

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 加藤 淳也

---

本研究は、放線菌 *Streptomyces griseus* 自身が生産し、二次代謝と形態分化を同時に制御する微生物ホルモン、A-ファクターによる信号伝達機構の解明に向けたものである。A-ファクターのような  $\gamma$ -ブチロラクトン骨格をもつ化合物による制御は放線菌において多数発見されており、このような制御系のモデルとして本研究は重要であると考えられる。

A-ファクターによる制御については以下のモデルがこれまで明らかになっていた。A-ファクターは特異的受容体であり転写抑制因子である ArpA と結合し、その DNA 結合能を失わせる。そこで ArpA により抑制されていた *adpA* の転写は活性化し、転写活性化因子である AdpA は二次代謝と形態分化の関連遺伝子群の転写活性化を行う、というものである。

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

まず申請者は AdpA 標的遺伝子の新規取得に取り組んだ。AdpA 結合 DNA 断片の解析の結果、分泌型金属プロテアーゼをコードする *sgmA* を新規標的遺伝子として同定した。上流には2カ所 (-60 位周辺、-260 位周辺) に AdpA が結合し、*adpA* 遺伝子破壊株では *sgmA* の転写消失がみられた。さらに、結合部位への変異導入実験を行うことにより直接的転写活性化を証明した。*sgmA* の遺伝子破壊株は気中菌糸形成開始時期の遅れがみられ、形態分化への寄与が示された。形態分化の過程で菌糸の一部を分解して栄養源にするアポトーシス様の現象が報告されており、*sgmA* はこの過程への関与が考えられた。

A-ファクターがアポトーシスに関与する加水分解酵素を制御しているのではないか、という着想のもとに新規標的の同定を進めた。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、上流1カ所 (-50 位周辺) 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し、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、同様の解析によって AdpA の結合による直接的転写活性化を明らかにした。*sprT*、*sprU* 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減少以外には野生株との表現型の差は見られなかった。

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った。*S. griseus* のゲノム情報をもとに、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。*sgiA* は培養を通じて強い転写を示し、かつ AdpA によって転写活性化されることを示した。*sgiA* については醗酵学研究室でさらに解析が進められている。互いに作用し合うプロテアーゼと阻害蛋白質がどちらも AdpA の標的遺伝子産物であるという例は初めてであり、その複雑な制御と生理機能との相関は興味深いものである。また、申請者は同時に *S. coelicolor* A3(2)の SSI ファミリー阻害蛋白質の解析も行った。

## (2) ArpA の A-ファクター結合変異体の解析

*arpA* 遺伝子破壊株、および ArpA が DNA 結合能を保持したまま A-ファクター結合能を失う点変異導入変異株 (MK2 株) の作製と解析を行った。これにより遺伝学的に示されていた *in vivo* での ArpA の機能をより詳細に確認した。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ると、表現型は全て回復することを示し、二次代謝と形態分化に ArpA の標的遺伝子は *adpA* のみで十分であることを明らかにした。

## (3) AdpA の自己転写抑制機構の解析

*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するが、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ことを明らかにした。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。特に、site 2 には site 1 に AdpA が結合する場合のみ AdpA が結合し、DNA ループを形成するような相互作用を行うという、転写因子研究としても興味深い仕組みを明らかにした。

本研究で得られた知見は *S. griseus* における微生物ホルモン、A-ファクターによる制御ネットワークの理解を一層深めるために非常に重要なものであると同時に、原核生物におけるアポトーシス研究に一石を投じ、今後の研究の展開も期待されるものである。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。