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　　　平野　節
指導教員名　　大西　康夫

論文題目

ゲノム情報を利用した放線菌の形態分化・二次代謝に関わる遺伝子群の解析

放線菌 *Streptomyces* は抗生物質をはじめとする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の土壌細菌であり、発酵工業や医薬産業に重要な菌群である。一方で放線菌はカビに似た菌糸状の生育形態を示し、胞子を形成するために生物の形態分化に関する基礎研究の材料にもなっており、基礎・応用の両面から非常に重要な研究対象であると言える。

本研究の研究対象である *Streptomyces griseus* においては、二次代謝と形態分化は自身の生産する微生物ホルモン A-ファクターによって厳密に制御されている。培養液中の A-ファクター濃度が閾値を超えると A-ファクターレセプター蛋白質による *adpA* の転写抑制が解除され、グローバルな転写因子 AdpA が生産される。これまでの研究により AdpA は様々な遺伝子の転写を活性化することで形態分化と二次代謝の両方を誘導することが明らかとなっているが、AdpA に依存して起こる現象のすべてが現在同定されている標的因子によって完全に説明されるには至っていない。そこで本研究はゲノム情報や網羅的な転写解析データから着目した個々の遺伝子について詳細な機能解析を行い、放線菌の形態分化・二次代謝の制御機構について新たな知見を得ることを目的とした。

1. <u>プロテアーゼ阻害蛋白質（SSI）をコードする *sgiA* の機能解析</u> [1)]

S. griseus は数多くの分泌型プロテアーゼを有するが、その多くは AdpA に応答して生産されることがわかっている。「放線菌は自身の菌糸を分解して栄養源として再利用する」というモデルも提唱されていることから分泌型プロテアーゼと形態分化との関連性に興味が持たれたが、その数の多さから分泌型プロテアーゼの網羅的な機能解析を行うことは難しい状況であった。そこで放線菌の有する分泌型プロテアーゼ阻害蛋白質 SSI （*Streptomyces* subtilisin inhibitor）に注目した。SSI を用いることにより分泌型セリンプロテアーゼ活性を一斉に抑制することが可能である。本研究では SSI の機能を解析し利用することで、分泌型プロテアーゼ活性と形態分化の関連性を明らかにすることを試みた。

S. griseus のゲノム上に SSI 様蛋白質をコードする遺伝子を探索し、ただ 1 つ（*sgiA* と命名）を見出した。作製した *sgiA* 遺伝子破壊株では分泌型プロテアーゼ活性は上昇していたが、その形態は野生株と同様であった。大腸菌を用いて生産した組換え SgiA を用いて *in vitro* プロテアーゼ阻害アッセイを行ったところ、精製 SgiA はウシ由来トリプシンを阻害するがウシ由来キモトリプシンは阻害しないことが示された。一方、*S. griseus* のコロニーの傍に組換え SgiA を添加したところ、SgiA に近い部分の菌体で気中菌糸形成の大幅な遅れが観察された。この結果は分泌型プロテアーゼの活性を阻害することで形態分化が抑制されることを示しており、形態分化に対する分泌型プロテアーゼの重要性が強く裏付けられた。また *sgiA* の転写は他の分泌型プロテアーゼをコードする遺伝子と同じく、*sgiA* プロモーター上流に結合する AdpA によって活性化されることが明らかとなった。プロテアーゼとそのインヒビターという逆の機能を持つ蛋白質が、遺伝子発現において同様の転写制御を受けていることは非常に興味深い。

2. <u>***strR*** **の転写制御に関わる AtrA-g の解析**</u> [2)]

S. griseus による抗生物質ストレプトマイシン（Sm）の生産は経路特異的転写活性化因子 StrR により制御される。*strR* の転写は AdpA により直接制御されること、また *adpA* 破壊株で Sm 生産が大幅に減少することから、StrR 発現のメインスイッチは AdpA であると考えられた。一方で *strR* プロモーター上流に AdpA 以外の蛋白質が結合することも示されており、この蛋白質が *strR* の転写に与える影響についても興味が持たれていたが、結合蛋白質が未同定のために解析は行われていなかった。このような状況下、2005 年に *S. coelicolor* A3(2) において抗生物質アクチノロージンの生産を正に制御する蛋白質として同定された AtrA（以

下 AtrA-c）が *S. griseus* の *strR* プロモーター上流にも結合すると報告された。そこで AtrA が Sm 生産に与える影響について解析を行った。

