

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 古 家 加 夫 留

放線菌 *Streptomyces peucetius* が生産するポリケタイド類の1つである daunorubicin は、DNA 結合性を有し、抗がん剤として利用されている。Daunorubicin の全生成遺伝子クラスターの塩基配列が明らかにされ、その中に二成分制御系応答因子と相同な蛋白をコードする *dnrN* 遺伝子および紫外線損傷の除去修復に関わる UvrA と相同性を有する蛋白をコードする *drrC* 遺伝子が同定された。本論文は、daunorubicin 生合成における DnrN 制御蛋白と DrrC 耐性蛋白の機能についてまとめたものである。

大腸菌に発現させた DnrN タンパク質を用いてゲル・リターデーション・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 ($K_d = 50$ nM) で特異的に結合することを証明した。DnrI 蛋白は、クラスター内の他の生合成酵素遺伝子に対する転写アクチベーターである。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。このことと 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て、daunorubicin が生合成制御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を提唱した。一方、二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、本タンパク質の場合、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、DnrN は二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、放線菌における先駆例となった。また、RamR や AmfR といった放線菌由来の二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 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。Daunorubicin 耐性酵素である DrrA タンパク質および DrrC 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。

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

伝子として機能することを確認し、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。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タンパク質は一般的にDNAに結合する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DNAへ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推定された。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、DNA損傷の除去修復を促進している可能性も考えられる。DNA結合性を有する抗生物質の自己耐性遺伝子が自身の生産物による自殺を防ぐ手段として、このような機構を持つ例としてこれが最初の報告であった。

以上、本論文は抗ガン剤として実用化されている薬剤daunorubicinの生合成におけるDnrN制御蛋白の機能および自己耐性に関わるDrrC蛋白の機能を述べたもので、学術上、応用上貢献するところが少ない。よって審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。