

論文の内容の要旨

論文題目 放線菌*Streptomyces kasugaensis*の生産するアミノグリコシド系抗生物質カスガマイシンの生合成とその排出に関する分子遺伝学的研究

氏名 池野 聡一

*Streptomyces*属放線菌（以後、放線菌と称す）はグラム陽性の原核微生物であるが、真核微生物のカビに類似した菌糸状の生育形態を示して気菌糸形成から孢子形成にいたる形態分化を行う。さらに、抗菌活性をはじめとする多種多様な生理活性をもつ抗生物質を二次代謝産物として生産している。放線菌から見出された抗生物質は、これまで発見されたカビをはじめとする微生物由来の抗生物質の60%を占めており、放線菌は創薬の研究・開発において極めて重要な微生物資源であると言える。

アミノグリコシド（AG）系抗生物質に分類されるカスガマイシン（KSM）は、稲イモチ病菌*Piricularia oryzae*（現在では*Magnaporthe grisea*の学名が使用されている）に対して強い抗菌活性を示す物質として、1965年に梅沢らによって*Streptomyces kasugaensis* M338-M1株の培養液から発見され、現在でも農薬として国内で広く使用されている。KSMは、アミノ糖のカスガミンとD-chiro-イノシトールがグリコシド結合して、カスガミン部分のC-4'位にはカルボキシホルミドイル側鎖を有する（図1）。

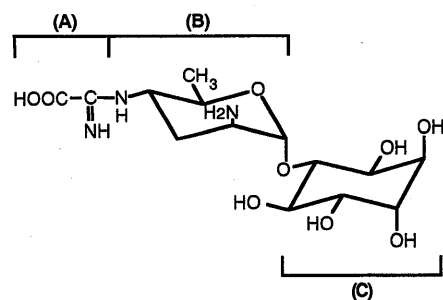


図1 カスガマイシンの化学構造
(A) カルボキシホルミドイル基。(B) カスガミン。
(C) D-chiro-イノシトール。

KSMの生合成については、カルボキシホルミドイル基がグリシン、カスガミンがUDP-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) , そしてD-*chiro*-イノシトールが*myo*-イノシトールをそれぞれ前駆体としていることが明らかにされている。しかし、その後、KSM生合成の酵素学的研究は行われず、また分子遺伝学的研究についても、約25年を経た1993年にKSM生産菌株*Streptomyces kasugaensis* MB273-C4株からC-2'位のアミノ基を特異的にアセチル化してKSMを不活性化するKSMアセチル化酵素遺伝子 (*kac*²⁷³) のクローニングが行われたのみであった。著者は、農薬として今もなお重要な位置を占めているにも拘わらず、生合成の一部の解明に留まっていたKSM生合成に着目し、既に確立していた放線菌での遺伝子操作技術とそれまでに蓄積されていた情報を駆使すればKSM生合成関連遺伝子群の取得が可能であろうと考えた。本研究は、KSM高生産株の育種およびハイブリッド抗生物質などの新規化合物の創製を究極の目的として、KSM生合成関連遺伝子群の取得を行うとともに、KSM生合成の総括的解明をめざすものである。

1) カスガマイシンアセチル化酵素遺伝子 (*kac*)

1993年、KSM生産菌株*S. kasugaensis* MB273-C4株よりKSMを特異的にアセチル化して不活性化するKSMアセチル化酵素遺伝子 (*kac*²⁷³) がクローニングされた。著者は、KSM生産が認められた由来の異なる4放線菌株について、*kac*²⁷³をプローブとしてサザンブロット解析を行い、4菌株すべてにおいて*kac*²⁷³との相同DNA部分を見出した (各菌株に見出されたKSMアセチル化酵素遺伝子を“*kac*”と総称する)。また、*Streptomyces albulus* MF861-C4株より得られたKSM非生産株において、*kac*相同遺伝子が欠失していたことから、*kac*周辺領域にKSM生合成関連遺伝子群が存在している可能性が高いことが判明した。さらに、著者が*S. kasugaensis* M338-M1株よりクローニングした*kac*³³⁸は、*kac*²⁷³の場合と同様に大腸菌JM109株をKSMに対して高度耐性化することを明らかにした。

2) *S. kasugaensis* M338-M1株の*kac*³³⁸周辺領域のクローニング

著者は、*S. kasugaensis* M338-M1株より*kac*³³⁸の周辺領域 (22,414bp) をクローニングし、その全塩基配列を決定した。Open reading frame検索の結果、“kas

