸、灰色箇所は少なくとも 70% のアミノ酸が一致する位置を表している。NADP(H) 結合部位のコンセンサス配列を下線で示した。また、Ser-Tyr-Asn の触媒トライアドは*で表した。

2-4-4-6 DH ドメインの *in silico* 解析

DH ドメインは KR ドメインにより作られたヒドロキシ基の脱水反応を触媒する (Wu *et al.*, 2005)。LadA PKS における DH ドメインの解析により、7 個の DH ドメイン全てが保存モチーフである HXXXGXXXXP と、2 つの活性部位 (Asp および His 残基) を有していることが分かった (図 21)。この結果は、これら DH ドメインがポリエン二重結合の形成に関与していることを示唆している。しかし、lavencidin および RKGS-A2215A のポリケタイド生合成にはモジュール 7 の DH 活性は必要ないため、これらの化合物の生合成過程において DH7 は不活性である可能性がある。同様の矛盾は nystatin や rifamycin などの他のポリケタイドの生合成経路にも見出されている (Brautaset *et al.*, 2000、Tang *et al.*, 1998)。

2-5 節 考察

2-5-1 Target-AID 技術を利用した放線菌の塩基編集

本章では、*ermE**p による sgRNA 発現ベクター (Tong *et al.*, 2019) に、*PmCDA1-UGI-LVA* 融合遺伝子 (Zhao *et al.*, 2020) を *dCas9* の下流に挿入し、これらを放線菌用にコドン最適化した塩基編集ベクターを構築した。この塩基編集ベクターによる *S. coelicolor* A3(2)株の塩基編集効率は、形質転換体選抜用培地に出現したコロニーから無作為に選抜した 50 菌株に対して、49 菌株において actinorhodin の消失が観察されたことから、98% (49/50) と見積もられた。さらに、actinorhodin の消失が観察された菌株全てにおいて、標的塩基配列に変異が導入されていた。この結果は、Zhao らの塩基編集システムによる *actI-ORF2* 変異導入効率 80% (Zhao *et al.*, 2020) や、Tong らによる複数の actinorhodin 生合成遺伝子の変異導入効率 30% ~ 100% (Tong *et al.*, 2019) と比較して、十分に高効率である。さらに、この塩基編集ベクターは、数日の静置培養でプラスミドを脱落できることや、異なる標的配列を持つプラスミドの再導入により二重、三重変異株を迅速に構築できる拡張性も有している。Target-AID 技術は、標的遺伝子に終止コドンを導入するだけでなく、標的タンパク質中のアミノ酸を置換することも可能にする。したがって、二次代謝産物の生産に対する負の制御因子の機能を阻害したり、プロモーター配列を改変することで、休眠二次代謝産物の発見が容易になると考えている。

2-5-2 Lavencidin の基本骨格構造の生合成機構

Lavencidin のポリケタイドコア構造の生合成機構は、標準的な I 型 PKS システムのアセンブリラインによって説明できる。しかし、生産物の化学構造から考えると、lavencidin アセンブリラインの開始過程は、acetyl-CoA をローディングモジュールに組み込むステップであると考えられる。LadA1_KSL と他の KS ドメイン間で見られる保存モチーフの顕著な相違 (図 16) は、LadA1_KSL が、マロン酸からアセチル基を合成する脱炭酸酵素や Claisen 縮合を行う KS のような酵素機能を有していないことを示唆している。一方、系統樹において、LadA1_ATL は methylmalonyl-CoA を基質として認識する AT ドメイン群に位置付けられるが、その進化的距離はやや離れている (図 17)。さらに興味深いことに、LadA1_ATL は AT 活性に必須なアミノ酸配列を全て保存している一方で、これらの保存残基を取り囲むアミノ酸配列は他の AT ドメインの配列と異なっている (図 18)。これらの観察結果は、LadA1_ATL が methylmalonyl-CoA 以外の基質に特異的であるか、LadA1_ATL の機能が不活性である可能性を示唆している。4'-phosphopantetheinyl transferase をコードする *orf6* の下流領域には、GNAT

ファミリー*N*-acetyltransferase のメンバーである推定上の独立した酵素 (Orf4) が存在する。Curacin A 生合成におけるローディングモジュールの GNAT ドメインは、ACP ドメインへのアセチル基のローディングを触媒する (Gu *et al.*, 2007)。これは、Orf4 が lavencidin 生合成の初期段階に関与している可能性を示唆している。

2-5-3 Lavencidin の基本骨格生合成後の修飾機構

LadA PKS 組立ラインがポリエンマクロライドコア構造を合成した後、C-14 にカルボキシル基を形成する修飾プロセスが lavencidin 生合成に不可欠である。Rosamycin 生合成経路では、シトクロム P450 酵素 RosC が 20-deoxo-20-dihydrorosamicin のメチル基をカルボキシ基まで酸化し、20-carboxyrosamicin を生成する (Iizaka *et al.*, 2013)。Lavencidin 生合成遺伝子のうち、*ladB1* は推定シトクロム P450 タンパク質をコードし、*ladB2* および *ladB3* は P450 触媒回路における電子伝達を媒介すると考えられる産物をコードしている。したがって、これらの LadB タンパク質は、lavencidin の C-14 カルボキシル基の形成を担う修飾酵素であると考えられる。

2-6 節 結言

本章では、Target-AID 技術を利用して *S. coelicolor* A3(2)株と *S. lavendulae* FRI-5 株の二次代謝産物生合成遺伝子を不活化し、本技術がこれらの菌株に対して有効性をもつことを実証した。さらに、*S. lavendulae* FRI-5 株の推定 lavencidin 遺伝子不活化と *in silico* 解析を組み合わせることで、lavencidin BGC を同定した。Lavencidin 生合成酵素のドメイン解析から、LadA_AT の基質特異性や進化的距離が明らかになったほか、一部のドメイン (LadA1_KSL と LadA3_DH7) は触媒不活性であることが示唆された。さらに、クラスター内の遺伝子機能解析により、lavencidin の修飾過程を担う遺伝子や、生合成を調節する遺伝子も明らかとなったことから、lavencidin の生合成機構を提唱するに至った。今後さらに修飾反応や生合成制御機構の詳細の解明、新たな生物学的活性を有する lavencidin 類縁体の創製が可能となることが期待される。

本章での研究を通じて、放線菌の生合成遺伝子同定に Target-AID 技術が有用であることを示した。この Target-AID 技術は、他の放線菌においても未同定遺伝子の機能解析や生産物の生合成機構解明に応用できることに加え、休眠 BGC の活性化による新規天然物質の発見にも展開可能な技術となる。

第 3 章 グローバルレギュレーターの不活化による二次代謝プロファイル変動の解析

3-1 節 緒言

第 2 章では、*S. lavendulae* FRI-5 株に Target-AID 技術を適用し、lavencidin 生合成機構を明らかにした。本章では、Target-AID 技術をより広範な放線菌に適用することで *wblA* を不活化し、不活化株における二次代謝の変動を解析する。第 1 章にて述べたように、WblA は放線菌に高度に保存されている全長約 340 アミノ酸のタンパク質であり、特に *Streptomyces* 属放線菌においてはアミノ酸配列が最大 96%、最も低い種間でも 85%の相同性を示すことから (Nah *et al.*, 2012、Rabyk *et al.*, 2011、Huang *et al.*, 2016、Lu *et al.*, 2015、Yan *et al.*, 2016)、塩基配列レベルでの相同性も極めて高いことが予想される。そのため、標的 BGC に対して特異的なプラスミドを個別に設計する必要がある従来法と異なり、同一のプラスミドを一度に複数の菌株に導入し、*wblA* を不活化できると着想した。

本研究では、まずゲノム配列が利用可能な 20 種類の *Streptomyces* 属放線菌から *wblA* ホモログの塩基配列を取得し、多重配列アラインメント解析により *wblA* ホモログの相同性を塩基配列レベルで解析した。次に、塩基配列の相同性が高い遺伝子領域を標的とする sgRNA を挿入した *wblA* 不活化プラスミドにより複数の *Streptomyces* 属放線菌を形質転換し、得られた変異株の代謝物プロファイルを解析した。最後に、不活化株においてのみ新規ピークを検出した *S. virginiae* NBRC12827 株に着目し、当該代謝物の構造解析と生合成遺伝子の同定に取り組んだ。これらの研究を通して、Target-AID 技術を利用した *wblA* 不活化が様々な放線菌の休眠二次代謝活性化に応用可能な手法であることを実証することを目指した。

3-2 節 実験材料および機器

3-2-1 菌株

- ・当研究室保有の菌株

E. coli DH5α 株

E. coli ET12567/pUZ8002 株

S. coelicolor A3(2)株

S. lavendulae FRI-5 株

Streptomyces lividans TK21 株

Streptomyces sp. BB47 株

S. avermitilis K139 株
S. avermitilis KA320 株
S. antibioticus NF-18 株
Streptomyces scabies ATCC23962 株
S. virginiae NBRC12827 株
Streptomyces xanthochromogenes NBRC12828 株
Streptomyces matensis NBRC12889 株
Streptomyces niveus NBRC12917 株
Streptomyces pristinaspiralis NBRC13074 株
Streptomyces ostreogriseus NBRC13423 株
Streptomyces bambergiensis NBRC13479 株
Streptomyces sahachiroi NBRC13928 株
Streptomyces cattleya NBRC14057 株
Streptomyces griseocarneus NBRC16080 株

・ 理化学研究所 微生物材料開発室 (JCM) より購入した菌株

S. rimosus JCM4073 株
Streptomyces viridochromogenes JCM4265 株
Streptomyces griseofuscus JCM4276 株
Streptomyces lincolnensis JCM4287 株
Streptomyces collinus JCM 4361 株
S. albus JCM4450 株
Streptomyces filamentosus JCM4576 株
Streptomyces clavuligerus JCM4710 株
Streptomyces hygroscopicus subsp. *hygroscopicus* JCM4772 株
Streptomyces showdoensis JCM4830 株

3-2-2 プラスミド

pLK101 (第2章にて構築) (図 23)

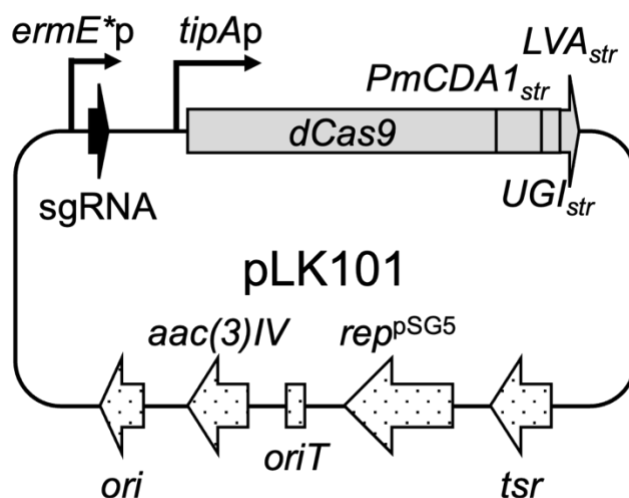


図 23. pLK101 のプラスミドマップ

3-2-3 試薬

試薬は以下の表に示すメーカーより購入した製品を使用した。

試薬	メーカー
LB 培地 (Lennox)、Tween80、HPLC 用蒸留水、HPLC 用 acetonitrile、HPLC 用 methanol、HPLC 用ギ酸、 <i>n</i> -butanol、NaCl、ethanol、 β -mercaptoethanol	ナカライテスク（京都、日本）
LC-MS 用超純水、LC-MS 用 0.1%(v/v)ギ酸-acetonitrile、LC-MS 用ギ酸、methanol- <i>d</i> ₄ 、寒天、D(-)-mannitol、NaCl、D(+)-glucose、D(+)-maltose · H ₂ O、MgCl ₂ · 6H ₂ O、MgSO ₄ 、CaCl ₂ · 2H ₂ O、kanamycin sulfate、chloramphenicol、nalidixic acid、可溶性デンプン、CaCO ₃ 、NaOH、KOH、DMSO、NZ-amine、glycerol、KCl、hygromycin B、isopropanol、Dimethyl sulfoxide	富士フイルム和光純薬（大阪、日本）
Cutsmart Buffer、 <i>Nco</i> I-HF、NEBuffer2、NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	New England Biolabs（Ipswich、米国）

Difco ISP Medium 2、Tryptic Soy Broth、casitone、peptone、酵母エキス、麦芽エキス、PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent、DNA プライマー、一本鎖オリゴ DNA	Thermo Fisher Scientific (Waltham、米国)
EmeraldAmp PCR Master Mix、NucleoSpin® RNA	タカラバイオ (滋賀、日本)
KOD FX Neo、KOD One™ PCR Master Mix-Blue、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover	東洋紡 (大阪、日本)
KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (2×) Kit	Roche (Basel、スイス)
Thiostrepton、benzonase	Sigma-Aldrich (St. Louis、米国)
Apramycin sulfate	LKT Laboratories (St. Paul、米国)
きな粉	富士食糧 (東京、日本)

3-2-4 培地

YMS 培地		A16 培地	
可溶性デンプン	4 g	Glucose	20 g
酵母エキス	4 g	ファーマメディア	10 g
麦芽エキス	10 g	CaCO ₃	5 g
pH 7.5	/1 L	pH 7.0	/1 L
A11M 培地		A3M 培地	
Glucose	2 g	Glucose	5 g
可溶性デンプン	25 g	可溶性デンプン	20 g
酵母エキス	5 g	Glycerol	20 g
HI POLYPEPTON N	5 g	ファーマメディア	15 g

NZ-amine	3 g
CaCO ₃	3 g
pH 7.0	/1 L

TSB 培地	
Tryptic Soy Broth	30 g
pH 未調整	/1 L

SM17 培地	
Glucose	2 g
Glycerol	40 g
可溶性デンプン	5 g
きな粉	5 g
Peptone	5 g
酵母エキス	5 g
NaCl	5 g
CaCO ₃	2 g
水道水	/1 L
pH 未調整	

酵母エキス	3 g
pH 7.0	/1 L

F 培地	
Glycerol	15 g
Casitone	7.5 g
酵母エキス	7.5 g
NaCl	2.5 g
pH 6.5	/1 L

MYM 培地	
D(+)-maltose · H ₂ O	5 g
酵母エキス	20 g
麦芽エキス	20 g
Trace element solution	2 mL
水道水	500 mL
脱イオン水	500 mL
pH 7.3	/1 L

3-2-5 合成オリゴヌクレオチド

名称	塩基配列 (5'-3')
ssDNA-wblA	CGGTTGGTAGGATCGACGGCTCAAGGAGCGGCACAGAACAGTTTT AGAGCTAGAAATAGC
wblA-Fw	GAAGGGAGCGGACATATGGGCTGGGTAACCGACTGGAGTG
wblA-Re	TCCTCTAGAAAGCTTGCGCGACCGCTTCACCTCGC
vector-Fw	AAGCTTTCTAGAGGATCCCCGGGTACC
vector-Re	CATATGTCCGCTCCCTTCTCTGACGCC
qPCR-hrdB-F	CGAGAACACGGAAGAGGGTC
qPCR-hrdB-R	TGACGAAGCCCTTGTTCTCC
qPCR-rpoB-F	CCAATACGAACAACGGTGCC
qPCR-rpoB-R	AGTCAAAGCTCTCGGTCTGC
qPCR-wblA-F	CTGGGTTACCGACTGGAGTG
qPCR-wblA-R	TCTGTGCCGCTCCTTGAAC
qPCR-ctg207-F	GTGTGGTGCGAGAGCTACTG
qPCR-ctg207-R	GGTCGTGGAAGAGGTGTGTC
qPCR-ctg287-F	GTCCTGCACATCCTGGAAGG
qPCR-ctg287-R	AGGAGGACGAGTTCGGAGG
qPCR-ctg334-F	CACCGAACTGGTCAAACCTCG
qPCR-ctg334-R	CGATCTCGACCGGGAGTTC
qPCR-ctg436-F	GCCTCGTACTCCAACCTACGG
qPCR-ctg436-R	GGAAGGGTGCTGTAGATGCC
qPCR-ctg464-F	CTCAAGACCGGGGACAGC
qPCR-ctg464-R	GAAGCGGGACACCCAGTG
qPCR-ctg541-F	ACCAAGGAACTCGAAAGCCC
qPCR-ctg541-R	TAGGCCTCCTTGTCGGAGAG
qPCR-ctg622-F	GCGTCTCCACGTCATCTAC
qPCR-ctg622-R	AGAGCTGGGTGTTGGGATTG
qPCR-ctg794-F	AATGGGCGGTGTCCAAGTTC
qPCR-ctg794-R	GTGGCGTAGGTGAGTTCCC
qPCR-ctg1010-F	CCGAACTGGACACCCTGG
qPCR-ctg1010-R	TCGACTTCACCGAACCGAAG

qPCR-ctg1057-F	CTGCACTCCAACCCGGTATC
qPCR-ctg1057-R	GTCGGAGTCGTACTCGAAGC
qPCR-ctg1148-F	CACGCGCTACGAGACCTAC
qPCR-ctg1148-R	GTGAGGGACAGCACGAGG
qPCR-ctg1382-F	CGTACTGGTGACGAACTCCC
qPCR-ctg1382-R	TCTCCACGGACAGGTAGGG
qPCR-ctg1423-F	GTTCGTCGGGGTGATGGG
qPCR-ctg1423-R	GGTAGGAGATCCGGTTGGC
qPCR-ctg1452-F	TCTCCTACGAACGGGAGGTC
qPCR-ctg1452-R	AGGTCAGCAGGTCGTTTGAG
qPCR-ctg1547-F	ATGAAGCCCATGGCACACC
qPCR-ctg1547R	CAGATGTTCTCGGCCACCAC
qPCR-ctg1606-F	GTCGAGGTCCCGGCAAAC
qPCR-ctg1606-R	GTCTGCGGGTAGTGGAAG
qPCR-ctg1658-F	AGGAACCCGACCTGACACTC
qPCR-ctg1658-R	CAGCAGCGGTTCTGGGTATG
qPCR-ctg1700-F	CTATCACATGGGCTGGAGGG
qPCR-ctg1700-R	TCTTTGATCTCACCACCACCG
qPCR-ctg1801-F	CGTGATAACCGGTATGGGGG
qPCR-ctg1801-R	GGGGTCGAAGAAGCTGATCC
qPCR-ctg2352-F	CGAGAGAAACGGTCAACCCC
qPCR-ctg2352-R	AGCCGAAGTGGTACATCGC
qPCR-ctg2668-F	CGAGTACGCCAGCATGGAC
qPCR-ctg2668-R	CACCGAGCGAGATGCCC
qPCR-ctg3204-F	GACCACCAGGTCAAGATCCG
qPCR-ctg3204-R	CCTCGCCGACGATGATGATG
qPCR-ctg3479-F	CATCAGGGTCGCGGAAGAG
qPCR-ctg3479-R	CGTCCTTGTCGTTCCGGTAG
qPCR-ctg3965-F	GTACGTGGAGGCGATCCG
qPCR-ctg3965-R	GAACTCCAGGACCGCGTAG
qPCR-ctg4027-F	GTTCGAGGACATCCGGCTC

qPCR-ctg4027-R	CCGTCCAGCGGTTCTGTG
qPCR-ctg4440-F	GAGGAGTTCCAGCTGTCCTG
qPCR-ctg4440-R	TTCTTGAGGTTGCCGACCAG
qPCR-ctg5128-F	ATTCTGGCAGGGTTACAGGG
qPCR-ctg5128-R	CGATCCAGCAAATGCCATCC
qPCR-ctg6022-F	ACCTGCCCATGGTGTCTTC
qPCR-ctg6022-R	GGAGAGGAAGACGTGCCG
qPCR-ctg6066-F	CTATGGCGTTCCGTCGCTC
qPCR-ctg6066-R	GAGCGGATCGTGGTGTCC
qPCR-ctg6094-F	GTCCAACCCGTACTTCGTCG
qPCR-ctg6094-R	GGAGAAGGACAGGAGCTTGC
qPCR-ctg6223-F	GCAGTACGAGGAGACCGAAC
qPCR-ctg6223-R	AGTCCCAGTTGAAGGTGAGC
qPCR-ctg6404-F	CGGGATGCTCGATCTGTGTG
qPCR-ctg6404-R	CGATCATCCGCTGACAGGC
qPCR-ctg6603-F	GAGATCGACTACGTCAACGC
qPCR-ctg6603-R	AGGTCATCGGCGTCTTGTAG

3-2-6 使用機器

2-2-6 で使用した機器に加えて、以下の機器を使用した。

- ・高速冷却遠心機

機器 7-1：トミー精工社製 Suprema21

- ・培養器

機器 8-1：タイテック社製 G・BR-200

- ・フラッシュ精製装置

機器 9-1：バイオタージ社製 Isolera™ Prime

- ・ロータリーエバポレーター

機器 10-1：東京理化器械社製 N-1210BV-W

- ・凍結乾燥機

機器 11-1：東京理化学器械社製 FDM-2000

3-3 節 実験方法

3-3-1 *wblA* 不活化ベクターの構築

1. pLK101 を *NcoI* にて処理した。
2. *wblA* 標的配列を含んだ一本鎖オリゴ DNA (ssDNA-*wblA*) を設計し、2-3-2-2 の方法により pLK101 に挿入した。

- ・設計した *wblA* 標的配列

	塩基配列 (5'-3') (PAM 配列は赤字で表記)	オンターゲット スコア	オフターゲット スコア
<i>wblA</i> 標的配列	TCAAGGAGCGGCACAGAACA GGG	60	98

3. DNA 塩基配列解析により目的プラスミドを得た。これを pTarget-*wblA* とした。

3-3-2 *wblA* 変異株の色素系抗生物質生産解析

3-3-2-1 固体培地における *wblA* 変異株の表現型解析

1. 2-3-4-1 と同様の方法にて pTarget-*wblA* を *S. coelicolor* A3(2)株と *S. lividans* TK21 株に導入し、*wblA* 変異株を構築した。これを *mwblA* 株とした。
2. 形態分化を観察するため、*S. coelicolor*-*mwblA* 株と *S. lividans*-*mwblA* 株を MS2 培地に塗布し、30℃にて4日間、静置培養した。(機器 2-5)
3. 次に、色素生産を観察するため、両菌株を R5 培地に塗布し、30℃にて4日間、静置培養した。(機器 2-5)

