

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成 14 年度博士課程 進学

氏 名 友野 理生

指導教員名 堀之内 未治

論文題目 A-ファクター制御カスケード内の転写因子 AdpA の標的遺伝子に関する研究

原核生物である放線菌はカビのように気菌糸を張り巡らし胞子を着生するという複雑な形態分化と、抗生物質をはじめとする多種多様な二次代謝生産という特徴をもつことから、基礎生物学的にも医学的、工業的にも重要な菌群である。ストレプトマイシン生産菌である *Streptomyces griseus* は、微生物ホルモンとも言われる低分子化合物 A-ファクターを生産し、自身の形態分化と二次代謝を自己調節するという興味深い調節機構を持っている。

A-ファクターは γ -ブチロラクトン環を有する分子量 242 の低分子化合物であり、 10^{-9} M という極微量で作用を及ぼす。A-ファクターは特異的レセプター ArpA に結合し、ArpA を *adpA* 遺伝子のプロモーター領域から解離させることで *adpA* の転写抑制を解除する。これにより発現誘導される転写因子 AdpA は、形態分化および二次代謝の両方に必須であり、*S. griseus* の分化において非常に重要な鍵となる転写因子である。AdpA の標的遺伝子としては、気中菌糸形成に必須なシグマ因子をコードする *adsA*、ストレプトマイシン生合成遺伝子群の経路特異的な制御因子 *strR* など、形態分化および二次代謝に重要な因子をコードする多数の遺伝子が同定されている。本研究は、AdpA のさらなる標的遺伝子を探索・同定し、それらの遺伝子の制御様式や機能の解析を行い、AdpA による形態分化・二次代謝の制御機構を明らかにすることを目的とする。

1. ストレプトマイシン生合成制御遺伝子 *strR* の解析

strR 遺伝子はストレプトマイシン生合成クラスターの経路特異的な制御因子をコードしており、AdpA の標的遺伝子として最初に同定された。しかしその制御について詳細な解析がなさ

れていなかったため、AdpA による *strR* の転写活性化様式を明らかにすることを目的に研究を行った。

strR 遺伝子破壊株がこれまで取得されていなかったため、まず *strR* 遺伝子の大部分を欠失させた株 (*strR* 破壊株) を作製し、野生株に比べてストレプトマイシンをほとんど生産しないことを確認した。AdpA は *strR* の転写開始点に対して-55 位および-270 位付近に結合することを DNase I footprint によって明らかにした。AdpA の結合が転写に必要であることを調べるためにそれぞれの AdpA 結合配列に変異を導入し、変異型プロモーターと *strR* を組み込んだプラスミドを *strR* 破壊株に導入した。野生型プロモーターでは *strR* 破壊株のストレプトマイシン生産能が回復するのに対し、2 つの結合部位をそれぞれ変異させたもの、両方変異させたものは野生型ほどの回復が見られなかった。このことから、-55 位および-279 位の両方の AdpA 結合部位が *strR* の活性化に必要であることが示された。

2. キモトリプシン様セリンプロテアーゼの解析

放線菌の複雑な形態分化においては、様々な分解酵素が働くと考えられている。これまでに AdpA の標的遺伝子として気中菌糸形成に関わる分泌型メタロエンドペプチダーゼ SGMPII をコードする遺伝子 *sgmA*、分泌型トリプシン型プロテアーゼ SGT をコードする遺伝子 *sprT* が同定されており、AdpA は分泌型プロテアーゼを直接制御していることが分かってきた。筆者は *S. griseus* が生産する分泌プロテアーゼ中に多く含まれるキモトリプシン様セリンプロテアーゼが AdpA によって転写活性化されることを見出した。

2-1 *sprA, B, D* 遺伝子は AdpA によって転写活性化される

S. griseus において同定されていたキモトリプシン様セリンプロテアーゼ遺伝子 *sprA-E* のプロモーター上流について解析したところ、*sprA*、*sprB*、*sprD* の3つのプロモーター上流に AdpA が結合した。これらの遺伝子の転写は野生株に比べて *adpA* 破壊株で減少あるいはほとんど消失しており、AdpA 依存的であった。DNase I footprint の結果、AdpA 結合部位は *sprA* の転写開始点に対して-49 位および-372 位、*sprB* の-48 位、*sprD* の-40 位および-179 位であった。これらの結合配列に変異を導入し、それぞれの遺伝子の転写に AdpA の結合が必要であることを *in vivo* で解析した結果、*sprA* の-49 位と-372 位、*sprB* の-48 位、*sprD* の-40 位が転写活性化に必須であることが明らかとなった。

