

氏名(本国籍)	西村賢治 (静岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第462号
学位授与年月日	平成19年9月12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	放線菌・枯草菌の低レベル streptomycin 耐性変異に関する研究
審査委員会	主査 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

放線菌は多様な二次代謝を行う細菌である。ストレプトマイシン (Sm) は1944年に放線菌 *Streptomyces griseus* より見出された抗生物質であり、抗結核薬としての重要性から多くの知見が得られている。

放線菌の Sm 耐性変異は主に2つのタイプに分類される。1つは親株の50倍~100倍の耐性を付与する Type I 変異である。この変異はリボゾームタンパク質 S12 遺伝子 (*rpsL*) に変異が導入される事により、耐性を獲得する。さらに特定の *rpsL* 変異は *S. coelicolor* の生産する青色の抗生物質アクチノロジン (Act) の高生産を促す。一方、親株の5~10倍の耐性を付与する Type II 変異を持つ株は高濃度耐性株同様 Act を高生産するが、その変異位置は Sm の発見以来、約60年間未決定のままである。さらに Type II 変異株のみ、S-アデノシル-L-メチオニン (SAM) 合成酵素遺伝子 *metK* の高発現が確認されており、これらの現象を解明する事は興味深い。以上の背景より、本研究では低濃度 Sm 耐性原因遺伝子の同定及び解析を行った。

以前にゲノムマッピング法により、おおよそその変異位置が報告されている低濃度 Sm 耐性 KO-132 株ゲノムを新規変異同定技術である Mutation Mapping 法に供した。その結果、SCO3885 (*rsmG*) 遺伝子にのみアデニンの488番目に欠失変異が認められた。新たに低濃度 Sm 耐性株を分離し、*rsmG* をシーケンスした結果、すべての株に変異が認められ、多くの株がナンセンス変異を有していた。これより、RsmG が機能しなくなることで Sm 耐性になると強く示唆された。遺伝子工学的手法により、*rsmG* 欠損株を構築した結果、本欠損株は野生株よりも Sm 耐性及び Act 高生産を示した。以上の結果より、本遺伝子が Sm 耐性及び Act 高生産の原因遺伝子であった。

Sm 耐性機構を明らかにするため、野生株と *rsmG* 欠損株よりリボゾームを調製し、Sm 耐性実験を行った結果、欠損株のリボゾーム画分に Sm 耐性が認められ、リボゾームが耐性に関与していた。詳細に解析するため、16S rRNA を調製後、ヌクレオシドを高速液体クロマトグラフィ

ーで解析した。その結果、欠損株の7-メチルグアノシン(m7G)と予想されるピークが欠失していた。これより、岡本らが*大腸菌*において証明したようにRsmGは16S rRNAの518番目(*大腸菌*では527番目)のグアノシンをメチル化するメチルトランスフェラーゼであった。G518はSmの結合塩基として知られており、メチル基の欠失がSmとrRNA間の結合に影響を及ぼし、耐性の原因となっていると結論づけた。

Actを高生産するSm高濃度耐性*rpsL*変異株は定常期のタンパク質合成が野生株よりも活性化されている事が報告されている。親株とRsmG欠損株よりリボソームを調製し、*in vitro*で定常期のタンパク質合成活性を比較した。*rsmG*欠損株は、*rpsL*変異株同様、野生株よりも顕著に高いタンパク質合成活性を示した。しかし、リボソーム以外の画分が活性上昇の一要因となる*rpsL*変異株と異なり、*rsmG*変異株ではリボソーム画分が原因であった。さらに、*rsmG*欠損株は*metK*発現レベルが野生株よりも顕著に上昇していた。MetKの高生産は細胞内のSAM濃度を上昇させる。*放線菌*は細胞内SAM濃度の上昇で抗生物質の生産を促進する。以上の結果から、*rsmG*欠損株のAct高生産は定常期におけるタンパク質合成活性に加えて、細胞内SAM濃度の上昇に起因すると結論した。