3-3-2-2 液体培地における *wblA* 変異株の色素系抗生物質生産解析

1. *S. coelicolor*-*mwblA* 株と *S. lividans*-*mwblA* 株の TSB 前培養液 1 mL を 100 mL YMS 培地 (500 mL バッフルフラスコ) に植菌し、30℃、160 rpm にて7日間、培養した。(機器 2-2)
2. 培養開始3日目から7日目に、培養液 1 mL を計り取り、14,000 rpm にて1分間遠心し、上清と菌体を分離した。(機器 1-4)

3. 培養液の pH を塩基性に移行させるため、培養上清に等量の 2M KOH を添加した。
4. 混合液の 640 nm における吸光度 (A_{640}) を測定し、actinorhodin 生産を解析した。(機器 3-1)

・ Actinorhodin 量の計算式

$$[(A_{640}) \times (\text{希釈率})] \div [\text{乾燥菌体重量 (mg-dry cell weight)}]$$

5. 菌体に methanol 500 μ L を添加し、30 分間、超音波破碎した。(機器 6-1)
6. 抽出液に 1M 塩酸 500 μ L を添加し、16,880 $\times$ g にて 1 分間遠心し、上清と菌体を分離した。(機器 1-4)
7. 培養上清の 530 nm における吸光度 (A_{530}) を測定し(機器 3-1)、undecylprodigiosin 生産を解析した。
8. 菌体を 60 $^{\circ}$ C にて 24 時間乾燥させた後、乾燥菌体重量を測定した。

・ Undecylprodigiosin 量の計算式

$$[(A_{530}) \times (\text{希釈率})] \div [\text{乾燥菌体重量 (mg-dry cell weight)}]$$

3-3-3 *S. lavendulae*-mwblA 株の二次代謝産物生産解析

3-3-3-1 *S. lavendulae*-mwblA 変異株の indigoidine 生産解析

1. 2-3-4-1 と同様の方法にて pTarget-wblA を *S. lavendulae* FRI-5 株に導入し、*S. lavendulae*-mwblA 株を構築した。
2. ISP2 寒天培地上に生育した mwblA 株を 1 cm 角切り取り、70 mL A2M 培地 (500 mL バックルフラスコ) に植菌し、30 $^{\circ}$ C、160 rpm にて 7 日間、培養した。(機器 2-2)
3. 培養液を 16,880 $\times$ g にて 1 分間、遠心した。(機器 1-4)
4. 上清 1 mL をフィルター (0.2 μ m 孔径) にて濾過し、590 nm における吸光度 (A_{590}) を測定した。(機器 3-1)

3-3-3-2 *S. lavendulae*-wblA 変異株の lavencidin 生産解析

1. 3-3-3-1 における mwblA 株の A2M 培養液 1 mL に *n*-butanol 500 μ L を添加し、ボルテックスミキサーにより攪拌した。
2. 16,880 $\times$ g にて 1 分間、遠心した。(機器 1-4)
3. *n*-butanol 層 400 μ L を遠心エバポレーターにて濃縮乾固した。(機器 4-1)

4. 乾固物を DMSO 100 μL に溶解し、溶液 20 μL を逆相 HPLC 解析に供した。（HPLC 解析条件 2）

<HPLC 解析条件 2>

機器：SHIMADZU LC-20A series（島津製作所社製）

カラム：COSMOSIL 5C₁₈-AR-II 4.6×250 mm（ナカライテスク社製）

移動相：A：0.1%（v/v）ギ酸含有水/B：0.1%（v/v）ギ酸-acetonitrile

流速：0.8 mL/分

移動相の濃度勾配

時間（分）	A（%）	B（%）
0-3	85	15
3-25	85-15	15-85
25-35	15	85

5. Lavencidin 類縁体の分子量を測定するため、4.の乾固物を methanol 100 μL に溶解し、その 1 μL を LC-MS 解析に供した。（LC-MS 解析条件 1）

<LC-MS 解析条件 1>

機器：SHIMADZU LCMS-8060NX（島津製作所社製）

カラム：COSMOCORE 2.6C₁₈ 2.1×100 mm（ナカライテスク社製）

移動相：A：0.1%（v/v）ギ酸-超純水/B：0.1%（v/v）ギ酸-acetonitrile

流速：0.4 mL/分

移動相の濃度勾配

時間（分）	A（%）	B（%）
0-2	95	5
2-10	95-0	5-100
10-12	0	100
12-15	95	5

3-3-3-3 *wblA* 相補株の構築

1. *S. lavendulae* FRI-5 株の *wblA* を含む 350 bp の DNA 断片を *wblA*-Fw と *wblA*-Rv により PCR 増幅した（表 15、16）。

表 15. PCR 反応液組成

dH ₂ O	4.3 μL
2×PCR Buffer for KOD FX Neo	10 μL
2 mM dNTPs	4 μL
10 μM Forward primer	0.4 μL
10 μM Reverse primer	0.4 μL
鋳型 DNA	0.5 μL
1 U/μL KOD FX Neo	0.4 μL
/ 20 μL	

表 16. PCR 反応条件

94°C	2 分	35 サイクル
98°C	10 秒	
55°C	30 秒	
68°C	30 秒	
12°C	∞	

2. 1.と同様の条件で、Vector-Fw と Vector-Rv を用いて pLK101 の *dCas9-PmCDA1_{str}* を除く 7.3 kb の DNA 断片を PCR 増幅した。

3. 1.と 2.の PCR 増幅産物を用いて Gibson Assembly 反応液を調製し、50°Cにて 15 分間、静置した。（表 17）。

表 17. Gibson Assembly 反応液組成

1.の増幅産物	0.5 μ L
2.の増幅産物	0.5 μ L
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	1 μ L
/2 μ L	

4. 反応液全量を *E. coli* DH5 α 株に導入し、LB 寒天培地 (apramycin 50 μ g/mL を含む) にて 37°C、一晚、静置した。(機器 2-3)
5. 生育した菌体よりプラスミドを抽出し、DNA 塩基配列解析を経て、目的プラスミドを得た。これをそれぞれ pOXwblA_{SLA} とした。
6. pOXwblA_{SLA} を *S. lavendulae*-mwblA 株に導入し、wblA 相補株を構築した。

3-3-4 他種 *Streptomyces* 属放線菌の wblA 不活化と変異株の代謝物解析

3-3-4-1 他種 *Streptomyces* 属放線菌の wblA 不活化

1. 2-3-4-1 と同様の方法にて pTarget-wblA を 25 種類の *Streptomyces* 属放線菌に導入した。
2. MS 培地上に出現した形質転換体候補株を ISP2 培地 (apramycin 50 μ g/mL と nalidixic acid 50 μ g/mL、thiostrepton 5 μ g/mL を含む) に植菌し、30°C にて数日間、培養した。(機器 2-4)
3. 形質転換体よりゲノム DNA 溶液を調製し、DNA 塩基配列解析を経て目的の mwblA 株を取得した。

3-3-4-2 mwblA 株の代謝物解析

1. mwblA 株の glycerol 懸濁液 100 μ L を MS2 培地に植菌し、30°C にて数日間、培養した。(機器 2-4)
2. MS2 培地上に生育した mwblA 株を 1 cm 角切り取り、7 種類の培地 (A3M、A16、A11M、ISP2、F、SM17、MYM 培地) 70 mL (500 mL バッフルフラスコ) に植菌し、30°C、160 rpm にて 7 日間、培養した。(機器 2-2)
3. 培養液 10 mL に *n*-butanol 5 mL を加え、ボルテックスミキサーにより攪拌した。
4. 2,330 $\times$ g にて 5 分間、遠心した。(機器 1-5)
5. *n*-butanol 層 1 mL を遠心エバポレーターにて濃縮乾固した。(機器 4-1)

6. 乾固物を DMSO 100 μ L に溶解し、溶液 20 μ L を逆相 HPLC 解析に供した。（HPLC 解析条件 2）

3-3-5 *S. virginiae*-mwblA 株が生産する化合物 7 の分離精製と構造同定

3-3-5-1 *S. virginiae*-mwblA 株の大量培養と代謝物抽出

1. *S. virginiae*-mwblA 株の TSB 前培養液 5 mL を 15 L A3M 培地 (500 mL $\times$ 30 フラスコ相当) (5 L バッフルフラスコ) にそれぞれ植菌し、30°C、160 rpm にて 7 日間、培養した。（機器 8-1）
2. 培養液に半量の *n*-butanol を加え、激しく攪拌した。
3. 6,800 $\times$ g にて 5 分間、遠心した。（機器 7-1）
4. *n*-butanol 層に飽和食塩水を適量加え、再度攪拌した。
5. *n*-butanol 層を回収し、無水 MgSO₄ を適量加えた後、室温にて 30 分間、静置した。
6. *n*-butanol 層を吸引濾過し、ロータリーエバポレーターにより濃縮乾固した。（機器 10-1）

3-3-5-2 化合物 7 の分離精製

1. 3-3-5-1 で得た乾固物を適量の methanol に溶解し、フラッシュ精製装置 Isolera™ Prime にて分画した。（機器 9-1、分画条件 1）

< Isolera™ Prime 分画条件 1 >

機器 : Isolera™ Prime (バイオタージ・ジャパン社製)

カラム : Sfär C18 D-Duo 100 Å 30 μ m 30 g (バイオタージ・ジャパン社製)

移動相 : A : 超純水 / B : acetonitrile

流速 : 25 mL/分

移動相の濃度勾配

カラム容量 (CV)	A (%)	B (%)
0-1	85	15
1-19	85-0	15-100
19-21	0	100

2. 各溶出画分をロータリーエバポレーターにより濃縮乾固し、逆相 HPLC にて化合物 **7** を精製した。（機器 10-1、HPLC 解析条件 2）
3. 分取した画分を濃縮乾固し、再度逆相 HPLC により化合物 **7** を精製した。（機器 10-1、HPLC 解析条件 3）

<HPLC 解析条件 3>

機器：SHIMADZU LC-20A series（島津製作所社製）

カラム：COSMOSIL π NAP 4.6×250 mm（ナカライテスク社製）

移動相：A：0.1%（v/v）ギ酸含有水/B：0.1%（v/v）ギ酸-acetonitrile

流速：0.8 mL/分

移動相の濃度勾配

時間（分）	A（%）	B（%）
0-1	70	30
1-17	70-10	30-90
17-18	10	90
18-25	70	30

3-3-5-3 化合物 **7** の LC-MS 解析

1. 化合物 **7** の分子量を測定するため、3.の乾固物を methanol 100 μ L に溶解し、その 1 μ L を LC-MS 解析に供した。（LC-MS 解析条件 1）

3-3-5-4 化合物 **7** の NMR 解析

1. 化合物 **7**（6.1 mg）を methanol- d_4 300 μ L に溶解し、SHIGEMI チューブに注入した。
2. ^1H -NMR（400 MHz）と ^{13}C -NMR（100 MHz）、 ^1H - ^1H COSY、HMBC、HMQC の各種スペクトルを測定した。

3-3-6 *S. virginiae*-mwblA 株が生産する化合物 **7** のハイブリッドゲノム解析

3-3-6-1 *S. virginiae* NBRC12827 株のゲノム DNA の精製

1. *S. virginiae* NBRC12827 株の TSB 前培養液 1 mL を 16,880 $\times$ g にて 1 分間、遠心した。（機器 1-4）

2. 上清を捨て、菌体を 50 mM EDTA 480 μ L に再懸濁した。
3. リゾチーム溶液 (5 mg/mL) を 120 μ L 加え、37°C にて 1 時間、静置した。
4. 16,880 $\times$ g にて 2 分間、遠心した。(機器 1-4)
5. 上清を捨て、Nuclei Lysis Solution 600 μ L を加え、穏やかに懸濁した。
6. 80°C にて 5 分間、静置した後、室温にて冷却した。
7. RNase 溶液 (4 mg/mL) を 3 μ L 加え、37°C にて 1 時間、静置した後、室温にて冷却した。
8. Protein Precipitation Solution 200 μ L を加え、ボルテックスミキサーにより攪拌した後、氷上にて 5 分間、静置した。
9. 16,880 $\times$ g にて 3 分間、遠心した。(機器 1-4)
10. Isopropanol 600 μ L が入ったエッペンチューブに上清を移し、16,880 $\times$ g にて 1 分間、遠心した。(機器 1-4)
11. 上清を捨て、70% ethanol 600 μ L を加えた後、16,880 $\times$ g にて 2 分間、遠心した。(機器 1-4)
12. 上清を捨て、沈殿物を室温にて 15 分間、風乾した。
13. Rehydration Solution 100 μ L を加え、4°C にて一晩、静置した。

3-3-6-2 *S. virginiae* NBRC12827 株のゲノム配列解析

1. 精製したゲノム DNA 溶液 50 μ L を大阪大学 微生物病研究所 ゲノム解析室に送付し、ゲノム解析を依頼した。

3-3-7 化合物 7 の推定生合成遺伝子の発現解析

3-3-7-1 *S. virginiae*-mwblA 株の RNA の抽出

1. MS2 培地上に生育した mwblA 株を 1 cm 角切り取り、A3M 培地 70 mL (500 mL バッフルフラスコ) に植菌し、30°C、160 rpm にて 7 日間、培養した。(機器 2-2)
2. 培養液 1 mL を 2 mL マイクロチューブに取り、16,880 $\times$ g にて 1 分間、遠心した。(機器 1-4)
3. 上清を捨て、TE Buffer 100 μ L (2 mg/mL リゾチームを含む) を加え、ボルテックスミキサーにより攪拌した。
4. RA1 Buffer 350 μ L と β -mercaptoethanol 3.5 μ L を加え、ボルテックスミキサーにより攪拌した。
5. 16,880 $\times$ g にて 1 分間、遠心した。(機器 1-4)

6. 上清を精製カラムに移し、70% ethanol 350 μL を加え、穏やかに混合した。
7. 16,880 $\times g$ にて 30 秒間、遠心した。（機器 1-4）
8. Membrane Desalting Buffer 350 μL を加え、16,880 $\times g$ にて 1 分間、遠心した。（機器 1-4）
9. Reaction Buffer for rDNase 100 μL （40 U benzonase を含む）を加え、室温にて 15 分間、静置した。
10. RAW2 Buffer 200 μL を加え、16,880 $\times g$ にて 30 秒間、遠心した。（機器 1-4）
11. RA3 Buffer 600 μL を加え、16,880 $\times g$ にて 30 秒間、遠心した。（機器 1-4）
12. RA3 Buffer 250 μL を加え、16,880 $\times g$ にて 2 分間、遠心した。（機器 1-4）
13. RNase-free H_2O 40 μL を加え、室温にて 1 分間静置した。
14. 16,880 $\times g$ にて 1 分間、遠心した。（機器 1-4）

3-3-7-2 逆転写反応による cDNA の調製

1. 4 $\times$ DN Master Mix 440 μL に対し、gDNA remover 8.8 μL を加え、転倒混和した。
2. 3-3-7-1 にて調製した RNA 溶液を 65 $^{\circ}\text{C}$ にて 5 分間、静置した。
3. 氷上にて、ゲノム DNA 除去用の反応液を調製した（表 18）。

表 18. ゲノム DNA 除去反応液組成

4 $\times$ DN Master Mix (gDNA remover を含む)	2 μL
RNA 溶液	6 μL
/ 8 μL	

4. 反応液を 37 $^{\circ}\text{C}$ にて 5 分間、静置した。
5. 次に、氷上にて逆転写反応液を調製した（表 19）。

表 19. 逆転写反応液組成

3.の反応液	8 μL
5 $\times$ RT Master Mix II	2 μL
/ 10 μL	

6. 反応液を穏やかに攪拌し、以下の反応条件にて逆転写反応を実施した（表 20）。

表 20. 逆転写反応条件

37°C	15 分
50°C	5 分
98°C	5 分
12°C	∞

3-3-7-3 qPCR による遺伝子発現解析

1. 3-3-7-2 にて調製した逆転写反応液を使用して qPCR 反応液を調製した（表 21）。

表 21. qPCR 反応液組成

KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix	5 μL
10 μM Forward primer	0.25 μL
10 μM Reverse primer	0.25 μL
逆転写反応液	1 μL
dH ₂ O	3.5 μL
/ 10 μL	

2. 反応液を穏やかに攪拌し、以下の反応条件にて qPCR 反応を実施した（表 22）。

表 22. PCR 反応条件

50°C	2 分	} 40 サイクル
95°C	10 分	
95°C	15 秒	
60°C	1 分	

95°C	15 秒
60°C	1 分
95°C	15 秒

3-4 節 実験結果

3-4-1 *Streptomyces* 属放線菌における *wblA* 塩基配列の比較解析

wblA の塩基配列を比較するため、ゲノム配列が利用可能な 20 種類の *Streptomyces* 属放線菌から *wblA* ホモログの塩基配列を取得した。これらの配列は、*S. coelicolor* A3(2)由来の *wblA* をクエリとして BLAST 検索により取得し、ClustalW を用いて多重配列アラインメント解析を実施した (図 24)。アラインメントの結果、すべての *wblA* ホモログは塩基配列レベルにおいても高度に保存されており、最大 99.4% (*wblA*-SCO と *wblA*-SLI)、最も低いペアにおいても 78.5% (*wblA*-SCO と *wblA*-SNI) の相同性を示すことが分かった。また、全ての *wblA* ホモログにおいて、開始コドンから 70 塩基の位置に glutamine コドン (Gln24) が含まれていたため、Gln24 コドンを終止コドンに変換するよう 20 塩基の標的配列を含む sgRNA を設計した (図 24)。この共通の標的配列により、様々な *Streptomyces* 種に適用可能な単一のプラスミドを構築した。

位置に下線を引いた。wblA-SCO (*S. coelicolor* A3(2)株由来)、wblA-SAV (*S. avermitilis* K139株由来)、wblA-SBA (*S. bambergiensis* NBRC13479 株由来)、wblA-SCA (*S. cattleya* NBRC14057株由来)、wblA-SCL (*S. clavuligerus* JCM4710 株由来)、wblA-SCOL (*S. collinus* JCM 4361 株由来)、wblA-SFI (*S. filamentosus* JCM4576 株由来) wblA-SGR (*S. griseocarneus* NBRC16080株由来)、wblA-SHI (*S. hygroscopicus* subsp. *hygroscopicus* JCM4772 株由来)、wblA-SLA (*S. lavendulae* FRI-5 株由来)、wblA-SLI (*S. lividans* TK21 株由来)、wblA-SLIN (*S. lincolnensis* JCM4287 株由来)、wblA-SMA (*S. matensis* NBRC12889 株由来)、wblA-SNI (*S. niveus* NBRC12917株由来)、wblA-SPR (*S. pristinaspiralis* NBRC13074 株由来)、wblA-SRI (*S. rimosus* JCM4073株由来)、wblA-SSH (*S. showdoensis* JCM4830 株由来)、wblA-SVI (*S. virginiae* NBRC12827株由来)、wblA-SVIRI (*S. viridochromogenes* JCM4265 株由来)、wblA-SXA (*S. xanthochromogenes* NBRC12828 株由来)

3-4-2 放線菌の色素系抗生物質生産に対する *wblA* 不活化の影響

3-4-2-1 *wblA* 標的配列の DNA 塩基配列解析

これまでに複数の研究グループが、*S. coelicolor* A3(2)株における *wblA* の欠失が actinorhodin 生産量の増加を誘導することを明らかにしている (Lee *et al.*, 2010、Kim *et al.*, 2011)。そこで、概念実証として、*wblA* を標的とする Target-AID 塩基編集ベクター (pTarget-*wblA*) を構築し、actinorhodin および undecylprodigiosin を生産する *S. coelicolor* A3(2)株とその近縁株 *S. lividans* TK21 株における遺伝子不活化を試みた。*WblA* の機能を不活化するため、PAM 配列から上流-19 位にある cytosine 残基を thymine 残基に変換し、*wblA* の内部に TAG 終止コドン生成するように sgRNA を設計した (図 25)。このプラスミドを用いて上記 2 株の形質転換を行い、得られた形質転換体の DNA 塩基配列解析の結果、両方の菌株において標的 cytosine 残基が thymine 残基に変換された。

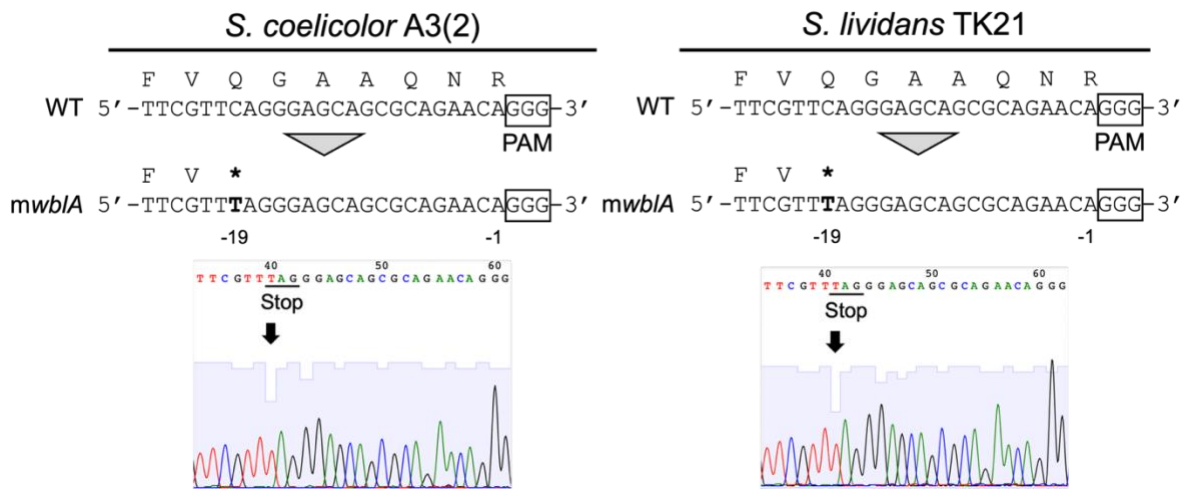


図 25. *wblA* の DNA 塩基配列解析。WT は野生株、*mwblA* 株は *wblA* に変異が導入された菌株を表す。PAM 配列は黒枠で囲まれている。塩基配列下部の数字は PAM 配列からの塩基数を表す。また、変異箇所を太字、終止コドン(*)で示した。下図は TAG ストップ変異が導入された 1 菌株のサンガーシーケンシングクロマトグラムであり、変異箇所を黒矢印で示している。

