

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成15年度博士課程 進学

氏名 加藤 淳也

指導教員名 堀之内 末治

論文題目 放線菌の A-ファクター制御カスケードを構成する主要因子群の解析

背景

放線菌は抗生物質をはじめとする多種多様な二次代謝産物を生産することで知られ、産業上有用な微生物である。一方、放線菌は原核生物でありながら複雑な形態分化（胞子発芽-基底菌糸形成-気中菌糸形成-胞子形成）を行うことから基礎生物学的にも非常に興味深い研究対象となっている。また、放線菌は形態分化の過程で、不足した栄養を補うため菌糸を積極的に分解しながら分化を進めていくことが示唆されており、原核生物のアポトーシスとも呼ばれる現象は形態分化に関する興味深いトピックの1つである。本研究で主として扱う *Streptomyces griseus* は、放線菌の二大特徴である二次代謝と形態分化を自身の生産する微生物ホルモン、A-ファクターにより制御している。A-ファクターは γ -ブチロラクトン骨格をもつ低分子化合物であるが、他の放線菌においても同じ骨格を持つ類似の化合物が発見され、それらが自身の二次代謝を制御していることが明らかになっており、このような制御機構は放線菌に広く存在するものである。A-ファクターのシグナル伝達機構は次のようになっている（図参照、本研究で明らかになった箇所も含む）。生育が進み A-ファクター濃度が閾値に達すると、A-ファクターはその特異的受容体である ArpA と結合する。ArpA は転写抑制因子であり、その下流にある *adpA* のプロモーターに結合することで *adpA* の転写を抑制しているが、A-ファクターとの結合により DNA 結合能を失いプロ

モーターから解離し、*adpA* の転写が開始する。AdpA は転写活性化因子であり、気中菌糸形成、胞子形成、二次代謝に関与する多数の遺伝子群の転写を活性化する。本研究では、この A-ファクター制御カスケードのシグナル伝達機構およびそれに制御される遺伝子群の解明を目的として、いくつかのステップについて遺伝生化学的な解析を進めた。

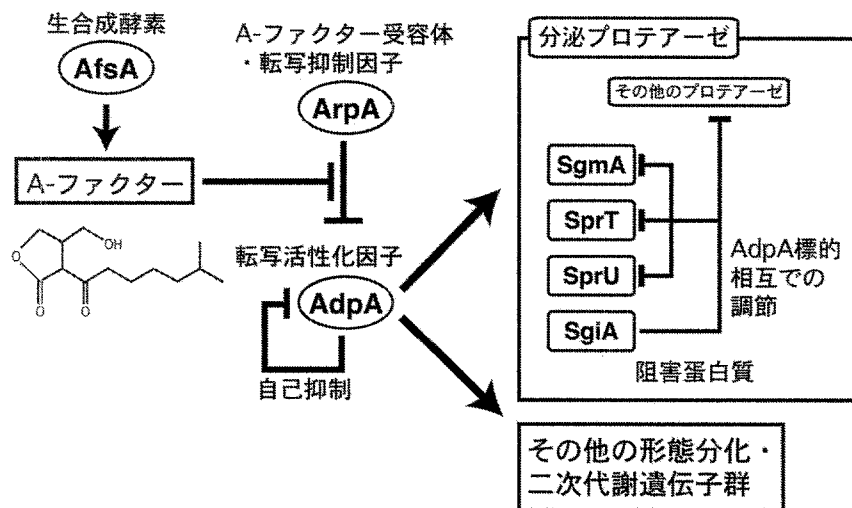


図 放線菌の A-ファクター制御カスケード

結果

本研究は大きく以下の3つに分けられる。

1. A-ファクターにより制御される分泌型プロテアーゼの解析

(1) 分泌型金属プロテアーゼをコードする *sgmA* の取得と解析

「AdpA レギュロン」を構成する遺伝子はこれまで多数解析されている¹⁾。筆者は修士課程において、AdpA 標的遺伝子であり形態分化に関わる分泌型金属プロテアーゼをコードする *sgmA* の単離・解析を行った²⁾。分泌プロテアーゼは菌糸分解による放線菌のアポトーシスに関与すると考えられているが、このような遺伝生化学的な研究のさきがけとなった。

(2) 分泌型トリプシン型プロテアーゼをコードする *sprT* と *sprU* の取得と解析³⁾

sgmA の研究からアポトーシスに関与する他の分泌プロテアーゼも AdpA により制御されているのではないかと予想した。データベース上に分泌型トリプシン型プロテアーゼをコードする *sprT* を見だし、その上流への AdpA 結合および転写依存性を調べたところ、上流1カ所 (-50位周辺、転写開始点を+1とする) に AdpA が結合することで転写活性化されることが明らかになり、種々の変異体を作製することにより直接的な転写活性化も証明した。また、解析の過程で *sprT* のパラログである *sprU* を発見し、これについても AdpA の結合による直接的転写活性化を明らかにした。これらの遺伝子の生理機能を探るため遺

