

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 池 遠哉

---

放線菌 *Streptomyces griseus* の形態分化は、胞子の発芽に始まり、培地表面へ基底菌糸を伸長し、栄養状態の変化に応答して基底菌糸から気中菌糸が分化し、気中菌糸の先端に胞子が着生する。このように野生株では、胞子は必ず気中菌糸から形成される。

しかし、UV 変異により取得された *S. griseus* NP4 はしわ状のコロニーを形成するとともに基底菌糸が気中菌糸形成を経ずに直接胞子を形成するという ESP (ectopic sporulation) 形質を示す。この ESP 形質を抑制する遺伝子として、*dasR* が取得された、ESP 形質をより強める遺伝子として、*dasA* が取得されたが、DasR は *dasA* の転写を抑制することが示唆されていた。そこで、DasR の *dasA* プロモーター領域への結合に関して解析を行った。

まず、大腸菌で過剰生産、精製した DasR を用いて、ゲル濾過及び chemical cross linking 実験を行い、DasR がダイマーを形成することを示した。次に、ゲルシフトアッセイおよび DNase I footprinting により、DasR が *dasA* プロモーター周辺の 2 カ所に結合することを示し、この結合部位に変異を導入した DNA 断片を用いたゲルシフトアッセイにより、DasR ダイマーが *dasA* プロモーター領域に存在する 2 カ所のオペレーター配列に協調的に結合することを示した。

報告された *Streptomyces coelicolor* A3(2) の DasR ホモログの情報により、*S. griseus* ゲノム配列中、DasR 結合コンセンサス配列を上流にもつ遺伝子を検索した。この検索によって、キチン結合タンパク質、キチン分解酵素、PTS 糖取り込み系の酵素、ABC トランスポーターの基質結合タンパク質をそれぞれコードする遺伝子が、DasR の標的遺伝子候補として得られた。ゲルシフトアッセイ及び S1 マッピングによって、*S. griseus* の DasR は得られた遺伝子上流に結合し、これらの遺伝子の転写を抑制することが強く示唆された。

*S. griseus* において、GlcNAc による気中菌糸形成阻害が観察されたが、GlcNAc 存在下では、DasR の標的遺伝子である PTS 糖取り込み系に関与する遺伝子群及び *dasA* の転写が誘導されていることを S1 マッピングにより確認した。また、ゲルシフトアッセイにより、GlcNAc-6 リン酸に加え、GlcN-6 リン酸にも DasR の DNA 結合能を阻害する効果があることを明らかにするとともに、ゲル濾過を用いた結合アッセイにより、GlcNAc-6 リン酸が DasR に結合していることを示した。

自身のプロモーターをもつ *dasA* を保持する高コピープラスミド (pES1) を野生株に導入することにより、ESP 形質が引き起こされるが、*dasA* のみをもつ高コピープラスミドによっては、ESP 形質が引き起こされないことを明らかにした。この結果は、ESP 形質には DasA の過剰生産だけでは引き起こ

されず、*dasA* プロモーターのコピー数の増加による細胞内の DasR のタイトレーションアウトが起こるため、*dasA* 以外 DasR の標的遺伝子の転写も活性化されることが示唆された。pES1 による引き起こされる ESP 形質に関与する遺伝子の探索のため、pES1 を野生株に導入したことによる遺伝子発現変化を、固体培養と液体培養の両方において、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム比較を行った。一方、AdpA の欠損株においても、遺伝子発現変化を同様にトランスクリプトーム比較を行った（固体培養のみ）。このように異なった culture condition（固体培地と液体培地）や、異なった genetic background（野生株と AdpA の欠損株）でも、pES1 の導入により、共通して ESP 形質が引き起こされるため、3 つのトランスクリプトーム比較（固体培養の野生株のみ、固体培養の野生株と液体培養の野生株、液体培養の野生株と固体培養の AdpA の欠損株）の結果から、pES1 の導入によって、転写が増大したものを ESP 形質に関与する可能性のある遺伝子として選んだ。これらの遺伝子の転写変動を定量 RT-PCR 及び S1 マッピングにより確認した。

DasR の標的遺伝子である GlcNAc 取り込みやキチン代謝に関する遺伝子群がいずれかの条件のトランスクリプトーム比較において、pES1 の導入により転写が活性化される遺伝子として検出された。この結果は、pES1 の導入により、*dasA* の過剰発現のみならず複数の DasR の標的遺伝子の高発現が引き起こされていること示している。

以上のように本論文は、放線菌の形態分化、二次代謝に関する制御タンパク質 DasR の基礎的知見について述べている。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。