3-4-2-2 固体培地における *wblA* 変異株の表現型解析

3-4-2-1 で取得した *wblA* に変異が導入された菌株 (*mwblA* 株) の形態分化および色素系抗生物質生産が変化するかを検証するため、*S. coelicolor*-*mwblA* 株と *S. lividans*-*mwblA* 株を MS 培地に塗布した。その結果、野生株においては actinorhodin と undecylprodigiosin の生産は観察されなかったが、*mwblA* 株においてはこれらの色素抗生物質の生産が顕著に見られた (図 26A)。また、*S. coelicolor*-*mwblA* 株においては孢子形成が見られず、*S. lividans*-*mwblA* 株においても野生株に比べて孢子形成能の低下を観察した。さらに、R5 培地上においても、*S. coelicolor*-*mwblA* 株の孢子形成が消失し、*S. lividans*-*mwblA* 株は野生株に比べて actinorhodin を顕著に生産した (図 26B)。この結果は、*wblA* が形態分化を調節する役割を担う先行研究結果と一致しており (Kang *et al.*, 2007)、*wblA* の不活化が遺伝子破壊と同様の表現型を導いたことを示す。

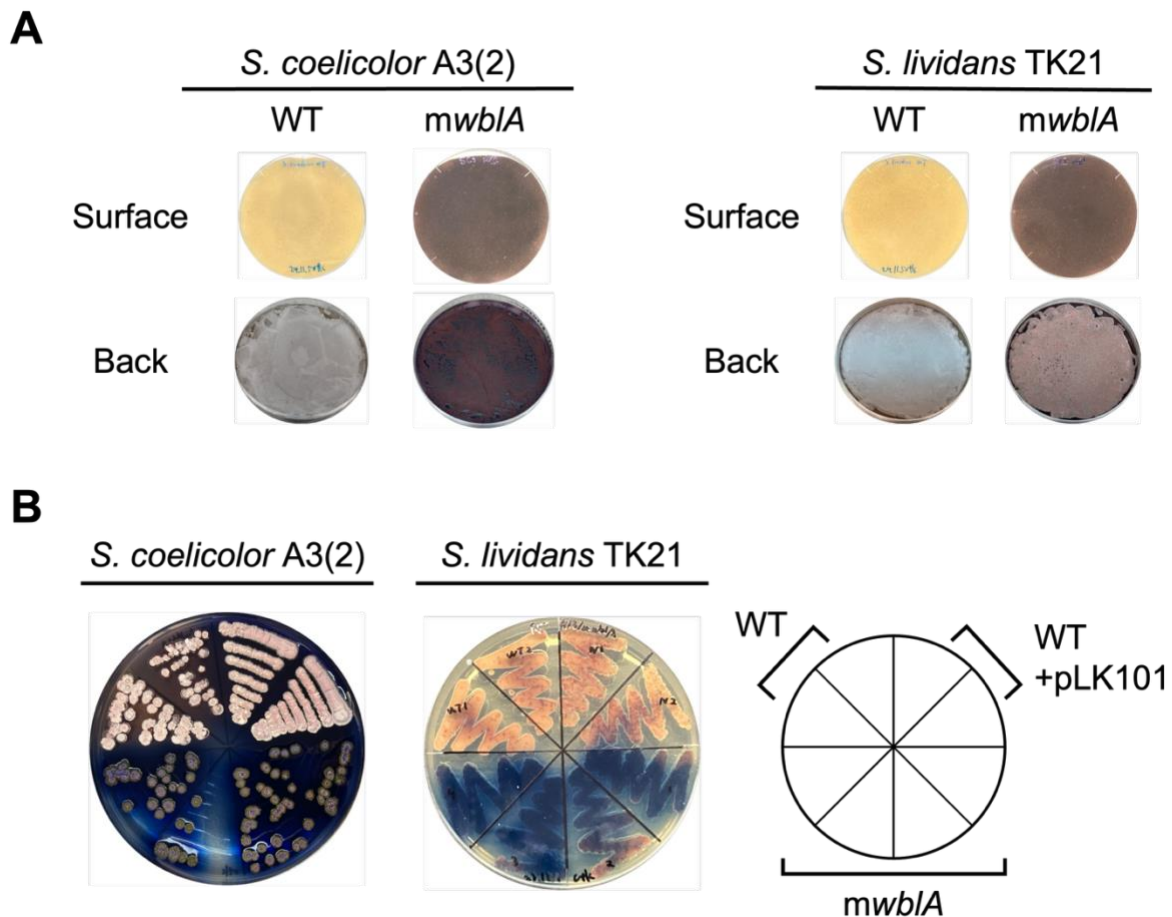


図 26. 固体培地における *mwblA* 株の表現型解析。WT は野生株、*mwblA* 株は *wblA* に変異が導入された菌株を表す。(A) MS 培地上における菌株の様子。各菌株を MS2 培地に塗布し、30℃にて 4 日間培養した。プレートは上面および底面から撮影した。(B) R5 培地上における菌株の様子。WT+pLK101 は pLK101 を導入した野生株を表す。各菌株を R5 培地に塗布し、30℃にて 4 日間培養した。プレートは *S. coelicolor* A3(2) 株の場合は上面、*S. lividans* TK21 株の場合は底面から撮影した。

3-4-2-3 液体培養における *wblA* 変異株の色素生産解析

液体培養においても *mwblA* 株の色素生産が変化するか検証するため、*S. coelicolor*-*mwblA* 株と *S. lividans*-*mwblA* 株を YMS 液体培地にて培養し、actinorhodin と undecylprodigiosin の生産量を経時的に定量した。解析の結果、液体培養においても、両菌株の actinorhodin と undecylprodigiosin の生産量は野生株に比べて増大した (図 27)。

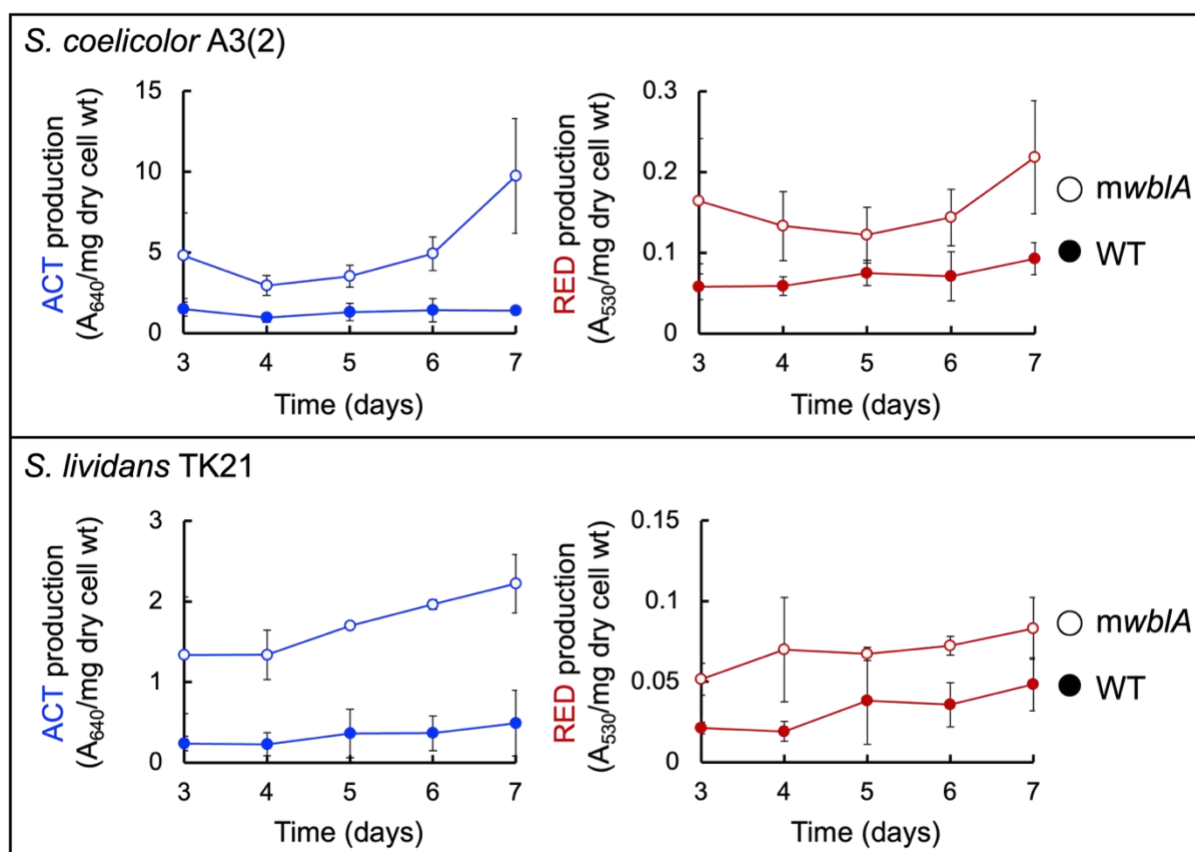


図 27. 液体培養における *mwblA* 株の色素系抗生物質生産。WT は野生株、*mwblA* 株は *wblA* に変異が導入された菌株を表す。また、ACT は actinorhodin、RED は undecylprodigiosin を表している。各菌株を YMS 液体培地にて培養し、培養 3 日目から 7 日目までの色素系抗生物質の生産量を定量した。全ての実験を 3 回実施し、結果を平均値±標準偏差として示している。

3-4-3 *S. lavendulae* FRI-5 株の *wblA* 不活化による二次代謝変化

3-4-3-1 *S. lavendulae* FRI-5 株の WblA の相同性解析

3-4-2 にて、Target-AID 技術による *wblA* 不活化が、*S. coelicolor* A3(2)株と *S. lividans* TK21 株において色素抗生物質の生産量増加に寄与することを示した。この手法をさらに他の放線菌にも適用するため、第 2 章で用いた *S. lavendulae* FRI-5 株の *wblA* を不活化し、二次代謝に及ぼす影響を調べることにした。*S. lavendulae* FRI-5 株のゲノム DNA 配列を *S. coelicolor* A3(2) 株の WblA (SCO3579、別名 WblA_{SCO}) との相同性に基づいて解析した結果、WblA_{SCO} と高い相同性 (94%) および同一性 (87%) を示す推定 WblA タンパク質 (WblA_{SLA}) をコードする候補遺伝子を見出した (図 28)。また、図 24 における *wblA*_{SCO} と *wblA*_{SLA} の塩基配列相同性は 84%であった。この結果は、*S. lavendulae* FRI-5 株によって生産される二次代謝産物が、*S.*

coelicolor A3(2)株および *S. lividans* TK21 株と同様に WblA_{SLA} によって制御されることを示唆している。

WblASCO	1	MGWVTDWSAQAACRTTDPDELFVQGAAQNR	30
WblASLA	1	MGWVTDWSAQAACRTTDPDELFVQGAAQNR	30
WblASCO	31	AKAVCTGCPVRTECLADALDNRVEFGVWGG	60
WblASLA	31	AKAVCTGCPVRTECLADALDNRVEFGVWGG	60
WblASCO	61	MTERERRALLRRRPTVTSWRRLLETARTEY	90
WblASLA	61	MTERERRALLRRRPTVTSWRRLLETARTEY	90
WblASCO	91	ERGVGIVPLDD---DEVYENYAAVG	112
WblASLA	91	ERSTGILTVDVGAEIDVAYETYAAAG	116

図 28. *S. coelicolor* A3(2)由来の WblA_{SCO} (SCO3579) と *S. lavendulae* FRI-5 由来の推定 WblA (WblA_{SLA}) の配列アラインメント。同一のアミノ酸残基を黒で表している。

3-4-3-2 *S. lavendulae* FRI-5 株の *wblA* の不活化

Target-AID 技術を用いて WblA_{SLA} を不活化するため、3-4-2 にて用いた pTarget-*wblA* を *S. lavendulae* FRI-5 株に導入した。得られた形質転換体の DNA 塩基配列解析の結果、WblA_{SLA} の上流 24 番目の glutamine コドン CAA が終止コドン TAA に変換されていることが分かった (図 29)。この結果から、pTarget-*wblA* によって *S. lavendulae* FRI-5 株の *wblA* に変異を導入することに成功した。

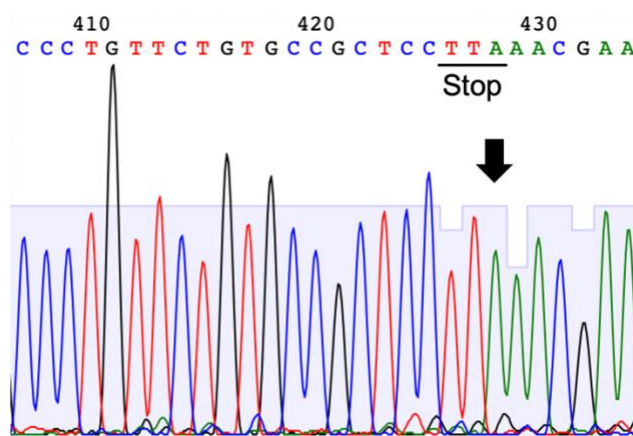


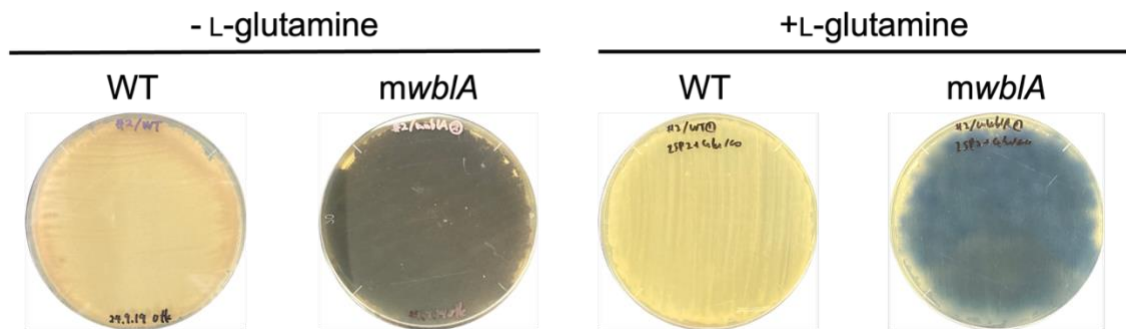
図 29. *wblA_{SLA}* の DNA 塩基配列解析。WT は野生株、*mwblA* 株は *wblA* に変異が導入された菌株を表す。塩基配列下部の数字は PAM 配列からの塩基数を表す。PAM 配列を黒枠で囲み、変異箇所を太字、終止コドン(*)で示した。変異株の塩基配列左側に示されている数字は、対応するストップ変異が導入された菌株数と、塩基配列解析に供した菌株の総数との比率を表す。右図は TAA ストップ変異が導入された 1 菌株のサンガーシーケンシングクロマトグラムであり、変異箇所を黒矢印で示している。

3-4-3-2 *S. lavendulae* FRI-5 株の *wblA* 変異株の indigoidine 生産解析

S. lavendulae FRI-5 株における *wblA* 不活化によって indigoidine 生産が変化するか検証するため、*S. lavendulae*-*mwblA* 株を L-glutamine を含む ISP2 寒天培地と A2M 液体培地にて培養し、その表現型と indigoidine 生産量を解析した。その結果、ISP2 寒天培地上では L-glutamine の添加によらず、*mwblA* 株は野生株に比べて indigoidine を顕著に生産していた (図 30A)。さらに、液体培養においても *mwblA* 株は野生株よりも高い indigoidine 生産量を示した (図 30B)。この結果から、*S. coelicolor*-*mwblA* 株と *S. lividans*-*mwblA* 株において観察された色素系抗生物質の生産量増大と同様に、*wblA_{SLA}* の不活化によって indigoidine 生産の制御が外れ、生産量増大を誘起したことが考えられた。*wblA_{SLA}* 発現ベクター pOXwblA_{SLA} を *S. lavendulae*-*mwblA* 株

に導入して *wblA_{SLA}* 相補株を構築したところ、この相補株においては indigoidine の生産量が野生株と同等にまで抑制された（図 30B）。以上の結果から、*wblA_{SLA}* の不活化が *S. lavendulae* FRI-5 株の indigoidine 生産の増大を引き起こすことを実証した。

A



B

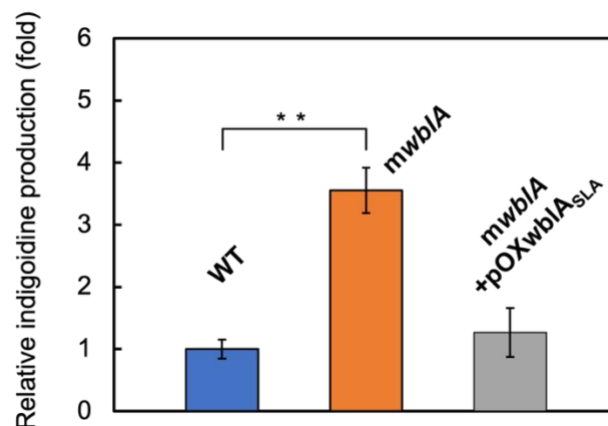


図 30. *S. lavendulae*-*mwblA* 株の indigoidine 生産解析。WT は野生株、*mwblA* 株は *wblA* に変異が導入された菌株を表す。（A）固体培地上での *mwblA* 株の様子。各菌株を ISP2 寒天培地（100 mM L-glutamine を含む）に塗布し、30℃にて 4 日間培養した。プレートは底面から撮影した。（B）A2M 液体培地での *mwblA* 株の indigoidine 生産。*mwblA*+pOX*wblA_{SLA}* は pOX*wblA_{SLA}* を導入した *S. lavendulae*-*mwblA* 株を表す。各菌株を A2M 液体培地に植菌し、30℃にて 7 日間培養した。縦軸の値は、培養液の 590 nm における吸光度を乾燥菌体重量（mg）で割った値を表しており、野生株の値で規格化した。全ての実験を 3 回実施し、結果を平均値±標準偏差として示している。*p* 値（有意水準）は、Student の *t* 検定を使用して計算した（***p*<0.01）。

3-4-3-3 *S. lavendulae*-*mwblA* 株における lavencidin とその類縁体の生産量解析

次に、*wblA* 不活化の lavencidin とその類縁体の生産への影響を解析した。抽出した代謝物の LC-MS 解析の結果、*mwblA* 株においては野生株と比較して lavencidin を含む複数の化合物の生産量が増大していることが分かった (図 31)。UV 吸収スペクトルとマスペクトルから、構造未同定のピークは新規 lavencidin 類縁体であることが強く示唆された (図 32、33)。また、UV-Vis スペクトルにおける各ピークの面積値からこれら化合物の生産量を算出したところ、その値は *mwblA* 株においては野生株と比べて増大していた (図 34)。さらに、indigoidine 生産解析の場合と同様に、*pOXwblA_{SLA}* を導入した相補株における lavencidin とその類縁体の生産量を解析したところ、これらの化合物の生産量は野生株と同等であった (図 34)。したがって、*wblA_{SLA}* の不活化は indigoidine 生産増大だけでなく lavencidin とその類縁体の生産増大も引き起こすことが明らかとなった。

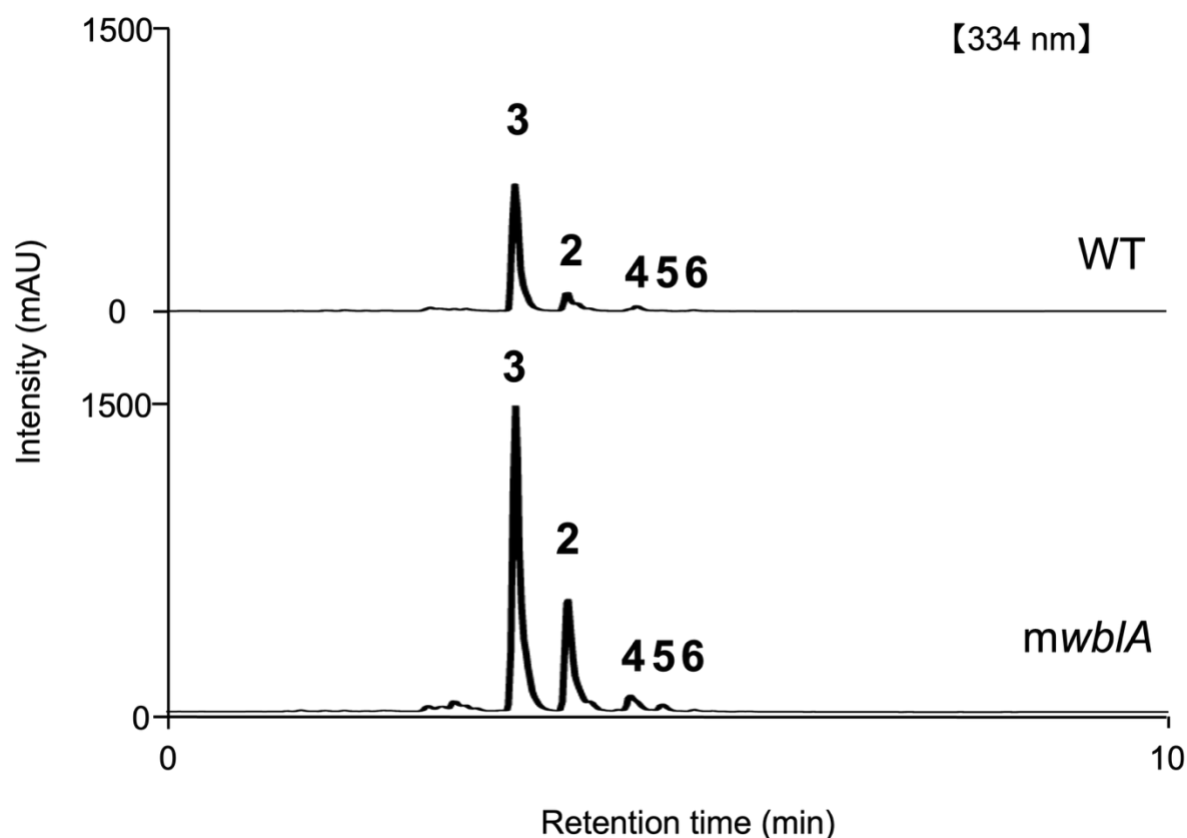


図 31. *S. lavendulae*-*mwblA* 株培養抽出物の LC-MS クロマトグラム。WT は野生株、*mwblA* 株は *wblA* に変異が導入された菌株を表す。各菌株を A2M 液体培地に植菌し、30℃にて 7 日間培養した。334 nm (ミリ吸光単位) で検出した。RKGS-A2215A (3)、lavencidin (2)、化合