伝子破壊株を作製し解析したが、細胞外トリプシン活性の著しい低下以外には野生株との表現型の差は見られなかった。

(3) プロテアーゼ阻害蛋白質 (SSI) をコードする *sgiA* の取得と解析

以上のように、多数の分泌型プロテアーゼが AdpA により転写活性化されることが明らかになったが、プロテアーゼの形態分化への関与は確認できなかった。そこで、逆に放線菌自身が生産するプロテアーゼ阻害蛋白質について解析を行うことで形態分化との関連を調べることにした。研究開始当初、ゲノム情報が明らかになっていた *Streptomyces coelicolor* A3(2)の SSI ファミリー阻害蛋白質の遺伝子破壊株を作製し解析したが、プロテアーゼ活性の劇的な上昇はみられたものの形態分化への影響は見られなかった⁴⁾。

一方、醗酵学研究室で独自に推進した *S. griseus* のゲノム解析も進み、SSI ファミリー阻害蛋白質をコードする *sgiA* を染色体上に見いだした。転写解析の結果、予想外に *sgiA* は AdpA によって直接転写活性化されることが明らかになった。AdpA によって活性化されるプロテアーゼの活性を阻害する蛋白質もまた AdpA により発現制御されるという点は非常に興味深く、現在醗酵学研究室でさらに解析が進められている。

2. ArpA の A-ファクター結合変異体の解析⁵⁾

ArpA の 119 番目のトリプトファンは A-ファクター結合に必須のアミノ酸残基であり、また *in vitro* 解析によりアラニン置換 (W119A) 変異体は DNA 結合能を保持したまま A-ファクター結合能を失うことが判明していた。この変異を染色体に導入した変異株 (MK2 株) は、予想通り A-ファクター非感受性となり、二次代謝と形態分化が抑制されることを確認した。さらに、MK2 株で AdpA を強制発現し、A-ファクターカスケードの *adpA* より下流の経路のみを活性化させたところ、二次代謝と形態分化の表現型は全て回復した。それまで ArpA の標的遺伝子は *adpA* 以外明らかになっていなかったが、この解析により二次代謝と形態分化に必要な ArpA の標的遺伝子は *adpA* ただ一つであることが明らかになった。同時に *arpA* 遺伝子破壊株の作製とその解析も行い、それまで *in vitro* で示されていた ArpA の機能を *in vivo* で確認した。また、各種変異株の A-ファクター生産量を定量したところ、ArpA は A-ファクターの生産に関与しないことが明らかになった一方で、AdpA が何らかの形で A-ファクター生産を負に制御していることが明らかになった。

3. AdpA の自己転写抑制機構の解析⁶⁾

adpA 遺伝子破壊株では *adpA* の転写量が野生株に比べて顕著に増加していた。そこで、AdpA は自身の転写に対しては抑制的に働くことで、細胞内 AdpA 濃度を厳密に制御しているのではないかと考え、解析を行った。その結果、AdpA は自身の遺伝子上流 3 カ所、site 1 (-100 位周辺)、site 2 (プロモーター直上)、site 3 (+80 位周辺) に結合することで

自身の転写を抑制することを *in vitro* と *in vivo* 両方の実験により示した。さらに site 2 には site 1 に AdpA が結合する場合のみ AdpA が結合し、おそらく DNA ループを形成するような相互作用を行うことで厳密な抑制を可能にしているという、大変興味深い仕組みを明らかにした。site 3 への結合は RNA ポリメラーゼの進行を妨げることで転写を阻害すると考えられる。様々な遺伝子の転写に影響を及ぼし、形態分化と二次代謝を制御する AdpA の発現量はこの機構により厳密に調節されていることが明らかとなった。

総括

S. griseus の栄養増殖には関与しないトリプシン型およびキモトリプシン型プロテアーゼは、A-ファクター制御カスケード内の AdpA レギュロンの構成員であることを明らかにした。今後は、*S. griseus* のゲノム情報に基づいた研究により、AdpA を介して広がるカスケード下流の構成因子の数をさらに増やすことができると考えられる。その中では、本研究のプロテアーゼと阻害蛋白質の間の調節のように AdpA 標的間での相互作用も見いだされるであろう。

A-ファクターシグナルを伝達する ArpA は *adpA* のみを制御し、二次代謝と形態分化を支配する。そしてカスケードの鍵となる AdpA は自身の転写抑制を行うことでシグナル伝達の調節を行っており、カスケード的に連なる主要因子群の厳密な調節ネットワークが明らかになってきた。本論文ではふれていない A-ファクターの生合成機構は重要なポイントであり、現在解析中であるが、これが明らかになればカスケードの起点への理解を深めるにあたり大きな一歩となる。

参考文献

- 1) Ohnishi, Y., Yamazaki, H., Kato, J., Tomono, A. & Horinouchi, S. (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 431-439.
- 2) Kato, J., Suzuki, A., Yamazaki, H., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2002) *J. Bacteriol.* **184**, 6016-6025.
- 3) Kato, J., Chi, W.-J., Ohnishi, Y., Hong, S.-K. & Horinouchi, S. (2005) *J. Bacteriol.* **187**, 286-295.
- 4) Kato, J., Hirano, S., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2005) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 1624-1629.
- 5) Kato, J., Miyahisa, I., Mashiko, M., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2004) *J. Bacteriol.* **186**, 2206-2211.
- 6) Kato, J., Ohnishi, Y. & Horinouchi, S. (2005) *J. Mol. Biol.* **350**, 12-26.