

論文の内容の要旨

ML-236B 生合成遺伝子クラスターの構造と機能に関する研究

阿部 有生

ML-236B は、糸状菌の一種 *Penicillium citrinum* SANK18767 の培養上清に見出された強力なコレステロール合成阻害物質であり、コレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害することにより、メバロン酸の生合成を抑制する。また、ML-236B のデカリン骨格 6 β 位に、水酸基の導入されたプラバスタチンナトリウムは、高脂血症治療薬(商品名:メバロチン)として開発された。プラバスタチンナトリウムの工業生産において、ML-236B の発酵生産性とプラバスタチンナトリウムへの微生物変換効率を改善し、安価で、かつ、大量合成することは重要な課題である。後者の微生物変換については、変換菌である *Streptomyces carbophilus* からシトクロム P450_{sca-2} モノオキシゲナーゼが単離され、変換効率を改善するための諸検討が行われた。一方で、ML-236B の生合成機構は未解析の状態にあり、その発酵生産性の向上には、長らく、従来の微生物変異育種法、すなわち、変異原として紫外線照射、あるいは、ニトロソグアニジン処理により高生産株を選抜する方法、が用いられてきた。

本研究の目的は、これまで未知であった ML-236B の生合成に関与する遺伝子を単離し、その生合成機構を分子レベルで解析し、さらに、得られた知見に基づき ML-236B の発酵生産性向上に応用することにある。

第一章では、PCR 法による PKS 遺伝子断片のクローニングおよび ML-236B 生合成遺伝子クラスターのクローニングについて論ずる。PCR 法を用いて *P. citrinum* から PKS 遺伝子の単離を試みた結果、推定される候補遺伝子を 4 つ取得することができ、それぞれ *pks1* から *pks4* と命名した。次に、ML-236B の生合成に関与する可能性を検討するために、類縁物質ロバスタチン生産菌である *A. terreus* を用いて、各 PKS 遺伝子に対する相同遺伝子の有無を調べた結果、*pks4* についてのみ、相同遺伝子が検出された。ML-236B とロバスタチンは構造が非常に類似していることから、生合成に関与する PKS 遺伝子にも相同性を予測し、ML-236B 生産菌とロバスタチン生産菌の双方に存在する *pks4* が目的遺伝子ではないかと考えた。そこで、*pks4* 全長とその近傍の塩基配列解析を実施した結果、ML-236B の生合成に関与すると推定される、その他のタンパク質をコードする遺伝子が多数、存在することが明らかになり、ML-236B 生合成遺伝子クラスターの単離が示唆された。

第二章では、PCR 法で取得した *pks4* (*orf7* と同一) と生合成遺伝子クラスター内に、新に見出された PKS 遺伝子、*orf5* の機能を解析した。*orf7* の破壊株は ML-236B とその関連代謝産物の生産能力を完全に消失し、また、*orf5* の破壊株は ML-236B を産生しないが、その代わりに関連代謝産物である ML-236A を産生した。これらの結果、および、他の結果と総合して、*orf7* と *orf5* が、ML-236B のノナケチド鎖およびジケチド鎖の生合成にそれぞれ関与することが明らかになった。

第三章では、*A. terreus* より単離され、その構造が明らかにされたロバスタチン生合成遺伝子クラスターと、第一章で単離した *P. citrinum* の生合成遺伝子クラスターとの比較解析を実施して、ML-236B 生合成遺伝子の同定を試みた。*P. citrinum* における生合成遺伝子クラスターの構成遺伝子と、ロバスタチン生合成遺伝子クラスターの構成遺伝子との相同性を調べた結果、第二章で機能が明らかになった 2 つの PKS 遺伝子、*orf5* と *orf7*、を含む 9 つの遺伝子について、ロバスタチン生合成遺伝子クラスターの構成遺伝子と相同性が見出された。そこで、ML-236B 生合成遺伝子クラスター内のこれらの遺伝子について、ML-236B の生合成に関与する可能性を考え、それぞれ *mlcA* から *mlcH*、および、*mlcR* と命名した。また、各生合成遺伝子について、cDNA の塩基配列解析を実施し、推定されるタンパク質の構造を明らかにした。さらに、Reverse transcription (RT)-PCR 法を用いて、ML-236B の生産時期における各遺伝子の発現状態

