

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 徐 正又

申請者は放線菌の複雑な形態分化および生理的分化の調節機構を分子レベルで明らかにすることを目的に研究を行い、その過程でクローニングされた遺伝子を解析することにより、次のような結果を得た。

1. *Streptomyces griseus* の形態分化に関与する ABC トランスポーターシステムに関する解析

グルコースを含む培地上において、基底菌糸から直接孢子形成を行うという ESP 形質を示す変異株 NP4 を UV 変異により取得した。野生株の染色体 DNA ライブラリーを NP4 株に導入し、(1) NP4 株の ESP 形質を相補する遺伝子 *dasR* (GntR 型の転写抑制因子と高い相同性のある蛋白をコード)、および (2) NP4 株の ESP 形質を著しく強める遺伝子 *dasA* (ABC トランスポーターの基質結合蛋白と高い相同性のある蛋白をコード) を取得した。高コピーベクター上の *dasA* は NP4 株だけでなく、野生株においても ESP 形質を引き起こしたが、この株で作られる孢子は NP4 株のものと異なり、未成熟なものであった。*S. griseus* 染色体上では、*dasA* は *dasR* のすぐ上流に逆向きに存在し、*dasA* の下流には ABC トランスポーターの膜結合型パーミアーズと高い相同性を示す蛋白をコードする *dasB*, *dasC* が *dasA* と同じ向きに存在していた。また、*DasR* は *dasA* プロモーター領域に結合し、その転写を抑制していることが示された。以上の結果より、*DasABC* がコードしている ABC トランスポーターが ESP 形質に関与していることが強く示唆された。

NP4 株の *dasR*, *dasA* および両遺伝子間の領域には変異はなかった。しかしながら、NP4 株においては *dasA* の転写量が野生株に比べて増大しており、これが NP4 株の ESP 形質の原因であると推察された。また、NP4 株においては栄養増殖期における *dasR* の転写量も増大しており、これが *dasA* を過剰発現した野生株と NP4 株の形質の違いの原因であると考えられた。NP4 株の変異点は *das* オペロンの発現制御機構にあると思われた。

dasR 遺伝子破壊株では *dasA* の過剰生産が引き起こされ ESP 形質を示すと考えられたが、実際、一部の菌糸において ESP 形質が認められた。しかしながら、大部分の菌糸では隔壁形成が起こらないとともに、気中菌糸形成が完全に阻害された。一方、*dasA* 遺伝子破壊株でも気中菌糸形成が完全に阻害された。両遺伝子破壊株の形質はこれまで述べてきたものと異なり、培地の炭素源によらず観察され、本質的にこれらの遺伝子が気中菌糸形成に関しても重要な機能をもっていることが示された。

以上のように ABC トランスポーターの構成因子が ESP 形質、気中菌糸形成などの形態分化に深く関わっていることを明らかにした。

2. DasRによるシャペロニンの発現制御に関する解析

das オペロンの機能を明らかにするために行った一連の実験において、シャペロニン GroES/EL1, GroEL2 の発現量は、*dasR* 破壊株で顕著に増加し、DasR 過剰生産株で減少することを SDS-PAGE およびウエスタンブロットングにより明らかにした。そこで *groEL2* 遺伝子をクローニングし、その転写を解析した。*groEL2* の転写は対数増殖期において見られるが、静止期においてはほんのわずかしか検出されなくなった。しかしながら、*dasR* 破壊株では静止期においても *groEL2* の転写が継続していた。一方、*dasR* 過剰発現株では、*groEL2* の転写が弱くなる傾向が見られた。さらに、*dasA* プロモーターへの結合よりは弱いものの、DasR が *groEL2* プロモーター領域近辺に結合することを明らかにした。以上の結果は、DasR がシャペロニンの発現を直接制御していることを示しており、熱ショック以外によるシャペロニンの発現制御を考える上で非常に重要である。

3. グルコースの形態分化抑制効果に対するグルコキナーゼの役割に関する解析

放線菌の形態分化にグルコースが抑制効果をもつことが報告されているが、そのメカニズムはほとんど解明されていない。3%のグルコースを含む培地上では、*S. griseus* の形態分化は完全に抑制されるが、以前取得された変異株 VHK2 は 5%のグルコース存在下でも形態分化の抑制は全く起こらない。また、VHK2 株ではカタボライト抑制を受ける典型的な酵素であるグルコース-キシロースイソメラーゼが過剰生産されていることを SDS-PAGE 解析により明らかにした。VHK2 株ではグルコキナーゼ活性が全く検出されず、グルコキナーゼがカタボライト抑制およびグルコースの形態分化抑制効果に関与することが示唆された。VHK2 株のグルコキナーゼ遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定したところ、147番 Gly が Arg に置換されていることが明らかになった。一方、これまでに真核生物型 Ser/Thr キナーゼ AfsK、およびその標的である転写制御因子 AfsR、さらには真核生物型 cAMP 合成酵素（アデニレートシクラーゼ）CyaA などについて研究が行われてきたが、これらの遺伝子破壊株においても、グルコースによる形態分化の抑制効果が部分的に解除されていることが明らかになり、グルコキナーゼを介した形態分化の制御機構は非常に複雑であることが明らかになってきた。

このように本研究により、(1) 形態分化に関与する ABC トランスポーターが明らかにされ、(2) その ABC トランスポーター遺伝子の転写抑制蛋白が、シャペロニンの発現をも直接制御している可能性が示された。さらに (3) 放線菌の形態分化に対するグルコースの抑制効果に、グルコキナーゼが重要であることが明らかにされ、さらなる解析の糸口が示された。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のあるものと認めた。