

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 鈴木 茂雄

微生物の生産する二次代謝産物は多種多様な構造と生理活性を有し、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、それら二次代謝産物の生産菌における生理的役割についてはほとんどの場合不明である。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という現象が見出された。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* が存在することが見出されていた。本研究は、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行われたもので、序論とそれに続く4章からなる。

序論でこの研究の背景を述べた後、第一章では、アロサミジン生産菌 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ている。AJ9463 株をキチン培地で培養したところ、培養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活性を活性染色法により解析したところ、46 kDa 及び 105 kDa キチナーゼの生産を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。また、菌の生育に対するアロサミジン添加の影響を調べたところ、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倍に増加させることがわかった。

第二章では、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を行っている。*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調べたところ、アロサミジンと同様に 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作製し、*chi65* の発現機構を解析したところ、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、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。これらの結果から、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。

第三章では、シグナル分子としてのアロサミジンの可能性を検討している。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いる。その菌体を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、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を明らかになった。

第四章では、新たに土壌から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* を用いてアロサミジンの作用の普遍性について解析している。いずれの菌においてもアロサミジンの添加によってキチナーゼの生産の上昇が観察され、また、それぞれのキチナーゼ遺伝子の上流には二成分制御系遺伝子が存在していることが明らかになった。以上より、AJ9463 株と同様のことがアロサミジン生産菌だけでなく非生産菌でも起こっていることが推定された。

以上、本論文は放線菌の二次代謝産物であるアロサミジンが自身及び他の菌に対してキチナーゼ生産を誘導するという生理作用を有することを分子レベルで明確に示したもので、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。