

氏名	木村宏之
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2418号
学位授与の日付	平成14年1月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Cephalosporin biosynthetic genes and their application to the strain improvement of <i>Acremonium chrysogenum</i> (セファロスポリン生合成酵素遺伝子と <i>Acremonium chrysogenum</i> の菌株育種への応用)
論文調査委員	(主査) 教授 清水 昌 教授 加藤 暢夫 教授 江崎 信芳

### 論文内容の要旨

臨床上広く用いられている感染症治療薬、セファロスポリン系抗生物質の合成出発原料、セファロスポリンCやデアセチルセファロスポリンC (DAC) は、糸状菌 *Acremonium chrysogenum* の高生産変異株を用いた発酵法で工業生産されている。本論文は、*A. chrysogenum* の育種改良に遺伝子組換え技術を応用するために行ってきた、セファロスポリン生合成酵素遺伝子のクローニングと構造および機能解析、*A. chrysogenum* の形質転換系及び遺伝子発現系の構築、生産菌への遺伝子導入効果、等の研究の過程で得られた結果をまとめたものである。内容は以下のように要約される。

#### I. セファロスポリン生合成酵素遺伝子のクローニングと構造解析

本研究では、生合成酵素をコードする遺伝子をクローニングするための遺伝子源としてセファバシン類を生産するグラム陰性細菌 *Lysobacter lactamgenus* YK90 を選択した。

*L. lactamgenus* YK90 から isopenicillin N synthase をコードする *pcbC* 遺伝子をクローニングした。*pcbC* 遺伝子の下流および上流領域の塩基配列を解析することにより、*pcbC* 遺伝子 (ORF2) を含む6個のORFが同方向にジーンクラスターとして存在することを明らかにした。各ORFの *Escherichia coli* での発現実験によりORF3が deacetoxycephalosporin C synthetase をコードする *cefE* 遺伝子、ORF5が isopenicillin N epimerase をコードする *cefD* 遺伝子、ORF6が  $\beta$ -lactamase をコードする *bla* 遺伝子であることを示した。さらに、6個のORFからなるジーンクラスターを *lac* プロモーターの下流に連結して *Pseudomonas putida* に導入すると、菌体内に $\beta$ -ラクタム抗生物質の蓄積が認められたことから、ジーンクラスターには前駆体アミノ酸からDACまでの生合成酵素遺伝子 (*pcbAB*, *pcbC*, *cefE*, *cefF*, *cefD*) がすべて含まれていることが明らかになった。

#### II. *Acremonium chrysogenum* の形質転換系および発現系の確立と菌株育種への応用

*A. chrysogenum* の菌株育種に遺伝子操作技術を応用するためには、*A. chrysogenum* への遺伝子導入法と、遺伝子が導入された形質転換株を効率よく選択するための選択マーカー遺伝子が必要となる。さらに効率的な発現システムを構築する必要がある。

*A. chrysogenum* からクローニングした $\beta$ -isopropylmalate dehydrogenase (*LEU2*) 遺伝子のプロモーター領域と細菌由来の hygromycin B phosphotransferase (*HPT*) 遺伝子から構築した *LEU-HPT* 融合遺伝子を用いて *A. chrysogenum* の形質転換系を確立した。

*Saccharomyces cerevisiae* の glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAP*) 遺伝子をプローブとしてクローニングした *A. chrysogenum* の *GAP* 遺伝子のプロモーター領域を用いた *A. chrysogenum* での遺伝子発現系を構築した。

*A. chrysogenum* ATCC11550 からDAC高生産株として育種されたD'39-2株の *cefEF* 遺伝子を、*L. lactamgenus* YK90 の *cefEF* 遺伝子をプローブとしてクローニングした。塩基配列決定の結果、育種の過程で *cefEF* 遺伝子は変異していないことが明らかになった。培養液中に生合成の中間体ペニシリンNの蓄積が認められるD'39-2株に *cefEF* 遺伝子を導入し、遺伝子導入効果を調べた結果、明らかにペニシリンNの蓄積量が低下し、DACの蓄積量が約20%増加した。

律速段階の酵素遺伝子を *A. chrysogenum* へ導入することにより、ランダムスクリーニング法で得られなかった特異な菌株を育種できたことから、遺伝子操作技術の菌株育種への有用性を示すことができた。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、セファロスポリン系抗生物質の合成出発原料、デアセチルセファロスポリン C (DAC) の生産菌、*Acremonium chrysogenum* の育種改良に遺伝子操作技術を応用するために行われた、セファロスポリン生合成酵素遺伝子のクローニングと構造および機能解析、*A. chrysogenum* の形質転換系及び遺伝子発現系の構築、生産菌への遺伝子導入効果についての結果が述べられているが、評価すべき点は以下の通りである。

### I. セファロスポリン生合成酵素遺伝子のクローニングと構造解析

*Lysobacter lactamgenus* YK90 から isopenicillin N synthase をコードする *pcbC* 遺伝子をクローニングし、*pcbC* 遺伝子の下流および上流領域の塩基配列を解析することにより、*pcbC* 遺伝子 (ORF2) を含む 6 個の ORF が同方向にジーンクラスターとして存在することを明らかにした。*Escherichia coli* および *Pseudomonas putida* を宿主とした各 ORF の検討により、ジーンクラスターにはセファロスポリンの前駆体アミノ酸から DAC までの生合成酵素遺伝子 (*pcbAB*, *pcbC*, *cefE*, *cefF*, *cefD*) がすべて含まれていることを明らかにした。さらに、 $\beta$ -lactamase をコードする *bla* 遺伝子もジーンクラスターに存在することを明らかにした。

### II. *Acremonium chrysogenum* の形質転換系および発現系の確立と菌株育種への応用

*A. chrysogenum* の菌株育種に遺伝子操作技術を応用するために必須となる遺伝子導入法と発現システムに関する検討を行っている。

*A. chrysogenum* からクローニングした  $\beta$ -isopropylmalate dehydrogenase (*LEU2*) 遺伝子のプロモーター領域と細菌由来のハイグロマイシン耐性遺伝子から構築した *LEU2-HPT* 融合遺伝子を用いて *A. chrysogenum* の形質転換系を確立した。さらに、*A. chrysogenum* の glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAP*) 遺伝子のプロモーター領域を用いた *A. chrysogenum* での遺伝子発現系の構築に成功した。

本遺伝子導入法を用いて、培養液中に生合成の中間体ペニシリン N の蓄積が認められる工業生産株に *cefEF* 遺伝子を導入し、遺伝子導入効果を調べた結果、ペニシリン N の蓄積量が低下し、目的生産物である DAC の蓄積量を約 20% 増加させることに成功した。従来技術で得られなかった特異な菌株を育種できたことは、遺伝子操作技術が *A. chrysogenum* の菌株育種に対して有用な技術であることを示すものである。

以上のように、本論文はセファロスポリン生合成酵素遺伝子のジーンクラスターの解析に加え、工業的に用いられている *A. chrysogenum* の遺伝子導入系及び遺伝子発現系を構築し、遺伝子操作技術の菌株育種への有用性を示したものであり、応用微生物学、分子生物学に貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 13 年 12 月 13 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。