

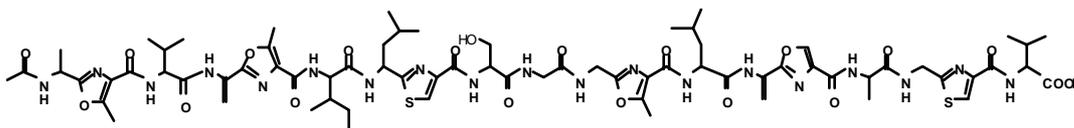
放線菌の二次代謝、形態分化を誘導するゴードスポリンの作用機作及び生合成機構の解明

尾仲 宏康

(富山県立大学工学部 生物工学研究センター)

研究の目的

goadsporin (ゴードスポリン、以下 GS と記載、下図参照) は放線菌に対して二次代謝と形態分化を誘導する薬剤で、*Streptomyces* sp. TP-A0584 より発見された新規物質である。GS は、無作為に選んだ 42 株の放線菌に対してその 85% にあたる 36 株に対して二次代謝もしくは形態分化誘導活性を示す。また、他の生物種に対しては全く活性を示さない。このような放線菌特異的に作用する薬剤の存在はこれまで報告されておらず、極めてユニークな物質であると思われる。本研究では、GS の生合成遺伝子を解析することによって生体内での GS の作用について考察することを目的とする。



ゴードスポリン (Goadsporin) の化学構造

方法及び結果

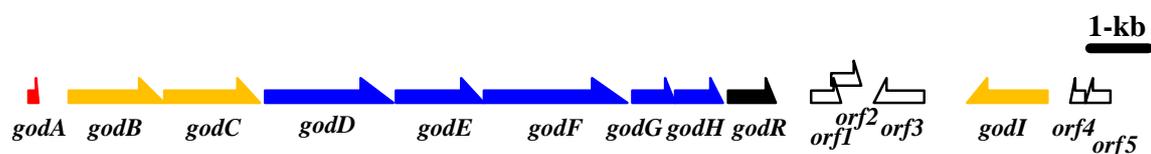
GS生合成遺伝子のクローニング

GS は、ペプチド化合物であるために、リボゾーム合成系を介して合成される化合物であると予想した。特殊構造であるオキサゾール、メチルオキサゾール、チアゾールはそれぞれセリン、スレオニン、システインが前駆体と予想できる。そこで GS 前駆体配列に対応するアミノ酸配列に基づいてオリゴ DNA プローブを作製し、GS 生合成遺伝子群を GS 生産菌 TP-A0584 株の染色体 DNA をクローニングしたコスミドライブラリーよりコロニーハイブリットによって取得した。クローニングベクターには新しく作成した Bi-functional cosmid vector, pTOYAMAcos を用いたため、得られたコスミドを *S. lividans* に導入し、異種発現をすることが可能である。その結果 GS の異種発現が確認され、GS 生合成遺伝子群であることが実験的に証明された。

GS生合成遺伝子の解析

異種生産が確認されたコスミドクローンの塩基配列を決定した。図に示すような 10 個の遺伝子が特定された。チアゾールやオキサゾールの環化に関与すると予想される遺伝子は全部で 5 つ(D, E, F, G, H)あり、全て既知の遺伝子との顕著な相同性が見られなかった。膜貫通領域と思われるモチーフを持つ二つの蛋白 *godB*, *godC* のうち *godB* につい

ては遺伝子破壊実験を行ったが、GS 耐性に変化はなかった。*godB* と *godC* の両者はアミノ酸配列上 20% の相同性があることから、両者は耐性機構には関与せず、GS もしくは GS 生合成酵素の局在化に関与していることが予想された。



Streptomyces sp. TP-A0584 よりクローニングされたゴードスポリン生合成遺伝子クラスター

GS耐性遺伝子の同定

GS 生産を行うようになった *S. lividans* 異種発現株は同時に GS 耐性も示す。この事より、GS 生合成遺伝子クラスターには耐性遺伝子の存在が示唆された。詳細なサブクローニング実験により生合成遺伝子群の末端に位置する *ffh* ホモログ *godI* が耐性遺伝子であることを明らかにした。*godI* のみをクローニングした pTYM*godI* を *S. lividans* に形質転換すると形質転換体は GS 耐性を示した。また、*godI* を除く GS 生合成遺伝子群をクローニングしても GS は生産されず、かつ形質転換体は得られることから、*godI* は GS 生合成においても何らかの役割を果たしていると示唆された。なお、*ffh* は蛋白質局在化装置である Signal Recognition Particle の構成員であり、全ての生物種において存在する基本的なシステムである。*ffh* ホモログが抗生物質耐性に関与するという結果はこれが始めてであり、どのようなメカニズムで耐性機構が誘導されるかは興味深いところであり、GS の作用機作解明の鍵になると思われる。

GS誘導株の作成

GS はリポゾームを介して生合成される化合物であるため、構造遺伝子の DNA 配列を改変することにより様々な誘導体の作成が可能である。そこで、GS 構造遺伝子、*godA* の破壊株を作製し、これに DNA 配列を改変した *godA* 遺伝子を形質転換して、新規誘導体の作製を行った。全部で 5 種類のアミノ酸配列置換を行うことができた。今後はさらに効率的に *godA* 遺伝子の配列を改変する方法を検討し、多数の誘導体を生産することを目指したい。

結論

GS 生合成遺伝子を *Streptomyces* sp. TP-A0584 よりクローニングすることに成功した。*god* 生合成遺伝子クラスターは 10 個の遺伝子、20 kb からなる。GS 耐性には *ffh* ホモログ、*godI* が関与していることが明らかになった。さらに生合成遺伝子を改変することにより 5 種類の新規 GS 誘導体の生産に成功した。