

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山崎 美佳

放線菌 *Streptomyces griseus* の二次代謝および形態分化は、化学調節物質A-ファクターにより調節されている。本研究は、A-ファクター制御カスケードの転写因子AdpAが転写を制御している遺伝子群を同定し、A-ファクターによる形態分化および二次代謝の制御カスケードを解明することを目的としている。

AdpAレギュロンの解明にあたり、AdpAが結合するDNA断片を*in vitro*で直接単離する手法を用いた。制限酵素で部分分解した *S. griseus* の染色体DNAと大腸菌より精製したヒスチジンタグ付加AdpAを混合し、AdpAと結合したDNA断片をゲルシフト反応とPCRの繰り返しによって分離増幅後、大腸菌用ベクターにクローニングした。2137クローンについて塩基配列解析した結果、60種のAdpA結合DNA断片AdBS1~60を取得した。転写解析の結果、AdBS1, 2, 3, 4, 11, 17, 18の7断片においてAdpA依存的に転写活性化される遺伝子を見出した。

AdBS1から見出したAdpA依存性遺伝子*adsA*はECFサブファミリーに属する新規なRNAポリメラーゼシグマ因子をコードしており、破壊株の形質から、二次代謝には関与せず気中菌糸形成のみを制御することが明らかになった。DNase I フットプリント解析の結果、AdpAは*adsA*の転写開始点の下流に結合した。AdBS11断片には、気中菌糸の隔壁形成を担う*ssgA*が見出され、*ssgA*はAdpA依存性かつ $\sigma^{AdsA}$  依存的に転写活性化された。*ssgA*破壊株は気中菌糸へ隔壁を形成することができず、胞子形成能を失った。AdpA結合領域は転写開始点に対して-235位、-110位および+60位の3カ所であった。各結合配列にAdpAが結合できなくなるような変異を導入し、*ssgA*とともに低コピー数ベクターに乗せて*ssgA*破壊株に形質転換した。その結果、*ssgA*の転写活性化および*ssgA*破壊株の胞子形成能の回復には-235位と-110位の両結合領域が必須であった。

AdBS18下流にコードされる金属プロテアーゼSgmAは、AdpAによって直接転写活性化されており、破壊株の形質から形態分化に関与するプロテアーゼであることが示された。

以上の手法とは独立に、放線菌の気中菌糸形成を制御する*amf*遺伝子クラスターの転写因子AmfRが、AdpAレギュロンに属することを見出した。*amfR*は自身のプロモーターからA-ファクター依存性かつAdpA依存的に転写されており、AdpAは*amfR*プロモーターの-200位に強く結合し、-60位に弱く結合した。これら2カ所のAdpA結合部位に変異を導入すると気中菌糸の形成が遅れたことから、A-ファクター依存的に発現されたAdpAが*amfR*プロモーターに結合して*amfR*の転写を増強し、気中菌糸形成を活性化していることが明らかになった。

一方、AdpAのDNA結合コンセンサス配列を同定するため、*adsA*、*ssgA*、*amfR*の各AdpA結合領域に対して3種の干渉フットプリント解析(U置換、T除去、GA除去)を行い、AdpA結合に重要な塩基を同定した。その結果、AdpA結合のコンセンサス配列としてCRRRAX<sub>3-4</sub>GCCA (R: G or A, X: any nucleotide)を見出した。さらに大腸菌より精製したヒスチジンタグ付加AdpAと*S. griseus*から精製したRNAポリメラーゼホロ酵素を用いて*adsA*、*amfR*、*ssgA*および*strR*について過マンガン酸カリウムを用いたフットプリント解析を行った結果、RNAポリメラーゼによるプロモーター領域の開鎖複合体形成にはAdpAが必須であった。

本研究により、放線菌 *S. griseus* の転写因子AdpAが二次代謝の制御因子StrRのみでなく、形態分化にかかわる複数の重要な遺伝子を直接転写活性化していることを明らかにし、微生物ホルモンによって形態分化と二次代謝の開始スイッチが同時に入る仕組みを解明した。さらにAdpAのDNA結合コンセンサス配列を明らかにし、*in vitro*における機能解析によってAdpAが原核生物の典型的な転写活性化因子とは異なり、転写開始点のかなり上流や下流に多彩に結合してRNAポリメラーゼによる開鎖複合体形成を促すことを示した。このように本研究は、放線菌の二次代謝と形態分化の制御機構に関する新知見をもたらす先駆的な研究である。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。