

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Lee Ping Chin

*Streptomyces coelicolor* A3(2)においてセリン/スレオニンキナーゼをコードする遺伝子 *afsK* とそのキナーゼのターゲットであるタンパク質をコードする遺伝子 *afsR* がクローニングされている。*AfsK* は外界からのある刺激に応答して自己リン酸化を行い、リン酸化型 *AfsK* が *AfsR* をリン酸化し、リン酸化された *AfsR* が二次代謝産物の生合成を誘導する事が明らかになっている。*AfsR* のリン酸化残基はセリン、スレオニン残基であり、N 末領域には DNA 結合ドメインが存在し、中域には A、B タイプ二種類の ATP 結合ドメインが含まれている。また、*S. coelicolor* A3(2)における色素性抗生物質アクチノローゼの生産が *afsK*、*afsR* 両遺伝子破壊株で著しく減少したことから、*AfsK* による *AfsR* のリン酸化が二次代謝産物生産制御に重要であると考えられた。本論文は、*AfsR* の ATP 結合モチーフとリン酸化が制御機能にどのように関わっているかを明らかにしたものである。

### 1. *afsS* の機能解析

*afsR* の直下流には、63 アミノ酸をコードする *afsS* 遺伝子が存在している。多コピーベクターを用いて *afsS* を、親株である *S. coelicolor* A3(2) M130 及び *afsR* 遺伝子破壊株に導入すると、両株におけるアクチノローゼ生産量が大幅に増加した。また、*afsS* 遺伝子破壊株ではアクチノローゼ生産量が親株に比べ著しく減少した。

### 2. *AfsR* による *afsS* の転写制御

*afsS*、*afsR*、*afsK* はアクチノローゼ生産制御に深く関わっている。それぞれの遺伝子座が互いに近いことから、*afsS* の転写が *afsR* あるいは *afsK* により制御されると予想し、*S. coelicolor* A3(2) M130 を親株として、親株、*afsR* 遺伝子破壊株、*afsK* 遺伝子破壊株 *afsS* の転写を調べた。その結果、*afsS* の転写は *afsR* 遺伝子破壊株ではほぼ完全に無くなり、*afsK* 遺伝子破壊株では転写開始時期が遅れた。また、RT-PCR 法により *afsR* と *afsS* は別の転写単位であることが確認された。これらの結果は *afsS* の転写は *afsR* の制御下にあることを強く示している。

非リン酸化型、リン酸化型 *AfsR* を用いて *afsS* プロモーター領域に対するゲルシフトアッセイを行った。その結果、リン酸化型では非リン酸化型の 10 倍低いタンパク質濃度でシフトバンドがみられた。このことから、*AfsR* は *afsS* プロモーター領域に結合するが、その結合はリン酸化により大きく増強されると考えられた。また DNase I フットプリンティングにより、*AfsR* の結合領域は RNA ポリメラーゼや大多数のリブ

レッサーが結合する -35 ~ -10 領域とオーバーラップしていた。

AfsR は A、B タイプ二つの ATP 結合モチーフを持つため、これらの ATPase, GTPase 活性を調べた。ネガティブコントロールとして、A、B タイプ両 ATP 結合モチーフのアミノ酸置換を行ったもの (AfsR $\Delta$ ATP) を用いた。予想どおり、AfsR は GTPase, ATPase 活性を示した。GTPase 活性は ATPase 活性に比べわずかに弱かった。また、ATP 活性を失った AfsR $\Delta$ ATP でも、*afsS* のプロモーター領域へ結合した。したがって、ATPase, GTPase 活性は DNA 結合には必須ではないといえる。

次に AfsR が持つ ATPase 活性のリン酸化による影響を、非リン酸化型 AfsR とリン酸化型 AfsR を用いて調べた。その結果、リン酸化型は非リン酸化型に比べ、2 ~ 3 倍高い ATPase 活性を示した。さらに、*afsR $\Delta$ ATP を多コピーベクターを用いて親株へ導入した株ではアクチノローゼとウンデシルプロディオシン生産量が著しく減少した。このことから、AfsR $\Delta$ ATP は DNA 結合については AfsR と拮抗し得るが、*afsS* の転写を促進することはできないと考えられた。加えて、*afsR* 遺伝子破壊株に AfsR $\Delta$ ATP を導入した株では *afsS* の転写回復は起こらなかったため、*afsS* の転写誘導に AfsR の ATPase 活性が必須であると考えられる。*

### 3. AfsK 以外の AfsR リン酸化キナーゼの機能解析

*afsK* 遺伝子破壊株の粗抽出液により AfsR がリン酸化されることから、AfsK 以外の AfsR リン酸化キナーゼの存在が予想された。コンピュータ検索により、*S. coelicolor* A3(2) には AfsK のキナーゼ触媒ドメインに類似したドメインを有するタンパク質が約 30 種類存在している。それらの中で AfsR リン酸化能を持つタンパク質を一つ同定し、これを PkaG と命名した。PkaG は AfsK 同様、自身のセリン、スレオニン残基を自己リン酸化した。*in vitro* リン酸化アッセイの結果、PkaG は AfsR のセリン、スレオニン残基をリン酸化した。*pkaG* 遺伝子破壊株においてアクチノローゼ生産量の減少がみられたが、*afsK* 遺伝子破壊株ほどの減少は起こらなかった。この事は AfsR のリン酸化が PkaG を含む他のキナーゼよりも AfsK に大きく依存することを示唆している。

以上、本論文は主に AfsK-AfsR 二次代謝制御系において AfsR の ATP 結合モチーフとリン酸化の重要性を示し、さらに AfsR の下流にコードされるタンパク質 *afsS* もこの制御系で重要な役割を持つことを示した。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あるものと認めた。