

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金 昭吟

希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis* は、多数の胞子を内包した孢子嚢を、短い孢子嚢柄を介して基底菌糸上に形成する。湿潤した環境におかれると孢子嚢外皮が破れ、べん毛をもった運動性胞子が泳ぎ出す。運動性胞子は生育に適した場所まで移動した後、出芽して菌糸状の生育を始めるが、この際、運動性胞子が示す走化性が重要な役割を果たしている。本論文は、*A. missouriensis* の走化性に関わるタンパク質のうち、化学物質を感知するセンサータンパク質 (methyl-accepting chemotaxis protein (MCP)、chemoreceptorとも呼ばれる) の機能解析を行った結果についてまとめたものであり、序論、5章からなる本論および総括により構成される。

序論においては、本研究の背景として、*A. missouriensis* に関するこれまでの研究、バクテリアの走化性及び運動性、走化性関連タンパク質の機能と細胞内局在などについて述べられている。

本論第1章では、*A. missouriensis* のゲノムにコードされる21種のMCPのアミノ酸配列に関して、種々の *in silico* 解析を行った結果について述べられている。

本論第2章では、MCP 遺伝子の転写解析について述べられている。21個のMCP 遺伝子のうち17個 (*mcp4*, *mcp5*, *mcp6*, *mcp13* 以外) が運動中の胞子で転写されていることが示された。また、孢子嚢形成固体培地で培養し孢子嚢を形成している菌体では、*mcp10* の以外のすべてのMCP 遺伝子の転写が確認され、多くのMCP は孢子形成の時点ですでに生産されているものと考えられた。以上の結果より、21種全てのMCP は運動性胞子で実際に生産されていることが強く示唆された。一方、液体培養した菌糸においても、*mcp8* と *mcp15* だけは転写が見られ、これら2つのMCP は運動性胞子の走化性とは異なった機能をもつ可能性が示唆された。

本論第3章では、MCP タンパク質の胞子細胞内における局在解析について述べられている。C末端にGFPが融合したタンパク質となるように設計した *mcp-gfp* 融合遺伝子を、染色体組み込み型ベクターを用いて、自身のプロモーターを使って転写が起こる形で染色体に1コ

ピー挿入した株を作製したところ、9つの *mcp-gfp* 組換え株 (MCP1, MCP2, MCP3, MCP5, MCP9, MCP12, MCP16, MCP17, MCP18 の GFP 融合タンパク質を生産する株) の運動性胞子において、GFP 由来の蛍光シグナルが観察された。MCP-GFP の局在パターンは、いずれの株でも同様であり、2個から6個の蛍光スポットが胞子細胞膜上に観察された。さらに、MCP18-RFP 融合タンパク質をコードする遺伝子との共発現により、MCP18 と6つの MCP (MCP1, MCP2, MCP3, MCP5, MCP9, MCP17) の共局在が示された。以上の結果より、*A. missouriensis* 運動性胞子細胞内では、一般の細菌と同様、複数の MCP がクラスターを形成することで、走化性シグナルの増幅がなされている可能性が示された。また、走化性に関わる *che* 遺伝子群の破壊株においては、MCP のクラスター形成が正常に起こらず、MCP のクラスター形成に Che タンパク質が関与することが示唆された。

本論第4章では、MCP タンパク質の局在パターンの詳細な解析について述べられている。94個の胞子について、MCP18-GFP の局在部位を3次元で解析した結果、2-6個の蛍光スポットが胞子の細胞膜上のランダムな位置に局在していることがわかった。また、1つの胞子細胞には、サイズの大きい蛍光スポットはほとんどの場合、1つか2つであり、これに加えて小さな蛍光スポットが0-4個含まれていることが明らかになった。以上の解析結果より、MCP のクラスター形成には、その部位や数を厳密に制御する機構は存在しないと推測された。

本論第5章では、MCP 遺伝子破壊株の作製について述べられている。15種の MCP 遺伝子の単独破壊株に加えて、二重破壊株を5種類、3重破壊株を4種類、4重破壊株を4種類取得した。本研究で作製した MCP 遺伝子破壊株ライブラリーは、今後の MCP の機能解析に重要である。

総括においては、本研究の総括と今後の展望が述べられている。

以上、本論文は、さまざまな角度から *A. missouriensis* の MCP の機能解析を行ったものであり、学術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。