

Streptomyces avermitilis NBRC 14893^T から新たに見出した complestatin と oxazolomycin 類縁体の生合成遺伝子クラスター

小牧久幸^{1)*}, 市川夏子²⁾, 関根光雄²⁾, 北橋優子²⁾, 藤田信之²⁾, 鈴木健一朗¹⁾

独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンター (NBRC)

¹⁾ 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足 2-5-8, ²⁾ 〒151-0066 東京都渋谷区西原 2-49-10

抗寄生虫薬 avermectin の生産菌として知られている *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267^T のゲノム配列が 2001 年に論文発表され (Omura *et al.*, 2001), 同基準株 *S. avermitilis* MA-4680^T の全ゲノム配列として 9 Mb の染色体と 94 kb のプラスミド SAP1 の DNA 配列が GenBank/EMBL/DDBJ で公開されている (Ikeda *et al.*, 2003). 今回 MA-4680^T に由来する *S. avermitilis* NBRC 14893^T のゲノム DNA を鋳型とした PCR で, 公開されているゲノム配列には存在しない未知の NRPS 遺伝子が増幅するという不可解な現象が確認された. その原因を調べるために NBRC 14893^T をゲノム解析した結果, 公開されているゲノム配列には存在しない配列を見出した. この中には約 40 kb の NRPS 遺伝子クラスターや約 65 kb の NRPS/PKS ハイブリッド遺伝子クラスターが存在し, それぞれ demethylcomplestatin と新規 oxazolomycin 類縁体の生合成に関与することが示唆された. *S. avermitilis* の基準株 (MA-4680^T) は Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL) を経た後に, KCC Culture Collection of Actinomycetes, Kaken Pharmaceutical Co., Ltd. (KCC) と American Type Culture Collection (ATCC) に渡っている. NBRC 14893^T は KCC 株に由来し, 2001 年のゲノム解読株は ATCC 株に由来している. *Streptomyces* ではプラスミドの欠落やゲノムの組換えなどが容易に起こり得るので, 本研究で見出した 2 つの生合成遺伝子クラスターは基準株が NRRL から ATCC に渡った後のどこかの段階で欠落したのであろう.

キーワード: complestatin, NRPS, oxazolomycin analog, *Streptomyces avermitilis*

序 文

Streptomyces avermitilis は抗寄生虫薬 avermectin の生産菌として産業利用された有用な放線菌である (Burg *et al.*, 1979; Ikeda *et al.*, 2001). その基準株である *S. avermitilis* ATCC 31267^T のゲノム配列が北里大学を中心とした研究グループによって 2001 年に論文発表され, 約 9 Mb の直鎖状染色体を有すること, そしてそのゲノム中には 10 種類の polyketide synthase (PKS) 遺伝子クラスターや 8 種類の non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) 遺伝子クラスターをはじめとする計 25 種類の二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターが存在することが明らかになった (Omura *et al.*, 2001). その 2 年後には同研究グループが *S. avermitilis* の全ゲノムが 9,025,608 kb の染色体と 94,287 bp の SAP1 プラスミドからなると報告し (Ikeda *et al.*, 2003), 配列は *S. avermitilis* MA-4680^T の全ゲノム配列としてアクセッション番号 BA000030 と AP005645 で GenBank/EMBL/DDBJ に登録され, 北里大学 (<http://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/>) や

NBRC のホームページ (www.bio.nite.go.jp/dogan/top) から公開している.

筆者らは *Streptomyces* を研究対象として PKS 遺伝子や NRPS 遺伝子を PCR で増幅し, その塩基配列をもとに二次代謝産物の新規性や多様性を推測することで, 生合成遺伝子に基づいた菌株の評価を試みている (Enkh-Amgalan *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2011; Komaki *et al.*, 2009, 2011). そのためには, 使用するプライマーや PCR 条件などが目的遺伝子の増幅に適しているかどうかを検証する必要があり, その検証実験の材料としてゲノム配列が公開されている *Streptomyces* を利用していた. ゲノム解読株を使えばゲノム中に存在する PKS と NRPS 遺伝子が全て明らかになっているので, PCR によって全ての遺伝子が満遍なく増幅されたかどうかを確認できるからである. 今回その実験の過程で *S. avermitilis* NBRC 14893^T ゲノム DNA を鋳型として NRPS 遺伝子を増幅したときに, GenBank/EMBL/DDBJ に登録されている *S. avermitilis* のゲノム配列には全く存在しない NRPS 遺伝子配列が得られた. 解析を行ったところ, NBRC 14893^T から新たに NRPS 遺伝子を含む生合成遺伝子クラスターを見つけたので報告する.

*Corresponding author

E-mail: komaki-hisayuki@nite.go.jp

Accepted: April 28, 2014

材料と方法

1) 試験菌株及びゲノム DNA の調製

S. avermitilis MA-4680^T に由来する *S. avermitilis* NBRC 14893^T (Fig. 1) を使用した. PCR の鋳型として用いたゲノム DNA は DNeasy Blood & Tissue Kit (株式会社キアゲン) で, genome sequencing 用のゲノム DNA は常法 (中川ら, 2001) を一部改変した方法で調製した.

2) NRPS 遺伝子の増幅及び配列決定

NRPS 遺伝子のアデニレーション (A) ドメインの保存領域に対して縮重プライマー (A3F-18/128: cac-StcSggNWcSacSgg, A7R-18/128: aSgtcNccSStScggtas) を設計した. 1×PCR Amplification Buffer, 0.4 mM dNTPs, 1.5 mM MgSO₄, 1×PCR Enhancer Solution, 1 μM A3F-18/128, 1 μM A7R-18/128, 10–20 ng ゲノム DNA, 0.05 U/μl Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) を含む 20 μl の溶液を 95°C/5 min, 95°C/30 sec–58°C/2 min–68°C/4 min (35 cycles), 68°C/10 min で反応させて, 約 700 bp の DNA を PCR で増幅した. 増幅産物のクローニング及び塩基配列の決定は既報 (Enkh-Amgalan *et al.*, 2012; Khan *et al.*, 2011; Komaki *et al.*, 2009, 2011) に従い, BLAST 検索には NCBI の Web サイト (<http://>

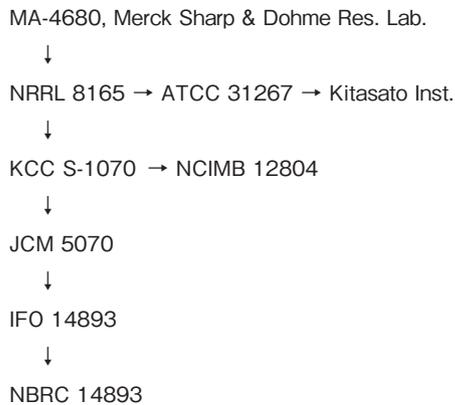


Fig. 1 History of the type strains of *S. avermitilis*. Histories are referred from www.nbrc.nite.go.jp/NBRC2/NBRCCatalogueDetailServlet?ID=NBRC&CAT=00014893, www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=31267&Template=bacteria, and www.ncimb.com/results.php?parent=culture

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) を利用した.

