

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 石垣 祐二

土壌中に広く分布するグラム陽性細菌である放線菌は、菌糸状に栄養増殖したのち空中に伸長した菌糸の先端に胞子を着生するという形態分化能を有するため、形態分化のモデル細菌として、基礎生物学上、重要な菌群である。一方、放線菌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ため、医薬品等の製造に寄与する産業微生物としても重要な菌群である。タンパク質の機能は翻訳後修飾によって調節されていることが真核生物でよく知られているが、これまで放線菌における翻訳後修飾の解析はほとんどなされていなかった。本研究は *Streptomyces griseus* を対象とし、放線菌の翻訳後修飾タンパク質の網羅的同定を行い、その全体像を明らかにするとともに、翻訳後修飾の生理的な機能を解析することを目的としており、第一部と第二部（第一章から第三章）で構成されている。

第一部では放線菌の特徴と翻訳後修飾におけるこれまでの知見についてまとめている。

第二部・第一章では、*S. griseus* のリジンアセチル化タンパク質の網羅的同定とその機能解析について述べている。免疫沈降によるアセチル化ペプチドの濃縮と MS 解析を行い、271 箇所のアセチル化部位と 211 種のアセチル化タンパク質の同定に成功した。同定したアセチル化タンパク質は液体培養において検出されたものが 75 種、固体培養において検出されたものが 65 種、両方の培養で検出されたものが 71 種であった。これらの多くは糖や核酸の代謝酵素、翻訳関連タンパク質であったが、形態分化や二次代謝に関わるタンパク質も含まれていた。さらに、これらのアセチル化タンパク質の構造予測を行い、アセチル化の機能を推定した。

次に、同定したアセチル化タンパク質の中で形態分化に関与する分泌性のグリセロホスホジエステラースホジエステラーゼ GlpQ1 に着目してアセチル化の機能に関する解析を行っている。変異解析によって、GlpQ1 のアセチル化部位 K197 は酵素活性に重要な残基であることが明らかになり、K197 のアセチル化によって GlpQ1 の酵素活性が失われることが強く示唆された。

一方、野生株と形態分化や二次代謝を行わない *adpA* 破壊株におけるアセチル化タンパク質を比較し、野生株で特異的なアセチル化が起こると考えられる 2 種のタンパク質を同定し、アセチル化部位を決定した。また、基底菌糸形成期と比較して孢子形成期でアセチル化が亢進する 6 種のタンパク質を同定しアセチル化部位を決定した。このうち、StrM の K70 は活性部位であり、この部位のアセチル化は酵素活性の消失をもたらすと考えられた。

第二部・第二章ではチロシンリン酸化タンパク質の同定とそのタンパク質の機能解析について述べている。免疫沈降と MS/MS 解析により、2 種のリン酸化タンパク質を同定し、それぞれのリン酸化部位を決定した。これらのうち、conserved hypothetical protein (SGR2042) に着目し、遺伝子破壊株を作製してその機能を調べた結果、SGR2042 はストレプトマイシン生産に正の影響を与えていることが示唆された。

第二部・第三章では原核生物型ユビキチン様タンパク質とプロテアソームの機能解析について述べている。*S. griseus* の原核生物型ユビキチン様タンパク質をコードする *pup* とプロテアソーム構成因子をコードする *prcB* と *prcA* の遺伝子破壊株を作製し、その機能を調べた。これらの破壊株と野生株の胞子液をシングルコロニーになるように植菌して培養したところ、*pup* 破壊株と *prcBA* 破壊株はコロニー形成時の菌糸成長の仕方において野生株との差異が観察され、*pup* や *prcB*, *prcA* が菌糸成長に影響を及ぼしている可能性が考えられた。また、*pup* 破壊株は野生株と比べて胞子の色が濃くなっていた。次に、抗 Pup 抗体を用いたウエスタンブロットを行って Pup 化されたタンパク質の検出を試みた。その結果、Pup 化タンパク質は固体培養ではほとんど検出されなかったのに対して、液体培養の対数増殖期後期と定常期では複数個検出された。さらに、*prcBA* 破壊株において一部の Pup 化タンパク質の量が増加することを示した。これらのタンパク質の一部を解析したところ、AlcB (putative acetyltransferase) が同定され、K153 の Pup 化が確認できた。

以上、本論文は放線菌の翻訳後修飾に関する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。