

論文の内容の要旨

応用生命工学 専攻  
平成19年度博士課程 進学  
氏名 田中 晶子  
指導教員名 大西 康夫

論文題目

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)における転写因子 AfsRによる二次代謝制御機構の解析

*Streptomyces* 属に代表される放線菌は、複雑な形態分化と多種多様な二次代謝産物を生産することで知られるグラム陽性細菌であり、発酵工業や医薬産業に重要な菌群である。醗酵学研究室では *S. coelicolor* A3(2)の二次代謝をグローバルに制御する転写因子をコードする *afsR* 遺伝子を取得し、その制御系について長年研究を行ってきた。これまでの研究から、AfsR を介した二次代謝制御モデルとして図 1 の AfsK/AfsR/AfsS 制御系が提唱されている。

真核生物型 Ser/Thr キナーゼ AfsK は外界からのシグナルを感知すると 168 番 Thr を自己リン酸化して活性型になり、AfsR の Thr 残基をリン酸化する。リン酸化型 AfsR は標的遺伝子 *afsS* のプロモーター領域に結合し、その転写を活性化する。

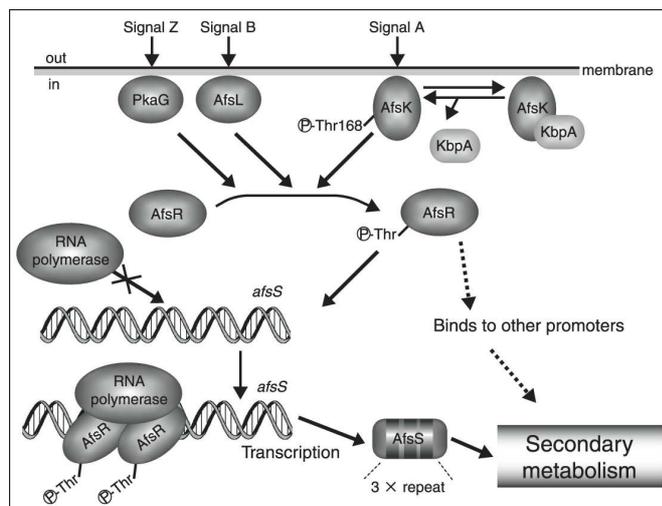


図 1 AfsK/AfsR/AfsS 制御系

AfsR は 993 アミノ酸からなり、図 2 のように、N 末端側に OmpR 型 DNA 結合ドメインを、中央やや N 末端寄りに ATPase ドメインを持つマルチドメインタンパク質である。

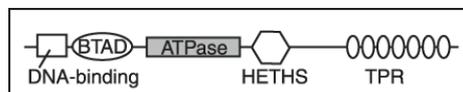


図 2 AfsR のドメイン構造

AfsR は N 末端側から、OmpR 型 DNA 結合ドメイン、転写活性化ドメイン (BTAD)、ATPase ドメインと STAND 型 ATPase に特徴的な HETHS ドメイン、タンパク質間相互作用に関わる TPR ドメインからなる。

*afsR* の破壊は、色素性抗生物質生産の劇的な減少を引き起こす。AfsR は複数の機能ドメインを有すること、真核生物型 Ser/Thr キナーゼ AfsK によってリン酸化されることでその活性が上昇することから、その活性は複雑に制御されていると考えられる。この AfsK/AfsR/AfsS 制御系による放線菌 *S. coelicolor* A3(2) の二次代謝制御機構全貌の解明を最終目標とし、その中心的役割を果たす転写因子 AfsR の機能解明を本研究の目的とした。

### (1) AfsR による転写制御機構の解明

AfsR は *afsS* のプロモーター領域に結合する。結合部位は 9 bp からなる direct repeat であり、-10 領域から 8 bp 上流に存在している。AfsR は放線菌の抗生物質生産に関わる転写因子 (SARP : *Streptomyces* antibiotic regulatory protein) ファミリーに属しているが、他の SARP も標的遺伝子のプロモーター上の同じ位置に存在する direct repeat に結合する。このような SARP ファミリーに特徴的な結合部位の意義を解明するため、direct repeat と -10 領域とのスペーサーの長さを 4~7 および 9~12 bp へと変えた変異型 *afsS* プロモーターを構築した。一方、AfsR の C 末端側を切り縮めた AfsR Δ TPR (Met1-Glu618) および AfsR Δ C (Met1-Ala270) を全長 AfsR (Met1-Arg993) と共に解析に使用した。AfsR Δ TPR、AfsR Δ C は全長 AfsR と同様に direct repeat に結合した。また、結合配列に変異を導入した実験により、2 分子の AfsR 単量体が協調的に結合することが示された。SARP の基本ドメインのみを有する AfsR Δ C を用いても全長 AfsR と同様の DNA 結合能および *in vitro* における転写活性化が観察されたため、転写因子としての AfsR の基本機能には、ATPase ドメインや TPR ドメインは必要でないことも示された。次に、最も安定だった AfsR Δ TPR タンパク質を用いて、RNA ポリメラーゼ (RNAP) の *afsS* プロモーターへの結合に AfsR が及ぼす影響を調べた。低濃度の RNAP は *afsS* プロモーターに結合できなかったが、AfsR Δ TPR 存在下では、(AfsR Δ TPR)<sub>2</sub>-RNAP-DNA 複合体が変異型プロモーターにおいても形成された。しかしながら、*in vitro* 転写解析においては、野生型プロモーターでは AfsR 依存的な転写が観察されたのに対