3) ゲノム解読

既報 (Komaki *et al.*, 2012) に従い, GS FLX Titanium System (Roche Applied Science) と Illumina HiSeq1000 (Illumina K.K.) を用いて whole genome shotgun sequencing を行った. 両ゲノムシーケンサーから冗長度約 67 倍の read 配列が得られ, Newbler Assembler (454 Life Science) によって 200 本の contig 配列にアセンブルされた. さらに contig 配列の前後関係を考慮して scaffold を構築した結果, 12 本の contig 配列と 80 本の scaffold 配列からなるドラフトゲノム配列が得られた. ゲノムサイズは約 10 Mb と算出された.

4) 未知の hybrid PKS/NRPS 遺伝子クラスターの同定

Table 1 の A-07 ~ A-10 の配列を含む contig/scaffold 配列を選抜した. ORF は MiGAP (Sugawara *et al.*, 2009) で同定し, PKS と NRPS 遺伝子は既報 (Komaki *et al.*, 2012) に従って解析した.

5) アクセッション番号

S. avermitilis NBRC 14893^T のドラフトゲノム配列を BAVY01000001–BAVY01000092 のアクセッション番号で GenBank/EMBL/DDBJ に登録した.

結果

1) *S. avermitilis* ATCC 31267^T のゲノム配列には存在しない未知の NRPS 遺伝子

A3F-18/128 と A7R-18/128 プライマーを用いた PCR でゲノム中の NRPS 遺伝子を満遍なく増幅できるかどうかを検証するために, *S. avermitilis* NBRC 14893^T のゲノム DNA を鋳型にして PCR を行った. 目的の大きさである約 700 bp の DNA が増幅したので, 増幅産物をクローニングした後, 28 クローンの配列を決定した. 重複を除くと 10 種類の配列 (A-01 ~ A-10) が得られ, BLASTn で相同性検索した結果 (Table 1), A-01 ~ A-04 は *S. avermitilis* ATCC 31267^T (MA-4680^T の配列として登録されている) のゲノム中に存在する NRPS 遺伝子の配列と完全に一致した. A-05 と A-06 ではゲノム配列と一致しない箇所が 1 ~ 2 塩基だけ認められたものの, *S. avermitilis*

Table 1 BLAST search of amplified NRPS gene sequences from *S. avermitilis* NBRC 14893^T

contig seq.	No. of clones	Top hit of BLAST search	
		Identity	Closest NRPS gene / origin
A-01	2	100%	SAV_3643 (<i>nrps2-2</i>) / <i>Streptomyces avermitilis</i>
A-02	6	100%	SAV_3159 (<i>nrps3-3</i>) / <i>Streptomyces avermitilis</i>
A-03	1	100%	SAV_603 (<i>nrps6</i>) / <i>Streptomyces avermitilis</i>
A-04	2	100%	SAV_860 (<i>nrps7-11</i>) / <i>Streptomyces avermitilis</i>
A-05	1	99%	SAV_3198 (<i>nrps1-2</i>) / <i>Streptomyces avermitilis</i>
A-06	1	99%	SAV_3642 (<i>nrps2-1</i>) / <i>Streptomyces avermitilis</i>
A-07	4	67%	<i>tlm VI</i> (tallysomyacin) / <i>Streptoalloteichus hindustanus</i>
A-08	3	73%	<i>comC</i> (complestatin) / <i>Streptomyces lavendulae</i>
A-09	6	72%	<i>comA</i> (complestatin) / <i>Streptomyces lavendulae</i>
A-10	2	72%	SBI_09660 (<i>ozmO</i>) / <i>Streptomyces bingchengensis</i>

ATCC 31267^T の NRPS 遺伝子に対して 99% 以上の相同性示したので、ゲノム中に存在する NRPS 遺伝子配列に一致したとみなした。一方、驚くべきことに、A-07 ~ A-10 は *S. avermitilis* ATCC 31267^T の NRPS 遺伝子とは全く異なり、既知の NRPS 遺伝子に対しても 70% 程度の相同性しか示さない新規な配列であった。なお、本実験に用いた *S. avermitilis* NBRC 14893^T に他の菌株が混入していた可能性も考えられたので、NBRC 14893^T 株から単一コロニーを分離し、純化したコロニーに由来する 8 株を得た。これらの 16S rDNA 塩基配列は *S. avermitilis* の 16S rDNA 配列と完全に一致した。そしてこれら 8 株に Table 1 の A-07 ~ A-10 の NRPS 遺伝子が存在するかどうかを PCR で確認したところ、8 株ともこれらの NRPS 遺伝子を有していたので、今回新たに見つけた NRPS 遺伝子は *S. avermitilis* に由来しており、他の菌株に由来するものではないと判断した。

2) *S. avermitilis* NBRC 14893^T のゲノム解読

NBRC 14893^T から未知の NRPS 遺伝子が増幅したので、*S. avermitilis* NBRC 14893^T の全ゲノムをゲノムシーケンサーで解読した。得られた 92 の scaffold 配列の中から Table 1 の A-07 ~ A-10 を含む配列を探したところ、A-07 と A-08 と A-09 は 462,360 bp の scaffold 00010 (BAVY01000022) に、A-10 は 159,905 bp の scaffold 00019 (BAVY01000031) に存在した。scaffold 00010 は GC 含量が 69.5% で 392 個の ORF を、scaffold 00019 は GC 含量が 70.6% で、97 個の ORF をコードしていた。これらの scaffold 配列は公開されている *S. avermitilis* のゲノム配列 (BA000030 と AP005645) とオーバーラップしなかった。

