

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 阿部 有生

ML-236B は、糸状菌の一種 *Penicillium citrinum* SANK18767 の培養上清から単離された強力なコレステロール生合成阻害物質であり、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。ML-236B のデカリン骨格に水酸基を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として現在使用されている。本論文は、ML-236B の生合成機構の解明を基にして発酵生産性の向上を目指したもので、緒言と 6 章からなる。

緒言では、高脂血症の原因となるコレステロールの生合成について解説し、ML-236B およびロバスタチンを含む関連物質について述べ、ML-236B 自身の可能なポリケチド生合成経路について述べている。

第 1 章では、PCR 法によるポリケチド合成酵素 (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述べている。まず、PCR 法によって PKS の候補遺伝子を 4 つ取得し、そのうちロバスタチン生合成遺伝子との相同性から *pkc4* を目的遺伝子として選択した。次に、この遺伝子の全長とその近傍の塩基配列を解析した結果、ML-236B の生合成に関与すると推定される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となった。このことから、ML-236B 生合成遺伝子クラスターが単離されたと考えられた。

第 2 章では、*pkc4* (*orf7* と命名) を含む遺伝子クラスター内に新たに見つかった PKS 遺伝子 *orf5* の機能解析について述べている。すなわち、*orf7* および *orf5* のそれぞれの遺伝子破壊株を作製し、その代謝産物を精査することにより、これら 2 つの遺伝子が ML-236B の主鎖のノナケチドおよびそれにエステル結合したジケチドの生合成に関与することを明らかにした。

第 3 章では、単離された ML-236B 生合成遺伝子クラスターと *Aspergillus terreus* から単離されたロバスタチン生合成遺伝子クラスターとを比較することによって生合成遺伝子の同定を試みている。その結果、*orf5* および *orf7* を含めて合計 9 つの遺伝子に相同性が認められ、それぞれ *mlcA* から *mlcH* および *mlcR* と命名した。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 の生産とよく一致した発現が観察された。

第 4 章では、ML-236B の生合成遺伝子の発現調節機構の解析について述べている。*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ていることから転写調節に関与する可能性が考えられた。そこで、*mlcR* を恒常的に発現させたところ、生合成遺伝子のうち 7 つの遺伝子

が恒常的に発現するように改変され、ML-236B も恒常的に生産されるようになった。この結果から、*m/cR*は ML-236B 生合成遺伝子の転写調節遺伝子として機能することが明らかとなった。

第5章では、*P. citrinum*の生産変異株を解析した結果について述べている。変異育種によって造成された高生産株と約500分の1しか生産しない親株について、ML-236B 生合成遺伝子の構造および塩基配列を比較した結果、まったく同一であることがわかった。しかし、両者の生合成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が顕著に増大していることが明らかになった。すなわち、高生産株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増加したことにより、生産性が向上したと考えられた。

第6章では、これまでに得られた結果を基にして遺伝子工学的手法を用いた菌株育種について述べている。ML-236B 生合成遺伝子クラスターのうちの7つの遺伝子を含む断片を生産菌に導入した結果、親株に比して約20%生産性が向上した菌株が得られた。さらに、*m/cR*のコピー数を増幅した菌株を作製したところ、*m/cR*の発現量が増加し、ML-236B の生産性を約50%向上することができた。

以上、本論文はコレステロール生合成阻害剤 ML-236B の生合成遺伝子クラスターを取得し、その制御系を明らかにして、それを発酵生産に応用したものであり、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、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。