

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 米 川 徹

放線菌は原核生物でありながら複雑な形態分化を示す。放線菌のいくつかの種では形態分化が $\text{Ca}^{2+}$ 依存的であり、さらにこれらの形態分化はカルモジュリン阻害剤により抑制される。真核生物において $\text{Ca}^{2+}$ はセカンドメッセンジャーとして機能するが、その細胞応答反応はたいてい $\text{Ca}^{2+}$ がEF-hand型の $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパクと結合してその構造変化を引き起こし、それが複雑な反応応答の引き金を引く。EF-handモチーフを持つタンパクは原核生物では現在までに僅か2例の報告があるのみであり、そのうちの 하나가放線菌 *Streptomyces erythrae*より単離された calerythrin であるがその機能はほとんど解析されていない。本研究は放線菌における $\text{Ca}^{2+}$ の形態分化に及ぼす影響を $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパクの面から解析したものである。

## 1. *S. coelicolor* A3(2) におけるカルモジュリンホモログ CabB の機能解析

*S. coelicolor* A3(2) ゲノムプロジェクトデータベースを基にカルモジュリンに相同なアミノ酸配列をコードする遺伝子の検索を行った結果、カルモジュリンのN末側半分とC末側半分それぞれと約40%の相同性を示すタンパクが見出された。これをコードする遺伝子をクローニングし、*cabB*と命名し、機能解析を行った。大腸菌を用いて発現、精製したCabBについて $^{45}\text{Ca}$ 結合アッセイを行った結果、CabBは $\text{Ca}^{2+}$ 結合能を持つことが確認された。同方法で精製したタンパクについて $\text{Ca}^{2+}$ との結合により、大きな構造変化が起こることもCDスペクトラムにより確認された。次にCabBのカルモジュリンとしての機能の有無を判断するためにcAMP PDE活性化能、出芽酵母カルモジュリン温度感受性変異株に対する相補能を調べた。しかし、これらの結果はいずれもCabBがカルモジュリンとして機能し得ないという結果になった。

放線菌におけるCabBの機能解析を行うために、*S. coelicolor* A3(2) で*cabB*遺伝子破壊株を作製した。遺伝子破壊株は最少培地に高濃度 $\text{Ca}^{2+}$ を添加した時のみ親株に比べ、生育の遅れを示した。このことからCabBは菌体内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を低く保つために必要な $\text{Ca}^{2+}$ ポンプを活性化する機能を持つことが示唆された。次に*cabB*を多コピーベクターを用いて親株に導入し、その表現型を観察したところ、最少培地、栄養源が豊富に含まれる培地において高濃度の $\text{Ca}^{2+}$ を添加した時にコロニー形成率の低下が観察された。

以上のように細胞内でのCabBの増減により全く異なる表現型が見られ、このことからCabBは多機能タンパクであることが示唆された。

## 2. *S. ambofaciens*におけるEF-handタンパク CabA の機能解析

上記の calerythrin はアミノ酸配列上、カルモジュリンよりもむしろ細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ バッファーとして機

能するCa<sup>2+</sup>結合タンパクに類似している。また、calerythrinについて遺伝学的機能解析はほとんど行われていない。そこで、Ca<sup>2+</sup>依存的形態分化を示す*S. ambofaciens* IFO12651よりcalerythrin相同タンパクをコードする遺伝子をクローニングし、遺伝子破壊、過剰発現を行うことで他の株では観察することのできないような親株との表現型の違いが見られると考えられた。calerythrinのEF-handモチーフを基に設計したプライマーを用いて*S. ambofaciens* IFO12651の染色体DNAを鋳型としてPCRを行い、増幅したDNA断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行ったところ、calerythrinと約60%の相同性を示すタンパクをコードする遺伝子を取得した。この遺伝子を*cabA*と命名し、<sup>45</sup>Caを用いたCa<sup>2+</sup>結合アッセイを行い、CabAがCa<sup>2+</sup>結合能を持つことを確認した。Ca<sup>2+</sup>濃度を変化させた様々な培地上で*cabA*遺伝子破壊株および*cabA*過剰発現株の表現型を野生株と比較したが、試験した条件下では全ての株の表現型に違いは観られなかった。*cabA*の転写を調べたところ、基底菌糸から孢子形成初期の間、十分な転写が行われており、CabAは菌体内で発現され、機能している可能性が高い。そのためCabAは今回行った実験の条件下では観察する事ができないような菌体内の微妙なCa<sup>2+</sup>濃度の変化を調節するバッファーとして機能している可能性が高いと考えられる。

以上、本論文は放線菌の形態分化におけるカルシウムの役割を明らかにすべく、カルシウム結合タンパクの面から研究を行い、2種のカルシウム結合タンパクの単離、解析を通じてカルシウムの重要性を示したものである。よって審査委員一同は、本論文が、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。