



Title	Identification and Functional Analysis of Self-defense Mechanism in virginiamycin-producing <i>Streptomyces virginiae</i>
Author(s)	李, 昌権
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41420
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	李 昌 権
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 6 0 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	Identification and Functional Analysis of Self-defense Mechanism in virginiamycin-producing <i>Streptomyces virginiae</i> (放線菌 <i>Streptomyces virginiae</i> における virginiamycin 自己耐性及びその機能解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 山 田 靖 宙 (副査) 教 授 塩 谷 捨 明 教 授 原 島 俊 教 授 室 岡 義 勝

論 文 内 容 の 要 旨

放線菌は抗生物質をはじめとする多くの有用な生理活性物質を生産する発酵及び医薬品工業上重要な微生物である。中でも *Streptomyces* 属は既知の有用二次代謝物質の大部分を生産する代表的な放線菌である。本学位論文は家畜用有用抗生物質 virginiamycin 生産菌である *Streptomyces virginiae* の自己耐性及びその機能解析を目的として行った研究結果をまとめたものである。

論文は 5 章からなり、第 1 章は序論として、本研究に関わる歴史的な背景と現状について述べている。

第 2 章では、virginiamycin に対する自己耐性機構として *S. virginiae* の修飾不活性化機構について調べた結果を述べている。細胞抽出液を用いて *in vitro* 修飾不活性化を検討した結果、virginiamycin S (VS) については全く変化はなかったが、virginiamycin M₁ (VM₁) は不活性化されることが明らかにしている。この VM₁ の不活性化は NADPH 特異的であり、VM₁ 不活性物質を単離、構造決定した結果、*S. virginiae* は VM₁ の 16 位のカルボニル基を立体特異的に還元し、16*R*-dihydrovirginiamycin M₁ (16*R*-dihydro M₁) を生成する自己耐性機構を保持していることを明らかにしている。

第 3 章では、16*R*-dihydroVM₁ の生成に関与する VM₁ 還元酵素の精製及びその酵素学的性質を記述している。5 段階の精製課程を経て、本酵素を電気泳動で単一バンドに至るまで精製している。さらに本酵素の分子量を未変性状態で 27.6 万、変性状態で 7.3 万と決定し、4 量体の構造であることを明らかにしている。また、反応最適 pH 7.5、NADPH に対する Km 値を 0.13 mM、VM₁ に対する Km 値を 1.50 mM と決定している。本酵素は逆反応をほとんど触媒しないことを見出し、VM₁ の生合成酵素ではなく、VM₁ 不活性酵素であることを指摘している。

第 4 章では、VS 耐性遺伝子のクローニングとその機能を解析した結果について記述している。以前からの研究で、*S. virginiae* には、抗生物質生産を支配するブチロラクトン型 autoregulator (*virginiae* butanolide) とその特異的レセプタータンパク質 (BarA) が存在していることを明らかになっている。レセプタータンパク質をコードする barA 遺伝子の周辺塩基配列を決定し、相同生検索を行い、薬剤耐性遺伝子産物と相同生の高いタンパク質をコードする遺伝子を発見している。さらに、*in vivo* における本遺伝子の機能解析を行った結果、この遺伝子は VS に対する特異的な耐性遺伝子であることを明らかにしている。

第 5 章では以上の結果を要約、総括している。

論文審査の結果の要旨

Streptomyces 属放線菌は多種、多様な生理活性二次代謝物質を生産する、発酵工業上重要な微生物である。また、主要な土壌微生物であり、自然界における微生物生態学上でも注目すべき微生物群を形成している。*Streptomyces* 属放線菌が自己の生産する抗生物質に対して、どのような機構で耐性を示すのか、あるいはその生産を制御しているのかを解明することは有用二次代謝物質増産、新規物質の開発、野外での応用面で興味ある研究課題である。本論文は有用抗生物質 virginiamycin (VM₁, VS) 生産菌 *S.virginiae* における自己耐性の機構を調べたものであり、主な成果は次の通りである。

- (1) *S.virginiae* 細胞抽出液中に、VM₁ を修飾、不活性化する反応を見出し、その反応生成物を分離精製し、その構造を 16R-dihydroVM₁ と決定している。
- (2) この不活性化に関わる酵素を精製し、その分子量を 27.6 万と決定し、分子量 7.3 万のサブユニットの 4 量体であることを明らかにしている。
- (3) この酵素は NADPH 依存性であり、至適 pH、基質 VM₁、NADPH に対する K_m 値等その酵素学的性質を明らかにし、逆反応を触媒しない性質から、生合成に関わる酵素ではなく、自己耐性機構に関わる酵素であることを指摘している。
- (4) ブチロラクトン型 autoregulator と連携して virginiamycin 生産誘導を制御するそのレセプター遺伝子 *barA* の近傍下流の塩基配列より virginiamycin 耐性に関与するタンパク質、VarS、をコードする遺伝子を見出し、*in vivo* の実験系で VS 特異的に機能する自己耐性機構に関与する事を明らかにしている。
- (5) *varS* 遺伝子の転写、発現の機構の一部を明らかにしている。

以上のように、本論文は *S.virginiae* における自己耐性機構を有機化学、酵素学、分子生物学的手段を適用して解明し、有用な知見を得ており、応用生物工学に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。