3) 未知の NRPS 遺伝子を含む生合成遺伝子クラスター (1) 不完全な NRPS 遺伝子クラスター

Table 1 の A-07 は scaffold 00010 (BAVY01000022) の中央にコードされる 617 aa の NRPS 遺伝子 (ORF10-194) の配列だった。この NRPS は既知の NRPS (*Actinoplanes* sp. SE50/110 株の *nrpsIC/ACPL_1021*, AEV81918) に対して 44% の identity (55% の similarity) しか示さず、新規性は高いものの、A ドメインとチオレーション (T) ドメインしか持たず、周辺に他の NRPS もコードされていなかったため NRPS に必須な最小限のモジュール単位 (コンデンセーション (C) ドメイン-A ドメイン-T ドメイン) を形成していなかった (データ略)。従って、ペプチド系化合物の合成に必要な遺伝子を揃えたクラスターではない可能性が高い。

(2) Demethylcomplestatin の生合成遺伝子クラスター

Table 1 の A-08 と A-09 は scaffold 00010 の 5' 端よりコードされている NRPS 遺伝子 (ORF10-72, ORF10-70) だった。この領域には転写因子 (ORF10-68), ABC トランスポーター (ORF10-69), 4 個の NRPS (ORF10-70, ORF10-71, ORF10-72, ORF10-73), ハロゲナーゼ (ORF10-76), P450 (ORF10-77, ORF10-78) などがコードされていて、約 40 kb の遺伝子クラスターを形成していた。各 ORF は *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970 (locus_tag が SRIM) の遺伝子に対し最も高い相同性を示したが、これら遺伝子群が合成する化合物は調べられておらず。それ以外だと complestatin の生合成遺伝子 (*com*) 群 (Chiu *et al.*, 2001) に対して 67 ~ 86% の相同性 (similarity) を示した (Table 2)。このクラスターには *com* クラスターと同じセットの遺伝子が同じ順番で並んでいる。さらに対応する NRPS

のドメインも ComA と ORF10-70, ComB と ORF10-71, ComD と ORF10-73 では完全に一致し, ComC と ORF10-72 でもメチルトランスフェラーゼ (MT) ドメインの有無しか変わらない (Fig. 2). 従って, メチル基を欠いた新しい complestatin (demethylcomplestatin) またはそれによく似た類縁体の生合成遺伝子クラスターだと推測された.

(3) 新規 oxazolomycin 類縁体の生合成遺伝子クラスター

Table 1 の A-10 は scaffold 00019 (BAVY01000031) の 22 番目の ORF (ORF19-22) の一部であった. ORF19-22 は NRPS であり, その周辺には 4 個の PKS (ORF19-25, ORF19-23, ORF19-20, ORF19-18), 1 個の NRPS (ORF19-24), 1 個の NRPS/PKS ハイブリッド

Table 2 ORFs in the *com*-like gene cluster newly found in *S. avermitilis* NBRC 14893^T

ORF*	Size (aa)	Protein homolog**	Proposed function (domain)
10-68	329	SRIM_39728 (ELQ77631, 67/75) transcriptional regulator (AAK81822, 58/69)	transcriptional regulator
10-69	651	SRIM_39733 (ELQ77632, 73/81) ORF2 (AAK81823, 69/84)	ABC transporter
10-70	2,185	ORF3; <i>comA</i> (AAK81824, 57/67, A/T-C/A/T/E)	NRPS (A/T-C/A/T/E)
10-71	1,527	SRIM_10391 (ELQ83418, 65/73) ORF4; <i>comB</i> (AAK81825, 62/72, C/A/T/E)	NRPS (C/A/T/E)
10-72	4,587	SRIM_10391 (ELQ83418, 66/74) ORF5; <i>comC</i> (AAK81826, 62/73, C/A/T/E-C/A/T/E-C/A/T/E)	NRPS (C/A/T/E-C/A/T/E-C/A/T/E)
10-73	1,838	SRIM_10386 (ELQ83417, 62/71) ORF6; <i>comD</i> (AAK81827, 60/71, C/A/T/E-Te)	NRPS (C/A/T/E-Te)
10-74	75	SRIM_10381 (ELQ83416, 82/89) ORF7 (AAK81828, 74/84)	MbtH
10-75	428	SRIM_10376 (ELQ83415, 73/83) ORF8 (AAK81829, 68/77)	integral membrane ion antiporter
10-76	498	SRIM_10371 (ELQ83414, 80/89) ORF9; <i>comH</i> (AAK81830, 76/86)	halogenase
10-77	390	ORF10; <i>comO1</i> (AAK81831, 59/73)	P450-related oxidase
10-78	400	ORF11; <i>comO2</i> (AAK81832, 62/73)	P450-related oxidase
10-79	74	SRIM_10356 (ELQ83411, 58/70) ORF12; <i>comFR</i> (AAK81833, 59/73)	ferredoxin

*Each ORF was indicated by the combination of scaffold number and ORF number. **Given in parentheses are accession numbers, percentage identity/percentage similarity, and domain organization. A, adenylation domain; T, thiolation domain; C, condensation domain; E, epimerization domain, MT, methyltransferase domain; Te, thioesterase domain