最後に、RsmG機能の細菌における普遍性を確認するため、*枯草菌 Bacillus subtilis* 168株から低濃度Sm耐性株を分離した。*枯草菌*低濃度Sm耐性株は、*放線菌*同様に親株の5~10倍のSm耐性を示し、*rsmG*遺伝子に変異が認められた。16S rRNA解析の結果より、*枯草菌*のRsmGは、*大腸菌*及び*放線菌*同様に530ループの535番目のグアノシンをメチル化するメチルトランスフェラーゼであることを明らかにした。さらに*枯草菌 rsmG*変異株は野生株よりも翻訳精度が上昇していたため、本変異がリボソームに何らかの影響を及ぼしていると考えられた。一方、*枯草菌 rsmG*変異株は抗生物質生産や*metK*を高発現していなかった。*枯草菌*では、*放線菌*とは異なる結果が得られたことから、細菌における*rsmG*の機能の多様性が示された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究は、*放線菌 (Streptomyces coelicolor)* の低濃度ストレプトマイシン (Sm) の原因遺伝子を見だし、その耐性機構を明らかにしたものである。

(1) ゲノムマッピング法により、おおよそその変異位置が報告されている低濃度Sm耐性KO-132株ゲノムをMutation Mapping法に供した。その結果、SCO3885(以下*rsmG*)遺伝子にのみアデニンの488番目に欠失変異が認められた。新たに低濃度Sm耐性株を分離し、*rsmG*遺伝子の塩基配列を決定したところ、全ての株に変異が認められ、ほとんどの株がナンセンス変異を有していた。これより、RsmGが機能しなくなることでSm耐性になると強く示唆された。遺伝子工学的手法により、*rsmG*欠損株を構築した結果、本欠損株は野生株よりもSm耐性及びAct高生産を示した。以上の結果より、本遺伝子がSm耐性及びAct高生産の原因遺伝子であった。

(2) Sm耐性メカニズムを明らかにするため、野生株と*rsmG*欠損株よりリボソームを調製し、Sm耐性実験を行った結果、欠損株のリボソーム画分にSm耐性が認められ、リボソームが耐性に関与していた。詳細に解析するため、16S rRNAを調製後、ヌクレオシドを高速液体クロマトグラフィーで解析した。その結果、欠損株の7-メチルグアノシン(m7G)と予想されるピークが欠失していた。これより、岡本らが*大腸菌*において証明したようにRsmGは16S rRNAの518番目(*大腸菌*では527番目)のグアノシンをメチル化するメチルトランスフェラーゼであった。G518はSmの結合塩基として知られており、メチル基の欠失がSmとrRNA間の結合に影響を及ぼし、耐性の原因となっていると結論づけた。

(3) 他の細菌での RsmG の機能を確認するため、枯草菌 *Bacillus subtilis* 168 株から低濃度 Sm 耐性株を分離した。枯草菌低濃度 Sm 耐性株は放線菌同様、親株の 5~10 倍の耐性を示し、*rsmG* 遺伝子に変異が認められた。16S rRNA 解析の結果より、枯草菌 RsmG は、大腸菌及び放線菌同様に 530 ループの 535 番目のグアノシンをメチル化するメチルトランスフェラーゼであることを明らかにした。

このように本論文の内容は、細菌におけるストレプトマイシン耐性に関する研究に新しい知見を与えるものであり、Sm の発見以来約 60 年間未決解明であった低濃度 Sm 耐性機構を解明したものである。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. Kenji Nishimura, Takeshi Hosaka, Shinji Tokuyama, Susumu Okamoto, and Kozo Ochi: Mutations in *rsmG*, encoding a 16S rRNA methyltransferase, result in low-level streptomycin resistance and antibiotic overproduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 189 (10), 3876~3883 (2007)
2. Kenji Nishimura, Shanna K Johansen, Takashi Inaoka, Takeshi Hosaka, Shinji Tokuyama, Yasutaka Tahara, Susumu Okamoto, Fujio Kawamura, Stephen Douthwaite, and Kozo Ochi: Identification of the RsmG methyltransferase target as 16S rRNA nucleotide G527 and characterization of *Bacillus subtilis rsmG* mutants. *Journal of Bacteriology*, in press, (2007)