2-2 *sprA, B, D* の機能解析

これらのプロテアーゼの機能を調べるために、3つの遺伝子の単独破壊株、二重破壊株、三重破壊株をそれぞれ作製した。キモトリプシン様セリンプロテアーゼの特異的な基質を用いてこれらの破壊株の菌体外セリンプロテアーゼ活性を測定したところ、それぞれの単独破壊株の活性は野生株より減少し、*sprAB* 二重破壊株および *sprABD* 三重変異株は活性がほとんどなくなった。このことは、*sprA* および *sprB* が *S. griseus* の主要なセリンプロテアーゼをコードしてい

ることを示唆している。またこれらの破壊株は、スキムミルクを含んだ培地上において野生株とほぼ同程度のスキムミルク分解能を示したため、これらのセリンプロテアーゼは菌体外の栄養分摂取のためのタンパク質分解においては主要な役割をしていないと思われる。一方、*sprAB* 二重破壊株および *sprABD* 三重破壊株は *Micrococcus* のペプチドグリカンを含むプレート上でのハロー形成能を失った。グルコースやガラクトース存在下では、これらのセリンプロテアーゼ活性があるにもかかわらずペプチドグリカン分解を示すハローが形成されなかったことから、ペプチドグリカン分解を担う酵素はこれらのプロテアーゼ自身ではなく炭素源によって制御される別の酵素であり、プロテアーゼによって活性型にプロセッシングされるのではないかと考えられた。そこでペプチドグリカンを分解する酵素としてリゾチームに着目し、*S. griseus* の *Chalaropsis*-type (Ch-type) リゾチームと相同性のある2つの遺伝子および goose egg-white (g-type) リゾチームと相同性のある1つの遺伝子をクローニングし、野生株および *sprABD* 三重破壊株において強制発現させた。その結果 Ch-type の2つのリゾチームは、野生株およびプロテアーゼ破壊株どちらにおいてもペプチドグリカン分解能を示し、野生株においてより強く活性を持っているという結果が得られた。これらのリゾチームがセリンプロテアーゼの基質となっているかについては、今後さらに詳細な解析が必要である。

3. AdpA 結合断片 AdBS3 および AdBS4 の解析

AdpA の標的遺伝子を探索することを目的に行われたゲルシフトと PCR を組み合わせた SELEX 法により、約 60 種類の AdpA 結合断片 (AdBS:AdpA-binding sequence) が取得されていたが、筆者は AdBS3 および AdBS4 の下流に存在する遺伝子 *BS3-orfA*、*BS4-orf1* の転写が AdpA 依存的であることを見出した。

