

## 論文内容の要旨

応用生命化学専攻

平成12年度博士課程 入学

氏名 中西 央由

指導教官名 長澤 寛道

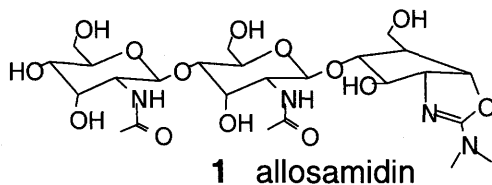
### 論文題目

キチナーゼ阻害物質アロサミジン生産放線菌におけるキチナーゼ生産機構に関する研究

自然界には様々な環境に適応した微生物が多数生息する。カビ、放線菌、キノコなどの微生物はたくさんの二次代謝産物をつくり、その構造は多彩で、生理活性物質の宝庫となっている。今日までに、抗生物質や酵素の阻害剤など様々な生理活性を有する二次代謝産物が数多く知られており、それらは薬剤開発をはじめ我々の生活にとって重要な役割を果たしている。しかし、それらの生産者である微生物自身に対する二次代謝産物の役割については未だ明らかになっていない。

放線菌の二次代謝産物のひとつとして生産されるアロサミジン 1 は特異な疑似三糖構造を有し、種々の生物由来のファミリー 18 キチナーゼを強く阻害する。アロサミジン生産放線菌は自然界で比較的高頻度で見出され、同時にキチナーゼも生産している。アロサミジン生産菌において、キチナーゼとその阻害物質であるアロサミジンの両者の生産性に関連が見られ、また、アロサミジンはアロサミジン生産菌の培養液に外部から添加した場合生産菌の菌体に吸着され、生産菌のキチナーゼ生産を促進する作用を有することが見いだされた。そこで、本研究では、微生物の二次代謝産物生産の生理的意義を探るためのモデルとして、アロサミジンの生産菌に対するキチナーゼ生産促進機構を分子レベルで解明することを目的とし、次の実験を行った。まず、アロサミジンのアロサミジン生産菌および非生産菌のキチナーゼ生産に対する影響を詳細に調べた。次に、アロサミジンによって生産が促進されるキチナーゼの解析を行った。即ち、アロサミジン生産菌において、アロサミジンの作用からキチナーゼ遺伝子の発現まで、何らかのシグ

ナル伝達経路が存在することが推測されるが、アロサミジンの作用の最終段階として分泌されるキチナーゼを解析し、アロサミジンの作用の全体像を探る手がかりとしようと考えた。以下にそれらの実験と結果について概説する。

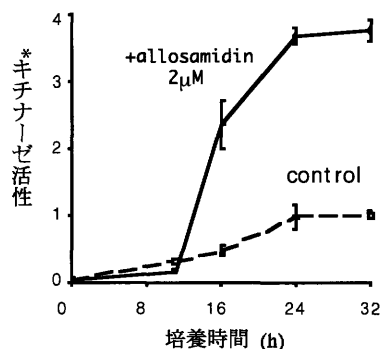


## 第一章 アロサミジン生産菌のキチナーゼ生産に対するアロサミジンの効果

まずアロサミジン生産放線菌 *Streptomyces* sp. AJ 9463 株の、培養液上清のキチナーゼ活性の経時変化に対するアロサミジン添加の影響を調べた。キチンを単一の炭素源とする培地で培養し、培養開始時にアロサミジンを培地に 2  $\mu\text{M}$  の濃度で添加した場合、無添加の場合と比較して活性の顕著な増加が観察された(図1)。

(図1)コロイダルキチン培地を用いた誘導実験

\*培養 32 時間目の control の活性を 1 とした相対値



次に、アロサミジン非生産菌である *Streptomyces lividans* を用いて、同様の培養条件でアロサミジン添加条件下でのキチナーゼ活性の経時変化を調べた。その結果、アロサミジン生産菌の場合とは異なり、アロサミジンを添加した場合にキチナーゼ活性の増加は見られず、無添加の場合より低いキチナーゼ活性が検出された。

放線菌では、ジ-N-アセチルキトビオースがキチナーゼ生産誘導活性を有することが知られている。AJ9463 株のキチン培地での培養においてジ-N-アセチルキトビオースを添加したところ、30  $\mu\text{M}$  の濃度でキチナーゼ活性の増加が見られ、アロサミジンの効果はジ-N-アセチルキトビオースより強いことが示された。

一方、グルコースを主炭素源とする Bennet 培地で培養後集菌し、無機塩培地に置換する条件下での、キチナーゼ生産誘導実験では、アロサミジンによるキチナーゼ生産誘導活性を検出することはできなかった。一方、ジ-N-アセチルキトビオースは、同条件下で 5  $\mu\text{M}$  の濃度でキチナーゼ生産を誘導し、アロサミジンとジ-N-アセチルキトビオースでのキチナーゼ生産に対する作用の違いがあることが示された。