物 4、化合物 5、化合物 6 は、それぞれカラム保持時間 6.7 分、6.9 分、7.3 分、7.4 分、7.6 分にて溶出した。

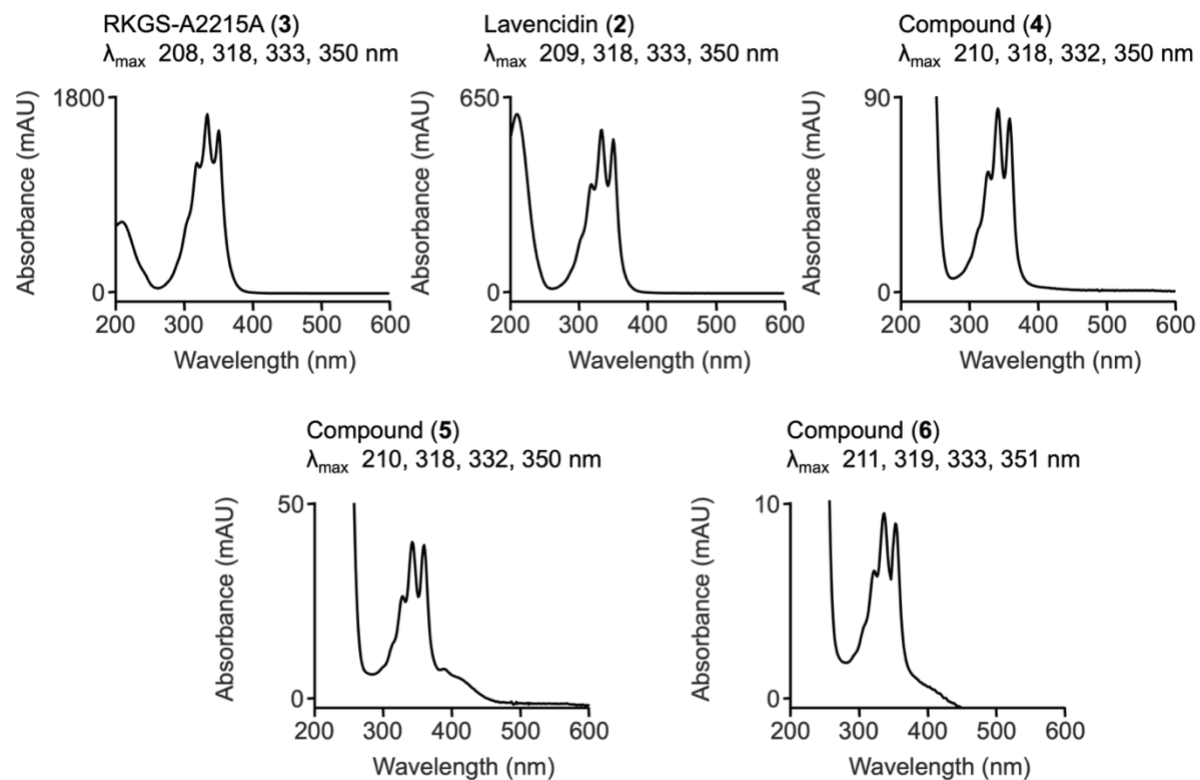


図 32. *S. lavendulae*-mwblA 株の培養により出現するピークの UV 吸収スペクトル。mAU はミリ吸光単位を表す。既知化合物として RKGS-A2215A (3) と lavencidin (2)、化合物 4 の UV 吸収スペクトルを上部に、化合物 5、化合物 6 の UV 吸収スペクトルを下部に示した。

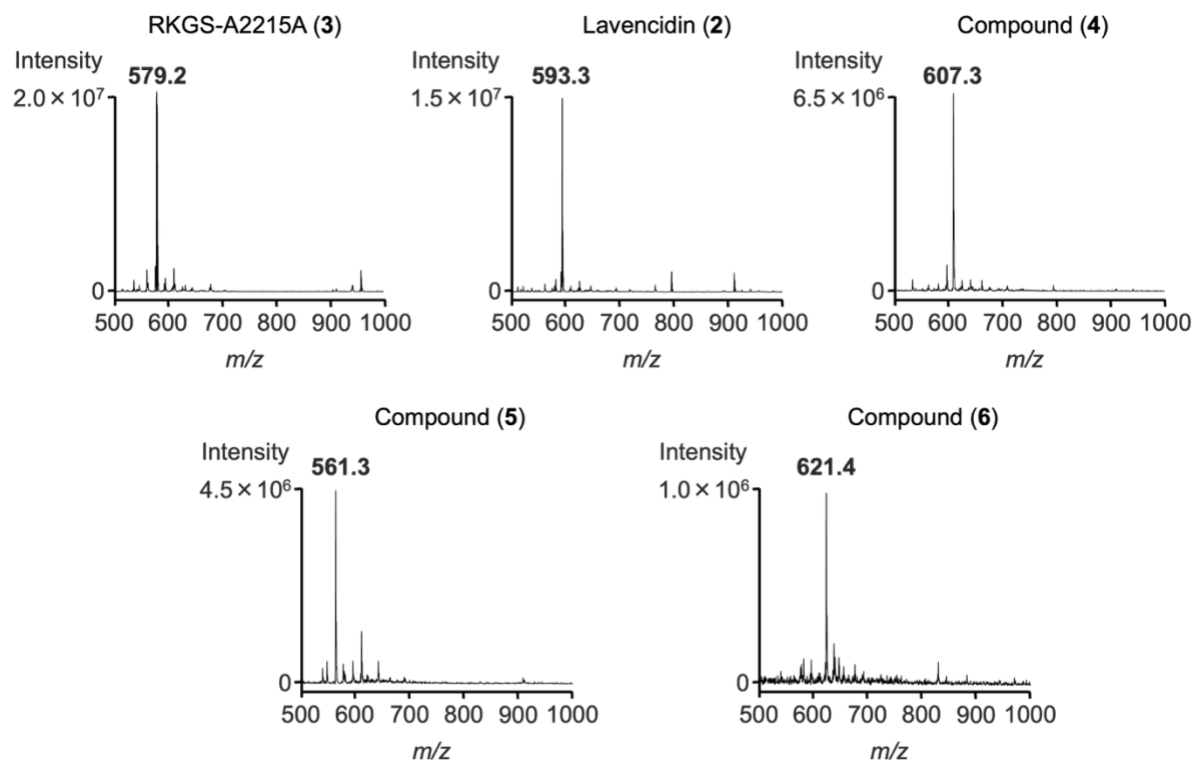


図 33. *S. lavendulae*-mwblA 株の培養により出現するピークの positive mode における マススペクトル。LC-MS 解析におけるトータルイオンクロマトグラム (TIC) にて検出したピークの MS スペクトラムを示した。TIC における 6.7 分のピーク (左上)、TIC における 6.9 分のピーク (中上)、TIC における 7.3 分のピーク (右上)、TIC における 7.4 分のピーク (左下)、TIC における 7.6 分のピーク (右下)。

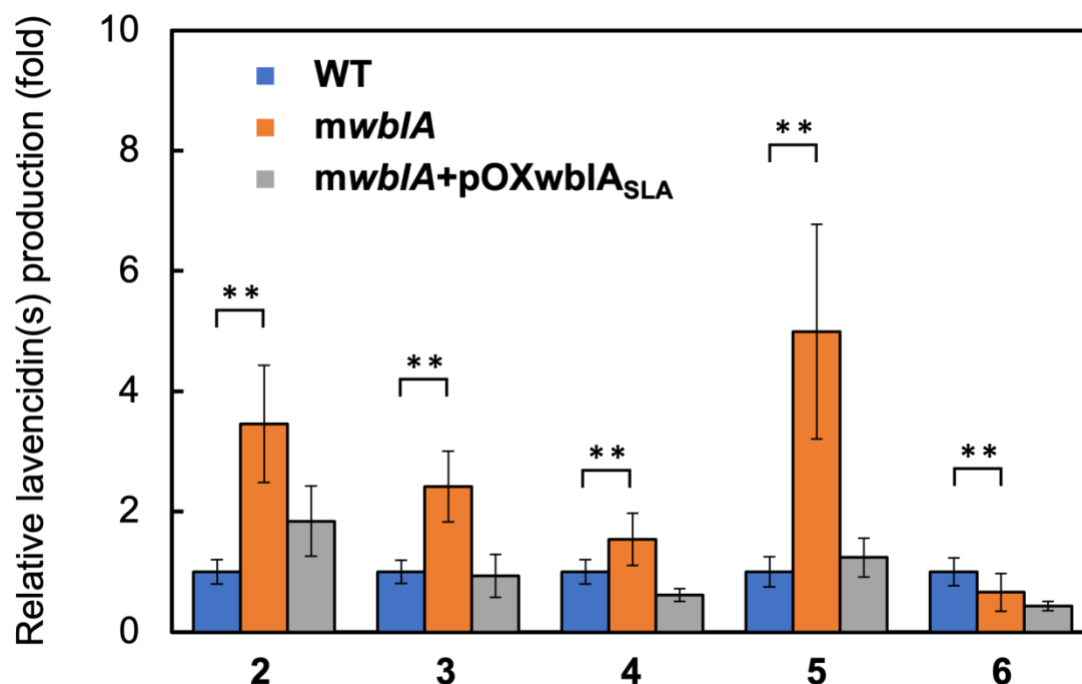


図 34. *S. lavendulae*-*mwblA* 株の lavencidin とその類縁体の生産量解析。WT は野生株、*mwblA* 株は *wblA* に変異が導入された菌株、*mwblA*+pOXwblA_{SLA} は pOXwblA_{SLA} を導入した *S. lavendulae*-*mwblA* 株を表す。各菌株を A2M 液体培地に植菌し、30℃にて 7 日間培養した。縦軸の値は、図 31 のピーク面積を乾燥菌体重量 (mg) で割った値を表しており、野生株の値で規格化した。横軸は左側から順に lavencidin (2)、RKGS-A2215A (3)、化合物 4、化合物 5、化合物 6 を表す。全ての実験を 3 回実施し、結果を平均値±標準偏差として示している。*p* 値 (有意水準) は、Student の *t* 検定を使用して計算した (** *p* < 0.01)。

3-4-3-4 未同定 lavencidin 類縁体の構造予測

図 32 の結果より、lavencidin の $m/z = 593.3$ ($[M-H]^+$) に対し、化合物 4 ($m/z = 607.3$)、化合物 6 ($m/z = 621.4$) はそれぞれ 1 つ、2 つのメチレン基に対応する質量増加に対応する。*lad* クラスターには methyltransferase 遺伝子がないため (表 14)、これらの質量増加は伸長基質の違いに由来することが考えられる。RKGS-A2215A と lavencidin の構造の違いが methylmalonyl-CoA と ethylmalonyl-CoA に由来するように、化合物 4、6 においても、lavencidin では methylmalonyl-CoA が取り込まれるモジュールにおいて ethylmalonyl-CoA が取り込まれた可能性がある (図 35)。次に化合物 5 ($m/z = 561.3$) については、RKGS-A2215A ($m/z = 579.2$) と比較して水分子が 1 つ脱離したと考えられる。2-4-4-5 で述べたように、DH7 は活性残基を

持つにも関わらず不活性と考察したが、化合物 **5** の合成においては DH7 が脱水反応を触媒し、ヘキサエン構造を持つ可能性がある。

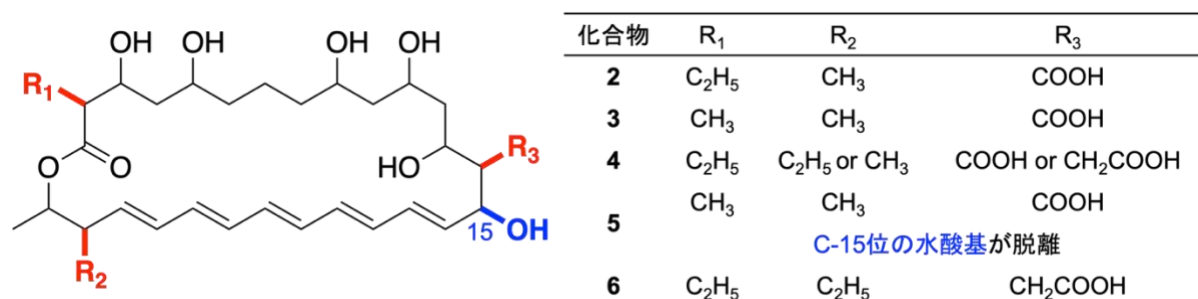


図 35. 化合物 **4~6** の推定化学構造

3-4-4 他種放線菌の *wblA* 不活化による二次代謝プロファイルの変動

3-4-4-1 *wblA* 変異株の代謝物解析

前項までに、*wblA* 不活化が複数種類の *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝産物の生産量を増大させることを実証した。そこで、より多様な放線菌に対しても *wblA* を不活化し、二次代謝プロファイルが変化するか検証した。前述のように、*wblA* の塩基配列は *Streptomyces* 属において保存性が高い。そのため、不活化用プラスミドを株ごとに再構築することなく、すでに構築した pTarget-*wblA* を用いて広範な株の不活化が可能であると期待できる。

当研究室が保有する 25 種類（3-4-1 の 20 種類+ゲノム配列が未解析の 5 種類）の他種 *Streptomyces* 属放線菌（図 36A）に pTarget-*wblA* を導入したところ、7 種類の菌株において形質転換体を取得した。変異導入箇所周辺の塩基配列を確認した結果、そのうち 4 種類の菌株において *wblA* の目的 glutamine コドンが終止コドンに置換された *mwblA* 株を取得した（図 36B）。次に、取得した 4 種類の *mwblA* 株を 7 種類の培地にて培養し、その代謝物を HPLC にて解析した。その結果、*S. virginiae*-*mwblA* 株を A3M 培地にて培養した場合において、カラム保持時間 18.5 分に野生株に見られないピーク（化合物 **7**）を観察した（図 37）。

A

Streptomycetes used in this study		
<i>Streptomyces</i> sp. BB47	<i>S. niveus</i> NBRC12917	<i>S. albus</i> JCM4450
<i>S. avermitilis</i> K139	<i>S. sahachiroi</i> NBRC13928	<i>S. filamentosus</i> JCM4576
<i>S. avermitilis</i> KA320	<i>S. matensis</i> NBRC 12889	<i>S. clavuligerus</i> JCM4710
<i>S. virginiae</i> NBRC12827	<i>S. xanthochromogenes</i> NBRC12828	<i>S. hygroscopicus</i> subsp. <i>hygroscopicus</i> JCM4772
<i>S. pristinaspiralis</i> NBRC13074	<i>S. griseocarnus</i> NBRC16080	<i>S. showdoensis</i> JCM4830
<i>S. antibioticus</i> NF-18	<i>S. rimosus</i> JCM4073	
<i>S. cattleya</i> NBRC14057	<i>S. viridochromogenes</i> JCM4265	
<i>S. scabies</i> ATCC23962	<i>S. griseofuscus</i> JCM4276	
<i>S. ostreogriseus</i> NBRC13423	<i>S. lincolnensis</i> JCM4287	
<i>S. bambergiensis</i> NBRC13479	<i>S. collinus</i> JCM 4361	

B

mwblA strains/media	A3M	A16	ISP2	A11M	F	SM17	MYM
<i>S. matensis</i> -mwblA	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
<i>S. virginiae</i> -mwblA	New peak detected	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. bambergiensis</i> -mwblA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. pristinaspiralis</i> -mwblA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

図 36. 他種 *Streptomyces* 属放線菌の代謝物解析。(A) 本研究で使用した *Streptomyces* 属放線菌。青字で示した菌株は、pTarget-wblA の導入による形質転換体を取得した菌株を表している。(B) mwblA 株の代謝物解析。1 列目の菌株名は、wblA に変異が導入された 4 種類の菌株を表す。各菌株を 7 種類の培地で培養し、その *n*-butanol 抽出物を逆相 HPLC にて解析した。ND は新規ピーク未検出 (Not detected) を表す。また、- は未解析の培養条件を表す。

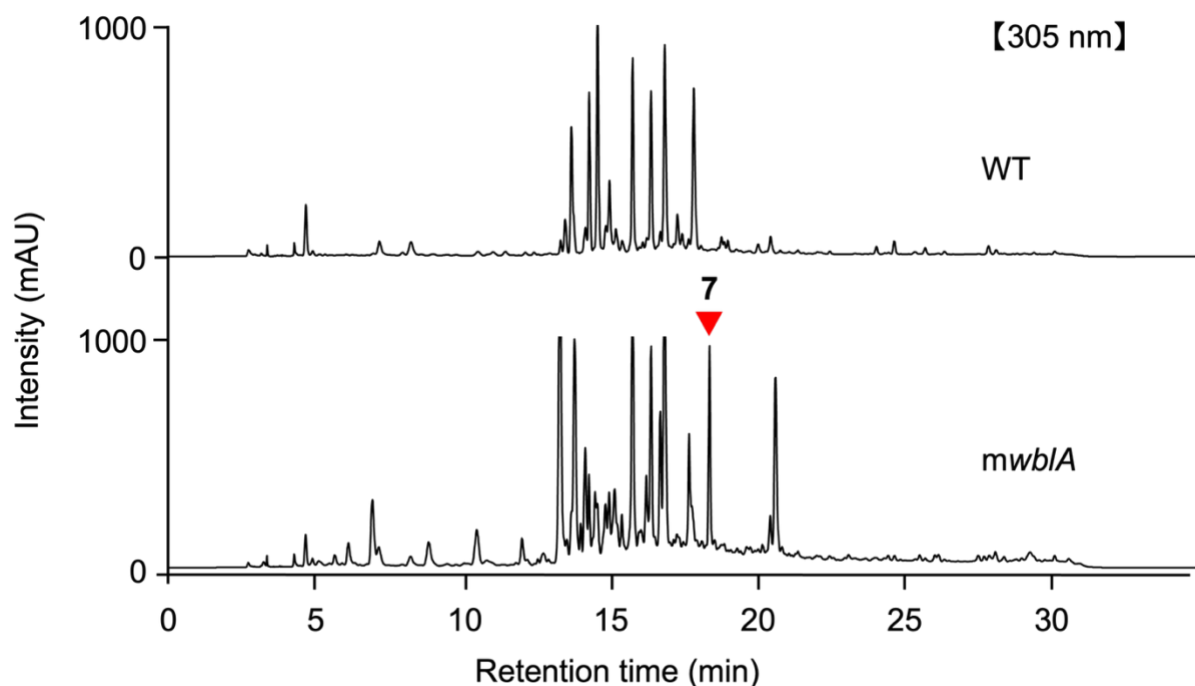


図 37. A3M 培地での培養における *S. virginiae*-*mwblA* 株の *n*-butanol 抽出物の HPLC クロマトグラム。WT は野生株、*mwblA* 株は *wblA* に変異が導入された菌株を表す。各菌株を A3M 液体培地に植菌し、30℃にて 7 日間培養した。305 nm（ミリ吸光単位）で検出した。化合物 7 は、カラム保持時間 18.5 分にて溶出した。

3-4-4-2 *S. virginiae*-*mwblA* 株が生産する化合物 7 の構造解析

3-4-4-1 の結果から、*S. virginiae*-*mwblA* 株において、*wblA* の不活化が化合物 7 の生産誘導を引き起こしたと推察した。また、化合物 7 は、*S. virginiae* NBRC12827 株の近縁株（*S. virginiae* MAFF10-06014 株と *S. virginiae* CBS 314.55 株）が生産する既知化合物（Pulsawat *et al.*, 2007、Sladič *et al.*, 2014）のいずれにも一致しなかった。そこで、化合物 7 の化学構造を決定するため、*S. virginiae*-*mwblA* 株の培養抽出物より精製した化合物 7 の詳細な解析を進めた。LC-MS 解析を行った結果、positive mode にて m/z 289.20 のピークを、negative mode にて m/z 287.15 のピークを検出した（図 38、39）。以上の結果から、化合物 7 の分子量を 288 と推測した。次に、化合物 7 の化学構造を決定するために各種 NMR（ ^1H NMR、 ^{13}C NMR、 ^1H - ^1H COSY、HMBC、HMQC）を測定した（図 40-44、表 23）。各種 NMR 解析に基づき、化合物 7 は芳香環と脂肪酸鎖を併せ持つ下図の化学構造を持つと考えられる（図 45）。

