



Title	Activation and characterization of cryptic phthoxazolin A biosynthetic gene cluster in <i>Streptomyces avermitilis</i>
Author(s)	Suroto, Dian Anggraini
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/70676
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 (DIAN ANGGRAINI SUROTO)	
Title	Activation and characterization of cryptic phthoxazolin A biosynthetic gene cluster in <i>Streptomyces avermitilis</i> (<i>Streptomyces avermitilis</i> におけるフトキサゾリンA休眠生合成遺伝群の活性化および機能解析)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>In Chapter 1, General Introduction of the features of <i>Streptomyces</i> are presented. The massive streptomycetes genome has uncovered the number of predicted biosynthetic gene clusters are greatly surpassed the number of isolated natural compounds. The gene clusters that are not related with any of the reported compounds are apparently cryptic biosynthetic pathways that are either not expressed or expressed in minute quantities under standard laboratory growth conditions, indicating that many beneficial compounds encoded in the genome still remain to be characterized in streptomycetes. The multifaced regulation of secondary metabolisms in <i>Streptomyces</i> has been one of the advantages that can be employed to increase the yields of secondary metabolite products in genetically amenable strains. The autoregulator signalling cascades are known to be the important regulatory system for secondary metabolisms in streptomycetes. <i>Streptomyces avermitilis</i> has a butenolide-type <i>Streptomyces</i> hormone (avenolide, that stimulates the production avermectin. The <i>avaR</i> locus contains <i>avaR1</i>, <i>avaR2</i>, and <i>avaR3</i> the homologue of autoregulators. The Ava3 controls production of avermectin and filipin, whose biosynthetic gene clusters are located approx. 4.0 Mb away from the <i>avaR</i> locus. This research were to further evaluate the effects <i>avaR3</i> deletion on the activation of cryptic secondary metabolite gene clusters in <i>S. avermitilis</i> and to characterize the biosynthetic gene cluster of the activated-secondary metabolite. In chapter 2, the activation of cryptic phthoxazolin A production in <i>Streptomyces avermitilis</i> by the disruption of autoregulator-receptor homologue Ava3 was observed. The study of the secondary metabolite profile of <i>avaR3</i> mutant and a detailed characterization of the remarkable peak at 33.9 min which is observed only in the <i>avaR3</i> mutant, resulting in the identification of phthoxazolin A. The bioassays showed that phthoxazolin A has inhibitory activity against plant pathogenic oomycetes. In contrast to avermectin production, phthoxazolin A production is adversely controlled by avenolide. Surplus precursors resulting from the non-producer of avermectin provides only partially to the increase of the phthoxazolin A production. As a consequence, the higher production of phthoxazolin A in the <i>avaR3</i> mutant can be assigned to the regulatory property of Ava3, rather than surplus precursor. In chapter 3, the characterization of phthoxazolin A biosynthetic gene cluster in <i>Streptomyces avermitilis</i> had been established. This research led to unravelling the genetic diversity between two wild-type strains of <i>Streptomyces avermitilis</i>. The original wild-type strain KA-320 has the larger genome size than that of its progeny K139 (genome sequence publicly available). The putative phthoxazolin A (<i>ptx</i>) biosynthetic gene cluster (99.99 kb) was found in the extrachromosomal region located more than 4.0 Mb away from the <i>avaR</i> locus of KA-320. Disruption of the <i>ptxA</i> gene encoding a discrete acyltransferase resulted in a complete loss of phthoxazolin A production, indicating that the <i>trans</i>-AT type I PKS-NRPS system is essential for the phthoxazolin A biosynthesis. Based on the prediction of modules and functional domains in the <i>ptx</i> assembly line, the biosynthetic pathway of phthoxazolin A was proposed. In Chapter 4, conclusions of this research were described. In <i>Streptomyces</i> genus that deregulation of autoregulator receptor homologue (Ava3) activates the cryptic secondary metabolite that are genetically encoded in the region distal to the autoregulatory locus was first reported. The uniqueness of avenolide as a new class of <i>Streptomyces</i> hormone was highlighted which functions not only to elicit but also to repress secondary metabolism. The identification of the phthoxazolin A gene cluster increases our understanding on diversity and complexity of <i>trans</i>-AT-type I PKS-NRPS hybrid machinery, which might provide interesting perspectives for the engineering of polyketide/nonribosomal peptide biosynthetic pathways.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (DIAN ANGGRAINI SUROTO)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	藤山 和仁
	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	内山 進
	副 査	教授	永井 健治