クラスター”と命名したクローン化領域には、*kac*³³⁸の他に19個の遺伝子（以後*kas*遺伝子群と称する）が見出された（図2）。

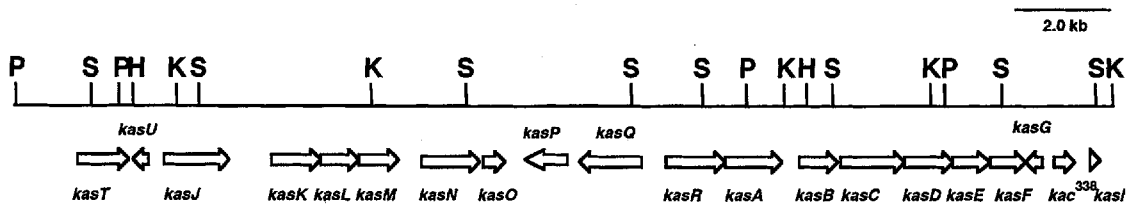


図2 *kas*クラスターに見出された*kas*遺伝子群

白抜きの矢印は、*kas*遺伝子群の位置および転写方向を示している。HはHindIII、KはKpnI、PはPstIそしてSはSacI認識部位を示している。

3) *kas*遺伝子群の転写解析

著者は、ノーザンブロット解析とRT-PCR法を用いて、*kas*遺伝子群の転写単位について検討した。その結果、*kas*遺伝子群は*kasT*、*kasU*、*kasJ*、*kasKLM*、*kasNO*、*kasPQ*、*kasRA*、*kac*³³⁸の単位で転写されていた。また、*kasBCDEF*領域は塩基配列の特徴から、ポリシストロニックに転写されていると思われるが、現在のところ少なくとも*kasCD*と*kasEF*はポリシストロニックに転写されていることが示唆された。さらに、プライマーエクステンション法と5'-RACE法を用いて転写開始点の検討を行い、*kasU*、*kasJ*、*kasKLM*、*kasNO*の転写開始点を決定した。これらのプロモーター配列は、いずれも*Streptomyces E. coli* σ^{70} -like promoters (SEP) と称するプロモーター配列と高い相同性が得られた。

4) カスガマイシン生合成に関わる遺伝子群

*kas*遺伝子群がコードする推定タンパク質のアミノ酸配列情報を基に、相同性検索を行った結果、19遺伝子産物のうち12遺伝子産物について既知タンパク質との相同性が得られた。これらのうち、*kasP*、*Q*、*R*、*A*、*C*、*D*の遺伝子産物は、C-3、C-6デオキシヘキソース生合成関連酵素や糖転移酵素などとの相同性が得られたことから、カスガミン生合成関連遺伝子群と推定された。また、*kasN*遺伝子産物はグリシン酸化酵素との相同性が得られたことからカルボキシホルミドイル基生合成遺伝子と推定された。さらに、*kasJ*遺伝子産物はストレプトマイシン (SM) 生合成に関与するStsBなど、イノシトール性水酸基の酸化酵素との相同性が得られたことから、D-chiro-イノシトール生合成に関与していると推定された。

5) *kas*遺伝子群の転写調節に関わる遺伝子

*kasT*遺伝子産物 (KasT) は, *Streptomyces griseus*のSM生合成遺伝子クラスターにおける経路特異的転写活性化因子 (StrR)と50%の identityを示した。KasTの*kas*クラスターDNA領域への結合について, チオレドキシンとの融合タンパク質 (Trx-KasT) を用いて検討したところ, KasTは少なくとも*kasU-kasJ*遺伝子間領域, *kasN*上流領域, そして*kasQ-kasR*遺伝子間領域に結合することが明らかとなった。さらに, KSM非生産となった変異株R6D4では, *kasT*を含めKSM生合成に関与する*kas*遺伝子群の転写が抑制されていたが, R6D4株中でプラスミドを介して*kasT*を恒常的に強制発現させると*kas*遺伝子群の転写が再び開始され, KSM生産が復帰したことを明らかにした。以上の結果より著者は, *kasT*が*kas*クラスターにおける経路特異的転写調節遺伝子であると考察した。

6) カスガマイシンの排出に関わる遺伝子群

*kasKLM*遺伝子群は前後する遺伝子の開始コドンと終止コドンがATGAで重複していることから, オペロンを形成していると予想された。著者は, RT-PCR法を用いて, *kasKLM*がポリシストロニックmRNAに転写されていることを明らかにした。*kasKLM*は, 抗生物質排出に関わるABCトランスポーターを構成する各サブユニットと相同性を有するタンパク質をコードしていると推定された。大腸菌JM109株中で*kasKLM*を発現させた結果, 得られた形質転換株がKSMに対して高度耐性化したことから, 著者は*kasKLM*がKSMトランスポーターをコードしていると結論した。また, KSMトランスポーターの構築とその活性の発現には, 各遺伝子産物であるKasK, KasLおよびKasMが必須であることを明らかにした。