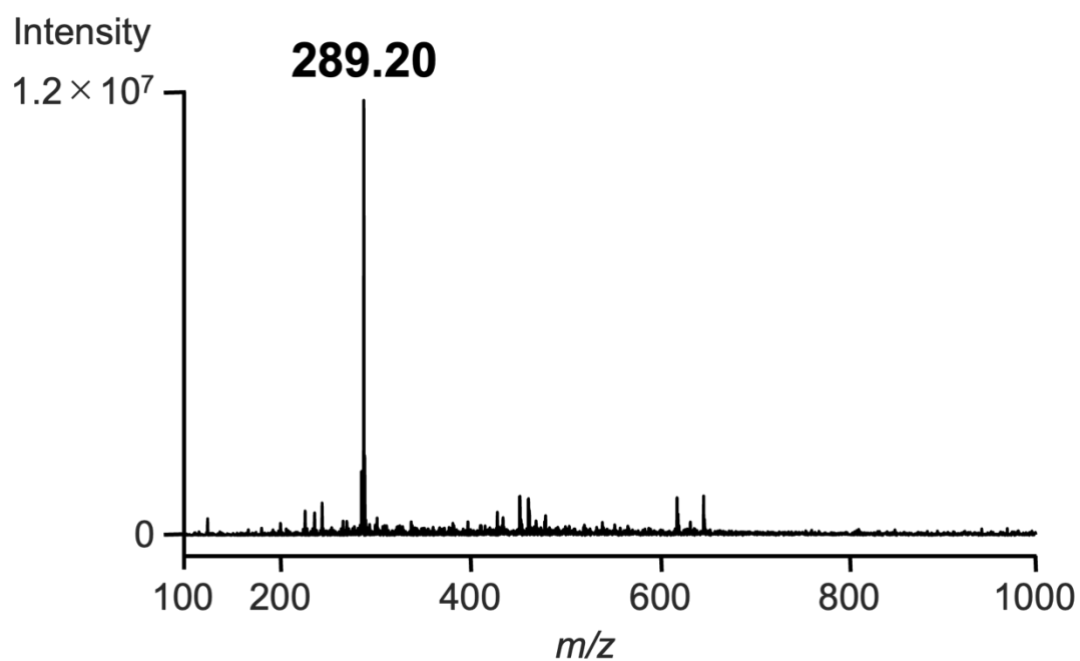


図 38. LC-MS による化合物 7 の positive mode スペクトル

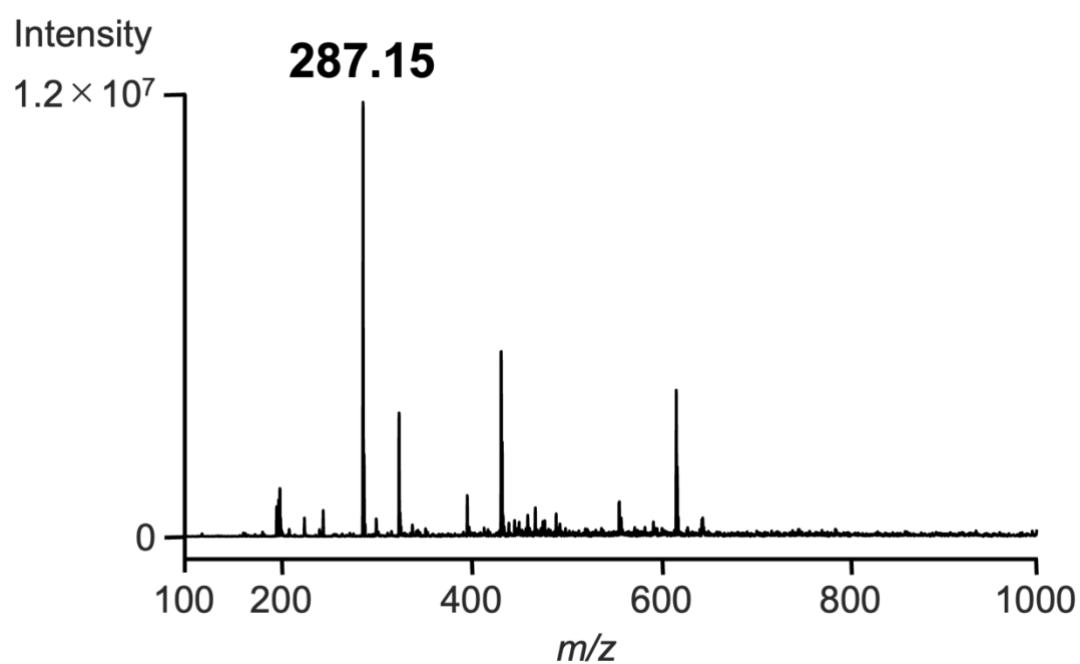


図 39. LC-MS による化合物 7 の negative mode スペクトル

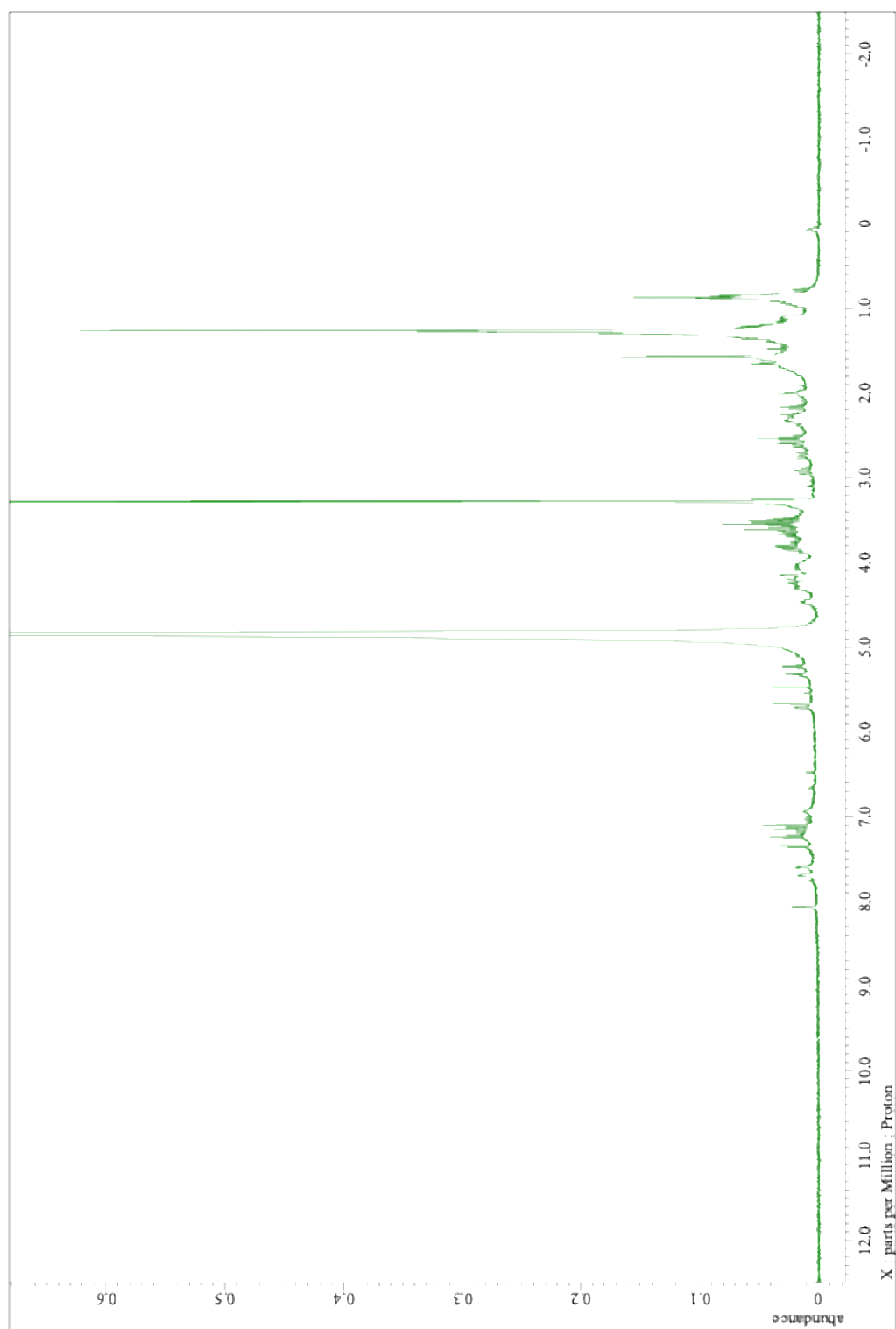


図 40. 化合物 7 の ^1H -NMR スペクトル (400 MHz)

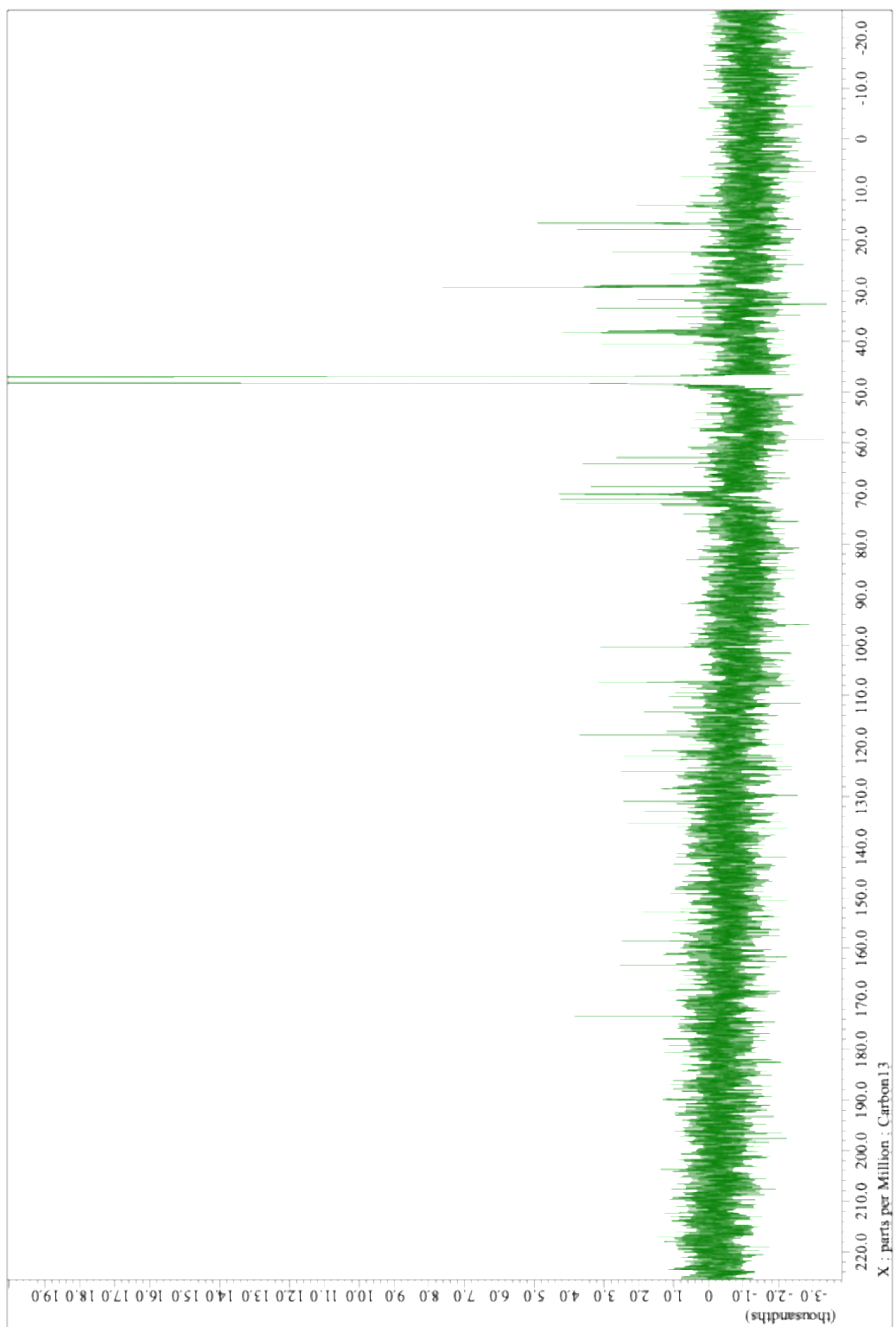


図 41. 化合物 7 の ^{13}C -NMR スペクトル (100 MHz)

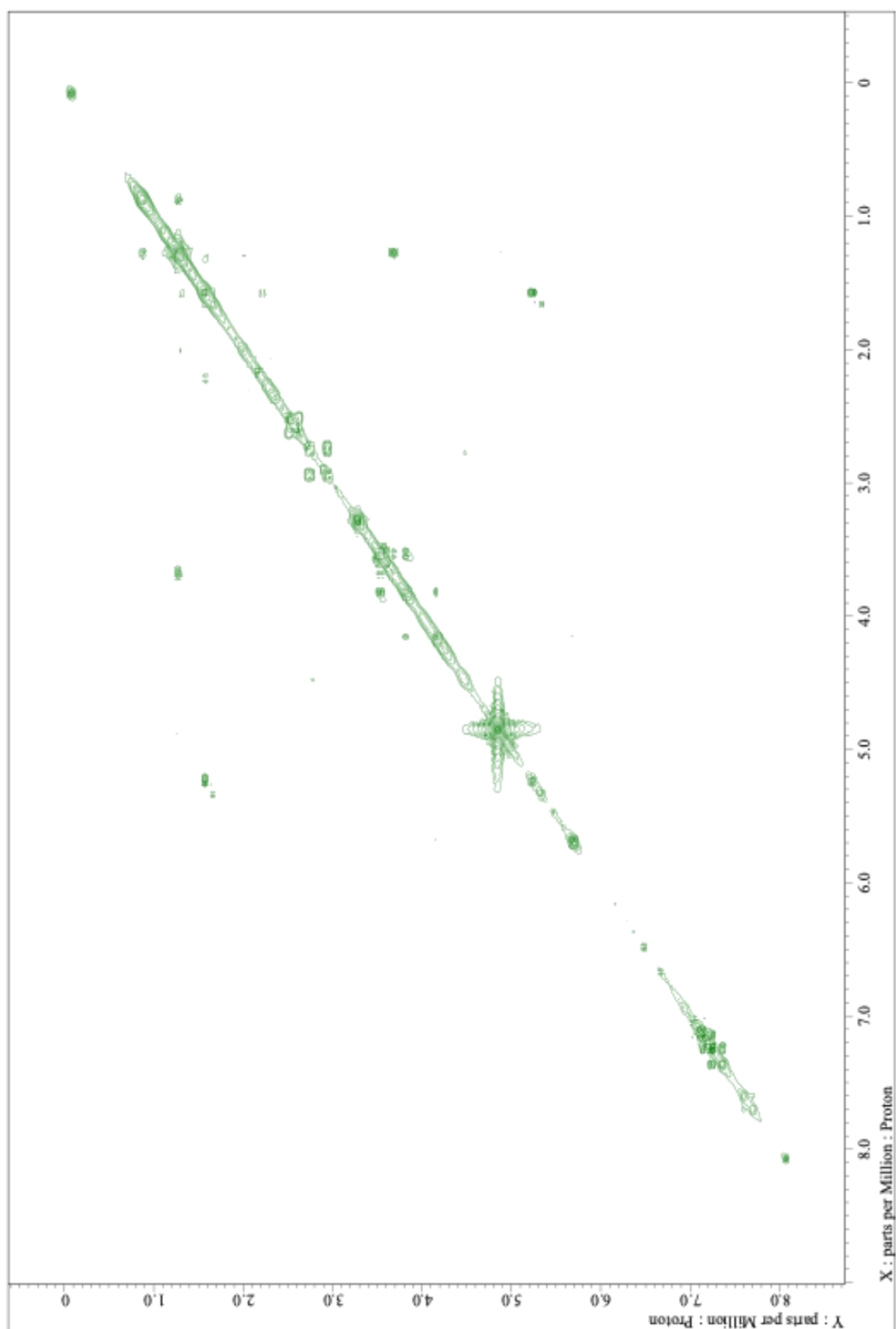


図 42. 化合物 7 の ^1H - ^1H COSY スペクトル

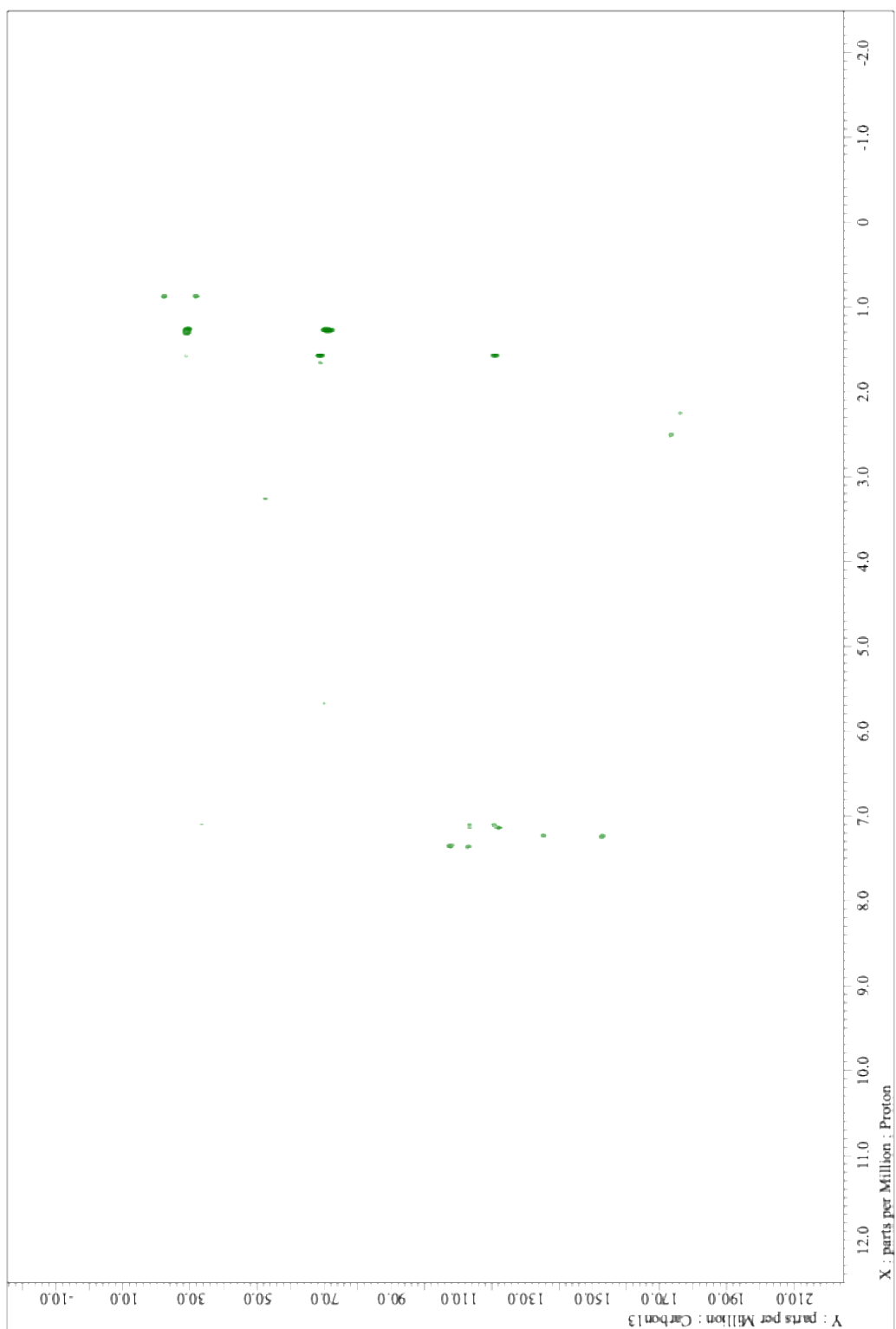


図 43. 化合物 7 の HMBC スペクトル

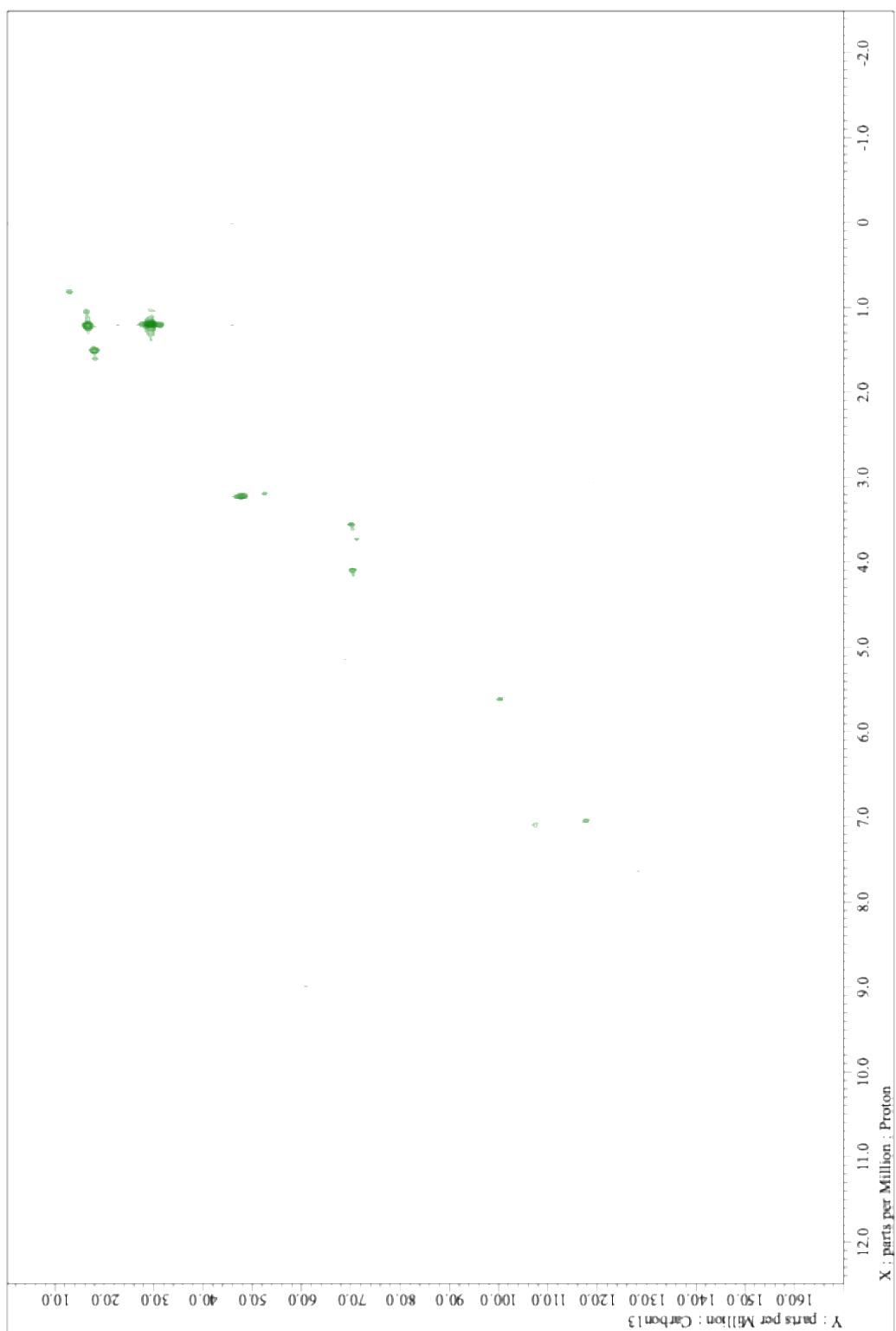


図 44. 化合物 7 の HMQC スペクトル

表 23. 化合物 **7** の NMR スペクトルの相関表

Position	δ_c	δ_H mult(<i>J</i> in Hz)	^1H - ^1H COSY	HMBC
1	152.7, qC			5
2	117.9, CH	7.03, s		
3	135.3, qC			5
4	122.0, CH	7.28, d (7.9)	5	6
5	125.2, CH	7.16, t (8.3)	4, 6	2, 4, 6
6	117.9, CH	7.07, d (7.9)	5	4
7	120.8, CH	5.24, m		2, 8, 9
8	68.8, CH	5.16, q (6.6)		9
9	17.9, CH ₂	1.49, d (6.4)	9	
10	29.2, CH ₂	1.18-1.22, m	8, 10	12
11	29.2, CH ₂	1.18-1.22, m	10, 12	9, 13
12	29.2, CH ₂	1.18-1.22, m	11, 13	10, 14
13	29.2, CH ₂	1.18-1.22, m	12, 14	11, 15
14	29.2, CH ₂	1.18-1.22, m	13, 15	12, 16
15	29.2, CH ₂	1.18-1.22, m	14, 16	13, 17
16	29.2, CH ₂	1.18-1.22, m	15, 17	14, 18
17	29.2, CH ₂	1.18-1.22, m	16, 18	15, 19
18	29.2, CH ₂	1.18-1.22, m	17, 19	16, 20
19	29.2, CH ₂	1.18-1.22, m	18, 20	17
20	13.0, CH ₃	0.80, m	19	
1-OH		5.39, s		

