

氏 名	AMMARA KHALID
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学位記号番号	博理工乙第242号
学位授与年月日	平成30年3月23日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Terpenoid production using <i>Streptomyces reveromyceticus</i> SN-593 (<i>Streptomyces reveromyceticus</i> SN-593 を活用したテルペノイド生産)
論文審査委員	委員長 連携教授 長田 裕之 委員 教授 西山 佳孝 委員 教授 高橋 康弘 委員 准教授 仲本 準

論文の内容の要旨

Terpenoids are diverse natural products used as pharmaceuticals, antimicrobial agents, fragrances, and flavors. Isolation of valuable terpenoids has been hampered by low yield from producing organisms and stereochemistry required for chemical synthesis. Therefore, for enhanced production of terpenoids the development of microbial platform has been a key approach. Thus, the main objective of present study was to develop a terpenoid producing host platform.

Streptomyces reveromyceticus SN-593 has a potential to produce 1 g/L of polyketide compound reveromycin and 0.7 g/L of polyketide-terpenoid hybrid compound furaquinocin. From high production potential of *S. reveromyceticus* SN-593, we speculated sufficient supply of primary precursor (acetyl-CoA and malonyl-CoA) that can be utilized to develop terpenoid producing host platform. In order to boost the carbon flow towards terpenoid biosynthesis, a clean host platform was developed by disrupting competing secondary metabolites (reveromycin and furaquinocin). Moreover, a key regulator (Fur22) was used to construct a system for coordinated expression between mevalonate gene cluster and target terpenoid synthase genes. The next step was selection of an optimum promoter for *fur22* gene expression. Initially we assumed that a strong promoter should induce high expression of *fur22* gene. We selected promoters of highly expressed genes from RNA-seq analysis at day 1 and 2. However, a strong promoter could not successfully support furaquinocin production. Then we decided to use a stage specific promoter with relatively high expression at late growth phase. To understand a growth stage specific profile of protein expression, we performed a 2-D gel electrophoresis analysis from day 2, 3, 4, and 5 of culture. We observed various expression patterns from 26 identified spots and classified them into different expression profiles.

A heat map was constructed to depict increased or decreased expression level as compared to control. Later, gene information for each spots was retrieved from our genomic database. The selected promoters were evaluated for terpenoid production by introducing farnesyl pyrophosphate synthase (*fpss*) from chicken and botryococcene synthase (*ss11-ss13*) genes from *Botryococcus braunii*. Contrary to our expectation, we found that terpenoid production was not influenced by expression pattern of late growth phase promoters. The promoters of genes related to primary metabolism resulted

in significant terpenoid production. We obtained about 0.3 g/L (212 ± 20 mg/L botryococcene, 98 ± 12 mg/L squalene) terpenoid yield that is higher than the previous reports from *Saccharomyces cerevisiae* and *Rhodobacter capsulatus*. In conclusion, promoter selection for synchronized expression between primary metabolism and *fur22* along with coordinated expression between mevalonate gene cluster and target terpene cyclases is crucial for high terpenoid production platform. Additionally, to expand available microbial platforms for valuable terpenoids, we screened high squalene producing marine thraustochytrids and identified 14 novel squalene-producing strains. These thraustochytrids producing valuable compounds from scratch provide alternative production platform as well as a solution for environmental pollution.

論文の審査結果の要旨

本学位論文の審査委員会は、当該論文の発表会を平成 30 年 1 月 31 日に開催し、詳細な質疑をもとに論文内容を審査した。以下に、学位論文の審査結果を要約する。

自然界には植物・微生物が生産する多くのテルペノイド化合物が知られ、医薬品、機能性食品素材、芳香剤、ゴムなど多岐に亘り利用されている。近年、エネルギー資源としても着目されている。生理活性を有する多くのテルペノイド化合物は立体特異的構造を有しており、化学合成が困難であることから、微生物を活用した生産手法の開発が重要である。本論文は、放線菌 *Streptomyces reveromyceticus* SN-593 を活用し、テルペノイド生産プラットフォーム構築を行った結果をまとめたものである。

(第 1 章) ゲノム解析技術の進歩に伴い、放線菌・糸状菌から新規テルペン環化酵素が続々と見いだされている。これら未知遺伝子の機能を解析し、生合成産物を活用するためには、生産プラットフォームの構築が重要である。これまでに大腸菌や酵母を用いたテルペノイド生産システムについて報告があるが、新たな生産ホストとして放線菌に着目した。放線菌は、医薬品や農薬、抗生物質など構造多様性を持った有用二次代謝物を生産することで知られ、大量生産株は工業的に利用されている。放線菌が有している物質生産の潜在的な能力は明らかであるが、テルペノイド生産に特化したホストとしては開発途上である。そこで、*S. reveromyceticus* SN-593 の二次代謝産物の生産能力に着目し、テルペノイド生産プラットフォーム構築を行った。

