



|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Molecular genetic analysis on regulatory mechanism for ML-236B biosynthesis in <i>Penicillium citrinum</i>                                      |
| Author(s)    | 馬場, 悟史  |
| Citation     | 大阪大学, 2009, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/57503">https://hdl.handle.net/11094/57503</a>   |
| 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、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>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           | 馬 場 悟 史  |
| 博士の専攻分野の名称    | 博士(工学)   |
| 学 位 記 番 号     | 第 23283 号  |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平成21年6月30日   |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当   |
|               | 工学研究科生命先端工学専攻  |
| 学 位 論 文 名     | Molecular genetic analysis on regulatory mechanism for ML-236B biosynthesis in <i>Penicillium citrinum</i><br>( <i>Penicillium citrinum</i> におけるML-236B生合成遺伝子群の発現制御に関する研究) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教授 仁平 卓也<br>(副査)<br>教授 原島 傑 教授 藤山 和仁 教授 福崎英一郎<br>教授 福井 希一 教授 大竹 久夫 教授 清水 浩   |

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、糸状菌 *Penicillium citrinum* の二次代謝産物 ML-236B (コンパクチン) について、その生合成に関する遺伝子の発現制御因子が MlcR であることを証明し、MlcR が結合する DNA 配列を決定することによりその制御機構を解明、さらに *mlcR* 遺伝子を用いた遺伝子工学的手法による ML-236B 高生産株の作製に関して論じたものであり、全体を 5 章で構成している。

第 1 章は緒論であり、高脂血症治療薬として用いられているスタチン系薬剤の作用機序と代表的スタチン系薬剤について述べ、続いて本研究で対象となる *Penicillium citrinum* の二次代謝産物 ML-236B およびプラバスタチンの発見と開発について論じた。次にこれまでに明らかになっている ML-236B 生合成遺伝子群とその機能について述べたのち、ML-236B 生合成に関与していると推定される、カビに特徴的な DNA 結合モチーフを有するジンククラスタータンパク質の概要について論じた。さらに、遺伝子工学的手法を用いた菌株育種についての現状とその応用について述べ、最後に本研究の研究目的、方針を記した。

第 2 章では、これまでに明らかにされたゲノム領域に含まれる、ジンククラスタータンパク質をコードする 2 つの遺伝子をそれぞれ破壊することで ML-236B 生産と生合成遺伝子群発現への影響を調べ、そのうち *mlcR* が ML-236B 生合成に必須であり、生合成遺伝子群の転写活性化因子であることを証明した。

第 3 章では、MlcR が結合する DNA 配列をゲルシフトアッセイおよびレポーター・アッセイを用いて同定し、その配

列がこれまでに報告のない新規の配列であること、およびその結合様式が、報告されている他のジンククラスタータンパク質とは異なるユニークなものである可能性があることを示した。

第 4 章では、ML-236B 高生産変異株の *mlcR* 遺伝子あるいは ML-236B 生合成遺伝子クラスターのコピー数を人為的に増加させることで ML-236B の生産性をさらに向上させることに成功し、高生産変異糸状菌においても遺伝子工学的菌株育種が有効であることを明らかにした。

第 5 章は結論であり、本研究で得られた結果を総括した。また今後の研究に関して、近年他の糸状菌から報告された、二次代謝産物生合成をグローバルに制御する因子が ML-236B 生合成に関与している可能性について述べ、これら因子の発見による効率的菌株育種法開発の可能性について記した。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ペニシリンの発見以来、多くの微生物由来生理活性物質が単離され、人類に寄与してきた。しかし、そのほとんどの場合、微生物が生産する生理活性物質の生産量はごく微量であり、工業的生産を行うためには時間と労力をかけた菌株育種が必須である。一方、これら生理活性物質の生合成に関わる遺伝子の単離など、生合成機構の解明を目指した研究も精力的に進められており、短期間での菌株育種法の開発や、新規骨格を有する生理活性物質の作製などが試みられている。本論文では、糸状菌 *Penicillium citrinum* が生産する ML-236B の生合成遺伝子発現制御機構を解明し、この機構を応用して ML-236B 生産量を遺伝子工学的手法で向上させたものである。得られた知見を要約すると以下の通りである。

- 1) 遺伝子破壊実験により、ML-236B 生合成遺伝子の発現および ML-236B 生合成に必須である因子が、他のカビや酵母で広く見られるファミリーに属する MlcR というタンパク質であることを明らかにしている。これにより、ML-236B 生合成遺伝子群の発現が厳密にコントロールされていることが示されている。
  - 2) MlcR が発現制御する遺伝子群のプロモーター近傍に、共通モチーフ 5'-(A/T)CGG-N<sub>6-8</sub>-TCGG-3' を見出し、MlcR がこの配列に結合することを明らかにしている。このモチーフはこれまでに報告のない新しい構造であり、またその結合様式も同じファミリーに属する他のタンパク質とは異なる可能性を示唆している。
  - 3) ML-236B 高生産変異株において、MlcR をコードする遺伝子、あるいはこれを含有する ML-236B 生合成遺伝子クラスターのコピー数を増加させることで、ML-236B 生産量を 1.5 倍に増加させている。このことから、ML-236B 生合成に関与する因子を人為的に操作することでその生産量を向上させることができること、さらにこれが高生産変異株においても有効であることが示されている。
- 以上のように、本論文では、ML-236B 生合成の制御機構が明らかにされており、この機構を人為的に操作することで生理活性物質の生産量を向上させることができることが示されている。本研究で得られた成果は、微生物二次代謝産物生合成機構のより詳細な解明およびより簡便かつ迅速な菌株育種法の開発に寄与するものと期待される。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。