S. griseus のゲノム上には AtrA-c と相同性を示す蛋白質（AtrA-g）がただ 1 つコードされており、大腸菌で発現、精製した AtrA-g は AtrA-c と同様に *strR* のプロモーター上流部位に結合した。作製した *atrA-g* 破壊株の Sm 生産能を評価したところ、ある培養条件において野生株と比較して Sm 生産量が減少していた。*atrA-g* 自身の転写は恒常的であり、*adpA* 破壊株においても同程度の転写が見られた。以上の結果から、*strR* を介して Sm 生産に多大な影響を与えるのは既知の A-ファクター、AdpA シグナル経路であり、AtrA-g は A-ファクターカスケードとは独立に Sm 生産のマイナーチューニングを行う役割を持つことが示された。

3. <u>**WhiB ホモログをコードする *wbl* 遺伝子群の解析**</u>

醗酵学研究室で野生株と種々の変異株を用いたトランスクリプトーム解析が行われた結果、<u>W</u>hi<u>B</u>-<u>l</u>ike (Wbl) 蛋白質をコードする遺伝子のいくつかが A-ファクターに依存した転写パターンを示すことがわかった。WhiB は *S. coelicolor* A3(2)で同定された 87 アミノ酸の蛋白質であり、遺伝子破壊株の表現型解析から胞子形成に必須であることが知られている。*Streptomyces* 属放線菌はゲノム上に 7-13 個と多くの Wbl 蛋白質をコードしており、それらの機能はほとんど未知のままであった。そこで *S. griseus* における *wbl* 遺伝子の転写調節機構と生体内での機能を明らかにすることを目的として研究を行った。

S. griseus は全部で 7 個の *wbl* 遺伝子を有するが、その中の 4 遺伝子（*wblA, wblC, wblI, whiD*）の転写が AdpA により活性化されることが詳細な転写解析から明らかとなった。ゲルシフトアッセイにより AdpA は *wblC* 以外の 3 遺伝子（*wblA, wblI, whiD*）のプロモーター付近に結合することがわかった。しかしながら、AdpA 結合部位への変異導入株を用いた転写解析の結果、AdpA はこれら 3 遺伝子の転写を間接的に活性化させることが示された。AdpA 依存的な *wbl* 遺伝子の *in vivo* での機能を解析するため遺伝子破壊株を作製して表現型を解析したところ、*wblA* 遺伝子破壊株は気中菌糸をほとんど形成することができず、*whiD* 破壊株は異常な形態の胞子を形成することが明らかとなった。*wblC* 遺伝子破壊株、*wblI* 遺伝子破壊株は野生株と同様の形態分化能を有していた。また、*S. griseus* における WhiB の機能を知るため遺伝子破壊株を作製したところ、*S. coelicolor* A3(2)での報告と同様に *whiB* 遺伝子破壊株は胞子を形成しなかった。以上の結果は Wbl 蛋白質が胞子形成だけでなく気中菌糸形成の段階にも関与することを示しており、WhiB ファミリー蛋白質は放線菌の形態分化に大

きな役割を担う蛋白質群であることが明らかとなった。

4. **気中菌糸形成を制御する AdsA の標的遺伝子に関する解析**

AdpA の標的遺伝子として同定された *adsA* は ECF シグマ因子をコードしており、遺伝子破壊株の表現型解析から気中菌糸形成に必須であることがわかっている。そこで気中菌糸形成に関与する遺伝子群を明らかにするため、AdsA によって転写される標的遺伝子を探索した。

はじめに野生株と *adsA* 破壊株との転写比較を DNA マイクロアレイと S1 マッピング法により行い、AdsA に依存した転写パターンを示す遺伝子を探索した。次に大腸菌で発現、精製した AdsA を用いて *in vitro* 転写を行ったところ、二成分制御系の応答制御因子をコードする *bldM* が AdsA の標的遺伝子として同定された。*bldM* 遺伝子破壊株は気中菌糸を形成することができず一見 *adsA* 破壊株と同様の表現型を示したが、*adsA* 破壊株に *bldM* を強制発現しても *adsA* 破壊株の気中菌糸形成能は回復しないままであった。以上の結果は BldM 以外にも AdsA によって転写活性化される気中菌糸形成に必須な遺伝子が存在することを示している。続いて野生株と *bldM* 破壊株との比較トランスクリプトーム解析を行い、BldM に依存した転写パターンを示す遺伝子群を同定した。大腸菌を用いて発現、精製した BldM を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ、複数の候補遺伝子のプロモーター付近に BldM が結合することが明らかとなった。BldM の標的遺伝子の中には疎水性の気中菌糸コート蛋白質である Chp 蛋白質をコードする遺伝子群が含まれており、これら遺伝子群の転写が大幅に減少するために *adsA, bldM* 遺伝子破壊株は気中菌糸を形成することができないと考えられた。

発表論文

1) S. Hirano, J. Kato, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi (2006) J. Bacteirol. 188:6207-6216

2) S. Hirano, K. Tanaka, Y. Ohnishi, and S. Horinouchi (2008) Microbiology 154:905-914