

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 友野 理生

放線菌は複雑な形態分化と多様な二次代謝生産を行う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。*Streptomyces griseus* は、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調節機構を持っている。A-ファクターは転写因子 AdpA を介して形態分化および二次代謝に関わる多くの遺伝子の転写を制御する。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に行われた。本論文は、ストレプトマイシン生合成の制御遺伝子 *strR*、キモトリプシン様セリンプロテアーゼ群をコードする 3 つの遺伝子、AdpA 結合断片の下流に存在する機能未知の遺伝子およびタイプ I ポリケタイド生合成 (PKS) 遺伝子クラスターの制御因子と予想される転写因子をコードする遺伝子が AdpA によって制御されることを同定し、その制御様式についての解析を行ったことを述べたものである。

第 1 章では、ストレプトマイシン生合成制御遺伝子 *strR* の AdpA による制御様式について解析した。*S. griseus* はストレプトマイシン生産菌として知られており、その生合成遺伝子クラスターに含まれる経路特異的制御因子をコードする *strR* 遺伝子は、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いため、本研究において解析した。AdpA は *strR* の転写開始点を +1 とすると -55 位および -270 位に結合することを明らかにした。これらの結合配列に変異を導入したところ AdpA との結合能を失った。ストレプトマイシン生産能を失った *strR* 破壊株に、野生型のプロモーター、2 つの結合部位をそれぞれ変異させたプロモーター、両方変異させたプロモーターをそれぞれ持った *strR* を導入したところ、野生型のものに対して変異させたプロモーターではストレプトマイシン生産を回復させなかったことから、-55 位および -270 位のどちらも *strR* の活性化に必要であることが示された。

第 2 章では、キモトリプシン様セリンプロテアーゼ群をコードする 3 つの遺伝子、*sprA*、*sprB* および *sprD* について解析した。AdpA が直接分泌プロテアーゼを制御している可能性が考えられていたため、*S. griseus* において同定されていた 5 つのキモトリプシン様セリンプロテアーゼ遺伝子について解析したところ、*sprA*、*sprB* および *sprD* のプロモーター上流に AdpA が結合することを見出した。これらの転写は AdpA 依存的であり、また AdpA は、*sprA* の上流に 2 ヶ所、*sprB* の上流に 1 ヶ所、*sprD* の上流に 2 ヶ所結合することを明らかにした。AdpA 結合領域に変異を導入すると転写が見られなくなることから、これらの遺伝子の転写を AdpA が直接活性化していることを示した。*sprA* と *sprB* の二重破壊株や *sprA*、*sprB* および *sprD* 三重破壊株はキモトリプシン活性をほとんど失ったが、形態分化においては野生株との差違は見られなかった。しかしこれらの破壊株は *Micrococcus* ペプチドグリカン分解活性を大きく失った。グルコースやガラクトース存在下では、キモトリプシン活性は充分見られるのに対し、ペプチドグリカン分解活性はほとんど観察されなかったこと、またこれらのプロテアーゼのホモログが分泌酵素のプロセッシングを行う例が報告されていることから、ペプチドグリカン分解はセリンプロテアーゼ自身によるものではなく、ムラミダーゼやアミダーゼなどの別の酵素であり、プロテアーゼによって活性化型にプロセッシングされるのではないかと考えられた。これらの結果より、AdpA の制御下にあり、ペプチドグリカン分解酵素をプロセッシングすると予想されるキモトリプシン様セリンプロテアーゼを 3 つ同定した。

第 3 章では、AdpA 結合断片 AdBS3 および AdBS4 について解析した。AdpA の標的遺伝子を取得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) が取得されており、そのうち AdBS3 および AdBS4 について解析を行った。その結果、それぞれの断片の下流に存在する BS3-*orfA*、BS4-*orf1* の転写が AdpA 依存的であることを同定した。BS3-*orfA* は 103 アミノ酸のタンパクをコードしており、破壊株は野生株との顕著な形質の違いを示さなかったため、機能を明らかにすることはできなかった。BS4-*orf1* は放線菌のタイプ I PKS 遺伝子クラスターに含まれる転写因子の多くが属する LAL (Large ATP-binding regulators of the LuxR family) と高い相同性を示し、また下流にタイプ I PKS 遺伝子が存在するため、PKS 遺伝子クラスターの制御因子であると予想された。

以上、本論文は、放線菌の複雑な形態分化・多様な二次代謝生産を制御する代表的な制御機構である A-ファクター制御カスケードにさらなる知見を与えたという点で、学術上ならびに応用上貢献するところ大である。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。