

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 池野 聡一

---

アミノグリコシド系抗生物質に分類されるカスガマイシン (KSM) は、イネイモチ病菌 *Piricularia oryzae* (*Magnaporthe grisea*) 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株の培養ろ液から発見され、現在でも農薬として国内で広く使用されている。本論文では、KSM生合成の全貌を解明し、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行うための基盤を構築することを究極の目的として、KSM生合成関連遺伝子群の取得・機能解析を行った。

まず第1章の序論で、KSMの生合成経路・生合成遺伝子、および本論文の研究目的について概説した後、第2章では、KSM生産が認められた由来の異なる4放線菌株すべてにおいて、KSMアセチル化酵素遺伝子 (*kac*) が存在していることをサザンブロット解析により示した。また、*S. 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ることを明らかにし、*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を示した。さらに、*S. kasugaensis* M338-M1株よりクローニングした *kac*<sup>338</sup> は、*kac*<sup>273</sup> 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示した。

第3章では、*S. kasugaensis* M338-M1株における *kac*<sup>338</sup> の周辺領域 (22,414bp) の全塩基配列を決定し、当該領域には、*kac*<sup>338</sup> の他に19個の遺伝子 (以後 *kas* 遺伝子群と称する) が存在することを示した。

第4章では、*kas* 遺伝子群がコードする推定タンパク質の機能を推定した。19遺伝子産物のうち12遺伝子産物については、既知タンパク質との相同性に基づいて、*kasP*、*Q*、*R*、*A*、*C*、*D* の遺伝子産物はカスガミン生合成に、*kasN* および *kasJ* 遺伝子産物は、カルボキシホルミドイル基およびD-*chiro*-イノシトールの生合成に関与していると推定した。また、*kas* 遺伝子群の転写単位が、*kasT*、*kasU*、*kasJ*、*kasKLM*、*kasNO*、*kasPQ*、*kasRA*、*kac*<sup>338</sup>、*kasCD*、*kasEF*であることを示した。さらに、*kasU*、*kasJ*、*kasKLM*、*kasNO* の転写開始点を決定し、これらのプロモーター配列が、いずれも *Streptomyces E. coli*  $\sigma^{70}$ -like promoters (SEP) と称するプロモーター配列と相同性を有していることを明らかにした。

第5章では、*kasT* の機能解析を行っている。*kasT* 遺伝子産物 (KasT) は、*S. griseus* のストレプトマイシン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を示す。チオレドキシンの融合タンパク質 (Trx-KasT) を用い

てゲルシフト解析を行い、KasTが少なくとも*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を示した。また、*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るKSM非生産変異株R6D4に*kasT*を恒常的に強制発現させることにより、*kas*遺伝子群の転写抑制が解除され、KSM生産が復帰することを示し、*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結論した。

第6章では、KSMの排出に関わる遺伝子群の機能解析を行っている。RT-PCR法により、*kasKLM*がポリシストロニックに転写されていることを示した。また、これを大腸菌JM109株中で発現させた場合、得られた形質転換株がKSMに対して高度耐性化することを示し、*kasKLM*がKSM排出に関わるABCトランスポーターをコードしていると結論した。さらに、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が必須であることも明らかにした。

以上、本論文は、*Streptomyces kasugaensis*におけるKSM生合成遺伝子群を単離するとともに、当該遺伝子クラスターにおける経路特異的転写調節因子やKSMの排出に関わる遺伝子の生理学的機能を明らかにしたものであり、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。