

氏 名 (本国籍)	田 中 幸 徳 (東京都)
主 指 導 教 員 名	静岡大学 教授 田 原 康 孝
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第541号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月15日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第3条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	静岡大学
学 位 論 文 題 目	ストレプトマイシンおよびリファンピシン耐性変異 を利用した微生物育種に関する研究
審 査 委 員 会	主査 静岡大学 教授 森 田 明 雄 副査 静岡大学 教授 田 原 康 孝 副査 静岡大学 准教授 徳 山 真 治 副査 岐阜大学 教授 河 合 啓 一 副査 信州大学 教授 千 菊 夫

論 文 の 内 容 の 要 旨

本研究はリボゾーム工学の一つの手法である薬剤耐性選抜法を用い、様々な微生物でのストレプトマイシンおよびリファンピシン耐性変異株が抗生物質および有用酵素の生産量を顕著に増加させることを明らかにしたものである。

はじめに、異なったストレプトマイシン耐性変異 (*rsmG* および *rpsL*) 導入による放線菌の抗生物質生産性を検討した。様々な抗生物質生産放線菌に二つのストレプトマイシン耐性変異 (高レベル耐性 *rpsL*、低レベル耐性 *rsmG*) をそれぞれ導入した。それぞれの放線菌から様々なストレプトマイシン耐性変異株を分離し、シーケンス解析により変異点を決定した。分離した変異株について、*Streptomyces antibioticus* および *Streptomyces parvulus* ではアクチノマイシン、*Saccharopolyspora erythraea* ではエリスロマイシン、また *Streptomyces griseus* ではストレプトマイシン生産性を調べ、それらの生産量が増加することを明らかにした。また低レベル耐性と高レベル耐性変異を段階的に導入した二重変異株が抗生物質生産を著しく増加すること、および変異の相乗効果があることも明らかにした。また、*S. erythraea* の *rpsL* 変異株のエリスロマイシン生産性の増加は、エリスロマイシン生合成遺伝子群制御遺伝子である *bltD* 遺伝子の高発現によることを明らかにした。さらに *S. griseus* の *rsmG* 変異株については本菌が有する数多くの“休眠遺伝子”の活性化の有無を調べるために、二次代謝遺伝子群の転写解析を行い、*rsmG* 変異が様々な二次代謝遺伝子群を活性化することを見出している。これにより、ストレプトマイシン耐性変異 (*rsmG* および *rpsL*) が多くの放線菌の育種に利用可能であることを実証している。次に、リファンピシン耐性 (*rpoB*) 変異の導入による各種抗生物質生産力の増強と“休眠遺伝子”の活性化について検討した。上記の放線菌に加え、フォルマイシン生産菌

Streptomyces lavendulae、バンコマイシン生産菌 *Amycolatopsis orientalis* の *rpoB* 変異株を多数分離し、その効果を広範囲に調べている。各菌から様々なリファンピシン耐性菌を分離し、シーケンス解析により変異点を決定し、様々な *rpoB* 変異株を分離した。その結果、得られた全ての放線菌で抗生物質生産性の増加が認められた。この結果は *rpoB* 変異が多彩な放線菌の育種に利用できる可能性を示している。また *S. griseus* の *rpoB* 変異株については二次代謝遺伝子群の転写解析を行い、*rpoB* 変異が休眠遺伝子のいくつかを強力に活性化すること、さらに *rpoB* 変異の種類により活性化される休眠遺伝子が異なるという事実を見出した。すなわち、*rpoB* 変異が微生物の育種だけでなく、新規物質のスクリーニングにも利用できる可能性があることを明らかにしている。最後に、サイクロデキストラン合成酵素生産菌 *Bacillus circulans* のストレプトマイシンおよびリファンピシン耐性変異導入による酵素生産性について検討している。工業的に重要な酵素であるサイクロデキストラン合成酵素 (cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase; CITase) 生産菌 *B. circulans* のストレプトマイシンおよびリファンピシン耐性変異の導入による育種を行った。既にあるレベルまで育種してある工業株 B12 株に、薬剤耐性選抜法によりストレプトマイシン耐性 *rpsL* 変異およびリファンピシン耐性 *rpoB* 変異を逐次的に導入し、二回の耐性菌分離操作だけで酵素生産性を野生型の 1000 倍まで増大させることに成功している。さらに、変異株の CITase 転写レベルの増加を明らかにしている。本法が物質生産だけでなく酵素生産性の改良にも有効であること、また既存の育種法で育種してある工業微生物の育種にも有効であることを実証している。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究はリボゾーム工学の一つの手法である薬剤耐性選抜法を用い、様々な微生物でのストレプトマイシンおよびリファンピシン耐性変異株が抗生物質および有用酵素の生産量を顕著に増加させることを明らかにしたものである。