3-Alkyl-phenol

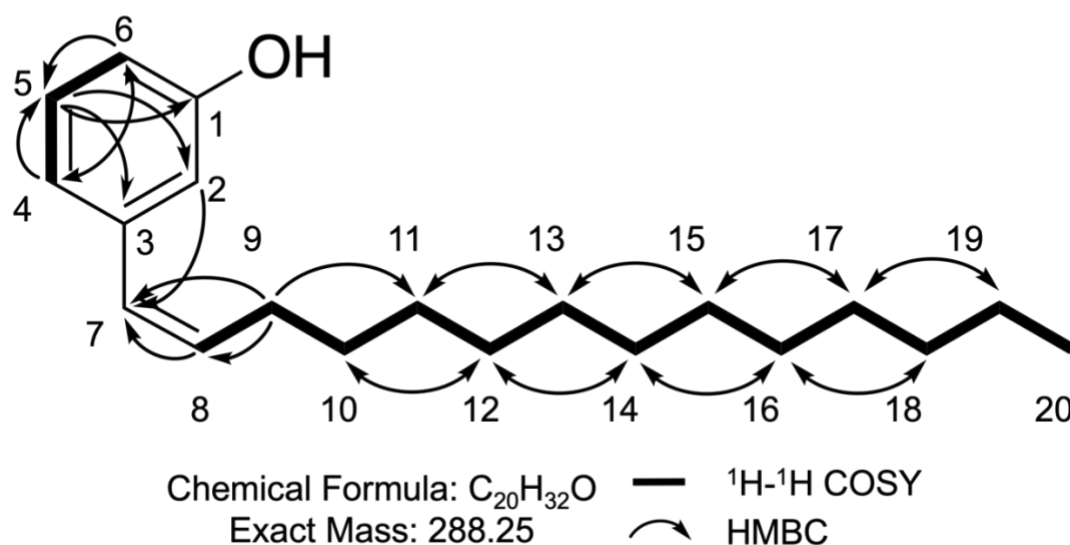


図 45. 化合物 7 の推定化学構造

3-4-4-3 *S. virginiae* NBRC12827 株のゲノム配列

S. virginiae NBRC12827 株の全ゲノム配列はまだ明らかになっていないため、図 45 に示した化合物 7 の生合成に関わる遺伝子クラスターを決定することは困難である。そこで、本菌株より抽出したゲノム DNA をゲノム配列解析に供した。MiSeq (Illumina, San Diego, 米国) による短鎖リードと、MinION (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, 英国) による長鎖リードを組み合わせたハイブリッドゲノム解析の結果、コンティグ数 4、GC 含量 72.3%、全長約 7.9 Mb の DNA 塩基配列を得た (表 24)。この DNA 塩基配列中にはコーディング領域が 7,243 個含まれ、tRNA が 84 個、rRNA が 21 個コードされていることが分かった。この DNA 塩基配列中より、化合物 7 の BGC を探索することにした。

表 24. *S. virginiae* NBRC12827 株のゲノム解析結果

	塩基数 (bp)	GC 含量 (%)	コーディング領域	tRNA	rRNA	形状
コンティグ 1	7,654,224	72.4	6,934	82	21	線状
コンティグ 2	170,632	69.5	188	1	-	線状
コンティグ 3	86,407	73.6	86	1	-	線状
コンティグ 4	31,447	71.2	35	-	-	環状
Total	7,942,710	72.3	7,243	84	21	

3-4-4-4 *S. virginiae*-mwblA 株の二次代謝産物生合成遺伝子の *in silico* 解析

S. virginiae NBRC12827 株のゲノムにコードされる二次代謝産物 BGC を見出すため、*S. virginiae* NBRC12827 株のゲノム配列を antiSMASH 8.0 (Blin *et al.*, 2025) に供した結果、33 個の推定 BGC を見出した (図 46)。これらの BGC には、I 型 PKS、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS)、ハイブリッド PKS-NRPS、およびいくつかのシデロフォアおよびテルペン生合成酵素をコードする BGC が含まれる。

BGC番号/ 生合成遺伝子	BGCの系統	BGC番号/ 生合成遺伝子	BGCの系統	BGC番号/ 生合成遺伝子	BGCの系統
1. ctg1_207	NAPAA	12. ctg1_1382	I型PKS	23. ctg1_3479	NRPS-like
2. ctg1_287	III型PKS	13. ctg1_1423	I型PKS	24. ctg1_3965	テルペン
3. ctg1_334	シデロフォア	14. ctg1_1452	テルペン	25. ctg1_4027	I型PKS
4. ctg1_436	メラニン	15. ctg1_1547	RiPP-like	26. ctg1_4440	シデロフォア
5. ctg1_464	テルペン	16. ctg1_1606	Hydrogen cyanide	27. ctg1_5128	ランチペプチド
6. ctg1_541	テルペン	17. ctg1_1658	I型PKS	28. ctg1_6022	I型PKS
7. ctg1_622	NRPS	18. ctg1_1700	テルペン前駆体	29. ctg1_6066	ブチロラクトン
8. ctg1_794	NRPS	19. ctg1_1801	II型PKS	30. ctg1_6094	I型PKS
9. ctg1_1010	I型PKS	20. ctg1_2352	テルペン前駆体	31. ctg1_6223	NRPS
10. ctg1_1057	NRPS	21. ctg1_2668	アリルポリエン	32. ctg1_6404	テルペン
11. ctg1_1148	テルペン	22. ctg1_3204	NRPS	33. ctg1_6603	II型PKS

図 46. *S. virginiae* NBRC12827 株の推定二次代謝産物 BGC。I 型 PKS BGC を青色ハイライトで示している。図中の生合成遺伝子は、各 BGC にそれぞれ含まれており、RT-qPCR による発現解析の対象遺伝子として選んだ。

3-4-4-5 化合物 7 の推定生合成経路

S. virginiae-mwblA 株において見出された化合物 7 は、その化学構造 (図 45) から 3-alkylphenol 類化合物であると推定される。一方、alkylsalicylaldehyde と総称される化合物群の中に化合物 7 と類似した構造を有しているものがある (Peter and Li, 2024)。Alkylsalicylaldehyde 類縁体化合物は、I 型 PKS によって生合成されるポリケタイドであり、salicylaldehyde (2-hydroxybenzaldehyde) を基本骨格として、アルキル基が付加された構造を有する (Yang *et al.*, 2023)。この化合物群の BGC は真菌に広く分布しているが (Peter and Li, 2024)、放線菌において生合成された例はこれまでにない。そこで、化合物 7 の BGC を見出すため、*S. virginiae* NBRC12827 株の推定二次代謝産物 BGC を精査した結果、BGC 番号 9、12、13、17、25、28、

30 が I 型 PKS BGC に属することが分かった。したがって、これら BGC のいずれかが化合物 7 の生合成を担うことが予想された。また、化合物 7 の NMR スペクトルは既知の alkylsalicylaldehyde 類化合物 (Nies *et al.*, 2020、Liu *et al.*, 2019、Yang *et al.*, 2023、Zhao *et al.*, 2019) のいずれにも合致せず、本化合物が新規 3-alkylphenol 類縁体であると期待される。化合物 7 の化学構造に基づき、その生合成経路は図 47 のように予想される。

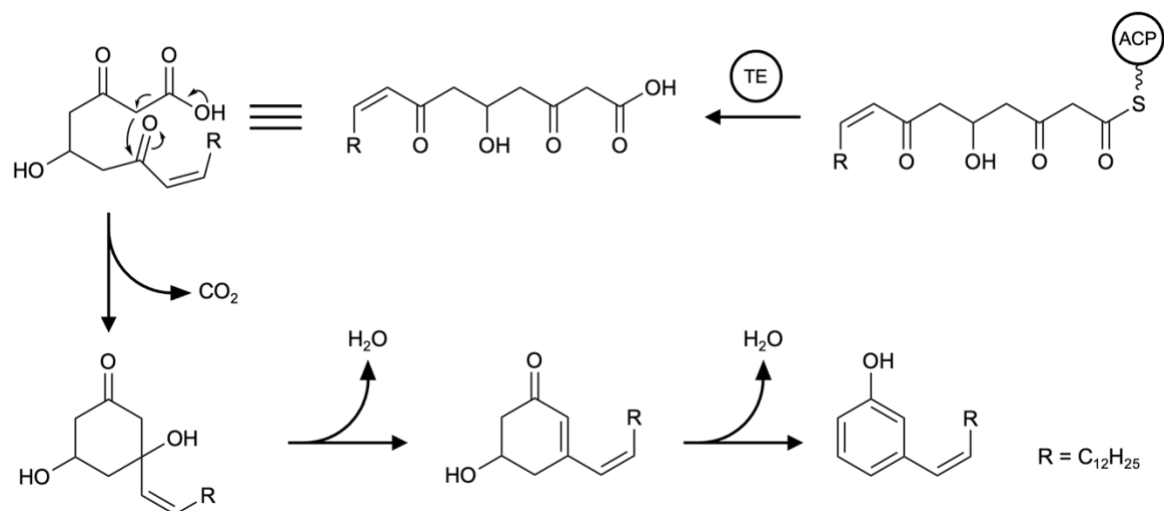


図 47. 化合物 7 の推定生合成経路。PKS の各ドメインを次のように表している: ACP, acyl carrier protein; TE, thioesterase。PKS から TE ドメインによって切り出された後、脱炭酸を伴う環化反応を受け、さらに芳香環が生じる。

3-4-4-6 *S. virginiae*-mwblA 株の二次代謝産物生合成遺伝子の発現解析

上述のように、*S. virginiae* NBRC12827 株においては I 型 PKS と推定される複数の BGC がコードされているが、その予測されたモジュール構成からは BGC を絞り込むことが困難であった。そこで、化合物 7 の BGC を同定するため、各 BGC 内の生合成遺伝子をそれぞれ一つずつ選び、それらの相対発現量を RT-qPCR により解析した。まず、*S. virginiae* 野生株と *mwblA* 株を A3M 培地で 7 日間培養し（化合物 7 の生産が検出された培養条件）、その菌体から total RNA を抽出した。その後逆転写酵素によって cDNA を調製して RT-qPCR を実施した。ハウスキーピング遺伝子には放線菌で一般的な *hrdB* (Shiina *et al.*, 1991) を選んだ。qPCR プライマーについては、プライマー自動設計ツール Primer BLAST (Ye *et al.*, 2012) を使用して、融解温度差がペア間で $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以内、かつプライマーダイマーが生じる指標となるスコアが最も低いプライマーセットを設計した。また、PKS BGC の生合成遺伝子に対しては、KS などの繰り返しドメイン部位を避け、TE などの特異性が高いドメイン領域を標的とした。その結果、

mwblA 株においては、野生型と比較して複数の生合成遺伝子の発現量が顕著に増加していた（図 48）。特に、シデロフォア *desferrioxamine B* の BGC と高い類似性を示す BGC 番号 26 の生合成遺伝子 *ctgI_4440* と、リボソーム翻訳後修飾ペプチドの一種の class V lanthipeptide に属する *pristin A3* の BGC と類似性の高い BGC 番号 27 の生合成遺伝子 *ctgI_5128* の相対発現量は、それぞれ約 74 倍と 117 倍に増加していた。一方で、テルペン前駆体を生産すると予測される BGC 番号 20 の生合成遺伝子 *ctgI_2352* を含む一部の生合成遺伝子においては、相対発現量が野生株に比べて減少していた。この結果は、*wblA* の不活化が *S. virginiae* NBRC12827 株における二次代謝の包括的な転写変動をもたらしたことを示唆している。

化合物 7 の候補 BGC と推定される I 型 PKS BGC に着目すると、BGC 番号 12 の *ctgI_1382* と BGC 番号 25 の *ctgI_4027* の相対発現量が野生株に比べてそれぞれ約 4.2 倍と約 2.8 倍増加していた（図 49）。したがって、これら BGC のいずれかが化合物 7 の生合成を担うと予想される。

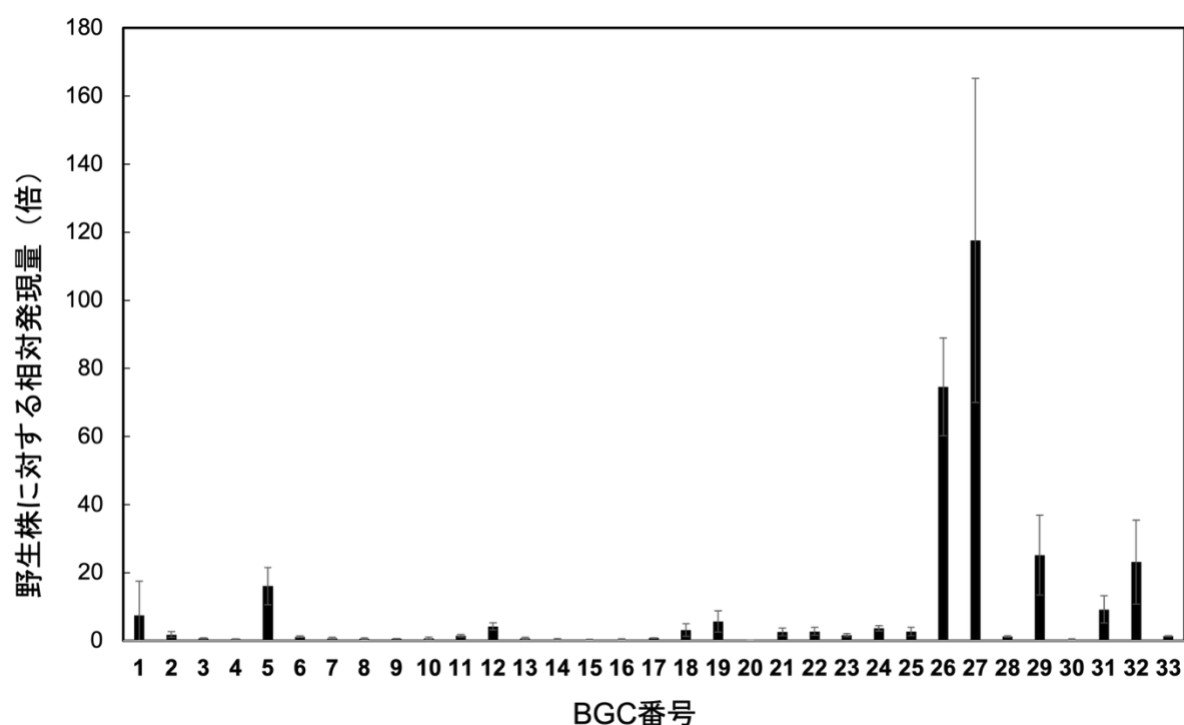


図 48. *S. virginiae-mwblA* 株における推定二次代謝産物生合成遺伝子の転写解析。全量 RNA を各生合成遺伝子と *hrdB* ホモログ遺伝子を増幅するよう設計したプライマーセットを使用して RT-qPCR 解析した。データは *hrdB* ホモログ遺伝子の転写量にて規格化した。図中の BGC

番号は、図 46 の BGC 番号と対応する。全ての実験を 3 回実施し、結果を平均値±標準偏差として示している。

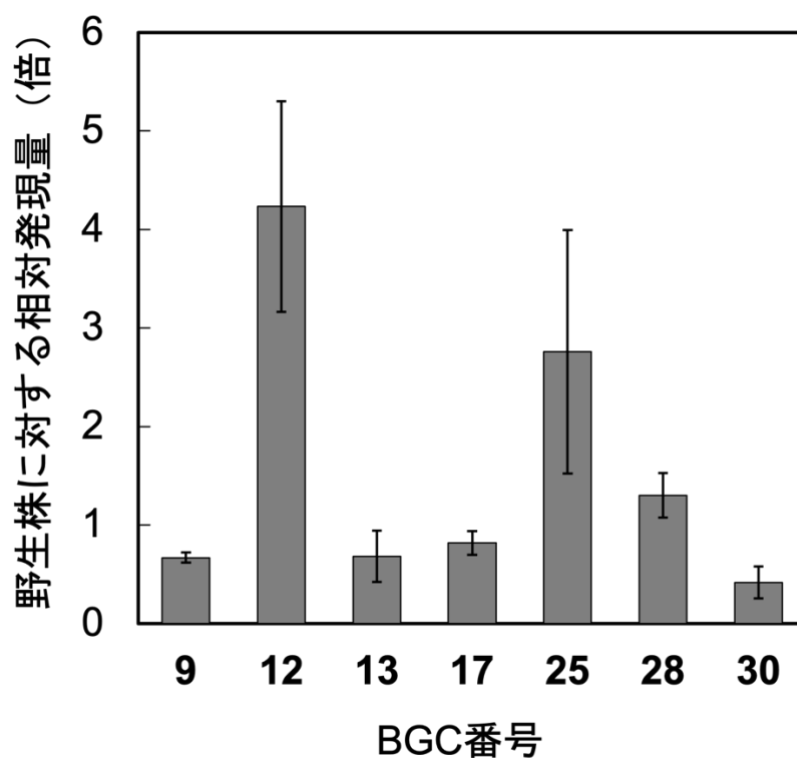


図 49. *S. virginiae*-*mwblA* 株における I 型 PKS BGC の転写解析。図 48 の結果から I 型 PKS BGC を抜粋した。図中の BGC 番号は、図 46 の BGC 番号と対応する。全ての実験を 3 回実施し、結果を平均値±標準偏差として示している。

3-5 節 考察

3-5-1 *wblA* の塩基配列保存性

wblA の塩基配列は *Streptomyces* 属において高度に保存されていた (図 24)。興味深いことに、*wblA* 塩基配列の 1~300 塩基の領域は最も高い相同性を示し、下流に向かうにつれて相同性が低下する傾向にあった。Wbl タンパク質は、補因子である鉄硫黄クラスター [4Fe-4S] を保持することで酸化ストレスを感知し、クラスターの酸化状態に応じて DNA 結合活性を変化させることで形態分化や二次代謝を制御する (Crack *et al.*, 2009)。この鉄硫黄クラスターが配位するための 4 つの Cys 残基からなる保存モチーフ [Cys-X₂₁-Cys-X₂-Cys-X₅-Cys] が WblA の開始コドンから 100 アミノ酸までに含まれていることから (Nah *et al.*, 2021)、*wblA* の上流

領域の塩基配列相同性が高いのは、この保存モチーフが機能的に重要な要素であるためと考えられる。本章で標的とした Gln24 コドンは、保存モチーフ内の上流から 1 番目と 2 番目の Cys 残基の間に位置している。したがって、Gln24 コドンを終止コドンに変換することにより WblA が鉄硫黄クラスター結合能を失い機能的に不活性となった結果、孢子形成能や二次代謝産物の変動を引き起こしたと推察される。また、これらの代謝変動は、wblA の不活化が間接的に引き起こした影響である可能性も考えられる。WhiB-like ファミリータンパク質はグローバルレギュレーターの階層的カスケードの中間に位置しており (Yan *et al.*, 2017)、下流の制御因子の発現量を変動させることで間接的に複数の表現型変化に寄与していることが考えられる。一方、Wbl ファミリータンパク質は末端領域に DNA 結合モチーフを有しているため (Bush, 2018)、BGC のプロモーター領域に直接結合して直接的かつ経路特異的に二次代謝産物生産を変動させている可能性も考えられる。

本章では、この wblA の塩基配列の高い保存性に基づき、共通のプラスミドを用いて不活化実験を行った。その結果、10/28 株で形質転換体を得られ、うち 7 株で mwblA 株が得られた。接合伝達を用いた *Streptomyces* 属細菌の形質転換効率率は株ごとに異なることが知られ、特に制限修飾系の厳密性などによって大きく影響される (Macneil, 1988)。よって、本研究における形質転換の成功率 (10/28) は必ずしも Target-AID を使った本研究手法に起因するものではないと考えられる。一方、塩基編集の成功率 (7/10) は高く、本研究手法の高い有効性を示している。なお sgRNA を設計した箇所の塩基配列 (図 24) は株間で多少の違いが見られるものの、完全に一致しない配列であっても mwblA 株が得られた菌株が見られた。このことから、dCas9 による目的部位の認識にはある程度のミスマッチが許容されることが示唆される。

3-5-2 *S. lavendulae*-mwblA 株にて見出された化合物 4、6 の生合成機構

S. lavendulae-mwblA 株においては、indigoidine と lavencidin の生産量増大に加えて、構造未同定の lavencidin 類縁体と推定される複数の化合物の生産量も増大した。このうち化合物 4、6 については、1 または 2 箇所 methylmalonyl-CoA ではなく ethylmalonyl-CoA が取り込まれたことが示唆された。すなわち、Lad PKS における LadA_AT1、LadA_AT7、LadA_AT13 の基質認識が厳密でないことが考えられる。同様の例として、FK506 の生合成酵素 FkbB の AT は、自己アシル化反応において methylmalonyl-CoA と ethylmalonyl-CoA に対して基質特異性を持ち、アシル基転移反応においては ethylmalonyl-CoA と allylmalonyl-CoA に対して基質特異性を持つことが知られる (Jiang *et al.*, 2015)。さらに、*Streptomyces tsukubensis* が持つ既知の ethylmalonyl-CoA 生合成遺伝子 *ccr1* (Blažič *et al.*, 2015) のホモログ遺伝子が *S. lavendulae* FRI-

5 株にもコードされており、そのアミノ酸配列相同性は 88.1% と非常に高い。これらを考慮すると、*S. lavendulae* FRI-5 株は *lad* クラスターとは離れた位置にコードされた遺伝子を使って ethylmalonyl-CoA を合成可能であり、*lad* クラスターの AT ドメインの基質特異性の揺らぎにより様々な lavencidin 類縁体を合成可能であることが示唆された。これらの類縁体は野生株でも生産が観察されるが、*wblA* 不活化により生産量が増大したことから、本研究手法によって詳細な構造解析が促進されると考えられる。