論文審査の結果の要旨

放線菌は、抗生物質などの生理活性物質を二次代謝産物として生産する微生物である。この放線菌の染色体 DNA には、多彩な二次代謝産物を生産する可能性がある遺伝子群が約 30 前後も座乗している。しかし、これらの遺伝子群の多くは、通常の培養条件下では、転写されていない、または低い転写効率にあり、休眠状態にある。つまり、これらの生合成遺伝子群がコードする有用化合物が有効活用されていないのが現状である。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、新たな生理活性物質を発見するとともに、これまでにない生合成酵素を同定できることが期待される。休眠状態にある生合成遺伝子群は、基質の供給不足や発現制御系による転写抑制などにより、転写活性化されていないと類推されるが、休眠遺伝子を転写覚醒化させる知見は、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 avermitilis* の二次代謝シグナル分子受容体を遺伝子破壊し、休眠状態の化合物を生産覚醒させるのと同時に、その生産覚醒物質とその生合成遺伝子群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) 二次代謝シグナル受容体破壊株の代謝物プロファイルを解析し、受容体遺伝子破壊に伴い、顕著に生産増加する化合物を見出している。この生産覚醒した化合物を精製し、その化学構造を機器分析により同定し、生産覚醒化合物が既報のフトキサゾリン A (セルロース合成阻害剤) であることを証明している。次に、フトキサゾリン A の生理活性を検討し、従来に報告されていない生理活性を報告している。また、フトキサゾリン A の生産が二次代謝シグナルとシグナル受容体様タンパク質によって制御される分子メカニズムを明らかにしている。これらの知見は、ゲノム上に休眠する有用化合物を生産覚醒させる技術として、放線菌二次代謝シグナル受容体の遺伝子破壊が有効な方法であることを強く示唆している。
- 2) フトキサゾリン A 生合成系をゲノム探索し、フトキサゾリン A の生合成酵素遺伝子が *S. avermitilis* の公開ゲノム情報に含まれていないことを示している。*S. avermitilis* 派生株のフトキサゾリン A 生産能を検討し、*S. avermitilis* のオリジナル野生型株のみがフトキサゾリン A 生産能を有することを証明している。このオリジナル野生型株のゲノム情報を解読し、推定フトキサゾリン A 生合成遺伝子群を染色体 DNA 右端領域に見出している。推定フトキサゾリン A 生合成遺伝子群に含まれる酵素遺伝子を破壊し、そのフトキサゾリン A 生産を検討することにより、この遺伝子群がフトキサゾリン A 生合成を担っていることを示している。フトキサゾリン A 生合成遺伝子群を *in silico* にて解析し、フトキサゾリン A 生合成系を解明している。これらの成果に基づき、報告されていなかったフトキサゾリン A 生合成系を遺伝子レベルにて明らかにしている。

以上のように、本論文では、放線菌 *S. avermitilis* を対象にし、二次代謝シグナル受容体を遺伝子破壊することにより、低生産性状態にあるフトキサゾリン A 生産の覚醒に成功している。また、既報化合物であるフトキサゾリン A の生理活性について詳細な検討を適用することにより、新たな生理活性を見出していることに加え、フトキサゾリン A の生産様式についても知見を得ている。加えて、フトキサゾリン A の生合成遺伝子群を同定することにより、その生合成系を詳細に明らかにするとともに、フトキサゾリン A 生合成系に新奇生合成酵素が含まれていることを示している。本研究で得られた成果は、放線菌二次代謝シグナル受容体様タンパク質の遺伝子破壊が、休眠化合物の生産覚醒を経て、有用生理活性物質と新奇生合成系発掘同定に有効であることを示唆するとともに、新奇生合成酵素を活用した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。