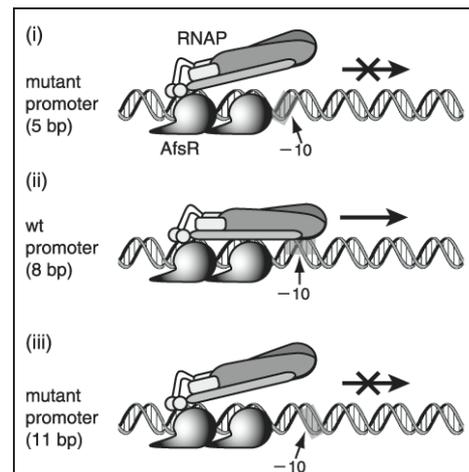
して、変異型では全く転写が起こらなかった。さらに、これらのプロモーターに連結した *afsS* を *afsS* 破壊株に導入した *in vivo* の解析においても、野生型のプロモーターからのみ *afsS* の転写が起こり、色素生産が誘導された。

以上の結果から、(1) AfsR は RNAP を *afsS* プロモーターにリクルートすること、(2) 転写の活性化には、スペーサーの適切な長さ (8 bp) が必須であることが示された。また、AfsR $\Delta$ C が転写因子として機能することから、他の SARP も AfsR と同様の機構により標的遺伝子の転写を活性化していると考えられた。

図 3 AfsR による *afsS* 制御のモデル図

(i), (iii) 変異を導入したプロモーターの場合、AfsR 結合部位と -10 領域が適切な位置関係になく、転写は起こらない。

(ii) 野生型プロモーターの場合、AfsR にリクルートされた RNAP は適切な位置にある -10 領域と結合でき、*afsS* の転写が活性化される。



## (2) ATPase ドメインの機能解析

上述したように、SARP の基本ドメインのみを有する AfsR $\Delta$ C は *in vitro* においては全長 AfsR と同じ DNA 結合能・転写活性化能を有していることが示された。しかし、*in vivo* において AfsR $\Delta$ C の低コピー発現では *afsS* 破壊株における色素生産誘導の欠損を相補できないことから、ATPase ドメインおよび TPR ドメインによって転写因子としての機能の増強がなされていることが推測された。そこで、多くの ATPase に保存されている Walker A および B モチーフにアミノ酸置換変異を導入し、解析を行った。両方のモチーフ、もしくは Walker B 部位のみに変異を加えた場合、色素生産誘導能を著しく失った。一方、Walker A 部位のみに変異を加えた場合には、色素生産時期の遅れが観察された。以上の結果より、ATPase ドメインによるヌクレオチド結合もしくは ATPase 活性が AfsR 機能に影響を及ぼすことが示された。

## (3) リン酸化部位同定の試み

リン酸化による AfsR 活性化の分子機構の解明において、リン酸化部位の同定は非常に重要である。そこで、*S. griseus* など他の 3 種の *Streptomyces* 属に存在する AfsR ホモログとの間に完全に保存されている 21 箇所の Thr 残基に注目し、リン酸化部位の候補とした。これらを 1 または 2 残基ずつ、Ala に置換した変異遺伝子群を構築した。Ala 変異を導入した変異型および野生型 AfsR を大腸菌内で異種発現し、精製したタンパク質に対して AfsK によ

る *in vitro* リン酸化アッセイを行ったが、いずれの変異タンパク質も野生型と同程度のリン酸化が観察された。これは、重要なリン酸化部位以外の Thr 残基も *in vitro* 反応ではリン酸化されるためだと考えられた。そこで野生型および変異型 *afsR* を導入した *afsR* 破壊株から AfsR を取得したが、抗リン酸化 Thr 抗体で検出されるリン酸化量には、野生型と変異型の間で大きな差異は認められなかった。したがって、*in vitro*, *in vivo* のどちらにおいても、Ala 置換した変異体のリン酸化量からリン酸化部位を同定することは非常に困難であると考えられた。

そこで、*in vivo* における機能からリン酸化部位の同定を試みることにした。いくつかの Ala 変異を導入した変異型 *afsR* では *afsR* 破壊株の色素生産能を十分に回復することはできなかった。次に、これらの Thr 残基をリン酸化 Thr と構造の似ている酸性アミノ酸 (Asp あるいは Glu) に置換し、*afsR* 破壊株に導入した。その結果、297 番目と 536 番目の Thr を Asp あるいは Glu に置換した *afsR* を導入した株のみ強い色素生産の回復が見られ、これらの Thr 残基が AfsR の機能に重要なリン酸化部位であることが強く示唆された。

#### (4) 297 番 Thr および 536 番 Thr 変異 AfsR に関する解析

リン酸化部位に Glu あるいは Asp 変異を導入し、恒常的活性化状態であると考えられる変異型 AfsR について、リン酸化を受けていない野生型 AfsR と比べてどのような機能の違いがあるか調べた。297 番 Thr や 536 番 Thr に変異をもつ AfsR に対し ATPase 活性の測定を行ったところ、これらの変異は ATPase 活性には大きな影響を与えないことが示された。また、これらの変異は DNA 結合にも影響がなかった。一方、ゲルろ過クロマトグラフィーにより AfsR タンパク質の溶液中における状態を調べた。野生型 AfsR は殆どが単量体で存在し、二量体が僅かに存在しているのに対して、297 番目あるいは 536 番目の Thr 残基を酸性アミノ酸残基に置換した変異型 AfsR では、全体の 1~3 割が溶液中で二量体になることが示された。この結果は、これらの部位のリン酸化によって AfsR は二量体化しやすくなることを示唆しており、これが AfsR 活性化の原因である可能性が考えられた。

発表論文

Tanaka, A., Takano, Y., Ohnishi, Y., Horinouchi, S. (2007). AfsR Recruits RNA Polymerase to the *afsS* Promoter: A Model for Transcriptional Activation by SARPs. *Journal of Molecular Biology*, 369, 322-333.