3-5-3 化合物 7 の推定生合成機構

化合物 7 の推定生合成経路から、本化合物は複数のモジュールを有する I 型 PKS によって生合成されると予想した。しかし、*S. virginiae* NBRC12827 株の BGC の中に、化合物 7 の生合成に必要なモジュールを全て含む I 型 PKS を見出せなかった。一方、通常真菌に限定されるが、単一のモジュールのみで複数回の鎖伸長を担う反復型 (iterative) I 型 PKS が放線菌においても見出されている (Sun *et al.*, 2012、Zhang *et al.*, 2013、Wang *et al.*, 2020)。このことから、*S. virginiae* NBRC12827 株においても反復型 I 型 PKS がコードされており、化合物 7 は同 PKS によって生合成される可能性が考えられる。実際、BGC 番号 12 や 25 に含まれる生合成遺伝子は、真菌の反復型 I 型 PKS に類似した KS、AT、DH、ER、KR、ACP のドメインで構成された単一のモジュールを含む I 型 PKS がコードされている。したがって、これら PKS のいずれかが化合物 7 の生合成を担う可能性が考えられる。

また、野生株は化合物 7 を生産しないことから、当該 BGC は休眠していると予想し、RT-qPCR 解析では発現量の大幅な上昇が期待された。一方、転写解析の結果からは、I 型 PKS 遺伝子と推定される BGC 番号 12 と 25 に含まれる生合成遺伝子の相対発現量は、増大が顕著であった BGC 番号 26 と 27 の生合成遺伝子の相対発現量と比較するとわずかであった。しかし、翻訳後制御の影響 (Wang, 2008) や、mRNA 量とタンパク質量の間には隔たりがある (Payne, 2015)、代謝経路全体のフラックスによって多くの反応が使われなくなる (Nishikawa *et al.*, 2008) といった理由により、遺伝子発現量と代謝物の生産量は必ずしも比例するとは限らない。したがって、BGC を特定するためには化合物 7 の生産量、各 BGC の転写量、各生合成酵素のタンパク質発現量の経時的な変化を詳細に観察することが重要である。また、Target-AID を使った遺伝子不活化はプラスミドを脱落させることで再度使用可能になることから、*mwblA* 株の候補 BGC を不活化し、化合物 7 の生産消失を検出する手法も可能である。

3-6 節 結言

本章では、単一の塩基編集プラスミドにより複数の *wblA* ホモログを同時に不活化することに成功し、複数の放線菌において二次代謝産物の生産増大と新規代謝物の生産を検出したことから、*wblA* の不活化が放線菌の二次代謝活性化に寄与することを示した。また、*wblA* が塩基配列レベルにおいても高度に保存されていることを明らかにし、その中でも相同性が高かった *wblA* の上流領域が機能的に重要な役割を果たすことが示唆された。さらに *S. lavendulae*-*mwblA* 株においては、未同定の化合物 **4**、**5** の生産量が増大し、その分子量を詳細に解析することで、*lad* BGC が当該化合物の生合成にも関与することが示唆された。*S. virginiae*-*mwblA* 株においては、野生株に見られない新規代謝物（化合物 **7**）を検出し、その化学構造の解析により化合物 **7** が 3-alkylphenol 中間体あるいは新規類縁体であることが示唆された。また、*S. virginiae* NBRC12827 株のゲノム配列を明らかにし、本菌株にコードされる推定二次代謝産物生合成遺伝子の相対発現量を解析することで、化合物 **7** の生合成を担うと推定される BGC を見出し、その生合成経路を推定した。本研究では *wblA* 不活化プラスミドを導入した 28 菌株のうち、*S. lavendulae*-*mwblA* 株と *S. virginiae*-*mwblA* 株の 2 菌株についてのみ代謝変動が確認された。これら 2 菌株においては実験日や解析条件を変更しても代謝変動が維持され、さらに *S. lavendulae*-*mwblA* 株においては相補実験で表現型が復帰することから、代謝変動の再現性が高い点において有用性がある。また、本手法は、少ない労力で対象菌株数を増やせるため網羅性が向上し、代謝変動の迅速な検出に寄与する。以上より、Target-AID 技術を利用した *wblA* の不活化が複数の放線菌の二次代謝活性化に活用できることを示した。

第4章 総括

本研究では、Target-AID 技術を利用した生合成遺伝子同定の適用範囲を拡大させると共に、同技術を用いた *wblA* の不活化が放線菌の二次代謝活性化に応用できることを実証した。その結果をまとめると以下ようになる。

第2章では、先行研究 (Tong *et al.*, 2019、Zhao *et al.*, 2020) に基づき、*ermE*^{*}p による sgRNA 発現ベクター (Tong *et al.*, 2019) と、dCas9-PmCDA1-UGI-LVA 融合タンパク質 (Zhao *et al.*, 2020) を組み合わせ、これらを放線菌用にコドン最適化した塩基編集ベクターを構築した。*S. coelicolor* A3(2)株においては、無作為に抽出した形質転換体のほぼ全てのクローン (49/50 クローン) において表現型の変化 (actinorhodin の生産能の欠失) が観察された。また、予想通り actinorhodin 生合成遺伝子 *actI-ORF2* に変異が導入されていたことから、構築した塩基編集ベクターが先行研究と同等以上の塩基編集効率で遺伝子を不活化できることを示した。加えて、これまで Target-AID 技術が未適用であった *S. lavendulae* FRI-5 株においても indigoidine 生合成遺伝子 *lbpA* を不活化し、Target-AID 技術が本菌株の遺伝子不活化にも適用できることを示した。また、*S. lavendulae* FRI-5 株の推定 lavencidin 生合成遺伝子 *ladA5* を不活化し、*ladA5* が lavencidin 生合成に関与することを実験的に証明し、BGC を決定した。さらに *in silico* 解析から lavencidin の生合成経路を提唱した。

第3章では、Target-AID 技術によりグローバルレギュレーター WblA を不活化し、複数の二次代謝産物の増大や野生株で検出されない新規代謝物の生産誘導に成功した。*wblA* の塩基配列が多く *Streptomyces* 属放線菌において高度に保存されていることを利用し、単一の標的配列を用いた汎用性の高い *wblA* 塩基編集プラスミドを構築した。このプラスミドを *S. coelicolor* A3(2)株と *S. lividans* TK21 株に導入したところ、形態分化の消失と共に actinorhodin と undecylprodigiosin の生産増大を観察した。また、*S. lavendulae*-*mwblA* 株においては indigoidine と lavencidin の生産量増大に加えて、複数の lavencidin 類縁体の生産量も増大した。さらに、*S. virginiae*-*mwblA* 株においては野生株では検出されない新規代謝物 (化合物 7) の生産が誘導された。これらの結果から、複数の放線菌において WblA が二次代謝を制御していることが示唆されると共に、Target-AID 技術を利用した *wblA* 不活化が放線菌の二次代謝活性化に有効であることを実証した。

本研究で明らかにした lavencidin 生合成機構の知見をもとに、LadA PKS への変異導入により基質特異性や酵素活性を変化させ、多様な生理活性を有する lavencidin 類縁体の創製が可能となる。また、本手法は、*wblA* が高度に保存されている他の様々な放線菌株に対して、単一の遺伝子改変プラスミドを同時に多数の放線菌株に導入し、代謝プロファイルを比較できる。このため、候補株の絞り込み時間が従来法に比べて大幅に短縮され、スクリーニングの高速化に繋げることができる。また、二次代謝を包括的に制御し、かつ代謝変動の再現性が高い *wblA* を標的とすることで、複数 BGC の同時活性化や新規化合物の発見が期待される。さらに、本手法は *WblA* 以外の配列保存性が高いグローバルレギュレーターに対しても適用可能であると考えられ、汎用性の高い手法と言える。以上より本研究では、Target-AID 技術を利用した様々な *Streptomyces* 属放線菌の塩基編集を通じて、二次代謝研究への活用法を拡大する有効なアプローチを提供した。本研究で得られた成果は、未解明の休眠 BGC の活性化、新規生理活性物質の創出、および微生物天然物を基盤とした創薬研究の加速に貢献すると期待される。

論文

1. **Otsuka R**, Sato Y, Okano K, Okamura E, Tomita H, Honda K, Kitani S. Identification of a critical gene involved in the biosynthesis of the polyene macrolide lavencidin in *Streptomyces lavendulae* FRI-5 using the Target-AID (activation-induced cytidine deaminase) base editing technology. *Appl Environ Microbiol.* 91: e00975-24. 2025.

※本博士論文 第2章に關与

2. Izumi M, Tomita H, Miyazaki K, **Otsuka R**, Honda K. Biosynthetic characterization of bacillibactin in thermophilic Bacillaceae and its potential for *in vitro* mutational synthesis. *ChemBioChem.* 26: e202400836. 2025.

学会発表

国際学会・シンポジウムにおける発表

1. ○ Otsuka Ryo. “Activation of cryptic *Streptomyces* secondary metabolism by site-directed mutagenesis of ribosomal RNA gene” The 24th Academic Exchange Seminar Between Shanghai Jiao Tong University And Osaka University. Online. November. 2022. (口頭発表)

国内学会・シンポジウムにおける発表

1. ○ 大塚遼、佐藤悠、岡野憲司、本田孝祐、木谷茂. 「*Streptomyces* 属放線菌における休眠遺伝子発現活性化を指向した塩基編集システムの開発」. 日本農芸化学会 2022 年度大会. 3B04-01. オンライン. 2022 年 3 月. (口頭発表)
2. ○ 大塚遼、佐藤悠、宮崎健太郎、本田孝祐、木谷茂. 「リボソーム遺伝子の部位選択的改変による放線菌二次代謝の活性化」. 2022 年度生物学若手研究者の集い. オンライン. 2022 年 5 月. (口頭発表)
3. ○ 大塚遼、佐藤悠、宮崎健太郎、本田孝祐、木谷茂. 「リボソーム遺伝子の部位選択的改変が放線菌二次代謝に及ぼす影響」. 第 36 回 日本放線菌学会大会. P-30C. 福井. 2022 年 9 月. (ポスター発表)
4. ○ 大塚遼、佐藤悠、宮崎健太郎、本田孝祐、木谷茂. 「翻訳制御部位の選択的変異導入による放線菌二次代謝の包括的影響」. 第 74 回 日本生物工学会大会. 2B02-07. オンライン. 2022 年 10 月. (口頭発表)
5. ○ 大塚遼、佐藤悠、岡村英治、本田孝祐、木谷茂. 「Target-AID 技術による *Streptomyces lavendulae* FRI-5 株のラベンシジン生合成遺伝子の同定」. 第 37 回 日本放線菌学会大会. P-47. 広島. 2023 年 9 月. (ポスター発表)
6. ○ 大塚遼、富田宏矢、宮崎健太郎、木谷茂、本田孝祐. 「グローバルレギュレーターの不活化による放線菌の二次代謝プロファイル変動の解析」. 日本農芸化学会 2025 年度大会. 札幌. 2025 年 3 月. (ポスター発表)

参考文献

1. Alberti F, Corre C. Editing streptomycete genomes in the CRISPR/Cas9 age. *Nat Prod Rep.* 36: 1237-1248. 2019.
2. Andersen JB, Sternberg C, Poulsen LK, Bjørn SP, Givskov M, Molin S. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 64: 2240-2246. 1998.
3. Ayed A, Wibberg D, Zendah el Euch I, Frese M, Limam F, Sewald N. Draft genome sequence of *Streptomyces tunisialis* DSM 105760^T. *Arch Microbiol.* 202: 2013-2017. 2020.
4. Baltz RH. Gifted microbes for genome mining and natural product discovery. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 44: 573-588. 2017.
5. Baltz RH. Natural product drug discovery in the genomic era: realities, conjectures, misconceptions, and opportunities. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 46: 281-299. 2019.
6. Bauman KD, Li J, Murata K, Mantovani SM, Dahesh S, Nizet V, Luhavaya H, Moore BS. Refactoring the cryptic streptophenazine biosynthetic gene cluster unites Phenazine, Polyketide, and Nonribosomal peptide biochemistry. *Cell Chem Biol.* 26: 724-736.e727. 2019.
7. Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang C-H, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.* 417: 141-147. 2002.
8. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot.* 65: 385-395. 2012.
9. Bibb MJ. Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol.* 8: 208-215. 2005.
10. Blažič M, Kosec G, Baebler Š, Gruden K, Petković H. Roles of the crotonyl-CoA carboxylase/reductase homologues in acetate assimilation and biosynthesis of immunosuppressant FK506 in *Streptomyces tsukubaensis*. *Microb Cell Fact.* 14: 164. 2015.
11. Blin K, Shaw S, Medema MH, Weber T. The antiSMASH database version 5. *Nucleic Acids Res.* gkaf1210. 2025.

12. Blodgett JAV, Zhang JK, Metcalf WW. Molecular cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the Phosphinothricin Tripeptide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 230-240. 2005.
13. Bode HB, Bethe B, Höfs R, Zeeck A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *ChemBioChem.* 3: 619-627. 2002.
14. Brautaset T, Sekurova ON, Sletta H, Ellingsen TE, Strøm AR, Valla S, Zotchev SB. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem Biol.* 7: 395-403. 2000.
15. Burg RW, Miller BM, Baker EE, Birnbaum J, Currie SA, Hartman R, Kong Y-L, Monaghan RL, Olson G, Putter I, Tunac JB, Wallick H, Stapley EO, Oiwa R, Ōmura S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob Agents Chemother.* 15: 361-367. 1979.
16. Bush MJ. The actinobacterial WhiB-like (Wbl) family of transcription factors. *Mol Microbiol.* 110: 663-676. 2018.
17. Caffrey P, Lynch S, Flood E, Finnan S, Oliynyk M. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem Biol.* 8: 713-723. 2001.
18. Cane DE. Programming of erythromycin biosynthesis by a modular polyketide synthase. *J Biol Chem.* 285: 27517-27523. 2010.
19. Chater KF. A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology.* 72: 9-28. 1972.
20. Chen S, Huang X, Zhou X, Bai L, He J, Jeong KJ, Lee SY, Deng Z. Organizational and mutational analysis of a complete FR-008/candididin gene cluster encoding a structurally related polyene complex. *Chem Biol.* 10: 1065-1076. 2003.
21. Chen Y, Wendt-Pienkowski E, Shen B. Identification and utility of FdmR1 as a *Streptomyces* antibiotic regulatory protein activator for fredericamycin production in *Streptomyces griseus* ATCC 49344 and heterologous hosts. *J Bacteriol.* 190: 5587-5596. 2008.
22. Chopra B, Dhingra AK. Natural products: A lead for drug discovery and development. *Phytother Res.* 35: 4660-4702. 2021.
23. Cobb RE, Wang Y, Zhao H. High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synth Biol.* 4: 723-728. 2015.

24. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE III, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream M-A, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 393: 537-544. 1998.
25. Crack JC, den Hengst CD, Jakimowicz P, Subramanian S, Johnson MK, Buttner MJ, Thomson AJ, Le Brun NE. Characterization of [4Fe-4S]-containing and cluster-free forms of *Streptomyces WhiD*. *Biochemistry*. 48: 12252-12264. 2009.
26. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *BBA Gen Subj*. 1830: 3670-3695. 2013.
27. Davis NK, Chater KF. The *Streptomyces coelicolor* whiB gene encodes a small transcription factor-like protein dispensable for growth but essential for sporulation. *Mol Gen Genet*. 232: 351-358. 1992.
28. Du D, Katsuyama Y, Onaka H, Fujie M, Satoh N, Shin-ya K, Ohnishi Y. Production of a novel amide-containing polyene by activating a cryptic biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. *Chembiochem*. 17: 1464-1471. 2016.
29. Feng L, Gordon MT, Liu Y, Basso KB, Butcher RA. Mapping the biosynthetic pathway of a hybrid polyketide-nonribosomal peptide in a metazoan. *Nature Communications*. 12:4912. 2021.
30. Fowler-Goldsworthy K, Gust B, Mouz S, Chandra G, Findlay KC, Chater KF. The actinobacteria-specific gene *wblA* controls major developmental transitions in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*. 157: 1312-1324. 2011.
31. Gao C, Hindra N, Mulder D, Yin C, Elliot MA. Crp is a global regulator of antibiotic production in *Streptomyces*. *mBio*. 3: e00304-12. 2012.
32. Gu L, Geders TW, Wang B, Gerwick WH, Håkansson K, Smith JL, Sherman DH. GNAT-like strategy for polyketide chain initiation. *Science*. 318: 970-974. 2007.
33. Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 1541-1546. 2003.

34. Hashimoto K, Nihira T, Sakuda S, Yamada Y. IM-2, a butyrolactone autoregulator, induces production of several nucleoside antibiotics in *Streptomyces* sp. FRI-5. *J Ferment Bioeng.* 73: 449-455. 1992.
35. He M, Varoglu M, Sherman DH. Structural modeling and site-directed mutagenesis of the actinorhodin β -ketoacyl-acyl carrier protein synthase. *J Bacteriol.* 182: 2619-2623. 2000.
36. Herrmann S, Siegl T, Luzhetska M, Petzke L, Jilg C, Welle E, Erb A, Leadlay PF, Bechthold A, Luzhetskyy A. Site-specific recombination strategies for engineering actinomycete genomes. *Appl Environ Microbiol.* 78: 1804-1812. 2012.
37. Hopwood DA. *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. *Oxford Univ Press.* 2007.
38. Hu S, Wang Y, Wang J, Liu K, Tang X, Gao J. *Streptomyces xanthii* sp. nov. and *Streptomyces roseirectus* sp. nov. isolated from a Chinese medicinal plant. *Int J Syst Evol Microbiol.* 71: 004962. 2021.
39. Huang H, Hou L, Li H, Qiu Y, Ju J, Li W. Activation of a plasmid-situated type III PKS gene cluster by deletion of a wbl gene in deepsea-derived *Streptomyces somaliensis* SCSIO ZH66. *Microb Cell Fact.* 15: 116. 2016.
40. Huang X, Ma T, Tian J, Shen L, Zuo H, Hu C, Liao G. *wblA*, a pleiotropic regulatory gene modulating morphogenesis and daptomycin production in *Streptomyces roseosporus*. *J Appl Microbiol.* 123: 669-677. 2017.
41. Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol.* 51: 72-80. 2019.
42. Iizaka Y, Higashi N, Ishida M, Oiwa R, Ichikawa Y, Takeda M, Anzai Y, Kato F. Function of cytochrome P450 enzymes RosC and RosD in rosamicin biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 1529-1531. 2013.
43. Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Ōmura S. Complete genome sequence and comparative analysis of *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol.* 21: 526-531. 2003.
44. Ji CH, Kim JP, Kang HS. Library of synthetic *Streptomyces* regulatory sequences for use in promoter engineering of natural product biosynthetic gene clusters. *ACS Synth Biol.* 7: 1946-1955. 2018.

45. Jiang H, Wang YY, Guo YY, Shen JJ, Zhang XS, Luo HD, Ren NN, Jiang XH, Li YQ. An acyltransferase domain of FK 506 polyketide synthase recognizing both an acyl carrier protein and coenzyme A as acyl donors to transfer allylmalonyl and ethylmalonyl units. *FEBS J.* 282: 2527-2539. 2015.
46. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 337: 816-821. 2012.
47. Jones AC, Gust B, Kulik A, Heide L, Buttner MJ, Bibb MJ. Phage P1-derived artificial chromosomes facilitate heterologous expression of the FK506 gene cluster. *PLoS One.* 8: e69319. 2013.
48. Kieser T, Bibb M, Buttner M, Chater K, Hopwood D. Practical streptomyces genetics. *John Innes Foundation.* 2000.
49. Kim JS, Lee HN, Kim P, Lee HS, Kim ES. Negative role of *wblA* in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor*. *J Microbiol Biotechnol.* 22: 736-741. 2012.
50. Kim SH, Lee HN, Kim HJ, Kim ES. Transcriptome analysis of an antibiotic downregulator mutant and synergistic actinorhodin stimulation via disruption of a precursor flux regulator in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol.* 77: 1872-1877. 2011.
51. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 533: 420-424. 2016.
52. König CC, Scherlach K, Schroeckh V, Horn F, Nietzsche S, Brakhage AA, Hertweck C. Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem.* 14: 938-942. 2013.
53. Koomsiri W, Inahashi Y, Leetanasaksakul K, Shiomi K, Takahashi Y, Ōmura S, Samborsky M, Leadlay PF, Wattana-Amorn P, Thamchaipenet A, Nakashima T. Sarpeptins A and B, lipopeptides produced by *Streptomyces* sp. KO-7888 overexpressing a specific SARP regulator. *J Nat Prod.* 82: 2144-2151. 2019.
54. Kurniawan YN, Kitani S, Maeda A, Nihira T. Differential contributions of two SARP family regulatory genes to indigoidine biosynthesis in *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98: 9713-9721. 2014.
55. Lai JR, Koglin A, Walsh CT. Carrier protein structure and recognition in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Biochemistry.* 45: 14869-14879. 2006.

56. Lee HN, Huang J, Im JH, Kim SH, Noh JH, Cohen SN, Kim ES. Putative TetR family transcriptional regulator SCO1712 encodes an antibiotic downregulator in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Environ Microbiol*. 76: 3039-3043. 2010.
57. Lewis K. The science of antibiotic discovery. *Cell*. 181: 29-45. 2020.
58. Lewis K. Recover the lost art of drug discovery. *Nature*. 485: 439-440. 2012.
59. Li H, Hu Y, Zhang Y, Ma Z, Bechthold A, Yu X. Identification of RimR2 as a positive pathway-specific regulator of rimocidin biosynthesis in *Streptomyces rimosus* M527. *Microb Cell Fact*. 22: 32. 2023.
60. Li K, Man Y, Liu J, Liu Z, Ma H, Zhu H, Zhou Y, Zhang C, Zhou X. *Streptomyces liliifuscus* sp. nov and an anti-ginger plague agent *Streptomyces liliiviolaceus* sp. nov, two novel species isolated from soil of *Lilium lancifolium*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 72: 005340. 2022.
61. Li L, Zhao Y, Ruan L, Yang S, Ge M, Jiang W, Lu Y. A stepwise increase in pristinamycin II biosynthesis by *Streptomyces pristinaespiralis* through combinatorial metabolic engineering. *Metab Eng*. 29: 12-25. 2015.
62. Li S, Liu Q, Zhong Z, Deng Z, Sun Y. Exploration of hygromycin B biosynthesis utilizing CRISPR-Cas9-associated base editing. *ACS Chem Biol*. 15: 1417-1423. 2020.
63. Li Y, Kong L, Shen J, Wang Q, Liu Q, Yang W, Deng Z, You D. Characterization of the positive SARP family regulator PieR for improving piericidin A1 production in *Streptomyces piomogeues* var. *Hangzhouwanensis*. *Synth Syst Biotechnol*. 4: 16-24. 2019.
64. Lincke T, Behnken S, Ishida K, Roth M, Hertweck C. Closthioamide: an unprecedented polythioamide antibiotic from the strictly anaerobic bacterium *Clostridium cellulolyticum*. *Angew Chem Int Ed Engl*. 49: 2011-2013. 2010.
65. Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 77:112-143. 2013.
66. Liu L, Tang MC, Tang Y. Fungal highly reducing polyketide syntheses biosynthesize salicylaldehydes that are precursors to epoxycyclohexenol natural products. *J Am Chem Soc*. 141: 19538-19541. 2019.
67. Liu Z, Zhao C, Huang C, Luo Y. Recent advances in silent gene cluster activation in *Streptomyces*. *Front Bioeng Biotechnol*. 9: 632230. 2021.
68. Loman NJ, Pallen MJ. Twenty years of bacterial genome sequencing. *Nat Rev Microbiol*. 13: 787-794. 2015.

