

## 論文の内容の要旨

論文題目      ダウノルピシン生合成に関わる DnrN 及び DrrC 蛋白質の機能解析

氏 名      古家加夫留

放線菌は気菌糸や孢子形成を含む独特な形態分化と多種多様の二次代謝を特徴とする興味深いグラム陽性細菌である。このような複雑な形質を制御するために放線菌は各種多様の制御機構を融合し、進化してきたと考えられる。制御機構の中には、真核生物に特徴的と思われていたセリン、スレオニンキナーゼやホルモン様物質を介したのものや、放線菌特異的な機構も発見されている。また、原核生物が一般に持つ制御機構も当然備えており、その中でもいわゆる 2 成分制御系の遺伝子の存在が近年相次いで報告されている。

放線菌で 2 成分制御系応答因子と相同性を持つ遺伝子が報告され、その遺伝子産物の結合標的が明らかとなった最初の例は *Streptomyces peucetius* 由来の daunorubicin 生合成系遺伝子群内の *dnrN* 遺伝子である。daunorubicin とその 14 位の水酸化体である doxorubicin は有用な anthracycline 系の化学療法剤であり、*S. peucetius* においては 40 Kb にわたる生合成遺伝子群の塩基配列が決定されている。その中のひとつである *dnrN* 遺伝子産物は 2 成分制御系応答因子、特に FixJ サブファミリーと非常に高い相同性を示し、さらに同生合成遺伝子群の他の調節遺伝子 *dnrI* の転写に必須であることが判明している。*dnrI* 遺伝子産物は AfsR 等の放線菌の調節タンパク質と相同性を持ち、daunorubicin の構造遺伝子や自己耐性遺伝子の活性化に直接作用する。

一方、上記生合成遺伝子群に存在し、daunorubicinの自己耐性に関与する遺伝子のひとつである *drnC* 遺伝子産物は興味深いことに、紫外線損傷の除去修復に関わる DNA 結合タンパク質 UvrA と全域にわたって相同性がある。daunorubicin は DNA に結合あるいは損傷することが知られていることから、DrrC タンパク質は UvrA タンパク質と同様な作用により自己耐性を付与する新しい耐性機構の例である可能性が考えられる。

この様に興味深い、二つの DNA 結合性タンパク質と推定される DnrN と DrrC の機能と制御機構の解明を目的として、本研究を行った。

大腸菌に発現させた DnrN タンパク質を用いてゲル・リーターデーション・アッセイを行い、このタンパク質が *dnrI* 遺伝子のプロモーター部分に高い親和性 ( $K_d=50\text{nM}$ ) で特異的に結合するタンパク質であることを証明した。DNase I フット・プリンティング・アッセイの結果、本タンパク質は *dnrI* 遺伝子の転写開始点の 37 塩基から 55 塩基上流の部分と、62 塩基から 100 塩基上流の二つの部分に特異的に結合する事が判明したが、この部分には、daunorubicin 結合性が高いと報告されている 3 塩基の配列 (5'-A/TGC, 5' A/TCG, 5'-A/TCA/T) が重なり合いながら、繰り返し存在した。この事とゲル・リーターデーション・アッセイで daunorubicin が DnrN タンパク質と *dnrI* 遺伝子のプロモーター部分の結合を阻害する事を考え合わせると、daunorubicin が制御機構の中のこの段階でフィードバック阻害因子として働いているというモデルが提唱される。放線菌の 2 成分制御系応答因子に相同性を持つ遺伝子の報告は多数あるが、タンパク質レベルでの解明が行われたのは、本研究が今のところ、唯一である。

2 成分制御系応答因子はリン酸化によりその活性が制御されるが、DnrN タンパク質の場合、菌体抽出液あるいは低分子リン酸基供与体である acetyl phosphate を用いてもリン酸化は検出できず、リン酸化を受けると推定される 55 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに変換したタンパク質もゲル・リーターデーション・アッセイで同等の結合能を示したことから、本タンパク質はリン酸化の影響を受けない事が明確となった。その後、DnrN タンパク質と高い相同性を示す *Streptomyces coelicolor* 由来の転写制御因子 RedZ や胞子形成に関わる WhiK や WhiI タンパク質でも、リン酸化を受ける可能性が低いことが相次いで報告され、本研究は 2 成分制御系応答因子

と高い相同性を持ちながら実際にはリン酸化による活性調節を受けない独立の転写制御因子であるタンパク質としての、放線菌における先駆例であった。

また、DnrN タンパク質を構成的プロモーターを用いて高発現させると、気菌糸形成が抑制されるという現象が見られたことより、*Streptomyces coelicolor* 由来の RamR や *Streptomyces griseus* 由来の AmfR といった 2 成分制御系応答因子相同タンパク質と同様に形態形成制御にも本タンパク質は関与している可能性が示唆された。