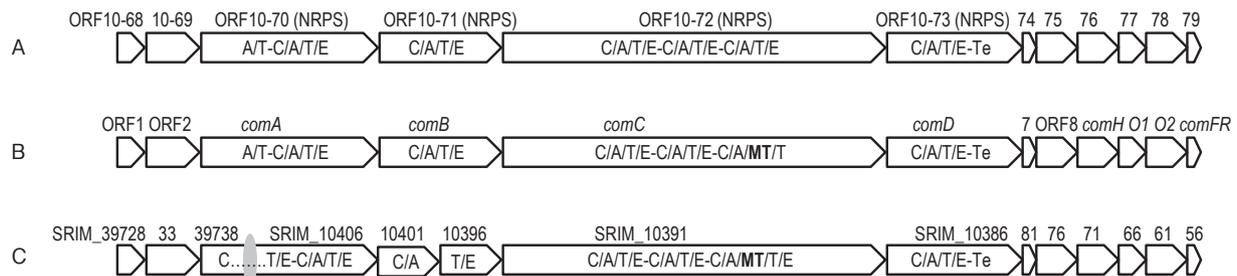


Fig. 2 Arrangement of *com*-like gene clusters. A, *com*-like gene cluster in *S. avermitilis* NBRC 14893^T (Table 2); B, *com* gene cluster in *Streptomyces lavendulae* (Chiu *et al.*, 2001); C, putative *com* gene cluster in *Streptomyces rimosus* subsp. *rimosus* ATCC 10970, which is divided into contig00026 (ANSJ01000022) and contig00355 (ANSJ01000274) in the draft genome sequence. The gap is shown in gray. A, adenylation domain; T, thiolation domain; C, condensation domain; E, epimerization domain; Te, thioesterase domain; MT, methyltransferase domain. MTs are highlighted in bold, because MT is not present in *S. avermitilis com*-like gene cluster (A), and they are specific in *S. lavendulae com* gene cluster (B) and *S. rimosus* subsp. *rimosus* putative one (C).

(ORF19-19) がコードされ, 約 65 kb の NRPS と PKS が存在する遺伝子クラスター (NRPS/PKS ハイブリッド遺伝子クラスター) を形成していた。BLAST 検索の結果, ORF19-23 ~ ORF19-18 が oxazolomycin の生合成に関与する酵素 (Ozm) (Zhao *et al.*, 2010) に対して 62 ~ 95% の相同性 (similarity)

を示した (Table 3)。しかし, 今回見出したクラスターは *ozm* クラスターとはモジュール数やドメイン構成が明らかに異なっていたので (Table 4, Fig. 3), 新規 oxazolomycin 類縁体を合成する可能性が高い。

Table 3 NRPS, PKS, and the related ORF in the hybrid PKS/NRPS gene cluster newly found in *S. avermitilis* NBRC 14893^T

ORF	Size (aa)	Protein homolog*	Proposed function
19-25	2,951	SSOG_07310 (EFL27596, 64/72)	PKS-I
19-24	3,542	SMCF_5513 (EHN75030, 68/77)	NRPS
19-23	4,885	OzmN (ADI12777, 73/80)	PKS-I
19-22	1,154	SMCF_2986 (EHN77489, 74/80)	NRPS
		OzmO (ABS90476, 53/62)	
19-21	377	OzmP (EHN75024, 91/95)	(unknown)
19-20	877	OzmQ (ADI12780, 55/66)	PKS-I
19-19	5,939	SSOG_07315 (EFL27601, 71/80)	hybrid NRPS/PKS-I
		OzmH (ADI12770, 53/63)	
19-18	1,065	SMCF_1747 (EHN78700, 76/82)	PKS-I (acyltransferase)
		OzmM (ABS90474, 58/69)	
19-17	169	Nsh-OrfB (AAB17876, 70/79)	polyketide cyclase

*Given in parentheses are accession numbers and percentage identity/percentage similarity.

Table 4 Comparison of domain organization between *ozm* cluster in *S. albus* JA3453 and ORFs on scaffold 00019 from *S. avermitilis* NBRC 14893^T

<i>Streptomyces albus</i> JA3453		<i>Streptomyces avermitilis</i> NBRC 14893 ^T	
OzmO	F/A(gly)/T	ORF19-22	F/A(gly)/T
OzmQ	KS/ACP	ORF19-20	KS/ACP
OzmN	KS/DH/KR/ACP- KS/DH/KR/ACP- KS/DH/KR/MT/ACP	ORF19-23	KS/DH/KR/ACP- KS/DH/KR/ACP- KS/DH/KR/MT/ACP
OzmH	KS/KR/MT/ACP- C/A(gly)/T- KS/DH/KR/ACP- KS/DH/ACP/MT/KR/ACP- ks/KS/KR/ACP	ORF19-19	KS/KR/MT/ACP- C/A(?)T- KS/DH/KR/ACP- KS/KR/ACP- KS
OzmJ	KS/ACP/ks/ DH/ER /KR/ACP	ORF19-25	ACP- KS/KR/ACP- KS/ACP
OzmK	acp/KS/MT/ACP	ORF19-24	C/A(?)T- C/A(ser)/T- C
OzmL	C/A(ser)/ MT /T- C		

F, formyl transferase domain; A, adenylation domain; T, thiolation domain; KS, ketosynthase domain; ACP, acyl carrier protein; DH, dehydratase domain; KR, ketoreductase domain; MT, methyltransferase domain; C, condensation domain; ER, enoyl reductase domain. Substrate amino acids of A domains are shown in parentheses. Domains suggested as inactive by DoBISCUIT (Ichikawa *et al.*, 2013) are lowercased. Distinct domains between the two gene clusters are boldfaced.

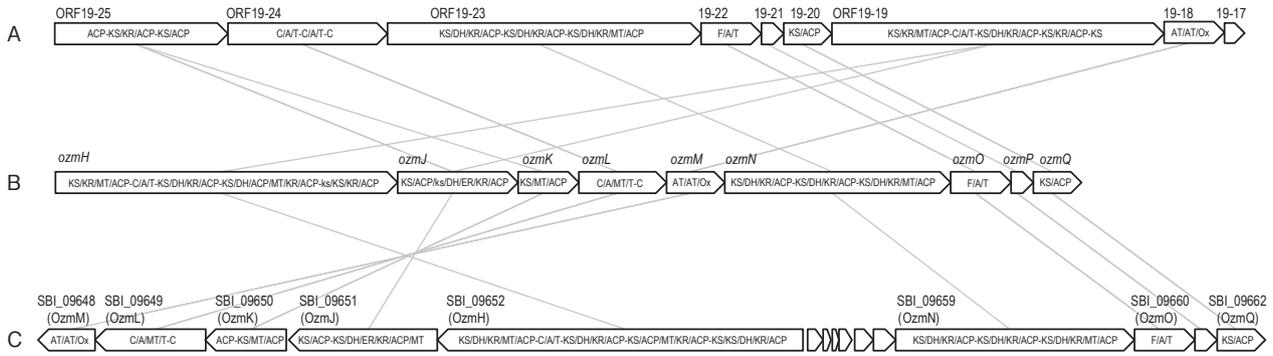


Fig. 3 Arrangement of ORFs in the hybrid PKS/NRPS gene cluster in *S. avermitilis* and those of related gene clusters. A, the hybrid PKS/NRPS gene cluster in *S. avermitilis* NBRC 14893^T (Table3); B, oxyazolomycin biosynthetic (*ozm*) gene cluster in *Streptomyces albus* JA3453 (Zhao *et al.*, 2010); C, gene cluster annotated as *ozm* in genome-elucidated *Streptomyces bingchenggensis* BCW-1 (Wang *et al.*, 2010). Each homolog trio is connected by gray lines. ACP, acyl carrier protein; KS, ketosynthase domain; KR, ketoreductase domain; DH, dehydratase domain; F, formylation domain; AT, acyltransferase domain; Ox, oxidation domain; ks, inactive KS

