

氏名	今井 優
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	甲 第 60 号
学位授与の日付	平成 27 年 9 月 30 日
学位授与の要件	信州大学学位規程第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	翻訳阻害剤の生理学・遺伝学的作用による <i>Streptomyces</i> 属放線菌の二次代謝活性化とその機構の分子生物学的解析
論文審査委員	主査 教授 福田 正樹 教授 小嶋 政信 教授 藤井 博 教授 池田 正人 教授 越智 幸三（広島工業大学）

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 翻訳阻害剤の生理学・遺伝学的作用による *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化とその機構の分子生物学的解析

放線菌は、ストレプトマイシン（抗結核薬）やタクロリムス（免疫抑制剤）をはじめとする様々な有用二次代謝産物を生産する微生物群であり、医薬リード化合物の探索源として重視されている。一方、近年様々な放線菌の全ゲノムが解読され、その結果、放線菌には研究室レベルの培養では極低発現の二次代謝産物生合成遺伝子（潜在遺伝子）が予想以上に存在することが判ってきた。この事実は、放線菌の潜在遺伝子を目覚めさせれば、有用な二次代謝産物を新たに発見できることを示しており、放線菌の二次代謝研究を飛躍的に発展させる上での重要な新視点をもたらした。以上の背景を踏まえ、本研究では、放線菌における二次代謝活性化機構を分子生物学的な面から解析し、得られる知見を新しい二次代謝活性化技術の確立に向けて応用することを目的とし、以下の課題に取り組んだ。

#### 1. *Streptomyces* 属放線菌の潜在的二次代謝能を引き出すエリスロマイシン耐性変異の特性解析

放線菌がリボソームや RNA ポリメラーゼを標的とする抗生物質に対する耐性を獲得すると、潜在能力を発揮して二次代謝産物を過剰生産することがある。これらの知見から、放線菌の二次代謝活性化において、転写（RNA ポリメラーゼ）、または翻訳（リボソーム）機能の改変が重要な要素であることが明らかとなってきた。本研究で著者は、*Streptomyces* 属放線菌へのエリスロマイシン（Ery, リボソーム 50S サブユニットを標的とする翻訳阻害剤）耐性付与が、強力な二次代謝活性化作用を示すことを新たに見出した。

Ery を含む寒天培地を用いた薬剤耐性選抜法により、*S. coelicolor* A3(2) から 259 菌株、*S. lividans* から 300 菌株の Ery 耐性変異株を分離した。これらの Ery 耐性変異株における二次代謝活性化頻度を青色抗生物質アクチノロージン（Act）生産性を指標に調べたところ、*S. coelicolor* A3(2) では 22%（259 菌株中 57 菌株）、*S. lividans*

では 20% (300 菌株中 61 菌株) であり、極めて高い頻度で二次代謝活性化菌株を取得できた。取得した Ery 耐性変異株のうち、*S. coelicolor* A3(2) 由来の SCE234 株は、親株の 22 倍の Act 生産を示し、*S. lividans* 由来の SLE259 株は、Act のみならず、親株が生産できない抗菌物質を高生産した。また、Ery 耐性付与により、*S. griseus* (ストレプトマイシン生産菌) や *S. parvulus* (アクチノマイシン生産菌) の二次代謝能を向上させることにも成功しており、Ery 耐性変異の活用が、様々な *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化にも有効であることが判った。

全ゲノム解析により、Ery 耐性および二次代謝活性化に関与する変異遺伝子の特定を行ったところ、SCE234 株が *nsdAT680G* 変異と *rrnA-23S rRNA-A2302T* 変異を有することを見出した。実際に、*S. coelicolor* A3(2) の親株に *nsdAT680G* 変異を導入したところ、取得した *nsdA* 変異株は親株よりも高い Act 生産性を示した。しかしながら、自然突然変異株である SCE234 株の Act 生産レベルにまで到達しておらず、加えて、Ery 耐性も示さないことが明らかとなった。このことから、Ery 耐性と Act 生産の劇的な向上には、*rrnA-23S rRNA-A2302T* 変異の存在が深く関わることが示唆された。

## 2. リンコマイシンによる *Streptomyces* 属放線菌の二次代謝活性化機構の解析

抗生物質は、高濃度では細菌の生育を完全に阻害する一方で、最小生育阻止濃度 (MIC) 未満では、細菌の遺伝子発現を変化させる作用がある。放線菌の二次代謝活性化には翻訳機能の改変が重要な因子であることから、著者らは MIC 未満の翻訳阻害剤を利用することで、放線菌の二次代謝を活性化できるのではないかとこの着想を得た。本研究で著者は、9 種類の翻訳阻害剤 [Ery, タイロシン, クリндаマイシン, リンコマイシン (Lin), ゲンタマイシン, ストレプトマイシン, チオストプトン, クロラムフェニコール, テトラサイクリン] を使用し、*Streptomyces* 属放線菌の二次代謝に及ぼす影響を検討したところ、Lin が顕著な二次代謝活性化作用を示すことを明らかにした。

*S. coelicolor* A3(2) を MIC (100 µg/ml) の 1/10 濃度の Lin 存在下で液体培養すると、Act 生産量が非存在下の 16 倍に増加し、Act 生合成の経路特異的調節遺伝子 *actII-ORF4* の発現量が大幅に上昇 (2.9 倍) することが判った。加えて、*S. lividans* を MIC (60 µg/ml) の 1/12 または 1/3 濃度の Lin を含む寒天培地で培養すると、Act のみならず、Lin 非存在下では認められない抗菌物質の生産量が増加し、その中には calcium-dependent antibiotic の新規類縁体が含まれることも突き止めた。

これまでの解析から、Lin 存在下の *S. coelicolor* A3(2) では、 $F_0F_1$  ATP 合成酵素の発現量が低下すること、 $F_0F_1$  ATP 合成酵素のネイティブ状態が定常期後期においても対数増殖期と同様の状態で維持されること、さらには、細胞内 ATP レベルが上昇することを明らかにした。しかし、これらの現象が *S. coelicolor* A3(2) の二次代謝能向上にどのように関与しているかは全く判っていなかった。そこで、これらの疑問点を明らかにするため、RNA シーケンス技術を活用し、Lin 存在下における遺伝子発現変化を網羅的に解析した。その結果、Lin 存在下の *S. coelicolor* A3(2) では、リボソームタンパク質遺伝子や薬剤耐性に関与する遺伝子 (23S rRNA メチルトランスフェラーゼ遺伝子など) など、解析対象となった 8152 遺伝子中 828 遺伝子で発現量に変化していた。特に ABC トランスポーターでは 200 遺伝子中 33 遺伝子の発現が変動していることを見出した。今後は、これら遺伝子の発現変化が、*S. coelicolor* A3(2) の二次代謝産物生産能の向上や細胞内 ATP 量の上昇にどのように寄与しているかを解析し、Lin が放線菌の二次代謝を活性化する仕組みの全容を明らかにする。