を解析した結果、ML-236B の生産と一致して、ML-236B 生合成遺伝子が発現することが明らかになった。

第四章では、ML-236B の生合成遺伝子について、発現調節機構の解析を行った。ML-236B 生合成遺伝子の一つ、*mlcR* は、GAL4 型 DNA 結合モチーフを有するタンパク質をコードし、遺伝子の転写調節に関与する可能性が考えられた。また、この *mlcR* の発現状態と生合成遺伝子のいくつかにおける発現状態や ML-236B の生産時期が一致することから、ML-236B 生合成遺伝子の発現に際して、*mlcR* が何らかの調節機能を有すると考えられた。本章では、*mlcR* の発現状態を人為的に改変し、*mlcR* を恒常発現させた場合、ML-236B 生合成遺伝子の発現状態や ML-236B の生合成にどのような影響があるかを解析した。*Aspergillus nidulans* の 3-phosphoglycerate kinase (*pgkA*) 遺伝子のプロモーターを用いて、*mlcR* を恒常的に発現する形質転換株を作製した結果、ML-236B 生合成遺伝子のうち 7 つの遺伝子について発現状態が改変され、ML-236B の恒常生産株となった。すなわち、*mlcR* は、ML-236B 生合成遺伝子の転写調節因子として機能することが示された。

第五章では、*P. citrinum* の生産変異株について解析を行った。変異育種によって造成された高生産株 No. 41520 について、その高生産性の要因を明らかにするために、土壤分離株と歴代生産変異株との比較解析を行った。まず、高生産株 No. 41520 と親株について、ML-236B 生合成遺伝子の構造や塩基配列をそれぞれ比較した結果、遺伝子構造や塩基配列に違いはなかった。しかし、一方で、ディファレンシャルハイブリダイゼーションやノーザン解析によって、遺伝子の発現状態を比較した結果、高生産株においては ML-236B 生合成遺伝子クラスター、および、その周辺に存在する遺伝子の発現量が顕著に増大していることが明らかになった。すなわち、本高生産株 No. 41520 においては、何らかの変異によって、ML-236B 生合成遺伝子の発現量が特異的に増加したことにより、生産性が向上したと考えられた。

第六章では、第一章から第五章において得られた知見を基にして、遺伝子工学的な手法を用いた菌株育種を実施した。従来の変異処理により造成された高生産株においては、ML-236B 生合成遺伝子の発現量が顕著に増加していた。そこで、更に、その発現量を増加させることを目的として、第一章で得られたコスミドを媒体として、7 つの

遺伝子を含む ML-236B 生合成遺伝子クラスターの一部を一度に、ML-236B 生産菌に導入した。その結果、親株に比し有意に生産性の向上した菌株が取得された。また、ML-236B 生合成遺伝子の転写調節に関わる *mlcR* を単独で ML-236B 生産菌に導入し、そのコピー数を増幅した場合にも、親株や上記の生合成遺伝子クラスター導入株よりも、さらに高い生産性を有する菌株が取得された。これらの遺伝子導入株においては、*mlcR* が過剰に発現しており、生産性の増加に結びついたと考えられた。すなわち、これらの検討結果から、生合成遺伝子、とくに、*mlcR* のコピー数を増幅することによって生産性を向上させることができ、遺伝子工学的手法を用いて更なる高生産株を取得するという当初の目的を達成することができた。

本研究により、*P. citrinum* の生産する ML-236B について、その生合成に関与する遺伝子の構造と機能が明らかになった。また、ML-236B 生合成遺伝子の発現制御機構や高生産性の要因を分子レベルで解析した結果、ML-236B 生合成遺伝子の多くが転写制御遺伝子 *mlcR* の制御下にあることや、高生産性の原因が生合成遺伝子の発現量増加にあることが明らかになった。そして、分子生物学的なアプローチにより、得られた知見を生産菌の育種に応用することができ、当初の目的を達成したと考えている。一方で、本研究により新たに、*mlcR* 自身の発現を調節するメカニズムが ML-236B 生合成遺伝子の発現制御において重要な役割をもつことが明らかになった。今後、この *mlcR* 自身の転写調節機構を解析すれば、微生物二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの発現制御機構について、より理解が深まると考えている。