さらに、DnrN タンパク質に対する抗体を作成して DnrN タンパク質の細胞内量を解析した結果、daunorubicin 系化合物を生産しない株では量が低下していたことから、daunorubicin あるいはその前駆体が DnrN タンパク質の発現誘導に関与していると考えられた。また、DrrC タンパク質および DrrA タンパク質の細胞内量を解析した結果からは、これら耐性タンパク質の発現誘導には DnrN/DnrI 制御系に加えて、daunorubicin が直接必要であることが判明した。

これらの知見をまとめると、daunorubicin の生合成の制御機構として以下のような様式が提唱される。daunorubicin が合成される以前の初期の増殖段階では、*dnrN* 遺伝子はほとんど発現しておらず、DnrN タンパク質の制御下にある *dnrI* 遺伝子、ひいては DnrI タンパク質の制御下にある daunorubicin の生合成酵素遺伝子および耐性遺伝子も低い発現レベルにある。daunorubicin あるいはその前駆体の菌体内濃度が高まると *dnrN* 遺伝子の発現を引き起こし、*dnrI* 遺伝子の発現上昇を介して生合成酵素遺伝子および耐性遺伝子の十分な発現がおきる。daunorubicin は発現された DrrA タンパク質及び DrrB タンパク質によって常に汲み出されるので、daunorubicin の生産量が低下すると菌体内の daunorubicin 量も低くなり、*dnrN* 遺伝子の発現が維持されず、生合成系全体が抑制される。逆に何らかの理由で菌体内の daunorubicin 量が上昇し過ぎて、DnrN タンパク質の *dnrI* 遺伝子プロモーターへの結合を阻害する濃度に達した場合、*dnrI* 遺伝子の発現がフィードバック阻害され生合成系全体が抑制される。*dnrI* 遺伝子のプロモーター部分は daunorubicin に対する結合性が染色体の他の部分に比べ高く、センサーの役目を果たしているとも考えられる。また、上述の様に daunorubicin は耐性遺伝子の発現段階に直接関わっており、計 3 段階で daunorubicin 系化合物が制御因子として働いていることになる。

DrrC タンパク質に関しては、本遺伝子が放線菌のみならず、大腸菌においても、daunorubicin 耐性遺伝子として作用することを確認し、その遺伝子産物が直接に耐性に関与していることの一つの証拠を示した。また、本遺伝子は *uvrA* 欠損株の紫外線耐性を相補する事はできず、DrrC タンパク質が UvrA タンパク質の機能をそのまま、代替できるものではない。しかし、一方、*uvrA*<sup>+</sup> の大腸菌に *drrC* 遺伝子を導入すると明らかな紫外線照射に対する耐性を付与した。このことから DrrC タンパク質は何らかの機構で UvrABC 除去修復機能を増強しており、しかも、その機構は UvrA タンパク質を介していると思われる。

次に大腸菌中で発現させた組換えタンパク質を用いて、DrrC タンパク質は DNA 結合性タンパク質である事を示した。さらに、この結合性は ATP が必須である点と、DNA にインターカレートする薬剤(本実験では daunorubicin)が結合を増強する点で UvrA タンパク質の結合性と類似した性質を示した。これらの特徴から DrrC タンパク質の耐性付与機能として、DrrC タンパク質は daunorubicin がインターカレートした DNA 領域に結合することによって、1) daunorubicin を DNA から遊離させ、転写や DNA 複製に対する毒性を軽減する 2) daunorubicin の引き起こすフリーラジカルによる DNA の損傷を防止するといったことが考えられ、同様な機構が UvrA-UvrB タンパク質複合体と anthramycin が結合した DNA に関して提唱されている。あるいは、UvrA タンパク質のように、UvrBC 複合体を daunorubicin が結合した部位に呼び寄せ、損傷を除去修復を促進している可能性も考えられる。いずれにせよ、抗生物質の自己耐性遺伝子がこのような機構を持つ例の報告はこれが最初であった。また、精製した DrrC タンパク質に対する抗体を作成し、本タンパク質は細胞質タンパク質である事を示し、この点でも DrrC タンパク質は ABC 型の膜タンパク質である DrrA タンパク質や DrrB タンパク質とは別のメカニズムで働いている事が確認された。

daunorubicin 生産菌において、遺伝子レベルで長年蓄積されてきた知見に、本研究ではタンパク質レベルでの解析を加えることによって、この菌における制御機構及び耐性機構をより詳細に浮かび上がらせた。この知見は daunorubicin の生産性の上昇に応用可能であるとともに、抗生物質生合成系において普遍性を持つ新たな耐性機構、制御機構のモデルの提唱にもつながったと考える。