考 察

本研究では NBRC14893^T から ATCC 31267^T のゲノム配列 (BA000030 と AP005645) に存在しない completestatin と新規 oxazolomycin 類縁体の生合成遺伝子クラスターを見出した。なぜ MA-4680^T に由来する NBRC 14893^T から予想に反して新たな生合成遺伝子クラスターが見つかったのかを考察するためにカルチャーコレクション間での *S. avermitilis* 基準株の来歴 (Fig. 1) を確認した。北里大学の研究グループは ATCC 31267^T のゲノム配列を解析し (Omura *et al.*, 2001), MA-4680^T の全ゲノム配列として GenBank/EMBL/DDBJ に公開している。一方で, NBRC は NRRL, KCC, Japan Collection of Microorganisms (JCM) の 3 機関を経て MA-4680^T を入手して, NBRC 14893^T として公開している。即ち, NBRC 14893^T と ATCC 31267^T の来歴は NRRL を境に独立しており, NBRC 株は ATCC 株に由来していない。従って, ATCC 31267^T と NBRC 14893^T の間で保有する生合成遺伝子クラスターに違いが生ずる可能性は十分に考えられる。

Substrain の whole genome resequencing を行った例としてシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 の研究が知られている。そこでは SNPs や数十 bp の塩基配列の挿入 / 欠失だけが認められ, 数十 kb に及ぶ生合成遺伝子クラスターや数百 kb の配列の挿入 / 欠失は報告されていない (Kanesaki *et al.*, 2012)。また, whole genome resequencing の研究ではないが, 乳酸菌 *Lactobacillus reuteri* の基準株のゲノム解析では *L. reuteri* DSM 20016^T 株には存在しないゲノム配

列が *L. reuteri* JCM 1112^T 株のゲノム中の 2 か所に見つかっている。1 か所は 8.4 kb で解糖系の酵素群がコードされていて, もう 1 か所は 30.2 kb で硝酸還元酵素のサブユニットとモリプトプテリン生合成に関与する遺伝子がコードされていた。2 か所とも IS が存在していたので, DSM 20016^T 株でこれらの領域がゲノムから欠損したものと推測されている (Morita *et al.*, 2008)。このように同一由来の substrain 間で数十 kb 以下の比較的短いゲノム配列の有無が IS によって説明できる例とは異なり, *Streptomyces* ではまずプラスミドの欠落や組換えなどがダイナミックに起こりうる事が知られている。その例として, *S. avermitilis* には約 250 kb のプラスミド pSA2 (Evans *et al.*, 1994) が存在し, それに相当する SAP2 は培養中に容易に欠落すると報告されている (Ikeda *et al.*, 2014)。*Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064^T には 1.8 Mb の巨大プラスミド pSCL4 が存在するが, *S. clavuligerus* NRRL 3585^T には 11 kb から 430 kb の 3 種のプラスミド (pSCL1, pSCL2, pSCL3) だけしか確認されておらず, 同種の基準株間でもプラスミドを含めたゲノムの構成が異なると報告されている (Medema *et al.*, 2010)。さらに *Streptomyces* ではプラスミドのみならず染色体 DNA もダイナミックな欠失や組換えが生ずるので, ゲノムの複雑な構造変化も起こり易い (Medema *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010; Fischer *et al.*, 1997; Uchida *et al.*, 2004)。我々は今回 *S. avermitilis* NBRC 14893^T 株から単一コロニーの分離操作を二度繰り返し, 約 30 個の単一コロニーを分離した。その分離株に A-07 ~ A-10 で示した NRPS 遺伝子が存在

するかどうかをPCRで確認したところ、これらのNRPS遺伝子が検出されない派生株が1株だけ得られた。この株はNRPS遺伝子をコードする領域を欠くだけでなく、おそらく scaffold 000010 と scaffold 000019 の全体を欠失していることがこれら scaffold 配列の両端にそれぞれ設計したプライマーによるPCRで示唆された（データ略）。さらに興味深いことに、染色体上に存在するPKS遺伝子の中で filipin の生合成に関与する *PteA* 遺伝子も欠損していることもPKS遺伝子に対するPCRで明らかとなった（データ略）。*PteA* は直鎖状染色体の末端付近に位置しているので（Omura *et al.*, 2001）、おそらく染色体の末端が大幅に欠落した結果だと推測している。これも染色体DNAがダイナミックに構造変化した例であろう。

Complestatin は vancomycin や teicoplanin などと似た骨格を有する糖ペプチド化合物である。これらの化合物のNRPS遺伝子クラスターはドメイン構成がよく保存されていることが報告されており（Li *et al.*, 2004; Pootoolal *et al.*, 2002）、今回 NBRC 14893^T から

見出したNRPS遺伝子スター（Table 2, Fig. 2）もこのグループに含まれる。*Com* クラスターとの高い相同性から本クラスターの産物は complestatin の脱メチル誘導体（demethylcomplestatin）であると考えているが、これらの化合物は基本骨格が複雑な環化反応や修飾を受けるので、最終的な産物の化学構造は *in silico* 解析だけでは判断できず、単離及び構造解析が必要である。

