

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 15 年度博士課程 入学

氏名 鈴木 茂雄

指導教員 長澤 寛道

論文題目 アロサミジンによるキチナーゼ生産促進の分子機構に関する研究

微生物の生産する二次代謝産物は多種多様な構造と強力な生理活性を有し、医薬、農薬等の有用物質として有効利用されてきた。しかし、それらの生産菌における役割についてはほとんどの場合不明である。抗生物質の機能は推定できるものの証明されておらず、その他多くの抗菌作用を持たない酵素阻害物質等に関しては機能解明に繋がる現象すらほとんど知られていない。

そうした中、放線菌の二次代謝産物でありキチナーゼ阻害活性を持つアロサミジンが、その生産菌自身に対してキチナーゼ生産を促進する活性を示す現象が見出された。放線菌の棲息する土壌にはキチンが豊富に存在し、キチナーゼの生産と菌体外への分泌は微生物の生育にとって重要である。従って、アロサミジンの示すキチナーゼ生産促進活性は、生産菌にとって生理的意義を持つと推測された。このアロサミジンの作用に関しこれまでに、アロサミジン生産菌 *Streptomyces* sp. AJ9463 において、アロサミジンによって生産が促進されるキチナーゼは *chi65* にコードされており、*chi65* の上流には二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及びレスポンスレギュレーターをそれぞれコードする *chi65S* 及び *chi65R* が存在することが当研究室で見出されている。本研究では、アロサミジンの生産菌での機能をその二成分制御系を手がかりに分子レベルで解析し、アロサミジンの生理機能の全体像を明らかにすることを目的としている。

第一章 アロサミジンの生産菌における生理活性

まず、AJ9463 株 におけるアロサミジンのキチナーゼ生産促進活性を詳細に調べた。各濃度のアロサミジンを追加したキチン培地で AJ9463 株を培養したところ、培養 24 時間後に得られる上清中のキチナーゼ活性はアロサミジン 60 nM ~ 2 μ M の範囲で濃度依存的に増加し、2 μ M では無添加の場合と比較して約 5 倍となった。その際、上清中のキチナーゼを、SDS-PAGE 後キチンゲルにタンパク質を移動させ酵素活性を測定する活性染色法により解析したところ、AJ9463 株が

キチン培地において生育初期に生産する主なキチナーゼである 46 kDa 及び 105 kDa キチナーゼの両者の生産をアロサミジンは濃度依存的に促進することが明らかになった。それらキチナーゼは N 末端アミノ酸配列解析により、ともに *chi65* 産物であることが示された。*chi65* のコードするタンパク質より大きな分子質量を持つ 105 kDa キチナーゼは二量体構造をとると考えられ、現在解析を行なっている。

キチンを唯一の炭素源とする培地での菌の生育にはキチナーゼの生産が必須であり、キチナーゼ生産の促進は生育の促進に繋がることが予想される。そこで、菌の生育に対するアロサミジン添加の影響を顕微鏡下で調べたところ、キチナーゼの生産を約 2 倍に上昇させる 0.25 μ M の濃度で、無添加のコントロールに比べ菌体量を約 2 倍に増加させた。その際 Calcoflour 染色により培地中のキチンの分解が促進されていることが観察された。

第二章 アロサミジンによって生産が促進されるキチナーゼの発現機構の解析

chi65 の上流には二成分制御系遺伝子の *chi65S* 及び *chi65R* が存在することから、アロサミジンがその二成分制御系を介して *chi65* の発現を活性化する可能性が考えられた。一方で、放線菌のキチナーゼ生産誘導物質としては *N,N*-ジアセチルキトビオース(ジアセチルキトビオース)が一般的であることから、アロサミジンとジアセチルキトビオースの両者が *chi65* の転写調節に関与することが推測された。まず、ジアセチルキトビオースのキチナーゼ生産促進活性をアロサミジンの場合と同様の方法で調べたところ、アロサミジンの 10 分の 1 程度の弱い活性ではあるが 46 kDa 及び 105 kDa キチナーゼの生産を促進することが示された。次に、二成分制御系遺伝子の破壊株を用いて *chi65* の発現機構の解析を行なった。*chi65S* と *chi65R* の両者を破壊した破壊株では、野生株で見られるようなアロサミジンの添加による *chi65* の転写量の増加や 46 kDa 及び 105 kDa キチナーゼの生産の促進が見られなくなった。一方で、ジアセチルキトビオースを添加した場合、破壊株では野生株と同様に 46 kDa 及び 105 kDa キチナーゼの生産が促進されることが明らかとなった。これらの結果は、アロサミジンは二成分制御系を介し *chi65* の転写を活性化するが、ジアセチルキトビオースは二成分制御系を介さず *chi65* の転写を調節することが強く示唆された。