69. Lu C, Liao G, Zhang J, Tan H. Identification of novel tylosin analogues generated by a *wblA* disruption mutant of *Streptomyces ansochromogenes*. *Microb Cell Fact*. 14:173. 2015.
70. Luo J, Chia N, Qin Y, Tan P, Zhang L, Yang S, Yuan Z, Hong L, Lee SY, Tong Y. STAGE: A compact and versatile TnpB-based genome editing toolkit for *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 122: e2509146122. 2025.
71. Luo S, Zhu J, Zhang H, Wen Y, Wang X, Chen L, Deng L, Yang M. The LuxR family regulator SAV111 enhances avermectin production by binding to *aveA1* gene promoter in *Streptomyces avermitilis*. *Arch Microbiol*. 208: 28. 2025.
72. Luo Y, Huang H, Liang J, Wang M, Lu L, Shao Z, Cobb RE, Zhao H. Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster. *Nat Commun*. 4: 2894. 2013.
73. Macneil DJ. Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. *J Bacteriol*. 170: 5607-5612. 1988.
74. Malpartida F, Hopwood DA. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature*. 309: 462-464. 1984.
75. Mao D, Okada BK, Wu Y, Xu F, Seyedsayamdost MR. Recent advances in activating silent biosynthetic gene clusters in bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 45: 156-163. 2018.
76. Mo S, Yoon YJ. Interspecies complementation of the LuxR family pathway-specific regulator involved in macrolide biosynthesis. *J Microbiol Biotechnol*. 26: 66-71. 2016.
77. Murakami T, Holt TG, Thompson CJ. Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J Bacteriol*. 171: 1459-1466. 1989.
78. Nah JH, Park SH, Yoon HM, Choi SS, Lee CH, Kim ES. Identification and characterization of *wblA*-dependent *tmcT* regulation during tautomycetin biosynthesis in *Streptomyces* sp. CK4412. *Biotechnol Adv*. 30: 202-209. 2012.
79. Nah HJ, Park J, Choi S, Kim ES. WblA, a global regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 48: kuab007. 2021.
80. Nguyen KT, Tenor J, Stettler H, Nguyen LT, Nguyen LD, Thompson CJ. Colonial Differentiation in *Streptomyces coelicolor* Depends on Translation of a Specific Codon within the *adpA* Gene. *J Bacteriol*. 185: 7291-7296. 2003.

81. Nie L, Cao M, Ji Q, Gao Y, Wang S, Lyu Y, Feng Z. Regulated expression of an environmental DNA-derived type II polyketide gene cluster in *Streptomyces* hosts identified a new tetracenomycin derivative TCM Y. *Curr Microbiol.* 79: 336. 2022.
82. Nies J, Ran H, Wohlgemuth V, Yin WB, Li SM. Biosynthesis of the prenylated salicylaldehyde flavoglaucon requires temporary reduction to salicyl alcohol for decoration before reoxidation to the final product. *Org Lett.* 22: 2256-2260. 2020.
83. Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A. Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science.* 353: aaf8729. 2016.
84. Nishikawa T, Gulbahce N, Motter AE. Spontaneous reaction silencing in metabolic optimization. *PLoS Comput Biol.* 4: e1000236. 2008.
85. Noh JH, Kim SH, Lee HN, Lee SY, Kim ES. Isolation and genetic manipulation of the antibiotic down-regulatory gene, wblA ortholog for doxorubicin-producing *Streptomyces* strain improvement. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:1145-1153. 2010.
86. Ohnishi Y, Ishikawa J, Hara H, Suzuki H, Ikenoya M, Ikeda H, Yamashita A, Hattori M, Horinouchi S. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J Bacteriol.* 190(11):4050-4060. 2008.
87. Oliynyk M, Samborsky M, Lester JB, Mironenko T, Scott N, Dickens S, Haydock SF, Leadlay PF. Complete genome sequence of the erythromycin-producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338. *Nat Biotechnol.* 25(4):447-453. 2007.
88. Omura S. Macrolide antibiotics: chemistry, biology, and practice. *Academic Press.* 2002.
89. Onaka H, Mori Y, Igarashi Y, Furumai T. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces species*. *Appl Environ Microbiol.* 77: 400-406. 2011.
90. Pait IGU, Kitani S, Kurniawan YN, Asa M, Iwai T, Ikeda H, Nihira T. Identification and characterization of *lbpA*, an indigoidine biosynthetic gene in the γ -butyrolactone signaling system of *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J Biosci Bioeng.* 124(4):369-375. 2017.
91. Pait IGU, Kitani S, Roslan FW, Ulanova D, Arai M, Ikeda H, Nihira T. Discovery of a new diol-containing polyketide by heterologous expression of a silent biosynthetic gene cluster from *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 45: 77-87. 2018.
92. Payne SH. The utility of protein and mRNA correlation. *Trends Biochem Sci.* 40: 1-3. 2015.

93. Peter M, Li SM. Cupin-domain containing protein is not essential for the alkyl salicylaldehyde formation in *Aspergillus ustus*. *Chem Commun.* 60: 11556-11559. 2024.
94. Pulsawat N, Kitani S, Nihira T. Characterization of biosynthetic gene cluster for the production of virginiamycin M, a streptogramin type A antibiotic, in *Streptomyces virginiae*. *Gene.* 393: 31-42. 2007.
95. Rabyk M, Ostash B, Rebets Y, Walker S, Fedorenko V. *Streptomyces ghanaensis* pleiotropic regulatory gene *wblA_{gh}* influences morphogenesis and moenomycin production. *Biotechnol Lett.* 33: 2481-2486. 2011.
96. Raja A, LaBonte J, Lebbos J, Kirkpatrick P. Daptomycin. *Nat Rev Drug Discov.* 2: 943-944. 2003.
97. Reid R, Piagentini M, Rodriguez E, Ashley G, Viswanathan N, Carney J, Santi DV, Hutchinson CR, McDaniel R. A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases. *Biochemistry.* 42: 72-79. 2003.
98. Rigali S, Titgemeyer F, Barends S, Mulder S, Thomae AW, Hopwood DA, Van Wezel GP. Feast or famine: the global regulator DasR links nutrient stress to antibiotic production by *Streptomyces*. *EMBO Rep.* 9: 670-675. 2008.
99. Robbins T, Liu YC, Cane DE, Khosla C. Structure and mechanism of assembly line polyketide synthases. *Curr Opin Struct Biol.* 41: 10-18. 2016.
100. Rutledge PJ, Challis GL. Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat Rev Microbiol.* 13: 509-523. 2015.
101. Schatz A, Bugie E, Waksman SA. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc Soc Exp Biol Med.* 55: 66-69. 1944.
102. Scherlach K, Hertweck C. Discovery of aspoquinolones A–D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining. *Org Biomol Chem.* 4: 3517-3520. 2006.
103. Schroeckh V, Scherlach K, Nützmann H-W, Shelest E, Schmidt-Heck W, Schuermann J, Martin K, Hertweck C, Brakhage AA. Intimate bacterial–fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106: 14558-14563. 2009.
104. Sensi P. Rifomycin, a new antibiotic-Preliminary report. *Il Farmaco.* 14: 146. 1959.
105. Siegl T, Petzke L, Welle E, Luzhetskyy A. I-SceI endonuclease: a new tool for DNA repair studies and genetic manipulations in streptomyces. *Appl Microbiol Biotechnol.* 87:1525-1532. 2010.
106. Silver LL. Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev.* 24: 71-109. 2011.

107. Sladič G, Urukalo M, Kirn M, Lešnik U, Magdevska V, Benički N, Pelko M, Gasparič A, Raspor P, Polak T, Fujs Š, Hoskisson PA, Petković H. Identification of lipstatin-producing ability in *Streptomyces virginiae* CBS 314.55 using dereplication approach. *Food Technol Biotechnol*. 52: 276-284. 2014.
108. Solecki RS, Shanidar IV. a Neanderthal flower burial in northern Iraq. *Science*. 190: 880-881. 1975.
109. Soliveri JA, Gomez J, Bishai WR, Chater KF. Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene *whiB* are present in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Microbiology*. 146: 333-343. 2000.
110. Staunton J, Weissman KJ. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep*. 18: 380-416. 2001.
111. Staunton J, Wilkinson B. Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. *Chem Rev*. 97: 2611-2630. 1997.
112. Sun D, Liu C, Zhu J, Liu W. Connecting metabolic pathways: Sigma factors in *Streptomyces* spp. *Front Microbiol*. 8: 2546. 2017.
113. Sun H, Ho CL, Ding F, Soehano I, Liang ZX. Synthesis of (R)-mellein by a partially reducing iterative polyketide synthase. *J Am Chem Soc*. 134: 11924-11927. 2012.
114. Tanaka Y, Hosaka T, Ochi K. Rare earth elements activate the secondary metabolite-biosynthetic gene clusters in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Antibiot*. 63: 477-481. 2010.
115. Tang L, Yoon YJ, Choi CY, Hutchinson CR. Characterization of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase involved in rifamycin B biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei*. *Gene*. 216: 255-265. 1998.
116. Shiina T, Tanaka K, Takahashi H. Sequence of *hrdB*, an essential gene encoding sigma-like transcription factor of *Streptomyces coelicolor* A3(2): homology to principal sigma factors. *Gene*. 107: 145-148. 1991.
117. Thind TS, Hollomon DW. Thiocarbamate fungicides: reliable tools in resistance management and future outlook. *Pest Manag Sci*. 74: 1547-1551. 2018.
118. Thong WL, Shin-Ya K, Nishiyama M, Kuzuyama T. Methylbenzene-containing polyketides from a *Streptomyces* that spontaneously acquired rifampicin resistance: structural elucidation and biosynthesis. *J Nat Prod*. 79: 857-864. 2016.
119. Tong Y, Charusanti P, Zhang L, Weber T, Lee SY. CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes. *ACS Synth Biol*. 4: 1020-1029. 2015.

120. Tong Y, Robertsen HL, Blin K, Weber T, Lee SY. CRISPR-Cas9 toolkit for actinomycete genome editing. *Methods Mol Biol.* 1671: 163-184. 2018.
121. Tong Y, Whitford CM, Robertsen HL, Blin K, Jørgensen TS, Klitgaard AK, Gren T, Jiang X, Weber T, Lee SY. Highly efficient DSB-free base editing for streptomycetes with CRISPR-BEST. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 116: 20366-20375. 2019.
122. Tong Y, Whitford CM, Blin K, Jørgensen TS, Weber T, Lee SY. CRISPR-Cas9, CRISPRi and CRISPR-BEST-mediated genetic manipulation in streptomycetes. *Nat Protoc.* 15: 2470-2502. 2020.
123. Umezawa H, Ueda M, Maeda K, Yagishita K, Kondō S, Okami Y, Utahara R, Ōsato Y, Nitta K, Takeuchi T. Production and isolation of a new antibiotic, kanamycin. *J Antibiot Ser A.* 10: 181-188. 1957.
124. Van der Heul HU, Bilyk BL, McDowall KJ, Seipke RF, Van Wezel GP. Regulation of antibiotic production in Actinobacteria. *Nat Prod Rep.* 35: 575-604. 2018.
125. Van Wezel GP, McDowall KJ. The regulation of the secondary metabolism of *Streptomyces*: new links and experimental advances. *Nat Prod Rep.* 28: 1311-1333. 2011.
126. Walsh CT, Fischbach MA. Natural products version 2.0: connecting genes to molecules. *J Am Chem Soc.* 132: 2469-2493. 2010.
127. Wang B, Guo F, Huang C, Zhao H. Unraveling the iterative type I polyketide synthases hidden in *Streptomyces*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117: 8449-8454. 2020.
128. Wang D. Discrepancy between mRNA and protein abundance: insight from information retrieval process in computers. *Comput Biol Chem.* 32: 462-468. 2008.
129. Wang J, Wang K, Deng Z, Zhong Z, Sun G, Mei Q, Zhou F, Deng Z, Sun Y. Engineered cytosine base editor enabling broad-scope and high-fidelity gene editing in *Streptomyces*. *Nat Commun.* 15: 5687. 2024.
130. Whitford CM, Gren T, Palazzotto E, Lee SY, Tong Y, Weber T. Systems analysis of highly multiplexed CRISPR-base editing in streptomycetes. *ACS Synth Biol.* 12: 2353-2366. 2023.
131. Wilkening I, Gazzola S, Riva E, Parascandolo JS, Song L, Tosin M. Second-generation probes for biosynthetic intermediate capture: towards a comprehensive profiling of polyketide assembly. *Chemical Communications.* 52:10392-10395. 2016.

132. Wolański M, Płachetka M, Naumouskaya V, Strzałka A, Tracz M, Valietova D, Zakrzewska-Czerwińska J. AdpA, a Global Regulator of Hundreds of Genes, Including Those for Secondary Metabolism, in *Streptomyces venezuelae*. *Antibiotics*. 14:878. 2025.
133. Wu J, Zaleski TJ, Valenzano C, Khosla C, Cane DE. Polyketide double bond biosynthesis. Mechanistic analysis of the dehydratase-containing module 2 of the picromycin/methymycin polyketide synthase. *J Am Chem Soc*. 127: 17393-17404. 2005.
134. Wu P, Pan H, Zhang C, Wu H, Yuan L, Huang X, Zhou Y, Ye B-C, Weaver DT, Zhang L, Zhang B. SACE_3986, a TetR family transcriptional regulator, negatively controls erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 41: 1159-1167. 2014.
135. Wu QB, Chen XA, Lv ZY, Zhang XY, Liu Y, Li YQ. Activation and discovery of tsukubarubicin from *Streptomyces tsukubaensis* through overexpressing SARPs. *Appl Microbiol Biotechnol*. 105: 4731-4741. 2021.
136. Xu J, Zhang J, Zhuo J, Li Y, Tian Y, Tan H. Activation and mechanism of a cryptic oviedomycin gene cluster via the disruption of a global regulatory gene, *adpA*, in *Streptomyces ansiochromogenes*. *J Biol Chem*. 292: 19708-19720. 2017.
137. Xu M, Wang Y, Zhao Z, Gao G, Huang SX, Kang Q, He X, Lin S, Pang X, Deng Z, Tao M. Functional genome mining for metabolites encoded by large gene clusters through heterologous expression of a whole-genome bacterial artificial chromosome library in *Streptomyces* spp. *Appl Environ Microbiol*. 82: 5795-5805. 2016.
138. Xu Z, Li Y. A MarR-family transcriptional factor MapR positively regulates actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor*. *FEMS Microbiol Lett*. 367: fnaa140. 2020.
139. Yan H, Lu X, Sun D, Zhuang S, Chen Q, Chen Z, Li J, Wen Y. BldD, a master developmental repressor, activates antibiotic production in two *Streptomyces* species. *Mol Microbiol*. 113: 123-142. 2020.
140. Yan L, Zhang Q, Virolle MJ, Xu D. In conditions of over-expression, WbII, a WhiB-like transcriptional regulator, has a positive impact on the weak antibiotic production of *Streptomyces lividans* TK24. *PLoS One*. 12: e0174781. 2017.
141. Yan X, Ge H, Huang T, Hindra, Yang D, Teng Q, Crnovčić I, Li X, Rudolf JD, Lohman JR, Gansemans Y, Zhu X, Huang Y, Zhao L-X, Jiang Y, Van Nieuwerburgh F, Rader C, Duan Y, Shen B. Strain prioritization and genome mining for enediyne natural products. *MBio*. 7: e02104-16. 2016.

142. Yan Y, Xia H. The roles of SARP family regulators involved in secondary metabolism in *Streptomyces*. *Front Microbiol.* 15: 1368809. 2024.
143. Yan YS, Yang YQ, Zhou LS, Zhang L, Xia HY, MilR3. a unique SARP family pleiotropic regulator in *Streptomyces bingchenggensis*. *Arch Microbiol.* 204: 631. 2022.
144. Yang R, Feng J, Xiang H, Cheng B, Shao L-D, Li Y-P, Wang H, Hu Q-F, Xiao W-L, Matsuda Y, Wang WG. Ketoreductase domain-catalyzed polyketide chain release in fungal alkyl salicylaldehyde biosynthesis. *J Am Chem Soc.* 145: 11293-11300. 2023.
145. Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics.* 13:134. 2012.
146. Yoshioka T, Igarashi Y, Namba T, Ueda S, Pait IGU, Nihira T, Kitani S. Lavencidin, a polyene macrolide antibiotic from *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J Antibiot.* 74: 359-362. 2021.
147. Yu P, Liu SP, Bu QT, Zhou ZX, Zhu ZH, Huang FL, Li YQ. WblAch, a pivotal activator of natamycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces chattanoogensis* L10, is positively regulated by AdpAch. *Appl Environ Microbiol.* 80: 6879-6887. 2014.
148. Zhang F, Gao D, Lin J, Zhu M, Zhuang Z, Duan Y, Zhu X. Construction of inducible genetic switch for the global regulator WblA to sustain both overproduction of tiancimycins and on-demand sporulation in *Streptomyces* sp. CB03234. *ACS Synth Biol.* 9: 1460-1467. 2020.
149. Zhang Q, Chen Q, Zhuang S, Chen Z, Wen Y, Li J. A MarR family transcriptional regulator, DptR3, activates daptomycin biosynthesis and morphological differentiation in *Streptomyces roseosporus*. *Appl Environ Microbiol.* 81: 3753-3765. 2015.
150. Zhang Q, Pang B, Ding W, Liu W. Aromatic polyketides produced by bacterial iterative type I polyketide synthases. *ACS Catalysis.* 3: 1439-1447. 2013.
151. Zhang Q, Ren JW, Wang W, Zhai J, Yang J, Liu N, Huang Y, Chen Y, Pan G, Fan K. A versatile transcription-translation in one approach for activation of cryptic biosynthetic gene clusters. *ACS Chem Biol.* 15: 2551-2557. 2020.
152. Zhang Y, Yun K, Huang H, Tu R, Hua E, Wang M. Antisense RNA interference-enhanced CRISPR/Cas9 base editing method for improving base editing efficiency in *Streptomyces lividans* 66. *ACS Synth Biol.* 10: 1053-1063. 2021.
153. Zhang Y, Zou Z, Niu G, Tan H. *jadR* and *jadR2* act synergistically to repress jadomycin biosynthesis. *Sci China Life Sci.* 56: 584-590. 2013.

154. Zhao Y, Tian J, Zheng G, Chen J, Sun C, Yang Z, Zimin AA, Jiang W, Deng Z, Wang Z, Lu Y. Multiplex genome editing using a dCas9-cytidine deaminase fusion in *Streptomyces*. *Sci China Life Sci.* 63: 1053-1062. 2020.
155. Zhao Z, Ying Y, Hung YS, Tang Y. Genome mining reveals *Neurospora crassa* can produce the salicylaldehyde sordarial. *J Nat Prod.* 82: 1029-1033. 2019.
156. Zhigang W, Smith DG, Mosbaugh DW. Overproduction and characterization of the uracil-DNA glycosylase inhibitor of bacteriophage PBS2. *Gene.* 99: 31-37. 1991.

謝辞

本論文は、筆者が大阪大学大学院 工学研究科 生物工学専攻において遂行した研究をまとめたものです。

本研究の遂行にあたって、終始熱心な御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学 生物工学国際交流センター 本田孝祐 教授、富田宏矢 准教授に謹んで感謝の意を表させていただきます。

本論文の作成にあたって、有益な御指導、御助言、および御校閲を賜りました大阪大学大学院 工学研究科 福崎英一郎 教授、關光 教授に厚く感謝申し上げます。

また、研究活動における懇切丁寧なご指導ならびに日頃からの貴重な御助言を頂きました青山学院大学 理工学部 化学・生命科学科 木谷茂 教授、大阪大学 生物工学国際交流センター 宮崎健太郎 特任教授に心から感謝申し上げます。

本論文第2章におけるプラスミドの提供と第2章に關与する投稿論文作成、ならびに温かい御指導、御助言を頂きました関西大学 化学生命工学部 生命・生物工学科 岡野憲司 准教授、山口大学 農学部 生物機能科学科 佐藤悠 助教、青山学院大学 理工学部 化学・生命科学科 岡村英治 助教に心より感謝申し上げます。

そして、本研究を遂行するに際し、常に温かい激励をくださり、互いに励ましあいながら研究生を送ってきた大阪大学 生物工学国際交流センター 分子微生物学研究室（本田研究室）の先生方、特任研究員、技術補佐員、事務補佐員の皆様、卒業生の先輩方、同期、後輩、そして現役学生諸氏、皆様の支えなくして筆者が本博士論文をまとめ上げることはできませんでした。心から感謝の意を表させていただきます。

尚、本研究は国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）および大阪大学 学際融合を推進し社会実装を担う次世代挑戦的研究者育成プロジェクト（グラント番号: JPMJSP2138）の助成を受け、遂行いたしました。

最後に、長きにわたり大学・大学院で学ぶ機会を与えてくださり、また有意義な学生生活を送るにあたり、これまで私を精神的、経済的に支援してくださった家族の皆様、そしていつも応援し続けてくれた多くの友人に深い感謝の意を表して謝辞といたします。