

シトルリンによるカスガマイシン産生誘発の遺伝生化学的研究

(予研・遺伝生化学) 〇 岡西昌則・木南貴行

1) 目的 Varga ¹⁾ および越智 ²⁾ によつて、シトルリンが微生物の分化および2次代謝の誘発に關与し、アルギニンにその効果のないことが示唆されている。演者はカスガマイシン(KSM)とオーレオスリシン(AT)生産菌の *Streptomyces kasugaensis* MB 273 から得られた 18a-C2219 株がペプトンを含む KSM 生産培地で KSM を生産せずシトルリンの添加でその生産性を回復し、アルギニンにその効果のないことを見出した。よつてこのシトルリン効果の機作を明らかにすることを目的として、KSM 生産に及ぼすシトルリン添加の最適濃度、シトルリン代謝関連物質および2次代謝誘発に關係する物質の効果を検討し、さらに ¹⁴C トラベルしたシトルリンの KSM への取込みを調べた。次にシトルリンの生合成遺伝子を C2219 株にクローン化して、Cit⁻の相補性および KSM 生産性を検討したので報告する。

2) 方法 本実験に用いた Cit⁻の C2219 株は野生株の MB273 から自然分離で得られた Cit⁻の 18a 株とさうしてプロトプラスト再生処理で純化したものである。KSM の生産培地の組成は MB273 株用に創案されたものであって、ペプトン、酵母エキス、マルトース等を含む寒天培地である。そのアガーペーストに接種して 28°C 7 日間培養した後はそのアガーペースト中の KSM 量を常法のデイスク検定用平板で検定した。検定菌は *Pseudomonas fluorescens* IMC B-0376 を NT4 処理したもののうちから KSM 高感受性の M212 株を選出した。デイスク検定による感度は親株が 25 μg/ml、M212 は 3 μg/ml であった。両者とも AT に対しては 100 μg/ml 以上の耐性を示した。C2219 株の Cit⁻を相補する遺伝子のクローニングはチオストレプトン耐性遺伝子を有する pSK21-B5 をベクターに用いて、これを Bcl I で消化し BAP 処理した。これに対して野生株の MB273 の総 DNA を Bcl I で部分消化したものをライゲーションさせ、これを C2219 株のプロトプラストに導入した。チオストレプトン耐性クローンを選抜したから、これを最少培地に移植してシトルリン非要求株を選出した。

3) 結果 KSM 生産に対するシトルリンの添加濃度は 20 mM までは高い方がよく、20 mM では 70 μg/ml の KSM を生産した。それ以上の濃度では生産阻害がみられた。菌の全育量はシトルリン無添加でも有意差は見出されなかった。次にシトルリン代謝関連物質とシトルリンの代りに加えて KSM 生産効果を調べた。アルギノサクレネートは僅かな効果が認められ以外には、オルニチン、アグマチン、トグア=ジノブケレート、尿素、スバルミジン、スperlミン、グア=ジノ酢酸、クレアチン及びクレアチン燐酸、ヒオキシンは KSM 生産は検出されなかった。また2次代謝及び気中菌糸形成の誘導物質として知られているものについて同様の実験を行った。0.5 mM の ppGpp および 0.1 mM の S-アデノシルメチオニンにそれぞれ 4.6 μg/ml と 5.4 μg/ml の僅かな効果が認められ、GTP、ATP、A 7 因子のいずれにも効果は検出されなかった。一方、¹⁴C トラベルしたシトルリンを KSM 生産培地に加えて、KSM への取込みは TLC で分別した後そのオートラジオグラムで調べた。¹⁴C の取込みは検出されなかった。以上の結果はシトルリンそのものまたはその結合物が KSM 産生のホジティブ制御、あるいは誘発に關与していることを示唆する。このことと遺伝学的に検討するにクローニング実験を試みた。野生株の MB273 の総 DNA を外來 DNA として、pSK21-B5 をベクターとして C2219 株の Cit⁻を相補する遺伝子をクローン化した。得られた組換え分子 pSK21-B5-MC1 は C2219 の Cit⁻を相補したが、*S. lividans* I10 のアルギノサクレネートセンサーセグメントを相補するとはできなかった。(これがこの組換え分子中には後者の酵素の遺伝子が含まれていないものと思われる。本組換え分子を C2219 に再導入したものはいずれも KSM 生産性が回復している。

1) Varga et al.: J. Gen. Microbiol., 129: 539 (1983)

2) Ochi et al.: J. Gen. Microbiol., 130: 2007 (1984)