

学位論文の審査結果の要旨

放線菌は、ストレプトマイシンなど我々にとって有用な二次代謝産物を生産する微生物群である。放線菌のゲノム中には多数の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在していることが知られているが、通常の培養ではそれら遺伝子の発現レベルは極めて低い。二次代謝産物生合成遺伝子を効率よく高発現させることができれば、新たな有用二次代謝産物の発見にも繋がる。このような背景のもと、本論文は薬剤耐性付加による放線菌の二次代謝活性化技術の確立や二次代謝活性化機構の分子生物学的解析などを目的に行われ、得られた研究成果をまとめたものである。

まず、放線菌の二次代謝を活性化する新たな薬剤耐性変異の探索を目的に、エリスロマイシン耐性変異により放線菌の二次代謝を活性化できるか否かを検討した。様々な *Streptomyces* 属放線菌からエリスロマイシン耐性変異株を分離後、青色抗生物質アクチノロージン生産性を指標にして二次代謝活性化作用を調査した結果、エリスロマイシン耐性変異を誘発することにより高頻度で二次代謝活性化菌株が取得できることを見出した。さらに、親株では生産されない抗菌物質を過剰生産するエリスロマイシン耐性変異株も存在したことから、ストレプトマイシン耐性変異など従来の薬剤耐性変異よりもエリスロマイシン耐性変異による二次代謝活性化効果は極めて強力であることが示された。また、*Streptomyces* 属放線菌の二次代謝を活性化するエリスロマイシン耐性変異を特定するために、関与遺伝子の探索を行った結果、23Sリボソーム遺伝子の変異がエリスロマイシン耐性の付与に深く関わっていることを明らかにした。この新規知見は、今後リボソーム攻撃性抗生物質による *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化のメカニズムを解明する上で極めて有益なものである。

次に、放線菌の二次代謝の活性化にはリボソーム機能の改変が重要因子であること、また最少生育阻止濃度 (MIC) より低い濃度の抗生物質が有する遺伝子発現調節作用に着目し、MIC以下の濃度の翻訳阻害剤により放線菌の潜在的な二次代謝を促進できるか否かを検討した。9種類の翻訳阻害剤のMICを決定後、MIC以下の濃度の各翻訳阻害剤存在下で放線菌の二次代謝産物生産性を検討した結果、例えばMICの1/12濃度のリンコ

マイシンを添加した場合に強い二次代謝活性化作用が認められた。さらに、リンコマイシン添加によって非添加条件では認められない複数の抗生物質が生産されることを明らかにするとともに、それら物質のうちの2つは新規CDA（カルシウム依存性抗生物質）類縁体であると推定した。また、二次代謝産物生合成遺伝子の定量リアルタイムPCR解析の結果から、リンコマイシン添加による放線菌の二次代謝活性化はCDA合成酵素遺伝子などの生合成遺伝子が高発現することに起因していることが示された。さらに、リンコマイシン存在下の*S. coelicolor* A3(2)株では、対数増殖期から定常期後期にかけてF₀F₁ATP合成酵素のネイティブ状態が維持されるとともに、細胞内ATP量が上昇することを見出した。次に、リンコマイシンによる放線菌の二次代謝活性化機構を検討するために、リンコマイシン存在下における遺伝子発現量の変化を網羅的に解析した結果、リボソームタンパク質遺伝子など解析対照遺伝子の約10%（8,152遺伝子中828）で発現量の変化が認められ、放線菌の遺伝子発現におよぼすリンコマイシンの影響は広範囲におよぶことが示された。それら遺伝子の中には、リボソームタンパク質の組成変化や物質の輸送能に関与するものなどが含まれており、今後リンコマイシン添加による二次代謝活性化のメカニズムを解明する上での重要な情報が得られたと言える。

以上のように、本論文ではリボソーム工学技術による放線菌の二次代謝活性化に関する有益な新規知見が複数得られており、本論文は信州大学大学院の博士（農学）の学位に値するものであると審査委員会は判断した。

公表主要論文名

- ・ Imai Y, Fujiwara T, Ochi K, Hosaka T, Development of the ability to produce secondary metabolites in *Streptomyces* through the acquisition of erythromycin resistance, *The Journal of Antibiotics* 65: 323-326
- ・ Imai Y, Sato S, Tanaka Y, Ochi K, Hosaka T, Lincomycin at subinhibitory concentrations potentiates secondary metabolite production by *Streptomyces* spp., *Applied and Environmental Microbiology* 81: 3869-3879