はじめに、異なったストレプトマイシン耐性変異 (*rsmG* および *rpsL*) 導入による放線菌の抗生物質生産性を検討した。様々な抗生物質生産放線菌に二つのストレプトマイシン耐性変異 (高レベル耐性 *rpsL*、低レベル耐性 *rsmG*) をそれぞれ導入した。それぞれの放線菌から様々なストレプトマイシン耐性変異株を分離し、シーケンス解析により変異点を決定した。分離した変異株について、*Streptomyces antibioticus* および *Streptomyces parvulus* ではアクチノマイシン、*Saccharopolyspora erythraea* ではエリスロマイシン、また *Streptomyces griseus* ではストレプトマイシン生産性を調べ、それらの生産量が増加することを明らかにした。また低レベル耐性と高レベル耐性変異を段階的に導入した二重変異株が抗生物質生産を著しく増加すること、および変異の相乗効果があることも明らかにした。また、*S. erythraea* の *rpsL* 変異株のエリスロマイシン生産性の増加は、エリスロマイシン生合成遺伝子群制御遺伝子である *bldD* 遺伝子の高発現によることを明らかにした。さらに *S. griseus* の *rsmG* 変異株については本菌が有する数多くの“休眠遺伝子”の活性化の有無を調べるために、二次代謝遺伝子群の転写解析を行い、*rsmG* 変異が様々な二次代謝遺伝子群を活性化することを見出している。これにより、ストレプトマイシン耐性変異 (*rsmG* および *rpsL*) が多くの放線菌の育種に利用可能であることを実証している。

次に、リファンピシン耐性 (*rpoB*) 変異の導入による各種抗生物質生産力の増強と“休眠遺伝子”の活性化について検討した。上記の放線菌に加え、フォルマイシン生産菌

Streptomyces lavendulae、バンコマイシン生産菌 *Amycolatopsis orientalis* の *rpoB* 変異株を多数分離し、その効果を広範囲に調べている。各菌から様々なリファンピシン耐性菌を分離し、シーケンス解析により変異点を決定し、様々な *rpoB* 変異株を分離した。その結果、得られた全ての放線菌で抗生物質生産性の増加が認められた。この結果は *rpoB* 変異が多彩な放線菌の育種に利用できる可能性を示している。また *S. griseus* の *rpoB* 変異株については二次代謝遺伝子群の転写解析を行い、*rpoB* 変異が休眠遺伝子のいくつかを強力に活性化すること、さらに *rpoB* 変異の種類により活性化される休眠遺伝子が異なるという事実を見出した。すなわち、*rpoB* 変異が微生物の育種だけでなく、新規物質のスクリーニングにも利用できる可能性があることを明らかにしている。

最後に、サイクロデキストラン合成酵素生産菌 *Bacillus circulans* のストレプトマイシンおよびリファンピシン耐性変異導入による酵素生産性について検討している。工業的に重要な酵素であるサイクロデキストラン合成酵素 (cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase; CITase) 生産菌 *B. circulans* のストレプトマイシンおよびリファンピシン耐性変異の導入による育種を行った。既にあるレベルまで育種してある工業株 B12 株に、薬剤耐性選抜法によりストレプトマイシン耐性 *rpsL* 変異およびリファンピシン耐性 *rpoB* 変異を逐次的に導入し、二回の耐性菌分離操作だけで酵素生産性を野生型の 1000 倍まで増大させることに成功している。さらに、変異株の CITase 転写レベルの増加を明らかにしている。本法が物質生産だけでなく酵素生産性の改良にも有効であること、また既存の育種法で育種してある工業微生物の育種にも有効であることを実証している。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

1. Y. Tanaka, M. Komatsu, S. Okamoto, S. Tokuyama, A. Kaji, H. Ikeda, and K. Ochi. 2009. Antibiotic overproduction by *rpsL* and *rsmG* mutants of various actinomycetes. *Appl Environ Microbiol.* 75:4919-4922.

2. Y. Tanaka, S. Tokuyama, and K. Ochi. 2009. Activation of secondary metabolite-biosynthetic gene clusters by generating *rsmG* mutations in *Streptomyces griseus*. *J Antibiot.* 62: 669-673