3-1 BS3-orfA の解析

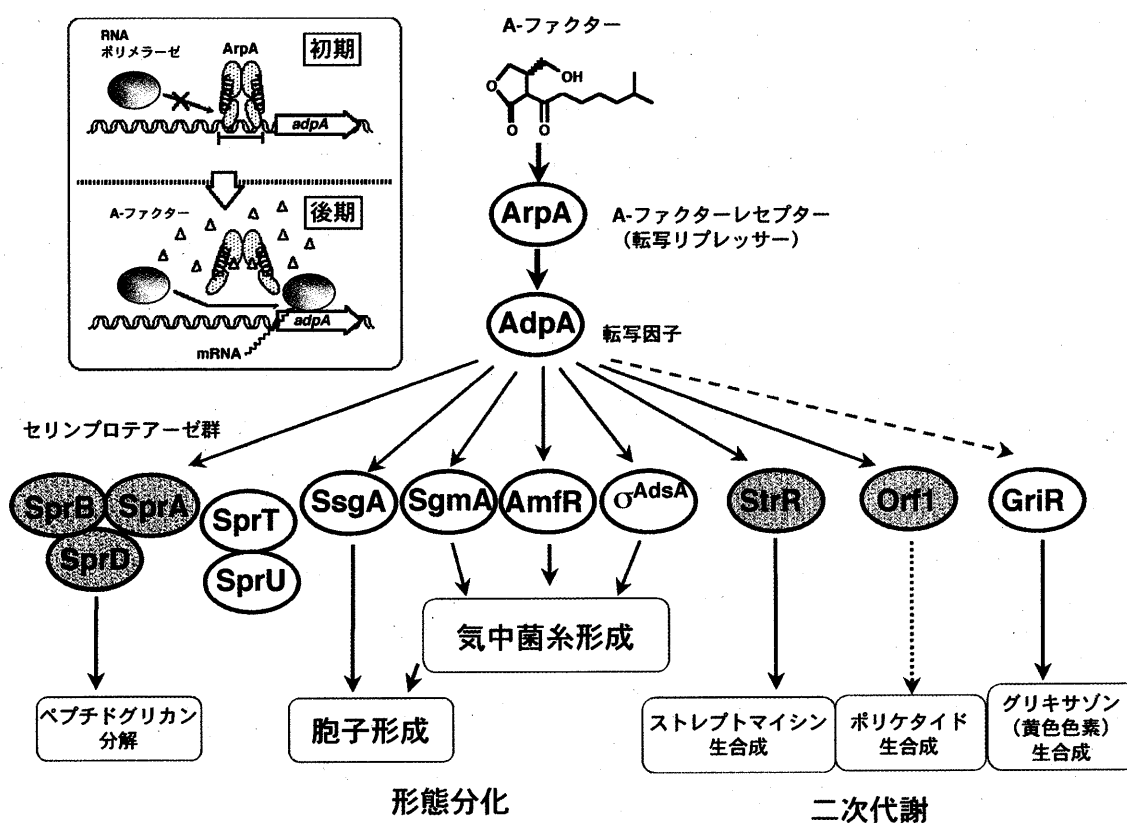
AdpA は *BS3-orfA* の転写開始点に対して-230 位に結合した。*BS3-orfA* は 103 アミノ酸のタンパクをコードしているが、モチーフ等は見つからないため機能を予想することはできなかった。*BS3-orfA* 破壊株は野生株との顕著な形質の違いを示さなかった。

3-2 BS4-orf1 の解析

AdpA は *BS4-orf1* の転写開始点に対して-45 位および+190 位に結合した。*BS4-orf1* は LAL (Large ATP-binding regulators of the LuxR family) と呼ばれる転写因子に属していた。放線菌に存在する LAL のほとんどはタイプ I 型ポリケチド生合成 (PKS) 遺伝子クラスターに含まれ、PKS の転写活性化因子であると考えられているが、*BS4-orf1* の2つ下流にもタイプ I 型 PKS 遺伝子が存在した。野生株においても PKS 遺伝子の転写を検出することができなかったため、直接 *BS4-orf1* が PKS 遺伝子の転写に関わっているかどうかを示すことはできなかったが、*BS4-orf1* 遺伝子産物も PKS 遺伝子クラスターの制御因子であり、A-ファクターシグナルをこの生合成遺伝子クラスターに伝達していると考えられる。

4. まとめ

AdpA レギュロンの新しいメンバーとして、分泌型セリンプロテアーゼ遺伝子 *sprA*, *sprB*, *sprD*、機能未知の遺伝子 BS3-*orfA*、タイプ I 型 PKS の制御因子と予想される BS4-*orf1* を新たに同定した。*sprA*, *sprB*, *sprD* およびストレプトマイシン生合成の経路特異的制御遺伝子 *strR* の AdpA 結合が転写に必須であることを明らかにした。また分泌型セリンプロテアーゼ遺伝子の多重破壊株は *Micrococcus* のペプチドグリカンを含む培地上でのハロー形成能を失っており、これらのセリンプロテアーゼが分解酵素の成熟化に関わることが示唆された。これまでの研究で明らかにされた A-ファクター制御カスケードを図に示した。



図： *S. griseus* における A-ファクター制御カスケード

本論文では、図中の網掛けの遺伝子を AdpA レギュロンのメンバーとして同定した。

参考文献

Yamazaki, H., Tomono, A., Ohnishi, Y., and Horinouchi, S. (2004) DNA-binding specificity of AdpA, a transcriptional activator in the A-factor regulatory cascade in *Streptomyces griseus*. *Molecular Microbiology* 53(2) : 555-572.