

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 張 文瑄

希少放線菌の1つである *Actinoplanes* 属放線菌は、栄養菌糸（基底菌糸）として増殖した後、空中に向かって短い孢子囊柄を伸ばし、その先端に孢子囊を形成する。1つの孢子囊は数十から百個程度の孢子を含む。十分に湿潤した環境に置かれると、孢子囊の外皮が破れ、数十本のべん毛をもった孢子が泳ぎ出す。走化性により適当な環境まで移動した運動性孢子は、やがて運動性を失い、出芽して再び菌糸状の生育を開始する。このように、*Actinoplanes* 属放線菌は最も複雑な生活環をもつ原核微生物の1つである。本論文は *Actinoplanes missouriensis* の形態分化や運動性孢子のべん毛形成・走化性に関して研究を行ったものであり、序論と4章からなる本論により構成される。

序論においては、放線菌、プラスミド複製、バクテリアべん毛の構成因子と生合成制御、バクテリアの走化性などについてのこれまでの知見をまとめるとともに、本研究の目的や本論文の構成について記述している。

第1章においては、*A. missouriensis* の形質転換系に関する実験結果をまとめている。まず、大腸菌との接合によりベクターDNAを *A. missouriensis* に導入し、染色体DNAに組込ませる系を開発した。次に、接合伝達性プラスミド pKmobsacB を用いた遺伝子破壊系を構築した。一方、57種の *Actinoplanes* 属放線菌及び2種の近縁属放線菌からプラスミドを探索した結果、近縁属放線菌である *Couchioplanes caeruleus* subsp. *azureus* から環状プラスミド pCAZ1 を見出し、その全塩基配列 (5,846 bp) を決定した。さらに、pCAZ1 を利用して *A. missouriensis* と大腸菌とのシャトルベクターを構築した。*A. missouriensis* における遺伝子導入法・破壊法の開発や *A. missouriensis* で複製可能な環状プラスミドの発見およびこれを利用した大腸菌とのシャトルベクターの開発により *A. missouriensis* の分子遺伝学的研究が可能になった。

第2章においては、べん毛生合成遺伝子群の機能解析および発現制御機構に関する解析結果について記述している。*A. missouriensis* のゲノム解析から、べん毛生合成に必要な一群のタンパク質をコードする遺伝子クラスターが見出されていたが、FliQ をコードすると考えられる遺伝子は、この遺伝子クラスターとは離れた遺伝子座にコードされていた。*fliQ* 破壊株では、べん毛が形成されず、この遺伝子もべん毛形成に必須であることが示された。2つのべん毛遺伝子 (*fliC*, *fliK*) については、遺伝子破壊により、それぞれ予想される機能をもっていることを確認した。さらに、べん毛遺伝子クラスター中の、ペプチド

グリカンの分解に関与する lytic transglycosylase ホモログをコードする遺伝子 *lytA* がべん毛形成に必須であることを示した。一方、RT-PCR および S1 ヌクレアーゼマッピングにより、べん毛遺伝子クラスターおよびそれと隣接する *che* クラスター1 は、10 個の転写単位により発現していることを明らかにした。さらに、*fliQ* 遺伝子を含む転写単位を加えて、11 個の転写単位について、5' -RACE や高解像度 S1 ヌクレアーゼマッピング法により転写開始点を決定した。また、液体培養した菌糸、孢子嚢形成培地上の基底菌糸と孢子嚢の混合物、運動性孢子のそれぞれから回収した RNA を用いて、半定量的 RT-PCR により、上述の転写単位について、その発現様式を解析した。さらに、クラスター中にコードされた唯一の転写因子 TcrA について、遺伝子破壊によりその機能を解析し、TcrA がべん毛遺伝子クラスター中の遺伝子だけでなく、孢子嚢形成や孢子嚢の亀裂形成に関与する未知の遺伝子の活性化にも関与することを明らかにした。

第3章においては、走化性に関与する可能性がある、3つの *che* クラスターについての解析結果について記述している。遺伝子破壊株の走化性アッセイの結果より、*che* クラスター1 と *che* クラスター2 の2つが、運動性孢子的走化性に関与していることが示された。両クラスターの転写は孢子嚢および運動性孢子で強く観察された。また、CheY タンパク質が孢子中の1点に局在していることも CheY-GFP 融合タンパク質発現株の蛍光顕微鏡観察によって明らかにされた。

第4章では、以上の実験結果をまとめるとともに、今後の研究展望について述べている。

以上、本論文は、運動性孢子を着生する放線菌における形態分化や運動性孢子的べん毛形成・走化性に関して多くの新たな知見をもたらすものであり、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。