S. reveromyceticus SN-593 は、reveromycin A (RM-A) 生産菌であり、ゲノム解読・遺伝子機能アノテーションが完了している。経路特異的転写制御因子 (RevQ) の活性化により RM-A 高生産 (1 g/L) が可能である。また、メバロン酸経路を活性化する転写制御因子 (Fur22) の構成的発現によって、休眠遺伝子であった furaquinocin (FQ) を高生産 (0.7 g/L) できる。以上の背景から、本菌は二次代謝産物を高生産するための一次代謝経路が強固であり、生産プラットフォーム開発には最適と考えた。これまでに、一次代謝産物のプールを最適化するために、主要二次代謝産物である RM 生合成遺伝子を破壊した SR1 株が構築されている。本研究では引き続き、FQ 生合成に関わる鍵遺伝子の in-frame 破壊を行った。これにより、メバロン酸経路が駆動するシステムを維持するとともに、生合成前駆体であるアセチル CoA 及びマロニル CoA がテルペノイド生産に効率よく利用できる SR2 株を構築した。

次に、*fur22* 遺伝子の活性化が重要であることから、全 RNA 発現解析により高発現遺伝子のプロモーターを探索した。候補の 6 プロモーターを FQ 生合成遺伝子クラスターの制御因子である *fur22* 遺伝子にそれぞれ連結したプラスミドを構築し、FQ 生産を指標 (褐色コロニーとなるため生産判断が容易) に二次代謝生合成とのリンクを検証した。その結果、予想とは大きく異なり、高発現しているプロモーターでは効率的な生産を達成できないことが判明した。

以上の結果から、二次代謝物を生産する生育時期特異的な発現プロモーター、または主要代謝経路との効果的リンクが可能なプロモーターを用いて *fur22* 遺伝子発現を制御することが重要と考えられた。*S. reveromyceticus* SN-593 を用いた全 RNA 発現解析では、培養初期の遺伝子発現解析が可能であるが、培養後期にあたる遺伝子発現データの取得が困難である。そこで、二次元電気泳動によるプロテオーム解析で、対数増殖期、定常状態で発現しているタンパク質量の経時的 (2 - 5 日) 変化のカタログ化を行った。二次元電気泳動後の各スポットは MALDI-TOF/MS 解析により同定した。次に、特徴的な発現挙動を示すタンパ

ク質をコードする遺伝子から推定されるプロモーター領域を PCR 増幅し、*fur22* 遺伝子に連結したプラスミドを構築した。前述のように FQ 生産を指標に検証を行った結果、有効なプロモーターは、必ずしも生育時期特異的発現パターンを示す遺伝子ではなく、一次代謝関連の遺伝子 (*sre2030*) 発現に関わるプロモーターを用いた場合に、生産性が良好であることが判明した。

以上の情報をもとに、*sre2030* プロモーターを *fur22* に連結したプラスミドを構築した。また、Fur22 に制御されるメバロン酸合成遺伝子クラスターとの同調制御を可能にするために、同因子によって制御されるプロモーター (*fur1p*) の下流に放線菌に適合するコドン改変を行ったテルペノイド生合成遺伝子 (ニワトリ由来ファルネシル二リン酸生合成酵素遺伝子および緑藻由来 C30 ボツリオコッセン合成酵素遺伝子) を導入することによって、高収率 (0.2 g/L) で石油代替資源である C30 ボツリオコッセンの生産に成功した。以上、構築した *S. reveromyceticus* SN-593 テルペノイド生産プラットフォームが有効に機能することが証明された。

(第 2 章) 新たなテルペノイド生産プラットフォーム開発を目的として、マングローブが生育する沖縄の様々な水域より 172 の海洋微生物を取得し、14 の新規スクアレン生産菌 Thraustochytrids (ヤブレッツボカビ科の真核微生物) を見出した。Thraustochytrids は、スクアレンを 7.54 - 13.9 (mg スクアレン /g dry cell weight) 生産した。

以上、本学位論文では、転写制御因子により厳密に制御される内在性メバロン酸生合成クラスター及び生合成遺伝子の同調発現制御により、放線菌テルペノイド生産プラットフォームが機能することを証明した。また、コドン頻度を放線菌型に調節した人工 DNA をテルペノイド生産プラットフォームに導入することによって、放線菌に限らず、動物や植物由来の遺伝子を活用したテルペノイド創出研究が展開できることも示した。さらに、新規プラットフォーム開発に向けて、海洋生物より新たなスクアレン生産菌を取得し、テルペノイド研究に貢献する基盤を構築した。以上のことから、本論文は博士の学位に相当する内容であると判断された。