

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 丸島 和也

Streptomyces 属は、カビに似た複雑な形態分化と多種多様な二次代謝産物の生産を特徴とする菌群であるが、多くの *Streptomyces* 種においてこれら二大特徴がカタボライト抑制の対象となることが知られている。従って *Streptomyces* 属のカタボライト抑制機構解明は基礎生物学上も応用上も大きな価値を持つ。

申請者は、*Streptomyces griseus* のグルコースカタボライト抑制（グルコース抑制）機構の解明を行うべく、関連因子探索のための 2 つの遺伝学的アプローチ、ならびに当該機構の鍵因子であると予想される G1kA のシグナル伝達機構解明を目的とした 1 つの蛋白工学的アプローチを試みた。本論文はこれら 3 章から成る。

(1) 高コピー導入で *S. griseus* の形態分化と二次代謝を促進する遺伝子の解析

申請者は、*S. griseus* が形態分化を行いにくい高濃度グルコース含有培地上において、高コピーでの導入により形態分化と二次代謝を促進する DNA 断片を取得し解析した。当該断片は、銅シャペロン (CopZ) ならびに銅排出型 P 型 ATPase (CopA1) をコードしており、このうち形態分化促進には *copA1* のみで充分であった。申請者は、これら CopZ, CopA1, ならびに CopA1 パラログである CopA2 が協調的に細胞内の過剰な銅の排出を行うこと示し、更にこれらをコードする遺伝子は、近年 *Mycobacterium tuberculosis* にて同定された銅排出遺伝子の制御因子である CsoR の *S. griseus* 内オルソログによって制御されることを示した。

copA1 の高コピー発現が分化を促進する機構は未解明であるが、過去に培地中への銅添加によってもこれらがやはり促進されることが示されていることから、*S. griseus* の栄養増殖には生体内の銅濃度が適切に保たれている必要があり、過剰・不足のいずれであっても分化が開始される機構が存在する可能性が予想される。

(2) 内在β-galactosidase に対しグルコース抑制能を失う *S. griseus* 変異株の解析

申請者は、*S. griseus* に内在するβ-galactosidase がグルコース抑制を受けるという観察のもと、この抑制が解除された変異株をコロニーの色で判別する新規スクリーニング系を構築し、UV 変異株群から目的の株を分離後、その変異点を同定することで、*S. griseus* のグルコース抑制に関わる未知因子を明らかにすることを目的とし実験を行った。

獲得された変異株の 1 つ GRD1 株の原因変異点は LacI 型転写因子 CebR をコードする遺伝子であった。CebR の解析を行った結果、当該蛋白は過去に解析された放線菌由来の 2 つのホモログと同じ 14 bp 反復繰り返し DNA 配列に結合し、その結合はエフェクター糖の存在によって阻害されることがわかった。*S. griseus* の CebR は、過去研究された同ファミリーのホモログと異な

り、グルコース 2 量体セロピオースから 6 量体セロヘキサオースまで、試行した全セロオリゴ糖をエフェクター分子として認識できる点で特異であった。*S. griseus* ゲノム中、上記 CebR-box は *cebR* 自身やセロピオース取り込み遺伝子、セルロース利用遺伝子を含む計 10 遺伝子のもの上流に見いだされ、CebR はこれらすべてを制御するセルロース / セロピオース代謝系グローバルリプレッサーであることが判明した。

Δ *cebR* 株は培地中のラクトースに応答して形態分化不全を示すことがわかった。この形態分化不全は、グルコースを更に添加することでより強くなった。GRD1 株分離の際に用いた培地は 0.5%ラクトースと 1.0%グルコースを糖源として含有するものであった。形態分化不全変異株の多くはカタボライト抑制能を失うことが過去に知られており、 Δ *cebR* がグルコース抑制能を失ったのは形態分化不全による間接的な結果と考えられる。

(3) *Rhodococcus* RHA1 株由来 G1k による Δ *glkA* 株の相補観察

Streptomyces 属カタボライト抑制の鍵因子として、解糖系初発酵素グルコキナーゼ (G1kA) が知られている。すなわち、*Streptomyces* の G1kA はグルコース資化だけでなく、カタボライト抑制を司る『制御』も行う二機能蛋白であると考えられる。申請者は、*S. griseus* G1kA と高い相同性を持つ異種 G1k を *S. griseus* Δ *glkA* 株に生産させ、その触媒活性と制御活性を観察した。異種 G1k としては非 *Streptomyces* 属放線菌である *Rhodococcus* sp. RHA1 株由来 G1k (*S. griseus* G1kA と 54%の相同性を有する) を用いた。その結果、当該蛋白生産 *S. griseus* Δ *glkA* 株では、グルコース資化能の回復が見られた一方でグルコース抑制は回復しなかった。この結果は、両種の G1k 間で保存されていない数少ない領域が、グルコース抑制シグナルに対し何らかの役割を担うことを強く示唆する結果である。SgG1k に DNA 結合ドメインは見いだされないことから、SgG1k は DNA に直接結合するのではなく、例えば他の蛋白との相互作用を経てグルコース抑制シグナルを発揮しているのかもしれない。

以上、本論文では、放線菌の特徴である形態分化と二次代謝を促進する遺伝子ならびに糖源特異的に形態分化に関与する遺伝子がそれぞれ新規スクリーニング系により同定され、更にグルコース抑制の鍵因子である G1kA が二機能性を持つこと証明とこれに重要な部位に関する知見が得られた。これらは学術上ならびに応用上、科学に貢献するところが少なくないと判断される。よって、審査委員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文としての価値を有するものであると認める。