本研究で見出した新規 oxazolomycin 類縁体生合成遺伝子クラスターが合成する化合物（中間体）の骨格を推測した。既に報告されている oxazolomycin の生合成遺伝子 (*ozm*) クラスター（Zhao *et al.*, 2010）を参考にしてPKSとNRPSが触媒する反応の順番を推定し（Fig. 4）、NRPS/PKSのassembly line（Fischbach *et al.*, 2006）に基づいて考えた結果、この産物は oxazolomycin の類縁体ではあるが、既知の oxazolomycins とは明らかに骨格の異なる新規化合物であることが示唆された（Fig. 5）。だが、NRPSとPKSで合成された骨格の環化や修飾は周辺の遺伝子情報だけから

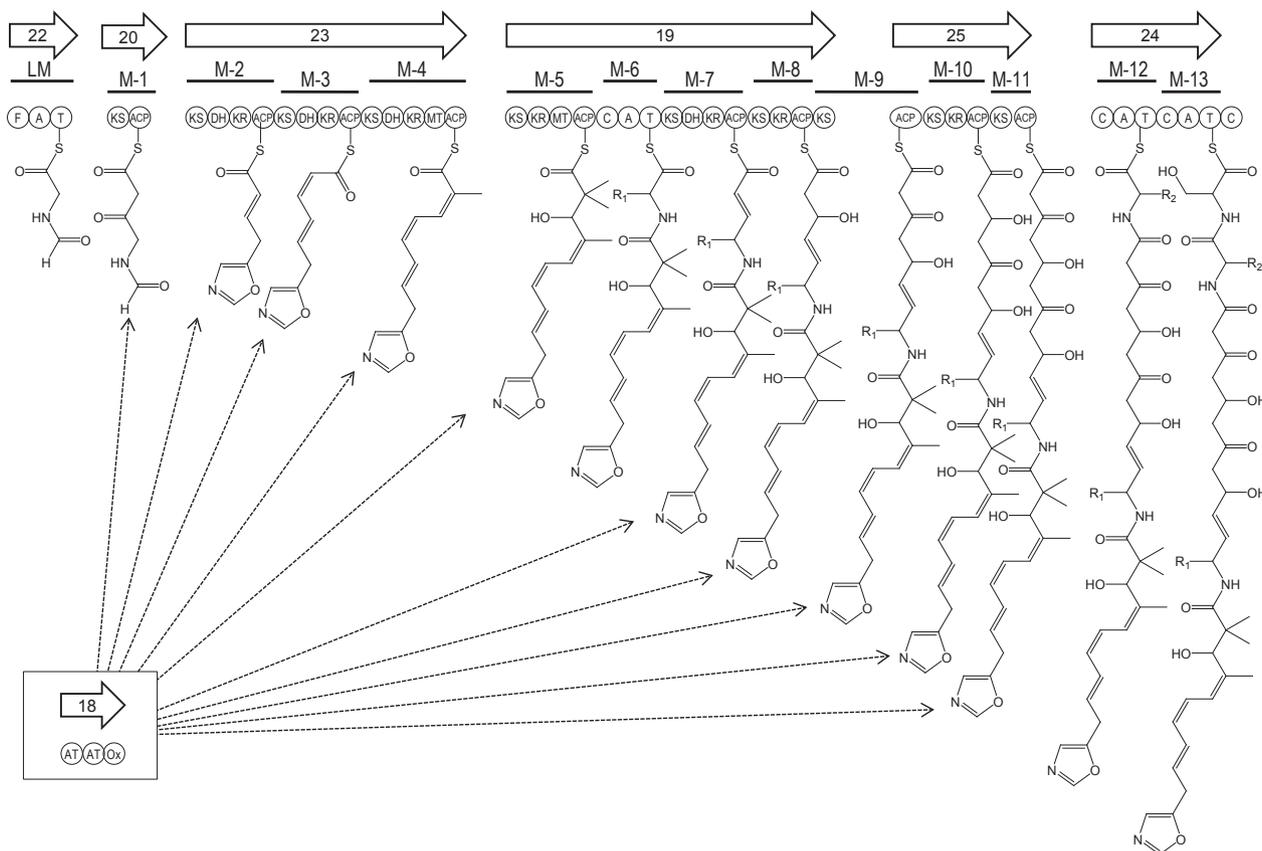


Fig. 4 Putative oxazolomycin analog biosynthetic hybrid PKS/NRPS gene cluster in *S. avermitilis* NBRC 14893^T. Each ORF is shown with arrow, in which 'ORF19' was omitted.

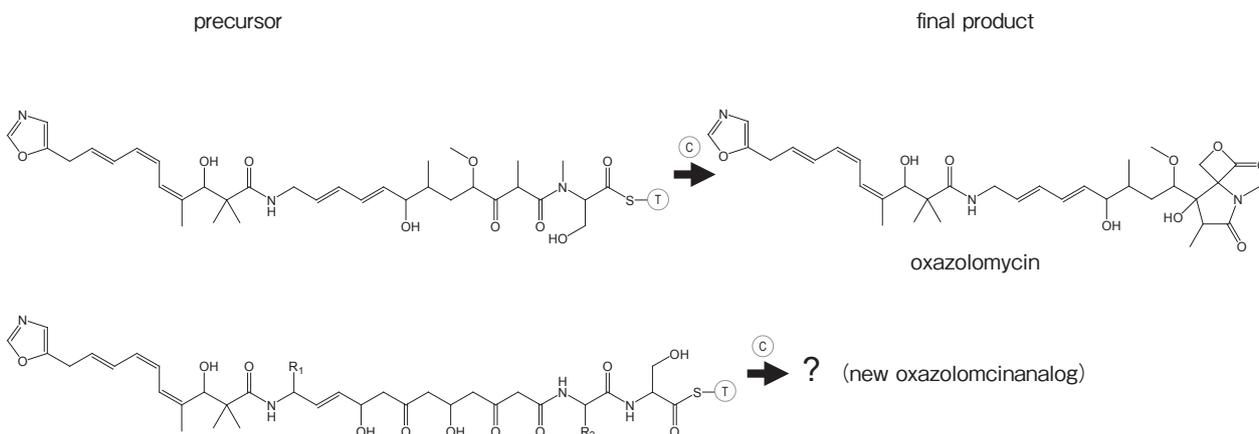


Fig. 5 Comparison of chemical structures between oxazolomycin and the putative analog. Upper; oxazolomycin; lower, putative product by the gene cluster discovered in the present study. T, thiolation domain; C, condensation domain.