## 第二章 アロサミジン添加により生産されるキチナーゼの解析

アロサミジン生産菌 AJ9463 株において、アロサミジンの添加によって生産が誘導あるいは促進されるキチナーゼが存在することが示唆されたことから、アロサミジンにより生産が促進されるタンパク質について解析を行った。アロサミジンの添加の有無により最も大きなキチナーゼ活性の差が認められる 24 時間培養後の培養上清を回収し、濃縮・アセトン沈殿後、SDS-PAGE・CBB 染色に供した。培養開始時にアロサミジンを 2  $\mu$ M 添加した場合、アロサミジン無添加の場合に比べて、約 105, 65, 52, 47 kDa の 4 本のバンドが明らかに強く検出された。SDS-PAGE 後活性染色した結果、CBB 染色で強く検出されたバンドのうち、65 kDa と 52 kDa のバンドに明らかにキチナーゼ活性が検出されたが、47 kDa のバンドには活性が認められなかった。

次に、アロサミジンの添加により誘導されるキチナーゼの同定を行うため、キチンカラムを用いた精製法を検討したところ、キチンカラムに 65, 52, 47 kDa のバンドが吸着し 100 mM 酢酸で溶出されることが分かった。更に、ビオチン化アロサミジンを固定化したアフィニティカラムには、65 kDa のタンパク質がやや強く吸着することが示された。

## 第三章 アロサミジンにより生産促進される 65 kDa キチナーゼ遺伝子の構造解析

アロサミジンにより誘導されるキチナーゼについて、電気泳動後、PVDF 膜への転写を行い、N 末端アミノ酸配列解析を行った。このうち、52 kDa については培養のバッチにより異なる複数のアミノ酸配列が得られることより、単一のタンパク質のバンドではないことが示唆された。65 kDa のタンパク質については、N 末端アミノ酸配列からの相同性検索よりキチナーゼであることが推定されたので、このタンパク質をコードする遺伝子を取得することを試みた。まず、アミノ酸配列より設計した縮重プライマーを用いて部分配列を決定し、得られた部分配列からジャストマッチプライマーを作製し、遺伝子全長の塩基配列を決定した。決定した配列から得られたアミノ酸配列(625 aa)は *Streptomyces griseus* の chitinase III 等の数種のファミリー 18 キチナーゼと 80%前後の高い相同性を有していた。また、47 kDa のタンパク質の N 末端アミノ酸配列は 65 kDa キチナーゼの 169 アミノ酸残基目からの配列と一致し、47 kDa タンパク質は 65 kDa キチナーゼの分解物であることが示された。65 kDa キチナーゼをコードする遺伝子のプロモーター領域には、*Streptomyces* 属のファミリー 18 キチナーゼ遺伝子に広く見られる 12 bp の繰り返し配列が存在した。

#### 第四章 AJ9463 株の生産するキチナーゼ遺伝子の発現解析

次に、アロサミジンによって生産が促進される 65 kDa キチナーゼの遺伝子発現量の解析を行い、アロサミジンの作用を調べた。mRNA 量は、RT-PCR 法により分析した。65 kDa キチナーゼ遺伝子の mRNA レベルはアロサミジン無添加の場合、培養開始 6 時間目に培養開始時の約 4 倍、9 時間目に約 6 倍で最大となり、その後下降して 15 時間目には培養開始時の約 2.5 倍で一定になった。一方、アロサミジン添加条件下では培養開始 6 時間目では培養開始時の約 2 倍であったが、その後急速に発現量が上昇し、9 時間目には培養開始時の約 10 倍に達した。その後は発現量は下降するが、下降速度はアロサミジン無添加の場合に比べ緩やかであり、培養開始 15-18 時間目で培養開始時の約 7.5 倍と無添加の場合の約 3 倍の発現量を維持していた。

AJ9463 株はグルコースを主炭素源とする Bennet 培地で培養した場合、ファミリー 18 キチナーゼである ChiS およびファミリー 19 キチナーゼである ChiIS の 2 種類のキチナーゼを主に生産することが知られる。キチン培地での培養で得られる培養上清からは、ChiS、ChiIS ともに SDS-PAGE では検出することができず、65 kDa キチナーゼに比べて生産量が非常に少ないことが推測された。*chiS* および *chiIS* の発現に対するアロサミジンの影響を、先程と同様 RT-PCR 法により mRNA 量の解析を行うことにより調べたところ、*chiS* の mRNA 発現量は培養初期でアロサミジン添加により無添加の場合より多い発現量であったが、その後急速に低下し、無添加の場合との差がほとんど認められないレベルとなった。一方、*chiIS* の mRNA レベルにはアロサミジンの添加による影響は見られなかった。

以上のように本研究では、アロサミジン生産菌をキチンを単一の炭素源とする培地で培養する際、アロサミジンが 2  $\mu$ M 程度の添加でキチナーゼ生産を顕著に促進することを見い出した。次いで、キチン培地での培養でアロサミジンの添加により誘導されるタンパク質について、分子量の確認と、活性染色によるキチナーゼ活性の検出を行い、このうち 65 kDa のキチナーゼについてコードする遺伝子全長の塩基配列を決定した。更に、65 kDa キチナーゼおよび *chiS*、*chiIS* について mRNA の発現量の経時変化を解析し、65 kDa キチナーゼについてはアロサミジン添加条件下で無添加の場合に比べ mRNA の発現量が明らかに増加していることを明らかにした。

以上、本研究により、アロサミジンはその生産菌に対して重要な生理作用を持っていることが明らかとなり、今後、アロサミジンによるキチナーゼ誘導機構の解明、更に、キチンが豊富に存在する土壌環境中での炭素代謝系におけるアロサミジンの役割等の解明への大きな手がかりとなることが期待される。