



Title	Discovery of cryptic compounds from <i>Streptomyces lavendulae</i> FRI-5 using an engineered microbial host
Author(s)	Pait, Ivy Grace
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69537
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 (Ivy Grace Umadhy Pait)	
Title	Discovery of cryptic compounds from <i>Streptomyces lavendulae</i> FRI-5 using an engineered microbial host (異種発現系の活用による放線菌休眠化合物の覚醒と同定)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>Members of the genus <i>Streptomyces</i> are prolific producers of antibiotics, in addition to anti-hypertensives, immunosuppressants and other clinically-relevant compounds. Traditional bioactivity-based screenings are often laborious and are constantly hindered by the frequent rediscovery of known compounds. From massive DNA sequencing data, the genome of streptomycetes has the ability to produce many novel and potentially useful bioactive compounds, but most of which are not produced under standard laboratory cultivation conditions and are referred to as "silent/cryptic" secondary metabolites. Through the targeted activation of the biosynthetic gene clusters (BGCs) for these "cryptic" compounds, we can potentially isolate and identify novel natural products and circumvent the historical problem of rediscovery.</p> <p><i>Streptomyces lavendulae</i> FRI-5 predominantly produces 4 compounds controlled by a <i>Streptomyces</i> hormone, IM-2 and its receptor FarA. However, this strain may also have the potential to biosynthesize more useful secondary metabolites. This work aimed to discover and identify cryptic metabolites from <i>Streptomyces lavendulae</i> FRI-5 by expressing its uncharacterized BGCs into an engineered <i>Streptomyces</i> host, <i>Streptomyces avermitilis</i> SUKA22. SUKA22 is a derivative of the avermectin industrial producer, <i>S. avermitilis</i>, in which DNA segments for majority of its endogenous gene clusters were deleted such that its primary metabolism-derived precursors and biochemical energy can be effectively exploited for the production of heterologous compounds. Here, several uncharacterized biosynthetic genes were identified from <i>S. lavendulae</i> FRI-5, including a putative indigoidine biosynthetic gene (<i>IbpA</i>), a unique angucycline gene cluster (<i>lac</i> cluster) and a transcriptionally silent gene cluster (<i>lav</i> cluster) for an unpredictable polyketide. These biosynthetic genes were cloned and introduced into the genome of <i>S. avermitilis</i> SUKA22 to reveal their corresponding products. Heterologous expression of <i>IbpA</i>, encoding a plausible nonribosomal peptide synthetase, in the versatile model host led to indigoidine production, which was enhanced dramatically by precursor feeding. These results confirmed that LbpA is an indigoidine biosynthetic enzyme in the IM-2 signaling cascade. Meanwhile, the engineered SUKA22 strain carrying the <i>lav</i> cluster produced compound 1 (named lavendiol) and other minor compounds that were undetectable in the culture broth of <i>S. lavendulae</i> FRI-5. Using various spectroscopic analyses, the chemical structure of lavendiol was elucidated as a new diol-containing polyketide. The proposed lavendiol assembly line shows a unique biosynthetic mechanism for polyketide compounds and a possible biosynthetic route for related Streptenol-family compounds. The results of this work exemplify the possibility of discovering new compounds from streptomycetes by genome mining and heterologous expression of cryptic BGCs in a genome-minimized host.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (Ivy Grace Umadhay Pait)		
論文審査担当者	(職)	氏名
	主査	教授 仁平 卓也
	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 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

土壤微生物として知られる放線菌は、抗生物質に代表される生理活性物質を二次代謝産物として生産する産業微生物である。この放線菌のゲノムには、二次代謝産物を合成すると考えられる遺伝子クラスターが 20~40 ものコードされているが、その多くが発現していない休眠状態にある。これらの休眠化合物群を生産覚醒させることができれば、新規天然物の発見や新奇生合成系の同定に繋がることが期待される。しかし、休眠状態にある生合成遺伝子クラスターは、発現制御系による転写抑制や基質の供給不足などの原因により、活性化されていないと推測されるが、その休眠覚醒技術に関する情報は、未だ集積段階にある。本論文は、放線菌における休眠化合物の生産覚醒技術に関する基盤情報を獲得するため、放線菌 *Streptomyces lavendulae* FRI-5 の二次代謝遺伝子クラスターを異種発現に最適化した放線菌に導入し、異種生産法を確立するのと同時に、新規化合物とその生合成系を報告するものである。得られた知見を要約すると、以下の通りである。

- 1) 放線菌 *S. lavendulae* FRI-5 は抗結核物質 D-サイクロセリンと核酸系抗生物質、青色色素インジゴイジンを生産する。インジゴイジン生合成に関わる酵素遺伝子をゲノムマイニング法により推定、異種発現最適化放線菌 *S. avermitilis* SUKA22 に導入し、その代謝物を解析することにより、その酵素遺伝子の機能を解析している。異種発現により生産される代謝物がインジゴイジンであることを質量分析により示すと共に、インジゴイジンの生合成基質であるグルタミンを培地に添加することにより、インジゴイジン生産性が劇的に向上することを明らかにしている。また、このインジゴイジン生合成遺伝子に加え、ポリケタイド生合成酵素遺伝子も同定し、これらの発現が二次代謝を調節する低分子シグナル化合物により、緻密に制御されていることを明らかにしている。これらの知見は、放線菌異種発現に必要な条件を与えるとともに、新規天然物の発見に繋がる休眠生合成遺伝子クラスターが、*S. lavendulae* FRI-5 のゲノムにも多数、存在することを示している。
- 2) 同菌株の潜在二次代謝遺伝子クラスターを多種多様なプログラムを用いて予測し、その存在を明らかにしている。これらの潜在遺伝子クラスターのうち、I 型ポリケタイド合成酵素遺伝子を主とする遺伝子クラスターに着目し、1) で用いた異種発現最適化放線菌に導入、その代謝物を解析している。遺伝子クラスター導入特異的な代謝物を見出し、その大量培養と精製を経て、各種光学分析に基づき、新規天然物ラベンジオールの同定に至っている。多数のラベンジオール類縁体は見出されているが、その生合成系は解明されておらず、ラベンジオール生合成系の新規性を論じている。これらの成果に基づき、潜在遺伝子クラスターの休眠覚醒には、異種発現最適化放線菌を活用した生産系が重要であることを示している。

以上のように、本論文では、放線菌 *S. lavendulae* FRI-5 を対象にし、二次代謝遺伝子クラスターの異種発現最適化放線菌への導入と代謝物解析を通じて、遺伝子クラスターの生合成能力を詳細に解明している。また、放線菌異種発現に必要な様々な遺伝情報を新しい知見として示すと同時に、確立した技術に基づき、新規天然物と新規性に富んだ生合成系を見出すことにも成功している。本研究で得られた成果は、異種放線菌発現系を活用した潜在二次代謝遺伝子クラスターの生産覚醒が、新規天然物または新奇生合成系の同定に有効であることを示唆すると共に、非天然型化合物の創製へと繋がる天然物研究を大きく進展させ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。