では推測できないので、最終産物の化学構造は现阶段では分からない。Oxazolomycin 類縁体としては oxazolomycins A, B & C, 16-methyl-oxazolomycin, KSM-2690B, KSM-2690C, triedimycins A & B, neooxazolomycin, inthoromycins A, B & C, そして lajollamycin が報告されている。これらは全て同一の基本骨格を有するか、もしくは oxazolomycins よりも基本骨格の短い類縁体である (Bagwell *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2006)。従って、今回 NBRC 14893^T から見つけた生合成遺伝子クラスターの産物は、これまで報告されてきた類縁体とは異なる新規の分子構造を持つ可能性が高い。近年、新規二次代謝産物の探索においてゲノムマイニングと呼ばれる手法が導入されるようになってきた (Challis, 2008a, 2008b)。この手法はゲノム中に新しい生合成遺伝子を持つ株から新規化合物を探していくものである。本研究による新規性の高い oxazolomycin 類縁体生合成遺伝子クラスターの発見はゲノムマイニングを進める研究者に対して NBRC が保有する *S. avermitilis* の有用性を示すことになり、カルチャーコレクションとして価値の高い仕事である。

NBRC では *S. avermitilis* NBRC 14893^T 以外にも、ゲノム解読された *S. griseus* NBRC 13350 (Ohnishi *et al.*, 2008) や *S. coelicolor* A3(2) (Bentley *et al.*, 2002) に由来する *S. violaceoruber* NBRC 15146 などを有している。そこで *S. griseus* NBRC 13350 と *S. violaceoruber* NBRC 15146 のゲノム DNA を鋳型にして NRPS 遺伝子を PCR で増幅したが、公開されている各菌株のゲノム配列に存在しない NRPS 遺伝子は一切増幅しなかった (データ略)。従って、今回 *S.*

avermitilis NBRC 14893^T における当初不可解に思えた事例に遭遇する頻度は低く、特殊な例だったのかもしれないが、カルチャーコレクションの担当者や菌株のユーザーはこのようにも起こりうると認識しておく必要がある。

文献

- Bagwell, C.L., Moloney, M.G. & Thompson, A.L. 2008. On the antibiotic activity of oxazolomycin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **18**: 4081-4086.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., 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, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J. & Hopwood, D.A. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- Burg, R.W., Miller, B.M., Baker, E.E., Birnbaum, J., Currie, S.A., Hartman, R., Kong, Y.L., Monaghan, R.L., Olson, G., Putter, I., Tunac, J.B., Wallick, H., Stapley, E.O., Oiwa, R. & Omura, S. 1979. Avermectins, new family of potent anthelmintic

- agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**: 361-367.
- Challis, G.L. 2008a. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology* **154**: 1555-1569.
- Challis, G.L. 2008b. Genome mining for novel natural product discovery. *J. Med. Chem.* **51**: 2618-2628.
- Chen, W., He, F., Zhang, X., Chen, Z., Wen, Y. & Li, J. 2010. Chromosomal instability in *Streptomyces avermitilis*: major deletion in the central region and stable circularized chromosome. *BMC Microbiol.* **10**: 198.
- Chiu, H.T., Hubbard, B.K., Shah, A.N., Eide, J., Fredenburg, R.A., Walsh, C.T. & Khosla, C. 2001. Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 8548-8553.
- Enkh-Amgalan, J., Komaki, H., Daram, D., Ando, K. & Tsetseg, B. 2012. Diversity of nonribosomal peptide synthetase and polyketide synthase genes in the genus *Actinoplanes* found in Mongolia. *J. Antibiot.* **65**: 103-108.
- Evans, M., Kaczmarek, F.S., Stutzman-Engwall, K. & Dyson, P. 1994. Characterization of a *Streptomyces lividans*-type site-specific DNA modification system in the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* permits investigation of two novel giant linear plasmids, pSA1 and pSA2. *Microbiology* **140** (Pt 6): 1367-1371.
- Fischbach, M.A. & Walsh, C.T. 2006. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* **106**: 3468-3496.
- Fischer, G., Decaris, B. & Leblond, P. 1997. Occurrence of deletions, associated with genetic instability in *Streptomyces ambofaciens*, is independent of the linearity of the chromosomal DNA. *J. Bacteriol.* **179**: 4553-4558.
- Ichikawa, N., Sasagawa, M., Yamamoto, M., Komaki, H., Yoshida, Y., Yamazaki, S. & Fujita, N. 2013. DoBISCUIT: a database of secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Nucleic. Acids Res.* **41**: D408-414.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. & Omura, S. 2003. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**: 526-531.
- Ikeda, H., Nonomiya, T. & Omura, S. 2001. Organization of biosynthetic gene cluster for avermectin in *Streptomyces avermitilis*: analysis of enzymatic domains in four polyketide synthases. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 170-176.
- Ikeda, H., Shin-ya, K. & Omura, S. 2014. Genome mining of the *Streptomyces avermitilis* genome and development of genome-minimized hosts for heterologous expression of biosynthetic gene clusters. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 233-250.
- Kanesaki, Y., Shiwa, Y., Tajima, N., Suzuki, M., Watanabe, S., Sato, N., Ikeuchi, M. & Yoshikawa, H. 2012. Identification of substrain-specific mutations by massively parallel whole-genome resequencing of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res.* **19**: 67-79.
- Khan, S.T., Komaki, H., Motohashi, K., Kozono, I., Mukai, A., Takagi, M. & Shin-ya, K. 2011. *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environ. Microbiol.* **13**: 391-403.
- Komaki, H., Ichikawa, N., Oguchi, A., Hanamaki, T. & Fujita, N. 2012. Genome-wide survey of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase gene clusters in *Streptomyces turgidiscabies* NBRC 16081. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **58**: 363-372.
- Komaki, H., Izumikawa, M., Ueda, J., Nakashima, T., Khan, S.T., Takagi, M. & Shin-ya, K. 2009. Discovery of a pimaricin analog JBIR-13, from *Streptomyces bicolor* NBRC 12746 as predicted by sequence analysis of type I polyketide synthase gene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **83**: 127-133.
- Komaki, H., Tamura, T. & Suzuki, K. 2011. Intrageneric diversity of type-I ketosynthase domain genes in the genus *Nocardia*. *J. Antibiot.* **64**: 617-620.
- Li, T.L., Huang, F., Haydock, S.F., Mironenko, T., Leadlay, P.F. & Spencer, J.B. 2004. Biosynthetic gene cluster of the glycopeptide antibiotic teicoplanin: characterization of two glycosyltransferas-

