

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 関 太泓

放線菌は菌糸状に生育するが栄養菌糸から形成された特殊な菌糸が孢子に分化する。放線菌の菌糸成長と孢子形成においては、菌糸先端や隔壁形成部位において細胞壁の合成と分解が起こると考えられるが、これらについてはほとんど研究がなされていなかった。本論文はペプチドグリカン分解酵素の1つである *N*-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼの局在と機能に関する解析により、放線菌の菌糸成長と孢子形成に関して新たな知見を得ることを目的としており、7章からなる。

第1章では、放線菌、ペプチドグリカン分解酵素、バクテリアの細胞骨格タンパク質などについて、これまでの知見をまとめるとともに、本研究の目的と本論文の構成について述べている。

第2章では、細胞内タンパク質局在を指標にした標的タンパク質の探索について述べている。最初に、固体培地で気中菌糸・孢子形成時期に強く転写されることがトランスクリプトーム解析によって示されていた遺伝子群から、局在予測や機能予測により、97個の遺伝子を選択した。これらの遺伝子産物を蛍光タンパク質（RFP）との融合タンパク質として生産させ、気中菌糸での局在をスライド培養法により観察した。しかしながら、興味ある局在を示すタンパク質はなかった。次に、細胞壁に局在すると考えられるタンパク質に注目し、15種の分泌タンパク質の液体培養菌糸での局在について、免疫蛍光顕微鏡観察により解析した。その結果、ペプチドグリカン結合ドメインをもった *N*-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ AmiA が、興味深い局在を示すことがわかった。AmiA はスポット状に局在したが、このスポットは sporogenic hypha 上、らせん状にほぼ等間隔に観察された。また、sporogenic hypha の先端部には、このスポットが必ず観察された。

第3章では、*S. griseus* ゲノムにコードされる AmiA を含む5つの *N*-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ (AmiA, AmiB, AmiC, AmiD, AmiE) の局在解析について述べている。AmiA 以外の4つのアミダーゼは、いずれも、上述した AmiA と同様の局在を示した。一方、AmiC, AmiD については GFP (あるいは RFP) との融合タンパク質を生産する組換え放線菌株を構築し、気中菌糸での局在が sporogenic hypha での局在と同様であることを示した。また、AmiC と AmiD が共局在することを示し、5つのアミダーゼが同一の部位に局在すると推測した。

第4章では、5つのアミダーゼの *in vivo* での機能に関して、遺伝子破壊により解析した結果を述べている。いずれの遺伝子破壊株でも、菌糸隔壁が形成される位置に異常が生じ、アブノーマルな長さをもつ孢子が形成されたが、その頻度は *amiA* 破壊株が最も高く、おおよそ40%の気中菌糸で異常が観察された。その他の遺伝子破壊株では頻度がずっと低く、数%程度であった。*amiA* と

amiC の二重破壊株、*amiA*、*amiC*、*amiE* 三重破壊株も作製したが、これらの株では、アブノーマルな長さの胞子を作る頻度は、それぞれ 70%、90%と大幅に上昇するとともに、細胞壁強度が著しく低下することが示唆された。以上の結果などから、*N*-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼは胞子形成時の隔壁形成および細胞壁合成全般に重要な機能をもつことが明らかになった。

第5章では、大腸菌などで新たに見出された細胞骨格形成の鍵タンパク質である RodZ の、放線菌でのホモログタンパク質 (RodZ と命名) の局在と機能について解析した結果を述べている。気中菌糸での隔壁形成の初期において、RodZ は AmiA と同様の局在を示した。また、*rodZ*破壊株は、*amiA*、*amiC*、*amiE* 三重破壊株と似た表現型を示した。

第6章では、RodZ と AmiC の局在について調べた結果を述べている。RodZ、AmiC をそれぞれ GFP、RFP と融合させたタンパク質を同時に生産する組換え放線菌株を用いて、両タンパク質が共局在することが示された。一方、*rodZ*破壊株においても AmiC は正常に局在したことから、RodZ は AmiC の局在には必須ではないことが示唆された。

第7章では、本研究を総括するとともに、今後の研究の展望について述べている。

以上、本論文は、放線菌の *N*-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼの局在と機能を明らかにし、放線菌の菌糸成長と胞子形成に関する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。