

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田中 晶子

放線菌 *Streptomyces coelicolor* A3(2)の二次代謝をグローバルに制御する転写因子 AfsR を介した二次代謝制御モデルとして、AfsK/AfsR/AfsS 制御系が提唱されていた。真核生物型 Ser/Thr キナーゼ AfsK により Thr 残基をリン酸化された AfsR は活性型となり、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。AfsR は複数の機能ドメインを有すること、AfsK によってリン酸化されることで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た。本論文は AfsK/AfsR/AfsS 制御系による二次代謝制御機構のさらなる解明を目的とし、AfsR による転写制御機構および AfsR の機能活性化について論じたものであり、5 章からなる。

第 1 章では、AfsR による転写制御機構について解析した。*afsS* のプロモーター領域に存在する AfsR 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。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、AfsR 結合部位と - 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、解析を行った。その結果、(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) が必須であることを示した。また、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) も全長 AfsR (Met1-Arg993) と同様の DNA 結合能および転写活性化能をもつことを示した。SARP 基本ドメインのみを有する AfsR Δ C も転写因子として機能することが示されたため、他の SARP についても 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。

第 2 章では、ATPase ドメインの機能解析を行った。AfsR Δ C の低コピー発現では *afsR* 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 ドメインや TPR ドメインによって AfsR 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。

第3章では、AfsRにおけるリン酸化部位の同定を試みた。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た21箇所の Thr 残基をリン酸化部位の候補とし、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。In vivo の解析において、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。

第4章では、第3章においてリン酸化部位とした Thr 残基に 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 と機能を比較した。これらの変異は、ATPase 活性や DNA 結合能には影響がなかった。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。

以上、本論文は、放線菌における AfsR による転写制御機構と AfsR の機能活性化についての研究成果をまとめたものであり、学術上ならびに応用上貢献するところが少なくない。よって、審査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。