- es and the key acyltransferase. *Chem. Biol.* **11**: 107-119.
- Medema, M.H., Trefzer, A., Kovalchuk, A., van den Berg, M., Müller, U., Heijne, W., Wu, L., Alam, M.T., Ronning, C.M., Nierman, W.C., Bovenberg, R.A., Breitling, R. & Takano, E. 2010. The sequence of a 1.8-Mb bacterial linear plasmid reveals a rich evolutionary reservoir of secondary metabolic pathways. *Genome Biol. Evol.* **2**: 212-224.
- Morita, H., Toh, H., Fukuda, S., Horikawa, H., Oshima, K., Suzuki, T., Murakami, M., Hisamatsu, S., Kato, Y., Takizawa, T., Fukuoka, H., Yoshimura, T., Itoh, K., O'Sullivan, D.J., McKay, L.L., Ohno, H., Kikuchi, J., Masaoka, T. & Hattori, M. 2008. Comparative genome analysis of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum* reveal a genomic island for reuterin and cobalamin production. *DNA Res.* **15**: 151-161.
- 中川恭好, 田村朋彦, 川崎浩子 2001. 第4章 遺伝子解析法 1. DNA の調製, 日本放線菌学会 (編), 放線菌の分類と同定, p. 83-87, 財団法人日本学会事務センター, 東京.
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M. & Horinouchi, S. 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* **190**: 4050-4060.
- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sasaki, Y. & Hattori, M. 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**: 12215-12220.
- Pootoolal, J., Thomas, M.G., Marshall, C.G., Neu, J.M., Hubbard, B.K., Walsh, C.T. & Wright, G.D. 2002. Assembling the glycopeptide antibiotic scaffold: The biosynthesis of A47934 from *Streptomyces toyocaensis* NRRL15009. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**: 8962-8967.
- Sugawara, H., Ohyama, A., Mori, H. & Kurokawa, K. 2009. Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP) for diverse users. The 20th International Conference on Genome Informatics (GIW2009) Poster and Software Demonstration, S001-001-002, Yokohama.
- Uchida, T., Ishihara, N., Zenitani, H., Hiratsu, K. & Kinashi, H. 2004. Circularized chromosome with a large palindromic structure in *Streptomyces griseus* mutants. *J. Bacteriol.* **186**: 3313-3320.
- Wang, X.J., Yan, Y.J., Zhang, B., An, J., Wang, J.J., Tian, J., Jiang, L., Chen, Y.H., Huang, S.X., Yin, M., Zhang, J., Gao, A.L., Liu, C.X., Zhu, Z.X. & Xiang, W.S. 2010. Genome sequence of the milbemycin-producing bacterium *Streptomyces bingchenggensis*. *J. Bacteriol.* **192**: 4526-4527.
- Zhao, C., Coughlin, J.M., Ju, J., Zhu, D., Wendt-Pienkowski, E., Zhou, X., Wang, Z., Shen, B. & Deng, Z. 2010. Oxazolomycin biosynthesis in *Streptomyces albus* JA3453 featuring an "acyltransferase-less" type I polyketide synthase that incorporates two distinct extender units. *J. Biol. Chem.* **285**: 20097-20108.
- Zhao, C., Ju, J., Christenson, S.D., Smith, W.C., Song, D., Zhou, X., Shen, B. & Deng, Z. 2006. Utilization of the methoxymalonyl-acyl carrier protein biosynthesis locus for cloning the oxazolomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces albus* JA3453. *J. Bacteriol.* **188**: 4142-4147.

Streptomyces avermitilis NBRC 14893^T has complestatin and oxazolomycin analog biosynthetic gene clusters, which do not exist in the reported genome sequence of *S. avermitilis* MA-4680^T

Hisayuki Komaki, Natsuko Ichikawa, Mitsuo Sekine, Yuko Kitahashi, Nobuyuki Fujita and Ken-ichiro Suzuki

Biological Resource Center, National Institute of Technology and Evaluation (NBRC)

The complete genome sequence of *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267^T, known as an avermectin producer, was reported in 2001 (Omura *et al.*, 2001), and is now published as that of *S. avermitilis* MA-4680^T in GenBank/EMBL/DDBJ (Ikeda *et al.*, 2003). In our PCR-based nonribosomal peptide synthetase (NRPS) gene analysis for actinomycetes, NRPS genes that are not present in the *S. avermitilis* complete genome sequence were unexpectedly amplified from *S. avermitilis* NBRC 14893^T. To investigate the reason of this unexpected result, we sequenced the whole genome of *S. avermitilis* NBRC 14893^T using Genome Sequencer FLX and Illumina HiSeq1000. Consequently, the genome size was estimated at approximately 10 Mb, and 92 contig/scaffold sequences were obtained. Some of the sequences were not present in the published *S. avermitilis* genome sequence. Approximately 40 kb of NRPS gene cluster and 65 kb NRPS/polyketide synthase hybrid gene cluster, previously unreported in *S. avermitilis*, were discovered in the NBRC 14893^T-specific genome sequences. Bioinformatic analyses suggested that the two gene clusters were likely involved in the synthesis of demethylcomplestatin and a novel oxazolomycin analog, respectively. According to strain transfer histories among culture collections, the original type strain *S. avermitilis* MA-4680^T had been deposited to Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), and the NRRL strain had been subsequently deposited to KCC Culture Collection of Actinomycetes, Kaken Pharmaceutical Co., Ltd. (KCC) and American Type Culture Collection (ATCC). NBRC 14893^T is derived from the KCC strain, while the complete genome-elucidated strain is from ATCC 31267^T. It is hard to imagine that pure culture stocks acquire additional DNA coding large biosynthetic gene clusters. Furthermore, plasmid loss and dynamic genome reconstitution frequently occur in the genus *Streptomyces*. Therefore, the deletion of the two gene clusters we discovered here had probably occurred after the type strain of *S. avermitilis* was transferred from NRRL to ATCC.

(担当編集委員：田中尚人)