

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 中西 央由

自然界には様々な環境に適応した微生物が多数生息し、多様な二次代謝産物をつくる。その構造は多彩で、生理活性物質の宝庫となっているが、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。アロサミジンを生産する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は関連性が見られ、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出されている。本研究は、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て行ったもので、序論とそれに続く4章からなる。

序論では、上記の背景を述べた後、第一章において、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に 2 mM の濃度で添加した場合、無添加の場合と比較してキチナーゼ活性の顕著な増加が観察された。この現象はアロサミジン非生産菌である *Streptomyces lividans* を用いた場合には見られなかった。また、放線菌でキチナーゼ生産誘導活性を有することが知られているジ-N-アセチルキトピオースを AJ9463 株のキチン培地での培養に添加したところ、30 mM 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-アセチルキトピ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のに対し、ジ-N-アセチルキトピオースは、5 mM でキチナーゼ生産を誘導したことから、両者はキチナーゼ生産に対する作用に違いがあることを示した。

第二章では、アロサミジン添加により生産されるキチナーゼの解析を行った。すなわち、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 染色に供したところ、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。キチンカラムによって 65, 52, 47 kDa のバンドが精製された。

第三章では、65 kDa のタンパク質について、N 末端アミノ酸配列解析を行い、その相同性検索から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。その結果、遺伝子全長の塩基配列を決定でき、625 アミノ酸をコードしており、ファミリー 18 キチナーゼと高い相同性を示した。また、47 kDa のタンパク質はその N 末端配列から 65 kDa タンパク質の N 末端側が切断された分解物であることがわかった。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することを示した。また、その上流には2成分制御系を構成すると考えられるセンサーヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレーターをコードする遺伝子が存在することを明らかにした。このことから、

アロサミジンが直接ヒスチジンキナーゼに結合し、リン酸の転移を伴って最終的に 65 kDa キチナーゼの転写が誘導される機構が推定された。

第四章では、AJ9463 株の生産するキチナーゼ遺伝子の発現解析を行い、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、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に比べて、常に高いレベルを維持することを明らかにした。AJ9463 株が生産する既知のキチナーゼ ChiS および ChiL の mRNA 発現量はアロサミジン無添加の場合と大差ないことがわかった。

以上、本研究は、アロサミジン生産菌を用いてその菌自身に対してキチナーゼを誘導するという二次代謝産物の役割の一端を分子レベルで明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。