



Title	Characterization of the biosynthetic gene cluster for maklamicin, a spirotetrone-class antibiotic of the endophytic <i>Micromonospora</i> sp. NBRC 110955
Author(s)	Daduang, Ratama
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/55952
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Ratama Daduang)

Title

Characterization of the biosynthetic gene cluster for maklamicin, a spirotetrone-class antibiotic of the endophytic *Micromonospora* sp. NBRC 110955
 植物内生放線菌由来スピロテトロン酸系抗生物質マクラマイシン生合成遺伝子群の機能解析

Abstract of Thesis

The spirotetrone antibiotics are a class of polyketide natural products that exhibit broad biological activities, including antibacterial and antitumor activities. They have a distinct chemical structure of a *trans*-decalin moiety conjugated with tetroneate moiety spiro-linked to a cyclohexene ring. Maklamicin was isolated from an endophytic actinomycete *Micromonospora* sp. NBRC 110955 as a new spirotetrone antibiotic with antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. Although almost 60 related spirotetrone antibiotics have been reported from actinomycetes, maklamicin has two unique structural features. First, maklamicin contains a stereogenic center on the substituent of the cyclohexene ring, whereas other spirotetrone antibiotics have an achiral substituent at the same position such as methyl and formyl. Second, the carbon chain connecting the decalin and the cyclohexene units in maklamicin is the shortest ever reported. In this work, we report genetic information to understand biosynthetic mechanisms underlying these two distinct characteristics of maklamicin.

The 152 kb DNA region including maklamicin (*mak*) biosynthetic gene cluster was identified by an *in silico* screening on the *Micromonospora* sp. NBRC 110955 contig database, using glycerate utilization operon that is necessary for the biosynthesis of the tetroneate moiety, together with screening and sequencing of cosmid and BAC clones. Gene disruption analysis and sequence analysis indicated that four typical modular type I PKS genes (*makA1-makA4*) encoding 12 modules are responsible for the polyketide assembly process. A set of five genes (*makB1-makB5*) is highly conserved in the biosynthetic gene clusters of spirotetrone antibiotics, and *makC2*, a cytochrome P450 gene, is estimated to be involved in the modification step to attach the hydroxyl group. Furthermore, the deoxy-maklamicin, produced by the *makC2* disruptant, displayed stronger bioactivity against *Staphylococcus aureus* compared to that of maklamicin. These results provide us the useful information for not only understanding the biosynthetic mechanism of spirotetrone antibiotics but also generating derivatives of maklamicin with significant bioactivity.

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (Rata ma Daduang)			
	(職)	氏名	
論文審査担当者	主査	教授	仁平 順也
	副査	教授	福崎 英一郎
	副査	教授	渡邊 肇
	副査	教授	紀ノ岡 正博
	副査	教授	福井 希一
	副査	教授	村中 俊哉
	副査	教授	大政 健史
	副査	教授	藤山 和仁
	副査	教授	永井 健治

論文審査の結果の要旨

スピロテトロン酸系抗生物質は、スピロテトロン酸構造を含むポリケタيد化合物であり、抗菌活性や抗がん活性などの多様な生理活性を示す化合物群である。このスピロテトロン酸構造は、多くの場合、そのスピロ結合するシクロヘキセン環を介して、*trans*-デカルン基と結合する。この特徴的な構造に対し、化学修飾が施されることにより、化学構造の多様性が生じている。したがって、スピロテトロン酸系抗生物質の生合成機構を遺伝子レベルで解明することができれば、スピロテトロン酸系抗生物質の構造多様性を創出できると考えられる。本論文は、植物内生放線菌 *Micromonospora* sp. NBRC110955 が生産するスピロテトロン酸系抗生物質マクラマイシンの生合成機構に関わる遺伝子群を同定し、マクラマイシン特有の化学構造を産み出す生合成機構を解明するのと同時に、詳細な代謝物解析から、マクラマイシン類縁体を新規天然物として同定したものである。得られた知見を要約すると以下の通りである。

- 1) *In silico* ゲノム解析からマクラマイシン生合成遺伝子群を推定し、遺伝子破壊解析により、この遺伝子群がマクラマイシン生合成遺伝子であることを明らかにしている。生合成遺伝子の機能解析から、マクラマイシンの特有構造である 31 位水酸基は I 型ポリケタيد合成酵素により、またマクラマイシンに含まれる大環状構造は、I 型ポリケタيد合成酵素の特定ドメインの機能変異により生じていることを解明している。一方、マクラマイシン生合成遺伝子群と他の生合成遺伝子群の比較から、スピロテトロン酸系抗生物質の生合成機構に必須な遺伝子群を推測し、新たな生合成酵素の存在を示唆している。
- 2) マクラマイシン生合成遺伝子群に含まれるシトクロム P450 遺伝子の機能に着目した結果、*makC2* 遺伝子が 29 位の水酸化を担っていることを遺伝子破壊解析と酵素機能解析などにより明らかにし、スピロテトロン酸系抗生物質の生合成機構解明において、初のシトクロム P450 遺伝子機能解析に成功している。また、遺伝子破壊株の代謝物解析より、マクラマイシン類縁体を新規天然物として同定している。

以上のように、本論文では、マクラマイシン特有な化学構造を生合成する機構とスピロテトロン酸系抗生物質の生合成機構に保存される酵素群の存在を明らかにし、遺伝子改変により新たなマクラマイシン類縁体の取得に成功している。本研究で得られた成果は、新規スピロテトロン酸系抗生物質の効率的な探索を可能とし、スピロテトロン酸系抗生物質の構造多様性創出に関する研究に大きな影響を与えるものと期待される。

よって、本論文は、博士論文として価値あるものと認める。