chi65 のプロモーター領域には他の放線菌キチナーゼ遺伝子の場合と同様の 12 bp の繰り返し配列が存在する。その繰り返し配列にキチナーゼ遺伝子発現の抑制に関与するリプレッサータンパク質が結合し、ジアセチルキトビオースはその抑制解除を行なっていると考えられている。従って *chi65* の場合、破壊株を用いた実験結果から、ジアセチルキトビオースはリプレッサーの抑制解除を行なうが、アロサミジンはリプレッサーに直接的には作用できないことになる。次に、アロサミジン単独での作用を調べるために、AJ9463 株の菌体をアロサミジン、ジアセチルキト

ビオース、あるいはその両者を添加した無機塩溶液中で振とうし、その上清中のキチナーゼ活性を測定した。その結果、アロサミジン単独ではキチナーゼの生産は促進されず、ジアセチルキトビオースあるいは両方を加えた場合 46 kDa 及び 105 kDa キチナーゼの生産が見られた。その際、両方を加えた場合に、より強く 46 kDa 及び 105 kDa キチナーゼの生産促進が観察されたことより、アロサミジンによるキチナーゼ生産促進機構には、ジアセチルキトビオースによるリプレッサーの抑制解除が必要であることが示唆された。

第三章 シグナル分子としてのアロサミジン

第二章までに示したアロサミジンの作用は外部よりアロサミジンを添加する実験系で解析したが、アロサミジンがキチナーゼ生産系におけるシグナル分子として機能するには、その局在性を考えることが重要である。AJ9463 株をアロサミジン生産培地であるベネット培地(キチンを含まない)で培養すると、アロサミジン生産は生育中期から見られるが、そのほとんどは菌体内に留まって、培養上清中には数%しか検出されない。そのアロサミジンを含んだ菌体を回収し、無機塩溶液あるいはキチン培地に再度懸濁し、12 時間振とうした後のアロサミジンの局在を解析した。その結果、無機塩溶液の場合、90%以上のアロサミジンが菌体内に留まっているのに対し、キチン培地では、50%以上のアロサミジンが上清中に放出されていることが明らかになった。このことから、菌体内で生産されたアロサミジンはキチンもしくはその分解物によって、菌体外に放出される仕組みの存在が示唆された。以上より、アロサミジンはキチン存在下では菌体外に放出され、キチナーゼ生産におけるシグナル分子として機能し得ることが判明した。

第四章 アロサミジンの作用の普遍性

放線菌におけるアロサミジンの作用の普遍性を調べるために、新たに土壌より分離したアロサミジン生産菌 MF425 株及びアロサミジン非生産菌 *Streptomyces griseus* を用いて解析を行なった。

MF425 株では、アロサミジンをキチン培地に添加し培養した場合、上清中のキチナーゼ活性の上昇が見られ、活性染色により検出される 52 kDa 及び 80 kDa キチナーゼの生産がアロサミジン添加により促進されていた。さらに、52 kDa キチナーゼの N 末端アミノ酸配列をもとに、そのキチナーゼ遺伝子及びその上流の塩基配列を解析したところ、*chi65* と高い相同性を持つキチナーゼ遺伝子と上流の二成分制御系遺伝子の存在が明らかになった。

S. griseus においても同様の解析を行なったところアロサミジンの添加により、46 kDa 及び 200 kDa のキチナーゼの生産が促進された。さらに、46 kDa キチナーゼをコードする遺伝子は *chi65* と相同性を持ちその上流には二成分制御系遺伝子が存在していた。以上より、AJ9463 株と

