

氏 名 福田 康二

授与した学位 博士

専攻分野の名称 農 学

学位授与番号 博甲第4154号

学位授与の日付 平成22年 3月25日

学位授与の要件 自然科学研究科 バイオサイエンス専攻

(学位規則第5条第1項該当)

学位論文の題目 放線菌の核酸系抗生物質生産に関わる *rpoB* 遺伝子解析及び新規アルギニン代謝経路の同定

論文審査委員 教授 稲垣 賢二 教授 神崎 浩 准教授 田村 隆

学位論文内容の要旨

放線菌 *Streptomyces incarnatus* が生産する核酸系抗生物質シネフンギンは、L-オルニチンの5位炭素とアデノシンの5位炭素が C-C 結合した構造を持ち、抗真菌活性、抗ウイルス活性、抗トリパノゾーマ活性を示す。過去の報告によるとその生合成は ATP と L-オルニチンもしくは L-アルギニンが前駆体であると推測されている。しかしその生合成機構は明らかではない。シネフンギン生産は *S. incarnatus* による二次代謝として厳密に制御されており、生合成研究には培養条件の確立、休止菌体反応系の確立、変異導入によるシネフンギン生産の活性化が必要とされた。本研究では放線菌の *rpoB* 遺伝子への変異導入による抗生物質生産の活性化を検討とした。次にシネフンギン生合成経路の解明を目的としてアルギニン変換反応の解析、関連酵素の精製と解析を行った。

放線菌の二次代謝は RNA ポリメラーゼ β サブユニット(*rpoB* 遺伝子産物)に ppGpp が結合して開始される。そこで *S. incarnatus* の *rpoB* 遺伝子への変異導入を行った。その結果、ppGpp 結合部位に変異を持つ株が得られ、そのシネフンギン生産量は約7倍向上した。また生育速度の上昇も確認された。*rpoB* 遺伝子のクローニングと全塩基配列決定の結果、変異変異によるアミノ酸置換は D427G の1箇所のみであった。また核酸系抗生物質ヌクレオシジンを生産する放線菌 *Streptomyces calvus* にも同様に *rpoB* 変異導入を行なった結果、ヌクレオシジン生産性が向上した。生育速度は野生株よりも著しく低下し、*rpoB* 遺伝子産物の H437R, R440S の2箇所に変異を同定した。本研究は *rpoB* 変異により核酸抗生物質生産が向上した最初の報告である。また D427G 単独変異, H437R, R440S 二重変異は新規な *rpoB* 変異であり、他の放線菌の抗生物質生産にも有効と考えられる。

次にシネフンギン前駆体を明らかにするために休止菌体反応系への前駆体の供給を検討した結果、L-アルギニンの添加によりシネフンギン合成が促進された。休止菌体反応系へL-アルギニンを供給しその経時変化を追跡した結果、12時間以内にL-アルギニンは低極性化合物へと完全に変換された。¹H-NMR, FAB-MS によって化合物の分析を行った結果、「オルニチンラクタム」同定された。さらに、このアルギニン代謝を触媒する酵素を解明するために、酵素精製を行った。休止菌体反応液での変換を活性を確認後、硫酸分画および DEAE-Toyopearl, Sephacryl S-200 HR, Phenyl Toyopearl Hydroxy-apatite の各種担体を用いたカラムクロマトグラフィーを行った。その結果、SDS-PAGE により 43 kDa の単一バンドを確認した。ゲル濾過カラムクロマトグラフィーで決定された酵素の分子量は 131 kDa であり、の3量体構造が示唆された。基質特異性の検討の結果、L-アルギニン特異的に反応が進行し、ウレアーゼ-GLDH 法により反応液中の尿素の生成が確認された。精製酵素の N 末端アミノ酸配列解析を行った。その結果、ストレプトマイセス属由来 L-アラニン脱水素酵素と N 末端7アミノ酸の配列が完全に一致した。精製した酵素にも L-アラニン脱水素酵素活性が確認され、L-アラニン脱水素酵素による L-アルギニンからオルニチンラクタムへの変換が強く示唆された。

以上より、本研究では放線菌の *rpoB* 遺伝子変異による核酸系抗生物質生産の活性化と、*Streptomyces incarnatus* におけるアルギニン代謝について重要な知見を提供した。

論文審査結果の要旨

放線菌 *Streptomyces incarnatus* が生産する核酸系抗生物質シネフンギンは、L-オルニチンの 5 位炭素とアデノシンの 5 位炭素が C-C 結合した構造を持ち、抗真菌活性、抗ウイルス活性、抗トリパノゾーマ活性を示す。シネフンギン生産は *S. incarnatus* による二次代謝として厳密に制御されており、生合成研究には培養条件の確立、休止菌体反応系の確立、変異導入によるシネフンギン生産の活性化が必要とされた。そこで本研究では、放線菌の *rpoB* 遺伝子への変異導入による抗生物質生産の活性化を検討した。放線菌の二次代謝は RNA ポリメラーゼ β サブユニット(*rpoB* 遺伝子産物)に ppGpp が結合して開始される。*S. incarnatus* の *rpoB* 遺伝子への変異導入を行った結果、ppGpp 結合部位に変異を持つ株が得られ、そのシネフンギン生産量は約 7 倍向上した。*rpoB* 遺伝子のクローニングと全塩基配列決定の結果、変異変異によるアミノ酸置換は D427G の 1 箇所のみであった。また核酸系抗生物質ヌクレオシジンを生産する放線菌 *Streptomyces calvus* にも同様に *rpoB* 変異導入を行なった結果、ヌクレオシジン生産性が向上した。*rpoB* 遺伝子産物の H437R, R440S の 2 箇所に変異を同定した。これらの成果は *rpoB* 変異により核酸抗生物質生産が向上した最初の報告である。

次にシネフンギン前駆体を明らかにするために休止菌体反応系への前駆体の供給を検討した。L-アルギニンの添加によりシネフンギン合成が促進することが示された。休止菌体反応系へ L-アルギニンを供給しその経時変化を追跡した結果、12 時間以内に L-アルギニンは低極性化合物へと完全に変換された。¹H-NMR, FAB-MS によって化合物の分析を行った結果、オルニチンラクタムと同定された。さらに、このアルギニン代謝を触媒する酵素を解明するために、酵素精製を行った結果、SDS-PAGE により 43 kDa の単一バンドを確認した。基質特異性の検討の結果、L-アルギニン特異的に反応が進行し、ウレアーゼ-GLDH 法により反応液中の尿素の生成が確認された。シネフンギン生合成には新規のアルギニン代謝系が関与することが示唆された。

上記の論文内容、発表会における応答を総合的に審査した結果、博士の学位に値するものと判断した。